

**Agregação de valor ao lixiviado de compostagem do bagaço de uva pelo uso como meio de cultura e componente de biofertilizante**

*Value addition to composted grape pomace leachate through its use as a culture medium and a component of biofertilizer*

*Adición de valor al lixiviado de bagazo de uva compostado mediante su uso como medio de cultivo y componente de biofertilizante*

**Alessandra Russi**

Doutoranda em Biotecnologia, UCS, Brasil

alessandrarussi@yahoo.com.br

**RESUMO**

As atividades da cadeia vitivinícola geram um grande volume de bagaço de uva e outros subprodutos que podem ocasionar significativos impactos ambientais. Nesse contexto, a compostagem é uma importante estratégia para decomposição e agregação de valor a resíduos orgânicos. Todavia, durante a compostagem ocorre a liberação de um lixiviado que pode causar poluição do solo e água. Assim, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar o uso do lixiviado de compostagem de bagaço de uva como componente de um meio de cultura para cultivo da bactéria promotora de crescimento vegetal *Bacillus subtilis* F62, bem como avaliar seu potencial como fertilizante em associação com essa bactéria no desenvolvimento de morangueiros. Inicialmente, foram avaliadas características físico-químicas do lixiviado e o efeito de diferentes diluições desse efluente sobre o crescimento bacteriano. Posteriormente, testou-se a aplicação do lixiviado sozinho e combinado com a bactéria em morangueiros micropropagados. Os resultados indicaram que apesar do lixiviado conter baixa concentração de carbono e nitrogênio, ele possibilitou o crescimento bacteriano de forma similar ao meio LB nas diluições de 10% e 25%. Além disso, tanto a aplicação do lixiviado sozinho quanto associado à bactéria proporcionaram a obtenção de morangueiros vigorosos, com destaque para a aplicação do biofertilizante contendo *B. subtilis* F62. Em síntese, o lixiviado proveniente da compostagem do bagaço de uva se destaca como um resíduo de alto valor agregado que apresenta significativa eficácia como meio para crescimento bacteriano e notável potencial como biofertilizante na cultura do morangueiro.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bagaço de uva. Fertilizante orgânico. Promoção de crescimento.

**ABSTRACT**

*The activities of the wine production chain generate a large volume of grape pomace and other by-products that can cause significant environmental impacts. In this context, composting is an important strategy for the decomposition and value addition to organic waste. However, during composting, leachate is released, which can cause soil and water pollution. Therefore, the present study aimed to evaluate the use of leachate from grape pomace composting as a component of a culture medium for cultivating the plant growth-promoting bacterium *Bacillus subtilis* F62, as well as to assess its potential as a fertilizer in combination with this bacterium for the growth of strawberry plants. Initially, the physicochemical characteristics of the leachate were evaluated, and the effect of different dilutions of this effluent on bacterial growth was assessed. Subsequently, the application of the leachate alone and in combination with the bacterium on micropropagated strawberry plants was tested. The results indicated that despite the leachate having a low concentration of carbon and nitrogen, it enabled bacterial growth similar to LB medium at dilutions of 10% and 25%. Moreover, both the application of the leachate alone and in combination with the bacterium resulted in vigorous strawberry plants, with particular emphasis on the biofertilizer containing *B. subtilis* F62. In summary, the leachate resulting from the composting of grape pomace stands out as a high-value-added residue that demonstrates significant efficacy as a medium for bacterial growth, and remarkable potential as a biofertilizer in strawberry cultivation.*

**KEYWORDS:** Grape pomace. Organic fertilizer. Growth promotion.

**RESUMEN**

*Las actividades de la cadena de producción de vino generan un gran volumen de bagazo de uva y otros subproductos que pueden ocasionar impactos ambientales significativos. En este contexto, el compostaje es una estrategia importante para la descomposición y valorización de residuos orgánicos. Sin embargo, durante el compostaje se libera lixiviado que puede causar contaminación del suelo y el agua. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el uso del lixiviado de la compostaje de bagazo de uva como componente de un medio de cultivo para el cultivo de la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Bacillus subtilis* F62, así como evaluar su potencial como fertilizante en asociación con esta bacteria en el desarrollo de plantas de fresa. Inicialmente, se evaluaron las características físico-químicas del lixiviado y el efecto de diferentes diluciones de este efluente en el crecimiento bacteriano. Posteriormente, se probó la aplicación del lixiviado solo y en combinación con la bacteria en plantas de fresa micropropagadas. Los resultados indicaron que a pesar de que el lixiviado contiene una baja concentración de carbono y nitrógeno, permitió el crecimiento bacteriano de manera similar al medio LB en las diluciones del 10% y 25%. Además, tanto la aplicación del lixiviado solo como en combinación con la bacteria permitieron obtener plantas de fresa vigorosas, destacando la aplicación del biofertilizante que contenía *B. subtilis* F62. En resumen, el lixiviado resultante del compostaje del bagazo*

*de uva destaca como un residuo de alto valor agregado que muestra una efectividad significativa como medio para el crecimiento bacteriano, y un notable potencial como biofertilizante en el cultivo de fresas.*

**PALABRAS CLAVE:** *Bagazo de uva. Fertilizante orgánico. Promoción del crecimiento.*

## 1 INTRODUÇÃO

Diferentes processos florestais, agrícolas e agroindustriais são responsáveis pela geração de grandes quantidades de resíduos e subprodutos (FERJANI et al., 2019). Nesse contexto, a indústria vitivinícola também produz um volume significativo de resíduos ao longo da cadeia de processamento da uva, de modo que mais de 20% de seu peso total é desperdiçado na forma de bagaço, engaço entre outros subprodutos (MUHLACK et al., 2018; ŠUNJKA; MECHORA, 2022). Embora tal resíduo seja rico em diversos nutrientes, ele não pode ser diretamente empregado como fertilizante em decorrência de suas propriedades físico-químicas, tais como elevada acidez e condutividade elétrica (ALCARAZ et al., 2018).

Tradicionalmente, esses resíduos são considerados passivos cuja disposição incorreta ocasiona sérios impactos ambientais, incluindo a perda de biodiversidade, a poluição do solo e de corpos d'água, além da emissão de gases associados ao efeito estufa (FERJANI et al., 2019; SANTIAGO BADILLO et al., 2021; AHMAD et al., 2020). No entanto, quando submetidos a tratamentos adequados, eles apresentam um potencial ainda pouco explorado como fonte de compostos bioativos e na produção de biopesticidas, fertilizantes, biochar e energia (ROY et al., 2018; SEBASTIÁN-NICOLÁS et al., 2020; AJENG et al., 2020; DA SILVA et al., 2022; ŠUNJKA; MECHORA, 2022).

Uma das estratégias empregadas para redução do volume e peso desses resíduos é a compostagem (GUTIÉRREZ-MICELI et al., 2017). Esse processo consiste na decomposição de resíduos orgânicos pela ação de micro-organismos mesofílicos e termofílicos, na presença de oxigênio, resultando em um composto estável que pode ser empregado como fertilizante agrícola (SAYARA et al., 2020). Contudo, durante a compostagem ocorre a liberação de um lixiviado conhecido como chorume, o qual apresenta elevada demanda bioquímica de oxigênio e pode conter compostos tóxicos, dependendo da biomassa compostada. Em virtude dessas características, o chorume requer tratamento especial antes de sua disposição final (HE et al., 2015; MOKHTARANI et al., 2015; ROY et al., 2018). Esses tratamentos possuem alto custo e incluem processos oxidativos, físico-químicos e biológicos. Contudo, esses custos podem ser minimizados através da conversão do lixiviado em produtos com alto valor agregado (ROY et al., 2018).

Dentre os possíveis usos do lixiviado de compostagem, destaca-se a produção de fertilizantes orgânicos, ou ainda, o uso como fonte de nutrientes para o crescimento bacteriano (GUNJAL et al., 2018; MORA et al., 2022). Os meios de cultura convencionais empregados no cultivo microbiano geralmente empregam componentes caros, demandam energia para produção e geram resíduos durante o processo produtivo (YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012; ELISASHVILI et al., 2019; ŠUNJKA; MECHORA, 2022). Em contraste, a utilização do lixiviado como meio de cultura e na produção de bioformulações oferece uma alternativa sustentável visto que não apenas minimiza os impactos ambientais associados ao descarte de resíduos, mas também contribui para a adoção de práticas mais sustentáveis e agregação de valor a esses subprodutos (YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012; BALASUBRAMANIAN; TYAGI, 2017).

*Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva e formadora de esporos (RABBEE et al., 2019) que tem sido extensivamente estudada por seu papel na promoção do crescimento das plantas, na indução de mecanismos de resistência em plantas e no controle biológico de doenças (MENEZES; GARCIA-FRAILE, 2017; MORALES-CEDEÑO et al., 2021). A promoção de crescimento é atribuída a sua capacidade de estabelecer interações positivas com as plantas através da produção de metabólitos secundários e reguladores de crescimento que estimulam o crescimento das plantas, melhoram a absorção de nutrientes e fornecem proteção contra vários patógenos e estresses ambientais (SHARMA et al., 2019; LEGEIN et al., 2020; MORALES-CEDEÑO et al., 2021). Além disso, *B. subtilis* possui uma notável habilidade de colonizar tecidos vegetais mediante a formação de biofilmes, o que contribui ainda mais para sua persistência e eficácia como agente de promoção de crescimento (DIMKIC et al., 2022).

Este trabalho teve como objetivo agregar valor ao lixiviado de compostagem mediante seu emprego como meio de cultura para o crescimento da bactéria promotora de crescimento vegetal *B. subtilis* F62, bem como verificar seu uso como fertilizante visando melhorar o desenvolvimento de morangueiros em condições de estufa.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Rizobactéria promotora do crescimento de plantas**

A bactéria *Bacillus subtilis* F62 foi obtida da coleção do Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas, da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. A identificação molecular desse micro-organismo foi realizada através do sequenciamento do gene *16S rDNA* resultando em correspondência completa com uma sequência pré-existente no banco de dados GenBank para *B. subtilis*, sob o número de acesso NR 102783.2.

### **2.2 Lixiviado de compostagem**

O lixiviado da compostagem estabilizado e isento de substâncias tóxicas ou acima dos limites legais (Material suplementar), foi gentilmente cedido pela empresa Beifiur Ltda., localizada em Garibaldi, Rio Grande do Sul, Brasil. Esse efluente líquido é proveniente do sistema de compostagem de bagaço de uva, conduzido em uma estrutura coberta, sob sistema similar ao Windrow, ao longo de um período de três anos e com recirculação do lixiviado.

Após coleta de lagoa de estabilização, o lixiviado foi disposto em frascos de 250 mL e autoclavado a 121 °C, 1,5 bar por 1 hora, a fim de inativar os micro-organismos presentes. Em seguida, realizou-se análise físico-química de amostras do lixiviado e do meio líquido Luria-Bertani (LB), marca Lennox®. Esse meio de cultura rico em nutrientes é comumente empregado no cultivo de bactérias em laboratório. O meio comercial LB foi dissolvido em água deionizada e preparado conforme instruções do fabricante. As concentrações de C e N foram determinadas através de um detector de condutividade térmica /infravermelho e convertidos em teores percentuais dos respectivos elementos. Além disso, foi avaliada a relação C/N, pH e condutividade elétrica (mS cm<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas em triplicata.

### 2.3 Crescimento bacteriano em meio contendo lixiviado

O pré-inóculo foi preparado a partir da adição de uma colônia bacteriana em um frasco contendo 10 mL de meio líquido LB (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio), com pH ajustado em 7,0. Em seguida, o pré-inóculo foi colocado em um agitador orbital a 130 rpm e 28 °C. Após um período de 24 horas, essa cultura foi transferida para um novo frasco contendo 90 mL de meio líquido. Esse meio foi elaborado com lixiviado de compostagem em diferentes diluições (10%, 25%, 50%, 75% e 100%). Essas distintas concentrações foram obtidas mediante a diluição do lixiviado em água deionizada, com subsequente correção de pH para 7,0. O controle consistiu no cultivo em meio líquido LB.

Subsequentemente, as culturas bacterianas foram incubadas em um agitador orbital nas mesmas condições previamente mencionadas por 24 horas. A contagem bacteriana foi realizada mediante diluições seriadas em placas contendo meio LB, suplementado com 1,5 % de ágar. Após incubação a 37 °C por 24 horas, o número de unidades formadoras de colônia por mililitro foi determinado e expresso como UFC mL<sup>-1</sup>. O ensaio foi realizado em triplicata, empregando o delineamento inteiramente casualizado.

### 2.4 Material vegetal

Estolões de morangueiro cv. Albion (*Fragaria × ananassa*) foram coletados de plantas com dois anos de idade. Eles foram individualizados em segmentos nodais contendo uma gema cada um. Esses explantes foram submetidos à desinfestação superficial em cabine de fluxo laminar. Inicialmente, os segmentos nodais foram tratados com uma solução de etanol 70% (v/v) por 1 minuto, e após imersos em uma solução de NaOCl 1% (v/v) com 2 gotas de Tween 20 por 20 minutos. Posteriormente, os explantes foram lavados três vezes com água deionizada estéril e inoculados em frascos contendo meio MS (Murashige e Skoog), acrescido de 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,8.

As plântulas foram transferidas para meio de cultura fresco em intervalos de 30 dias, durante 90 dias. Posteriormente, realizou-se o enraizamento em meio MS suplementado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico (AIB). A incubação foi realizada em sala de crescimento a temperatura de 25 ± 2 °C. As plântulas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas de luz, provido por lâmpadas de LED de 20 W, com intensidade de 72 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Explantes com quatro folhas e um sistema radicular bem desenvolvido foram removidos dos frascos de cultivo e transferidos para copos plásticos contendo 200 mL de substrato autoclavado. Para o ensaio, empregou-se um substrato comercial contendo mistura de turfa e vermiculita na proporção de 9:1. A aclimação foi realizada a uma temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de 350 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 2.5 Ensaio de promoção de crescimento

O papel da bactéria promotora de crescimento *B. subtilis* F62 foi avaliado em um experimento com mudas de morangos obtidas através de micropropagação e aclimatadas

durante 30 dias. Após esse período, os morangueiros foram transferidos para vasos de 1 L contendo o mesmo substrato descrito na Seção 2.4. Nesse momento, determinou-se o número de folhas e o comprimento da parte aérea de cada planta, a fim de avaliar a variação dessas respostas ao longo do ensaio. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado, com três replicatas de 20 plantas por tratamento. O ensaio foi repetido duas vezes.

As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle (aplicação de água estéril), lixiviado (aplicado nas concentrações de 10% e de 25%), bactéria em lixiviado (cultura bacteriana em lixiviado 10%, contendo  $6,3 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de *B. subtilis* F62). Os morangueiros permaneceram em estufa a uma temperatura de  $23 \pm 2$  °C durante 60 dias. A irrigação foi realizada diariamente em aproximadamente 50% da capacidade máxima de retenção de água. Decorridos 60 dias do início do ensaio, as plantas foram removidas do substrato e lavadas. Em seguida, determinou-se a variação no número de folhas, variação no comprimento da parte aérea, comprimento das raízes, peso seco da parte aérea e peso seco das raízes. O peso seco foi avaliado após secagem do material vegetal até peso constante em uma estufa a 60 °C.

## 2.6 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias através do teste de Levene. Subsequentemente, dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Dunn-Bonferroni. O nível de significância das diferenças foi definido como  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas empregando o software estatístico SPSS v.22.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Lixiviado de compostagem

O resultado da análise físico-química do lixiviado e do meio LB Lennox® pode ser visualizado na Tabela 1. Verificou-se que o meio LB apresentou maior quantidade de nutrientes em relação ao lixiviado de compostagem, no entanto a relação C/N foi semelhante nos dois produtos.

Tabela 1 – Características físico-químicas do meio de cultura Luria-Bertani (LB) e do lixiviado de compostagem.

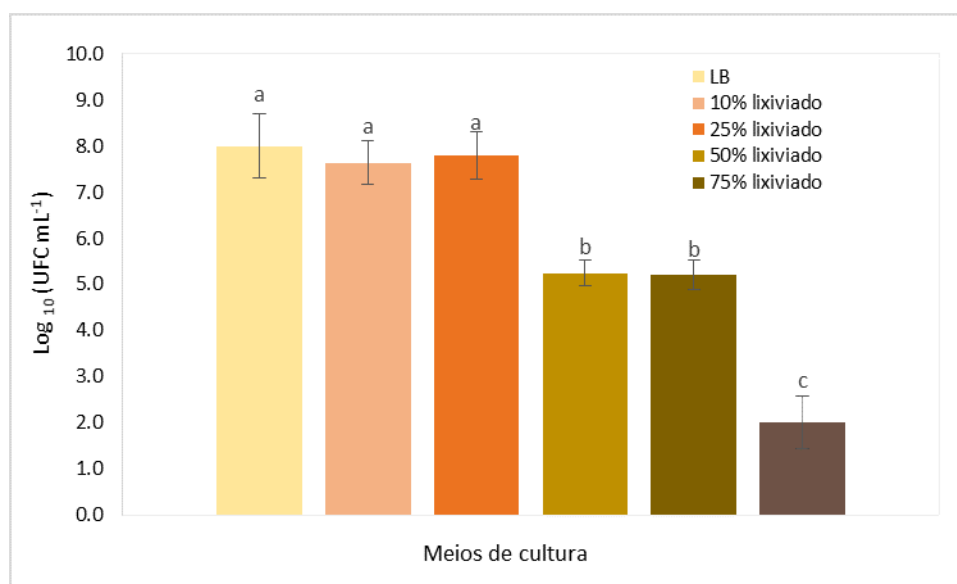
Nutrientes	Meio LB*	Lixiviado
C (%)	0,622	0,340
N (%)	0,305	0,165
C/N	2,04	2,06
pH	7,00	9,34
Condutividade (mS cm <sup>-1</sup> )	3,16	3,02

\*Meio LB marca Lennox®.

### 3.2 Crescimento bacteriano em meio contendo lixiviado

Após a determinação de algumas características físico-químicas do lixiviado de compostagem, foi avaliado o efeito de diferentes diluições desse efluente sobre o crescimento de *B. subtilis* F62. Assim, verificou-se que os meios contendo o lixiviado nos percentuais de 10% e 25% promoveram um crescimento bacteriano similar ao controle (meio LB), o qual variou de 7,5  $\log_{10}$  a 8,0  $\log_{10}$ . Por outro lado, percentuais superiores a 50% tiveram um efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano comparado ao controle (Figura 1).

Figura 1 – Concentração de *Bacillus subtilis* F62 após crescimento em meio de cultura com diferentes concentrações de lixiviado em comparação ao meio comercial LB. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa de acordo com análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



### 3.3 Ensaio de promoção de crescimento

A ação do lixiviado de compostagem nas concentrações de 10% e 25% e da bactéria *B. subtilis* F62 cultivada e armazenada neste efluente foi avaliada no desenvolvimento de morangueiros (Tabela 2). Assim, verificou-se que a aplicação do lixiviado nas concentrações de 10% e 25% aumentou o peso seco da parte aérea e de raízes em relação ao controle. Contudo, o lixiviado diluído em 10% viabilizou a ocorrência de um maior número de folhas em morangueiros quando comparado ao controle. Em relação ao comprimento da parte aérea das plantas, não houve diferença entre os tratamentos testados (Tabela 2).

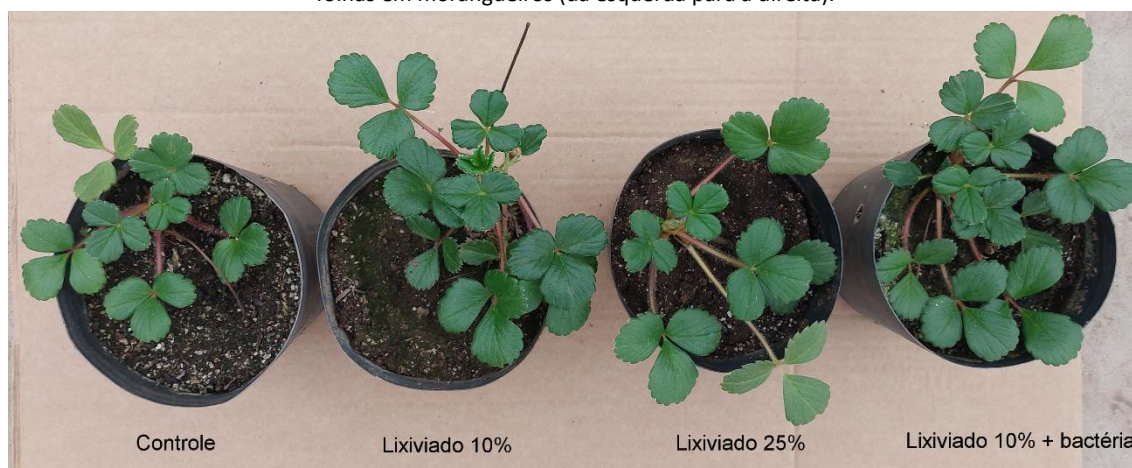
Por outro lado, o uso do lixiviado de compostagem a 10% contendo a bactéria promotora de crescimento proporcionou um aumento estatisticamente significativo no número de folhas, no comprimento de raízes, no peso seco da parte aérea e no peso seco de raízes em relação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Respostas de crescimento em morangueiros tratados com lixiviado de compostagem (10% e 25%) e lixiviado 10% + bactéria (*Bacillus subtilis* F62). Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa de acordo com teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn-Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Tratamentos	$\Delta$ Número de folhas	$\Delta$ Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento raízes (cm)	Peso seco parte aérea (g)	Peso seco raízes (g)
Controle	2,0 $\pm$ 0,4 c	4,6 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 0,8 b	0,82 $\pm$ 0,7 c	0,75 $\pm$ 0,7 b
Lixiviado 10%	3,2 $\pm$ 0,6 b	5,2 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,9 ab	0,98 $\pm$ 0,5 b	0,94 $\pm$ 1,1 a
Lixiviado 25%	2,8 $\pm$ 0,7 bc	5,4 $\pm$ 0,9	4,1 $\pm$ 0,3 ab	0,95 $\pm$ 0,4 b	0,99 $\pm$ 0,6 a
Lixiviado 10% + bactéria	5,0 $\pm$ 0,5 a	4,9 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 0,5 a	1,23 $\pm$ 1,1 a	1,03 $\pm$ 0,9 a

A seguir, na Figura 2, pode ser visualizado o efeito dos diferentes tratamentos no vigor e no número de folhas em morangueiros, evidenciando a ação sinérgica entre o lixiviado na concentração de 10% em combinação com a bactéria *B. subtilis* F62.

Figura 2 – Efeito do lixiviado (10% e 25%) e do lixiviado 10% + bactéria (*B. subtilis* F62) no vigor e no número de folhas em morangueiros (da esquerda para a direita).



#### 4 DISCUSSÃO

A compostagem é uma importante ferramenta para o manejo de resíduos sólidos orgânicos, possibilitando a obtenção de biofertilizantes e diminuindo a demanda nacional por fertilizantes importados. Assim, tanto o composto quanto o lixiviado oriundos da compostagem podem ser empregados na agricultura, contanto que não apresentem metais pesados ou xenobióticos acima dos limites previstos em legislação (SAYARA et al., 2020; ROY et al., 2018). Dessa forma, inicialmente, avaliou-se o uso do lixiviado, proveniente da compostagem do bagaço de uva, como componente de um meio de cultura para crescimento da bactéria promotora de crescimento vegetal *B. subtilis* F62.

Tradicionalmente, os meios de cultura empregados no cultivo de bactérias são considerados complexos, uma vez que não apresentam uma composição química bem definida (TEIXIDÓ et al., 2022). Assim, por exemplo, o meio LB é constituído por fontes de nitrogênio/proteínas e carbono/carboidratos como triptona e extrato de levedura. Contudo, esses meios apresentam como desvantagens o elevado custo, a falta de padronização e a baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos (ELISASHVILI et al., 2019; TEIXIDÓ et al., 2022). Assim, o desenvolvimento de meios empregando resíduos industriais ou substratos lignocelulósicos representa uma alternativa para o cultivo de micro-organismos (ELISASHVILI et al., 2019). Embora esses últimos meios também sejam considerados complexos, eles se caracterizam pelo baixo custo de produção e por contribuírem para o reaproveitamento de resíduos.



Neste estudo, o uso do lixiviado da compostagem de bagaço uva possibilitou um crescimento de *B. subtilis* F62 similar ao obtido em meio LB, embora a composição físico-química do lixiviado fosse diferente do meio padrão para o cultivo bacteriano. Em relação à presença de macronutrientes, verificou-se uma menor concentração de carbono e nitrogênio no lixiviado. Além disso, o pH necessitou de correção a fim de viabilizar o desenvolvimento bacteriano. De acordo com Chen et al. (2019), a baixa concentração de nutrientes no lixiviado é decorrente do processo de compostagem e da mineralização de compostos orgânicos promovida por micro-organismos. Ademais, a composição química do lixiviado também depende das características da biomassa compostada, da tecnologia de compostagem e das condições climáticas ao longo desse processo (ROY et al., 2018). Assim, ao término da compostagem tende a ocorrer o acúmulo de compostos recalcitrantes à decomposição microbiana, como ácidos húmicos e fúlvicos, que podem dificultar o crescimento bacteriano em seu uso posterior (MULLANE et al., 2015).

Dessa forma, o uso do lixiviado sem diluição como meio de cultura levou uma baixa taxa de proliferação bacteriana, provavelmente em decorrência da presença de substâncias inibitórias. Contudo, a diluição do lixiviado em água deionizada viabilizou a multiplicação bacteriana, minimizando o efeito nocivo desses compostos. Similarmente, Santiago Badillo et al. (2021) verificaram um menor crescimento de bactérias da espécie *Bacillus subtilis* em meio contendo lixiviado não diluído. Nesse sentido, Sanadi et al. (2019) destacam a importância da diluição de efluentes de compostagem para reduzir a concentração e a fitotoxicidade de metais pesados, amônia e compostos orgânicos de baixo peso molecular.

Todavia, a diluição do lixiviado também reduz significativamente a concentração de macronutrientes essenciais ao desenvolvimento bacteriano, como carboidratos e proteínas. Essa diluição pode ter impactado na taxa de crescimento de *B. subtilis* F62, impedindo que a população bacteriana atingisse concentrações superiores às verificadas no meio padrão LB. Assim, poderia-se associar ao lixiviado outros resíduos industriais que contivessem altas concentrações de nutrientes como forma de minimizar o impacto da diluição. Nesse sentido, Santiago Badillo et al. (2021) avaliaram a adição de co-substratos como permeado de soro e leveduras da fermentação de cerveja ao lixiviado de compostagem. Em consequência dessa suplementação, foi verificada uma maior taxa de multiplicação e esporulação das bactérias *Bacillus megaterium* e *B. subtilis*.

O uso da autoclavagem no início do ensaio possibilitou eliminar a comunidade microbiana naturalmente presente no lixiviado. Isso, possibilitou a inativação de qualquer micro-organismo indesejado ou com potencial patogênico, favorecendo a multiplicação de *B. subtilis* F62. De acordo com Mora et al. (2022), as populações microbianas em lixiviados tendem a ser bastante heterogêneas, sendo constituídas tanto por micro-organismos benéficos quanto potencialmente prejudiciais. Assim, é de fundamental importância conhecer as comunidades microbiológicas presentes nos lixiviados ou controlá-las a fim de minimizar efeitos adversos às culturas vegetais e à saúde humana (BORTHONG et al., 2018).

Em relação à promoção do crescimento e do desenvolvimento vegetal, verificou-se que a aplicação do lixiviado apresentou um efeito positivo sobre os morangueiros. De forma similar, Čabilovski et al. (2023) reportaram que aplicação de lixiviado de vermicompostagem durante o período de três anos em morangueiros mantidos a campo promoveu um aumento na concentração de sólidos solúveis totais, antocianinas totais e atividade antioxidante, e uma redução na acidez total em morangos. Singh et al. (2010) também verificaram que a aplicação

foliar de lixiviado de vermicompostagem apresentou efeito benéfico sobre plantas de morangueiro, com um aumento na área foliar, na matéria seca da planta e na produtividade de morangos. Além disso, o uso de lixiviado oriundo da compostagem de esterco bovino com resíduos vegetais, na proporção de 1:2, proporcionou menor ocorrência de albinismo e de frutos malformados, bem como reduziu a incidência da podridão cinzenta em morangos.

O uso do lixiviado como carreador para a bactéria *B. subtilis* F62 possibilitou um incremento significativo no desenvolvimento dos morangueiros, destacando a importância desse micro-organismo no desenvolvimento de biofertilizantes. Similarmente, Gunjal et al. (2018) estudaram o uso do lixiviado da fermentação do bagaço de cana como fertilizante e substrato para a bactéria promotora do crescimento vegetal *Bacillus circulans*. Os autores verificaram que plantas de milho tratadas com essa formulação apresentaram um aumento no crescimento radicular. De forma semelhante, Mora et al. (2022) avaliaram a aplicação do produto comercial Orgaon®, um lixiviado da compostagem de resíduos agrícolas, diluído na proporção 1/512 em associação com as bactérias *Pseudomonas agronomica* e *Bacillus pretiosus*. O estudo indicou que o uso do produto promoveu um aumento na taxa de germinação, na viabilidade das sementes e na massa seca de alfafa (*Medicago sativa*).

## 5 CONCLUSÃO

O lixiviado proveniente da compostagem de resíduos de uva aplicado na forma diluída notavelmente possibilitou o crescimento da bactéria *B. subtilis* F62 de forma similar ao meio de cultura LB e estimulou o crescimento de morangueiros. Além disso, a aplicação do lixiviado combinado com *B. subtilis* F62, proporcionou um maior crescimento e vigor das plantas em comparação à aplicação do lixiviado sem a bactéria. Conseqüentemente, a associação entre o lixiviado e *B. subtilis* F62 pode contribuir para o aproveitamento e agregação de valor a resíduos, bem como para o desenvolvimento formulações biológicas destinadas a uma produção agrícola mais sustentável.

## 6 REFERÊNCIAS

AHMAD, B.; YADAV, V.; YADAV, A.; RAHMAN, M. U.; YUAN, W. Z.; LI, Z.; WANG, X. Integrated biorefinery approach to valorize winery waste: A review from waste to energy perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 719, p. 137315, 2020.

AJENG, A. A.; ABDULLAH, R.; LING, T. C.; ISMAIL, S.; LAU, B. F.; ONG, H. C.; CHEW, K. W.; SHOW, P. L.; CHANG, J. S. Bioformulation of biochar as a potential inoculant carrier for sustainable agriculture. **Environmental Technology and Innovation**, v. 20, p. 101168-101168, 2020.

ALCARAZ, L.; LOPEZ FERNANDEZ, A.; GARCIA-DIAZ, I.; LOPEZ, F. A. Preparation and characterization of activated carbons from winemaking wastes and their adsorption of methylene blue. **Adsorption Science and Technology**, v. 36, p. 1331-1351, 2018.

BALASUBRAMANIAN, S.; TYAGI, R. D. Biopesticide production from solidwastes. In. TYAGI, A. P.; JONATHAN, W. C.; WONG, R. D. (orgs.). **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2017, pp. 43-58.

BORTHONG, J.; OMORI, R.; SUGIMOTO, C.; SUTHIENKUL, O.; NAKAO, R.; ITO, K. Comparison of database search methods for the detection of *Legionella pneumophila* in water samples using metagenomic analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1272, 2018.

ČABILOVSKI, R.; MANOJLOVIĆ, M. S.; POPOVIĆ, B. M.; RADOJČIN, M. T.; MAGAZIN, N.; PETKOVIĆ, K.; KOVAČEVIĆ, D.; LAKIČEVIĆ, M. D. Vermicompost and vermicompost leachate application in strawberry production: impact on yield and fruit quality. **Horticulturae**, v. 9, p. 337, 2023.

DA SILVA, C. M. S.; DA BOIT MARTINELLO, K.; LÜTKE, S. F.; GODINHO, M.; PERONDI, D.; SILVA, L. F. O.; DOTTO, G. L. Pyrolysis of grape bagasse to produce char for Cu (II) adsorption: a circular economy perspective. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2022.

CHEN, M.; HUANG, Y.; LIU, H.; XIE, S.; ABBAS, F. Impact of different nitrogen source on the compost quality and greenhouse gas emissions during composting of garden waste. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 124, p. 326–335, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.03.006>.

DIMKIC, I.; JANAKIEV, T.; PETROVIC, M.; DEGRASSI, G.; FIRA, D. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 117, p. 101754, 2022.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; CHIKINDAS, M. L. Recent advances in the physiology of spore formation for *Bacillus* probiotic production. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 731-747, 2019.

FERJANI A. I.; JEGUIRIM, M.; JELLALI, S.; LIMOUSY L.; COURSON, C.; AKROUT, H.; THEVENIN, N.; RUIDAVETS, L.; MULLER, A.; BENNICI, S. The use of exhausted grape marc to produce biofuels and biofertilizers: Effect of pyrolysis temperatures on biochars properties. **Renewable and Sustainable Energy Review**, v. 107, p. 425–433, 2019.

GUNJAL, A. B.; KAPADNIS, B. P.; PAWAR, N. J. Pressmud, a lignocellulosic waste as potential carrier for in-situ production of plant growth promoting substances by *Bacillus circulans*. **The Journal of Solid Waste Technology and Management**, v. 44, n. 3, p. 281-287, 2018.

GUTIÉRREZ-MICELI, F. A.; GARCÍA-GÓMEZ, R. C.; OLIVA-LLAVEN, M. A.; MONTES-MOLINA, J. A.; DENDOOVEN, L. Vermicomposting leachate as liquid fertilizer for the cultivation of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 40-49, 2017.

HE, X-S.; XI, B-D.; ZHANG, Z-Y.; GAO, R-T.; TAN, W-B.; CUI, D-Y.; YUAN, Y. Composition, removal, redox, and metal complexation properties of dissolved organic nitrogen in composting leachates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 227–233, 2015.

LEGEIN, M.; SMETS, W.; VANDENHEUVEL, D.; EILERS, T.; MUYSHONDT, B.; PRINSEN, E.; SAMSON, R.; LEBEER, S. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1619, 2020.

MENENDEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P. Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world. **AIMS Microbiology**, v. 3, p. 502-524, 2017.

MOKHTARANI, N.; YASROBI, S. Y.; GANJIDOUST, H. Optimization of ozonation process for a composting leachate-contaminated soils treatment using response surface method. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 3, p. 279–286, 2015.

MORA, M. R.; PASTRANA, V. M. F.; LOBO, A. P.; JIMÉNEZ GÓMEZ, P. A. J. Valorization as a biofertilizer of an agricultural residue leachate: Metagenomic characterization and growth promotion test by PGPB in the forage plant *Medicago sativa* (alfalfa). **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1048154, 2022.

MORALES-CEDEÑO, L. R.; OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; LOEZA-LARA, P. D.; PARRA-COTA, F. I.; SANTOS-VILLOBOS, S.; SANTOYO, G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre and postharvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126612, 2021.

MUHLACK, R. A.; POTUMARTHI, R.; JEFFERY, D. W. Sustainable wineries through waste valorisation: a review of grape marc utilisation for value-added products. **Waste Management**, v. 72, p. 99–118, 2018.

MULLANE, J. M.; FLURY, M.; IQBAL, H.; FREEZE, P. M.; HINMAN, C.; COGGER, C. G.; SHI, Z. Intermittent rainstorms cause pulses of nitrogen, phosphorus, and copper in leachate from compost in bioretention systems. **Science of the Total Environment**, v. 537, p. 294–303, 2015.

RABBEE, M. F.; ALI, S. M.; CHOI, J.; HWANG, B. S.; JEONG, S. C.; BAEK, K. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. **Molecules**, v. 24, e1046, 2019.

ROY, D.; AZAÏS, A.; BENKARAACHE, S.; DROGUI, P.; TYAG, R. D. Composting leachate: characterization, treatment, and future perspectives. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 17, p. 323–349, 2018.

SANADI, N. F. A.; FAN, Y. V.; LEE, C. T.; IBRAHIM, N.; LI, C.; GAO, Y.; ONG, P. Y.; KLEMES, J. J. Nutrient in leachate of biowaste compost and its availability for plants. **Chemical Engineering Transactions**, v. 76, p. 1369-1374, 2019.

SANTIAGO BADILLO, T. P.; PHAM, T. T. H.; NADEAU, M.; ALLARD-MASSICOTTE, R.; JACOB-VAILLANCOURT, C.; HEITZ, M.; RAMIREZ, A. A. Production of plant growth-promoting bacteria inoculants from composting leachate to develop durable agricultural ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 29037–29045, 2021.

SAYARA, T.; BASHEER-SALIMIA, R.; HAWAMDE, F.; SÁNCHEZ, A. Recycling of organic wastes through composting: process performance and compost application in agriculture. **Agronomy**, v. 10, p. 1838, 2020.

SEBASTIÁN-NICOLÁS, J. L.; GONZÁLEZ-OLIVARES, L. G.; VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, G. A.; LUCHO-CONSTANTINO, C.; CASTAÑEDA-OVANDO, A.; CRUZ-GUERRERO, A. E. Valorization of whey using a biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 14, p. 1010-1027, 2020.

SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; KUMAR, V.; KOHLI, S. K.; SIDHU, G. P.; BALI, A. S.; HANDA, N.; KAPOOR, D.; BHARDWAJ, R.; ZHENG, B. Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. **Biomolecules**, v. 9, n. 7, p. 285, 2019.

SINGH, R.; GUPTA, R. K.; PATIL, R. T.; SHARMA, R. R.; ASREY, R.; KUMAR, A.; JANGRA, K. K. Sequential foliar application of vermicompost leachates improves marketable fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 1, p. 34-39, 2010.

ŠUNJKA, D.; MECHORA, Š. An alternative source of biopesticides and improvement in their formulation—Recent advances. **Plants**, v. 11, p. 3172, 2022.

TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; TORRES, R. Insight into a successful development of biocontrol agents: production, formulation, packaging, and shelf life as key aspects. **Horticulturae**, v. 8, p. 305, 2022.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V.; VIÑAS, I.; USALL, J.; TORRES, R.; SOLSONA, C.; TEIXIDÓ, N. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. **Biological Control**, v. 60, p. 280-289, 2012.

## Material Suplementar

<b>Minerais</b>	<b>Lixiviado de compostagem*</b>	<b>Limites legais para fertilizantes orgânicos**</b>
C org (%)	0,302	-
N (%)	0,143	-
P (%)	0,104	-
K (%)	0,568	-
Ca (%)	0,006	-
Mg (%)	0,00	-
S (%)	1,01	-
Si (mg kg <sup>-1</sup> )	20	-
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	20	-
B (mg kg <sup>-1</sup> )	10	-
Cl (mg kg <sup>-1</sup> )	890	-
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	-
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	40	-
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	-
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	-
Se (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	-
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	200
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	70
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	150
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	3
Hg (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	1
As (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00	20

\*Dados obtidos da empresa Beifiur Ltda.

\*\*Instrução Normativa SDA nº 27 de 05/06/2006 (Anexo V).