



Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido

**MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA RIZOBACTÉRIAS
E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Meloidogyne javanica* EM
OLERÍCOLAS**

ELISETE PEDREIRA LOPES

2019

ELISETE PEDREIRA LOPES

**MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA
RIZOBACTÉRIAS E CONTROLE BIOLÓGICO DE
Meloidogyne javanica EM OLERÍCOLAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Doutora”.

Orientadora
Prof.^a Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro

JANAÚBA
2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Lopes, Elisete Pedreira

L864m Meios de cultura alternativos para rizobactérias e controle biológico de *Meloidogyne javanica* em olerícolas [manuscrito] / Elisete Pedreira Lopes. – 2019.
58 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2019.
Orientadora: Prof^a. D. Sc. Regina Cássia Ferreira Ribeiro.

1. Agentes no controle biológico de pragas. 2. Nematóide. 3. Rizobactéria.
I. Ribeiro, Regina Cássia Ferreira. II. Universidade Estadual de Montes Claros.
III. Título.

CDD. 632.65182

Catlogação: Joyce Aparecida Rodrigues de Castro Bibliotecária CRB6/2445

ELISETE PEDREIRA LOPES

**MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA
RIZIOBACTÉRIAS E CONTROLE BIOLÓGICO DE
Meloidogyne javanica EM OLERÍCOLAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Doutora”.

Aprovada em 30 de abril de 2019.

Prof.^a Dra. Regina C. F. Ribeiro
UNIMONTES (Orientadora)

Prof.^a Dra. Adelica A. Xavier
UNIMONTES (Coorientadora)

Prof. Dr. Edson Hiydu Mizobutsi
UNIMONTES

Dr. Leandro de Souza Rocha
EMBRAPA- Mandioca e
Fruticultura

Pesq. Dra. Alnusa Maria de Jesus
EPAMIG NORTE

**JANAÚBA
2019**

Ao meu Deus...

Não tenho palavras para expressar tua bondade... Dia após dia me acudiu e me alentou a força da minha alma, sustentando-me e cuidando de mim em todos os momentos, a Ele toda honra e gloria.

À as minhas queridas professoras Regina e Adelica, que com muita competência e dedicação me ensinaram muito! Sou muito grata pela compreensão, carinho e cuidado. Sempre terei vocês como exemplo a ser seguido.

Ao meu amado esposo Chiquinho;

As minhas princesas Rúbia e Liz;

Aos meus amados pais, Jair e Valdelice;

Aos meus irmãos Janete e Jailson e respectivos conjugues e sobrinhos;

A vocês, os grandes amores da minha vida, por me suportarem nesse período de lutas, por terem sofrido comigo, lutado e torcido comigo, e simplesmente por terem me amado

Dedico.

Ainda que eu tenha o dom de profecia, saiba todos os mistérios e todo o conhecimento e tenha uma fé capaz de mover montanhas, se não tiver amor, nada serei.

1 Coríntios 13:2

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Montes Claros por ofertar graduação e pós-graduação;

À FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro;

À coordenação do doutorado e aos professores do Departamento de Ciências Agrárias da Unimontes pela dedicação;

À Professora Regina pela orientação, estímulo, confiança e amizade, a Professora Adelica, pelo apoio, orientação e amizade;

Aos professores Edson e Gisele pelo incentivo, carinho e amizade e ao professor José Augusto pela ajuda oferecida;

Aos colegas de laboratório de fitopatologia, Renato, Thais, Lorena e Isabela pelos serviços prestados, companheirismo, amizade, encorajamento e pelos momentos de entretenimento onde reanimávamos as forças para retomada. Saibam que vocês foram peças fundamentais deste trabalho;

À grande parceira Josi pelo apoio e ajuda que foi de grande valia nessa etapa final.

À minha amiga Juceliandy pela atenção e pela grande amizade que nasceu na Unimontes;

Aos colegas das escolas CEC e CESEC pelo apoio e incentivo;

À Igreja Presbiteriana pelas orações.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	11
ABSTRACT GENERAL.....	12
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPITULO 1. MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA CULTIVO DE RIZOBACTÉRIAS.....	19
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	19
1.1 INTRODUÇÃO.....	21
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1.2.1 Produção de meios de cultura sólidos com matérias primas alternativas e diferentes pH.....	22
1.2.2 Multiplicação dos isolados bacterianos e obtenção das suspensões bacterianas.....	22
1.2.3 Teste de crescimento bacteriano.....	23
1.2.4 Delineamento e análise estatística.....	23
1.2.5 Produção de meios de cultura sólidos com matérias primas alternativas e diferentes fontes de açúcar.....	23
1.2.6 Delineamento e análise estatística.....	24
1.2.7 Formulação de meios de cultura líquidos.....	24
1.3 RESULTADOS.....	25
1.4 DISCUSSÃO.....	28
1.5 CONCLUSÕES.....	31
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
CAPITULO 2. FORMULAÇÃO LÍQUIDA DE <i>Bacillus subtilis</i> -34, EM ARROZ, NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> E DESENVOLVIMENTO DE ALFACE.....	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	35
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.2.1 Desenvolvimento de formulação de <i>Bacillus subtilis</i> em caldo de arroz e estabelecimento da curva de crescimento.....	37
2.2.2 Avaliação de diferentes épocas de aplicação a formulação líquida de <i>Bacillus subtilis</i> em arroz no controle de <i>Meloidogyne javanica</i> e desenvolvimento de alface.....	38
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
2.3.1 Desenvolvimento de formulação de <i>Bacillus subtilis</i> em caldo de arroz e estabelecimento da curva de crescimento.....	39
2.3.2 Avaliação de diferentes épocas de aplicação da formulação líquida de <i>Bacillus subtilis</i> em arroz no controle de <i>Meloidogyne javanica</i> e desenvolvimento de alface.....	40
2.3.3 Avaliação da viabilidade da formulação de <i>Bacillus subtilis</i> em formulação líquida arroz em temperatura ambiente e geladeira.....	43
2.4 CONCLUSÕES.....	44
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CAPITULO 3. EFEITO DE <i>Bacillus subtilis</i> SOBRE <i>Meloidogyne javanica</i> E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO.....	48
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	48
3.1 INTRODUÇÃO.....	49

3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.2.1 Produção das mudas de tomate.....	50
3.2.2 Produção e aplicação do isolado bacteriano.....	50
3.2.3 Multiplicação do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i>	51
3.2.4 Montagem do ensaio.....	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.4 CONCLUSÃO.....	55
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO GERAL

Rizobactérias são microrganismos que promovem o crescimento de plantas e controlam fitopatógenos como nematoides fitoparasitas. Dentre os nematoides que podem ser controlados por tais antagonistas destaca-se o gênero *Meloidogyne* em função das perdas que induzem em diversas culturas com destaque para as olerícolas. Para estudos básicos e aplicados de rizobactérias é necessária sua multiplicação em meios de cultura que por sua vez são caros e oneram a pesquisa. Diante do exposto objetivou-se avaliar *in vitro*, meios de cultura com diferentes matérias primas vegetais, níveis de pH e fontes de açúcar na multiplicação de rizobactérias e a eficiência de formulação líquida de *Bacillus subtilis*, em arroz, no controle de *Meloidogyne javanica* e sobre o desenvolvimento de alface e tomateiro. Para a avaliação *in vitro* de meios de cultura com diferentes matérias primas vegetais e pH e diferentes matérias primas e fontes de açúcar foram montados ensaios individuais para *Bacillus subtilis*-34 e *Paenibacillus lentimorbus*-24. Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente ao acaso com cinco repetições. Os ensaios foram arranjados em esquema fatorial 7x3+1 (sete matérias primas vegetais, 3 pH e tratamento adicional-meio de cultura tryptic soy agar -TSA) e 7x3+1 (sete matérias primas vegetais, 3 fontes de açúcar e tratamento adicional-meio de cultura TSA). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. As médias dos tratamentos pareados foram comparadas pelo teste Dunnett a 5%. Na avaliação de meios líquidos foram avaliados caldos de arroz, de mandioca e o meio de cultura sintético tryptic soy broth (TSB) e testemunha. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente ao acaso com 4 tratamentos e seis repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Avaliou-se o tempo de vida de prateleira da formulação líquida de *B. subtilis* a base de arroz armazenada por 12 meses em condição ambiente e em refrigeração. Avaliou-se ainda, o efeito desta formulação na promoção de crescimento de alface e tomateiro e no controle de *M. javanica*. Para cada olerícola foi montado um experimento. Os dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e montados em delineamento inteiramente casualizado contendo cinco tratamentos e oito repetições. Os tratamentos consistiram de: 1-rega da formulação da bactéria ao substrato nos tubetes aos oito e quinze dias, 2-aplicado via rega ao substrato dos tubetes aos oito e quinze dias e no vaso aos 25 e 35 dias, 3-rega da formulação ao solo dos vasos aos 25 e 35 dias após o transplantio e duas testemunhas; 4-Onix[®] (Produto comercial a base de *B. methylothrophicus* – Isolado UFPEDA 20) e 5-testemunha absoluta- sem aplicação de bactéria e sem produto comercial. Em ambos os experimentos foram avaliados biomassa fresca e seca de parte aérea e crescimento de plantas e variáveis nematológicas: número de ovos, número de juvenis de segundo estágio, massa de ovos, número de galhas e fator de reprodução. Nos ensaios, *in vitro*, verificou-se que o meio de cultura, a base de mandioca com adição de dextrose, ajustado para pH 7 foi tão eficiente no crescimento de *B. subtilis* quanto o meio sintético TSA. *P. lentimorbus*-24 não se desenvolveu em nenhum meio de cultura quando o pH foi ajustado para 3 e 9. As combinações mais eficientes para esta bactéria em relação ao TSA foram meios de abóbora, arroz, arroz + feijão e banana no pH7. Das combinações entre meios de cultura e fontes de açúcar que diferiram do TSA, as mais eficientes foram arroz x açúcar cristal e arroz x dextrose. O meio de cultura líquido que promoveu maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. subtilis* e *P. lentimorbus* foi o caldo de arroz. *B. subtilis* se manteve viável até os doze meses na formulação armazenada em geladeira e até os oito meses em condições ambiente do norte de Minas Gerais. Maior promoção de crescimento de alface e controle de *M. javanica* foi obtida pela aplicação da formulação líquida de *B. subtilis* duas vezes ao solo no vaso. A aplicação da formulação líquida de *B. subtilis* ao solo no vaso e no tubete + vaso reduziu a reprodução de *M. javanica* e promoveu maior desenvolvimento do tomateiro.

Palavras-chave: Rizobactéria, nematoide-das-galhas, formulação, controle biológico.

GENERAL ABSTRACT

Rhizobacteria are bacteria capable of colonizing the root system of plants and by various mechanisms increase the development of plants and control plant pathogens like plant parasitic nematodes. Among the nematoids that can be controlled by such antagonists, *Meloidogyne* stands out due to the high losses induced in olive groves. For basic and applied studies of rhizobacteria as the production of new formulations aiming at their use as biological control products or biofertilizers, their multiplication in culture media is necessary, which in turn are expensive and influence the research. In view of the above, the objective was to evaluate, in vitro, culture media with different raw materials, pH and sugar sources in the development of *Bacillus* spp. and the efficiency of liquid formulation of *Bacillus subtilis* in rice on *Meloidogyne javanica* and on the development of lettuce and tomato. For the evaluation of different culture media and pH, two separate assays were set up for *Bacillus subtilis*-34 and *Bacillus lentimorbus*-24. The assays were mounted in factorial scheme $7 \times 3 + 1$ (7 culture media, 3 pH and additional treatment: TSA culture medium). For the evaluation of different culture media and sugar sources, two separate assays were set up for *Bacillus subtilis*-34 and *Bacillus lentimorbus*-24. The experiments were set up in a completely randomized design in a $7 \times 3 + 1$ factorial scheme (7 culture media, 3 sugar sources and additional treatment: TSA culture medium) and five replicates. The results were submitted to analysis of variance and the means of the treatments were compared by the Tukey test at 5%. The averages of the paired treatments were compared by the Dunnett test at 5%. In the evaluation of liquid media were evaluated rice, pumpkin, TSB and control (enriched water) broths. The assay was assembled in a completely randomized design with 4 treatments and six replicates. The results were submitted to analysis of variance and the means of the treatments were compared by the Tukey test at 5%. In the second part of the work the shelf life of the *Bacillus subtilis* liquid formulation in rice for 12 months and the development of lettuce and the control of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus subtilis* were evaluated. Then the effect of the liquid formulation on the control of *Meloidogyne javanica* and on the development of tomato was evaluated. The two experiments were conducted in a greenhouse and assembled in a completely randomized design containing five treatments and eight replications. The treatments consisted of: irrigation of the formulation of the bacteria to the substrate in the tubes at eight and fifteen days, applied via irrigation to the substrate of the tubes at eight and fifteen days and in the vessel at 25 and 35 days, watering the formulation to the soil of the vessels at 25 and 35 days after transplanting and two controls; Onix[®] (commercial product based on *B. methylotrophicus* - Isolated UFPEDA 20) and absolute control - without application of bacteria and without commercial product. In both experiments, fresh and dry shoot biomass and plant growth were evaluated, besides the nematological variables such as: number of eggs, number of juveniles of second stage, egg mass, number of galls and reproduction factor. In the in vitro assays, the cassava-based culture medium with the addition of dextrose adjusted to pH 7 was found to be as efficient in growth of *Bacillus subtilis* as the synthetic medium TSA. *Bacillus lentimorbus*-24 did not grow in any culture medium when pH was adjusted to 3 and 9. The most efficient combinations for this bacterium with respect to TSA were pumpkin, rice, rice + bean and banana media at pH7. From the combinations of culture media and sugar sources that differed from TSA, the most efficient were rice x crystal sugar and rice x dextrose. The liquid culture medium that promoted the highest number of colony forming units (CFU) of *Bacillus subtilis* and *Bacillus lentimorbus* was the rice broth.

Bacillus subtilis remains viable up to the months twelve in the formulation stored in refrigerator and up to eight months in environment in the North of Minas Gerais. The greater promotion of lettuce growth and control of *Meloidogyne javanica* was obtained by applying the liquid formulation of *Bacillus subtilis* twice to the soil in the pot. The application of the liquid formulation of *Bacillus subtilis* to the soil in the pot and the pot + vessel reduced the reproduction of *Meloidogyne javanica* and promoted greater development of the tomato.

Keywords: Rhizobacteria, root-knot nematode, formulation, biological control.

INTRODUÇÃO GERAL

Rizobactérias promotoras de crescimento são bactérias de vida livre que colonizam as raízes e estimulam o crescimento das plantas. O incremento no crescimento de plantas ocorre por meio de uma variedade de mecanismos que envolvem solubilização de nutrientes minerais, estimulação do crescimento das raízes e supressão de doenças radiculares (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010). Muitas dessas bactérias secretam uma série de metabólitos extracelulares que podem estar envolvidos no controle biológico de patógenos de plantas (SOHRABI et al., 2018), enzimas hidrolíticas tais como quitinases (LEE et al., 2014), proteases (EL-HADAD et al., 2010), lipases (CASTANEDA-ALVAREZ et al., 2016), glucanases e pectinases (MARIN-BRUZOS e GRAYSTON, 2019) que podem degradar ovos e juvenis de segundo estágio. Em geral, as enzimas líticas desempenham um papel crucial na atividade rizobacteriana contra nematoides devido a seus diferentes mecanismos de ação e à fisiologia relativamente simples (MARIN-BRUZOS e GRAYSTON, 2019).

Dentre as rizobactérias mais estudadas estão as do gênero *Bacillus* (HUANG et al., 2010). Características como a produção de metabólitos secundários, especialmente antibióticos, alta tolerância a mudanças de temperatura, rápido crescimento *in vitro* fazem de *Bacillus* uma boa opção para o controle de doenças de plantas. Além disso, *Bacillus* produz endósporos que são esporos produzidos em condições de privação de nutrientes e, em condições ambientais extremas possibilita sua sobrevivência por longo período. Isto o torna um ótimo microrganismo para o desenvolvimento de formulações, por apresentarem longo período de armazenamento também denominado vida de prateleira. (MARI et al., 2014).

Para o isolamento e crescimento de rizobactérias com a finalidade de desenvolvimento de pesquisas relacionadas à caracterização morfológica, fisiológica e de eficiência no controle de patógenos de plantas é necessária a utilização de meios disponíveis no mercado como tryptic soy agar e ágar nutriente. Estes meios apresentam nutrientes que são necessários ao metabolismo de bactérias, no entanto possuem um alto custo o que onera as pesquisas.

Os meios de cultura consistem da associação de substâncias que fornecem os nutrientes necessários a multiplicação de microrganismos quando estes se encontram fora do seu ambiente natural como fontes de carbono, nitrogênio e microelementos. Além disto, é necessário fornecer condições favoráveis ao seu desenvolvimento como temperatura, aeração, dentre outros.

Considerando tais necessidades, o meio de cultivo de microrganismos deve dar condições mínimas para seu crescimento. (BARBOSA et al., 2004). Para o crescimento das

bactérias, o meio deve possuir vitaminas, minerais, açúcar, pH ideal e serem incubados a temperaturas favoráveis.

Para a multiplicação de bactérias, alguns substratos alternativos como resíduos da agroindústria têm sido avaliados e podem se constituir em estratégia sustentável, visto que são geralmente poluentes ao ambiente. Resultados positivos foram obtidos na multiplicação de *Bacillus subtil* sem meios de manipueira que é um resíduo do processamento da mandioca, que embora altamente poluente, contém carboidratos, nitrogênio e diversos sais minerais (COSTA e PASTORE, 2004). A vinhaça, subproduto da cana de açúcar, gerado nas destilarias de álcool foi utilizado na multiplicação de *B. subtilis*, no entanto, tal formulação não aumentou a promoção de crescimento de cana-de-açúcar e controle de nematoides (CARDOZO e ARAUJO, 2009). Milhocina, água de maceração de milho e manipueira foram avaliados para a multiplicação de *Bacillus thuringiensis* se mostraram eficientes (ERNANDES, 2004).

Grãos de cereais também têm sido avaliados principalmente para multiplicação de *Trichoderma* (SINGH et al., 2007). Para bactérias, Bettiol et al. (2005) mostraram multiplicação superior de *B. subtilis* quando se usou farelo de arroz e farelo de trigo.

Dentre as várias funções benéficas das rizobactérias destaca-se o controle biológico de patógenos como fungos, bactérias, vírus e nematoides que reduzem ou limitam a produção de várias culturas. Existem várias espécies de nematoides que afetam culturas de valor econômico como fruteiras, ornamentais, medicinais e olerícolas.

As olerícolas sofrem danos significativos quando são atacadas por nematoides, particularmente do gênero *Meloidogyne*. Em tomate as perdas podem chegar a mais de 27% (KAUR et al., 2011). As plantas atacadas têm o desenvolvimento reduzido devido à dificuldade de absorção de água e nutrientes. O sintoma típico da doença é a formação de galhas nas raízes, resultantes da hipertrofia e hiperplasia celular, estas funcionam como drenos de nutrientes e água da planta (FERREIRA et al., 2012). Externamente verifica-se tamanho reduzido das plantas, sintomas de deficiência nutricional, murcha, definhamento de plantas e morte (FREITAS et al., 2012). A alface é uma cultura que se apresenta bastante suscetível ao ataque de pragas e doenças. Nematoides das galhas constituem-se como um dos principais problemas, causando perdas econômicas significativas. Segundo Pinochet (1987), no Panamá as perdas desta cultura são estimadas em 10 a 100%. A maioria das cultivares apresenta alta suscetibilidade a espécies de *Meloidogyne* (FIORINI et al., 2007). Até o momento existem apenas cultivares moderadamente resistentes ao nematoide (SILVA, 2006). Da mesma maneira que no tomateiro, plantas de alface, atacadas por nematoides, apresentam-se menos desenvolvidas, devido à densa formação das galhas no sistema radicular. Na parte aérea se

observam plantas amareladas, com cabeça de tamanho reduzido, pequeno volume foliar e sem valor para o consumo *in natura* (CHARCHAR e MOITA, 1996).

A principal medida e controle é a exclusão do fitonematoide, pois uma vez introduzido na aérea sua retirada é impossível, assim práticas de manejo devem ser adotadas visando reduzir a densidade populacional do patógeno. Nematicidas de origem química são amplamente utilizados para controle de *Meloidogyne*, porém afetam indiscriminadamente todos os grupos funcionais de nematóides, microrganismos benéficos, além de prejudicarem o ambiente. Portanto, é imprescindível buscar uma estratégia de gestão alternativa mais segura e econômica (SHARMA e SHARMA, 2017). Outras medidas adotadas são a utilização de cultivares resistentes, rotação de culturas, pousio, solarização do solo, cultivo de plantas antagonistas (FERRAZ et al., 2010). Entretanto, nem sempre existem cultivares resistentes para todas as culturas, a rotação de culturas pode ser inviável em função dos nematoides presentes na área serem polípagos ou devido à limitação de algumas culturas em determinados tipos de solo. O pousio, a solarização e o cultivo de plantas antagonistas requerem período sem plantio o que pode se tornar uma medida antieconômica.

Nesse contexto entra o controle biológico com rizobactérias, pois podem fornecer uma estratégia sustentável e ambientalmente segura, diferente dos pesticidas (SHARMA e SHARMA, 2015). Na literatura existem diversos relatos da ação de rizobactérias sobre fitopatógenos, além de outros benefícios ocasionados pelo desenvolvimento de rizobactérias na região da rizosfera.

B. subtilis isolado CCGB-LFB-775 reduziu o número de ovos e juvenis de segundo estágio de *M. javanica* em plantas de alface. Este efeito é atribuído aos antibióticos e proteases produzidos pela bactéria que atuou na fecundidade e fertilidade do nematoide (BERLITZ et al., 2016). A aplicação de *Bacillus cereus* reduziu o número de galhas de *M. incognita* e causou aumento da produtividade de tomate em 47,45% quando comparado com plantas não tratadas com a bactéria (WANG et al., 2018). Radwan et al. (2012) testaram produtos comerciais a base de *Bacillus* para controle de *M. incognita* em tomate e verificaram que *B. megaterium* reduziu em 89% o número de galhas.

Para a utilização de rizobactérias no controle de doenças e no incremento do crescimento de plantas é necessária sua produção em grande escala. Para isto é fundamental desenvolver meios de cultura e formulações de baixo custo e que permitam um grande número de unidades formadoras de colônia. As formulações desenvolvidas devem proporcionar vida de prateleira de no mínimo seis meses armazenada a temperatura ambiente e ser de fácil distribuição no ambiente (MELIM et al., 2007; TABASSUM et al., 2017). Diante disso objetivou-se avaliar a

eficiência de diferentes meios de cultura alternativos sobre a multiplicação de *Bacillus* spp. e o controle biológico de *M. javanica* em olerícolas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M.; AHMED, N.; ZAKI, M.; SHUAKAT, S.; KHAN, D. Potential of *Bacillus* species against *Meloidogyne javanica* parasitizing eggplant (*Solanum melongena* L.) and induced biochemical changes. **Plant Soil**, v.375, p.159-173, 2014.

ARRIEL-ELIAS, M. T.; OLIVEIRA, M. I. I.; SILVA-LOBO, V. L.; FILIPPI, M. C. C.; BABNA, A. H.; CONCEICÃO, E. C.; CORTES, M. V. C. B. Shelf life enhancement of plant growth promoting rhizobacteria using a simple formulation screening Method. **African Journal of Microbiology Research**, v.12, p. 115- 126, 2018.

BARBOSA, A.M.; CUNHA, P.D.T.; PIGATTO, M.M.; SILVA, M.L.C. Produção e aplicações de exopolis sacarídeos fúngicos. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.25, p. 29-42, 2004.

BERLITZ, D. L.; RABINOVITCH, L.; MACHADO, V.; MATSUMURA, A. T. S.; GUIMARÃES, A. M.; SANTIN, R. C.; CASSAL, M.; FIUZA, L. M. Evaluation of biological control of the *Meloidogyne javanica* with *Bacillus subtilis* and *Purpureo ciliumlilacinus* in green house with Lettuce. **International Journal of Research**, v.6, p.38 - 45, 2016.

CASTANEDA-ALVAREZ, C.; PRODAN, S.; ROSALES, I. M.; ABALLAY, E. Exoenzymes and metabolites related to the nematicidal effect of rhizobacteria on *Xiphinema index* Thorne & Allen. **Journal Applied Microbiology**, v.120, p. 413- 424, 2016.

CHARCHAR, J. M.; MOITA, A. W. Reação de cultivares de alface à infecção por misturas populacionais de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em condições de campo. **Horticultura Brasileira**, v.14, p. 185-189, 1996.

EL-HADAD, M. E.; MUSTAFA, M. I.; SELIM, S. M.; MAHGOOB, A. E. A.; EL-TAYEB, T. S.; ABDEL AZIZ, N. H. In vitro evaluation of some bacterial isolates as biofertilizers and biocontrol agents against the second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.26, p. 2249–2256, 2010.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. 2010. **Manejo sustentável de fitonematoides**. UFV: Viçosa. 304 p.

FERREIRA, P.A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G. Sintomas causados por fitonematoides. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS, J. R. W.C.; PEREIRA, O.L. **O essencial da fitopatologia**. Suprema: Viçosa. 2012.

FIORINI, C. V.A.; GOMES, L.A.A.; LIBÂNIO, R.A.; MALUF, W.R.; CAMPOS, V.P.; LICURSI, V.; MORETTO, P.; SOUZA, L.A.; FIORINI, I.V. A. Identificação de famílias F2:3 de alface homozigotas resistentes aos nematóides das galhas. **Horticultura Brasileira**, v.25, p. 509-513, 2007.

- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. Nematoides como patógenos de plantas. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS JUNIOR, W.C.; PEREIRA, O.L. **O essencial da fitopatologia**. Editora Suprema, Viçosa, p. 89-128, 2012.
- HUANG, Y.; XU, C.; MA, L.; ZHANG, K.; DUAN, C.; MO, M. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM 3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal Plant Pathology**, v.126, p. 417- 422, 2010.
- KAUR, D.N.; SHARMA, S.K.; SULTAN, M.S. Effect of different chemicals on root knot nematode in seed beds of tomato. **Plant Disease Research**, v.26, p.170-170, 2011.
- LEE, Y. S.; ANEES, M.; PARK, Y. S.; KIM, S. B.; JUNG, J. W.; KIM, K. Y. Purification and properties of a *Meloidogyne* antagonistic chitinase from *Lysobactercapsici* YS1215. **Nematology**, v. 16, p.63–72, 2014.
- MARI, M.; DI FRANCESCO, A.; BERTOLINI, P. Controlo f fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches. **Stewart Postharvest Review**, v.1, p.1, 2014.
- MARIN-BRUZOS, M.; GRAYSTON, S. Biological Control of Nematodes by Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Secondary Metabolites Involved and Potential Applications. In: **Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms**. Springer, Singapore, 2019. p. 253-264.
- MARTINEZ-VIVEROS, O.; JOURQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G.; MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, p. 293-319, 2010.
- MELIN, P.; HAKANSSON, S.; SCHNUER, J. Optimization and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.73, p. 1008 -1016, 2007.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.106, p.295 - 302, 2003.
- OLIVEIRA, E.F.B.; BARROS, S. S. U. Resíduos e Aspectos Sustentáveis da Cana-de-açúcar. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ciências Exatas e Agrárias Produção/Construção e Tecnologia**, v.7, p.28 – 45, 2017
- PEREIRA, E. L.; MARTINS, B. A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 14, p. 714-734, 2016.
- PINOCHET, J. Management of plant parasitic nematodes in Central America the Panamá Experience. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. **Vistas on Nematology**. Maryland: Society of Nematologists, 1987.
- RADWAN, M.A.; FARRAG, S.A.A.; ABU-ELAMAYEM, M.M.; AHMED, N.S. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. **Applied Soil Ecology**, v.56, p. 58-62, 2012.

SILVA, C. R. **Otimização do meio de cultura a base de soro de leite e água de maceração de milho para produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2.** 2006. 49p. Tese (Doutorado-Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2006.

SHARMA, I. P.; SHARMA, A. K. Effective control of root-knot nematode disease with *Pseudomonas* rhizobacteria filtrate. **Rhizosphere**, v.3, p. 123 – 125, 2017.

SHARMA, I.P.; SHARMA, A.K. Application of arbuscular mycorrhiza for managing Rootknot disease in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under glass-house conditions in Pantnagar, India. **African Journal Microbiology Research**, v.9, p.463 - 468, 2015.

SOHRABI, F.; SHEIKHOLESMA, M.; HEYDAR, R.; REZAEI, S.; SHARIFI, R. Evaluation of four rhizobacteria on tomato growth and suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* under greenhouse conditions a pilot study. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, p. 56, 2018.

TABASSUM, B.; KHAN, A.; TARIQ, M.; RAMZAN, M.; KHAN, M. S. I.; SHAHID, N.; AALIYA, K. Bottlenecks in commercialization future prospects of PGPR. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 102 -117, 2017.

WANG, C.; HU, H. J.; LI, X.; WANG, Y. F.; TANG, Y. Y.; CHEN, S. L.; YAN, S. Z. Effects of varying environmental factors on the biological control of *Meloidogyne incognita* in tomato by *Bacillus cereus* strain BCM2. **Biocontroland Technology**, v. 28, p. 359 – 376, 2018.

CAPÍTULO 1: MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA CULTIVO DE RIZOBACTÉRIAS

RESUMO

Na seleção de isolados promissores de rizobactérias para o controle biológico de fitopatógenos é necessário que estes sejam isolados e multiplicados em meios sintéticos. No entanto, os meios de cultura disponíveis no mercado possuem alto custo. Diante do exposto objetivou-se avaliar meios de cultura com diferentes matérias primas, níveis de pH e fontes de açúcar para o desenvolvimento de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus*. Para a avaliação de diferentes meios de cultura e pH, foram montados dois ensaios separados para as rizobactérias. Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial $7 \times 3 + 1$ (7 matérias primas, 3 níveis de pH e tratamento adicional: meio de cultura TSA) e $7 \times 3 + 1$ (7 matérias primas, 3 fontes de açúcar e tratamento adicional: meio de cultura TSA). Foram empregadas cinco repetições. Na avaliação de meios líquidos foram avaliados caldos de arroz, mandioca, TSB e testemunha. O ensaio foi montado em DIC com quatro tratamentos e seis repetições. O meio de mandioca ajustado para o pH 7 não diferiu significativamente do TSA no número de UFC de *B. subtilis*. No pH 5 em nenhum dos meios, a bactéria se desenvolveu. No pH 9, o meio de coco foi o mais eficiente na multiplicação da bactéria. Os meios de cultura de abóbora, arroz, arroz + feijão e banana no pH 7 proporcionaram maior número de UFC de *P. lentimorbus*-24 que o TSA. Nos pH 5 e 9 não houve crescimento da bactéria. Maior crescimento de *B. subtilis*-34 em relação ao TSA foi obtido no meio de abóbora + dextrose. Os tratamentos pareados arroz + açúcar cristal, abóbora + açúcar cristal, arroz + feijão + açúcar cristal e arroz + dextrose promoveram maior número de UFC de *B. lentimorbus*-24 em relação ao TSA. O caldo de arroz promoveu maior crescimento de *B. subtilis* que o meio sintético.

Palavras-chave: Rizobactérias, arroz, mandioca, pH, fonte de carbono.

ABSTRACT

In the selection of promising rhizobacteria isolates in the promotion of plant growth and in the biological control of phytopathogens, it is necessary that these be isolated and multiplied in synthetic media that provide nutrients for their development. However, the culture media available in the market have a high cost. The objective of this study was to evaluate the culture media with different raw materials, pH and sugar sources for the development of *Bacillus* spp. For the evaluation of different culture media and pH, two separate assays were set up for *B. subtilis*-34 and *B. lentimorbus*-24. The assays were assembled in a completely randomized design (DIC) in factorial scheme $7 \times 3 + 1$ (7 raw materials, 3 pH and additional treatment: TSA culture medium). For the evaluation of different culture media and sugar sources, two separate assays were set up for *B. subtilis*-34 and *B. lentimorbus*-24. The experiments were set up in DIC, factorial scheme $7 \times 3 + 1$ (7 culture media, 3 sugar sources and additional treatment: TSA culture medium) and five replicates. The results were submitted to the same analyzes. In the evaluation of liquid media were evaluated rice, pumpkin, TSB and control broths. The assay was assembled in DIC with 4 treatments and 6 replicates. The results were submitted to analysis of variance and the means of the treatments were compared by the Tukey test at 5%. Cassava medium adjusted for pH 7 did not differ significantly from TSA in the number of CFU of *B. subtilis*. At pH 5 there was no development of the bacterium. At pH 7, the best culture medium was cassava and at pH 9, the coconut medium. The culture media of pumpkin, rice, rice + beans and banana at pH 7 provided a greater number of CFU of *B. lentimorbus*-24 than TSA. At pH 5 and 9 there was no growth of the bacteria. Higher growth of *B. subtilis*-34 than TSA was

obtained in pumpkin + dextrose medium. The treatments matched rice + sugar crystal, pumpkin + crystal sugar, rice + beans + crystal sugar and rice + dextrose promoted greater number of CFU of *B. lentimorbus*-24 in relation to TSA. The rice broth promoted a higher growth of *B. subtilis* than the synthetic medium.

Keywords: Rizobacteria, rice, cassava, pH, carbon source, pH, in vitro culture.

1.1 INTRODUÇÃO

As rizobactérias colonizam raízes de plantas e promovem o seu crescimento (BENEDUZI et al., 2012). Este atributo ocorre devido a mecanismos diretos como produção de hormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas (SURESHBABU et al., 2016; KHAN et al., 2014; SOKOLOVA et al., 2011), solubilização de fosfatos (WANI et al., 2007), fixação de nitrogênio (SHRIDHAR, 2012), dentre outros. Indiretamente, o crescimento pode ser incrementado por meio do controle de fitopatógenos como fungos, bactérias e nematóides, por exemplo, pela produção de antibióticos (GUPTA et al., 2014), enzimas hidrolíticas (NIVYA, 2015), compostos voláteis tóxicos (CAMPOS et al., 2013), indução de resistência sistêmica (VEJAN et al., 2016).

A pressão da sociedade por medidas alternativas ao controle químico ou que possam fazer parte do manejo integrado de doenças tem alavancado a produção de produtos biológicos, a base de fungos, bactérias endofíticas e rizobactérias. Atualmente, no mercado brasileiro existem 20 produtos biológicos para controle de nematóides, destes 14 são a base de espécies de *Bacillus* (MAPA, 2019). O número maior de produtos à base de rizobactérias deve-se a sua eficiência no controle e por sua facilidade de multiplicação em meios sintéticos.

Na seleção de rizobactérias para o controle biológico de patógenos e pragas, para utilização como bioestimulantes ou como produtores de antibióticos, enzimas, surfactantes e outros metabólitos, o primeiro passo é seu isolamento do ambiente de rizosfera e sua multiplicação em meios de cultura sintéticos. Os meios de cultura consistem da associação de substâncias que fornecem nutrientes como fontes de carbono e nitrogênio (CUNHA et al., 2008) necessários ao cultivo de bactérias quando estas estão fora de seu ambiente natural, assim como fornecer ambiente favorável ao seu desenvolvimento como pH, pressão osmótica, umidade, temperatura e outros (COLOMBO, 2013)

Os meios de cultura sintéticos mais usados em trabalhos com rizobactérias são Tryptic Soy Agar (TSA) e Agar Nutriente (NA). No entanto, tais meios possuem custo elevado e oneram as pesquisas e a produção em massa para aplicação no campo. Existem vários trabalhos voltados para formulação de meios de culturas alternativos que sejam eficientes, de fácil produção e de baixo custo. Várias fontes de carbono e nitrogênio de substratos de baixo custo como vinhaça (CARDOSO e ARAUJO, 2012), resíduo sucroalcooleiro (SHI e ZHU, 2007) e melão (AL-BAHRY et al., 2013) têm se mostrado eficientes na multiplicação das bactérias (DIAS et al., 2014).

O pH é, sem dúvida, uma variável importante a ser considerada em cultivo de bactérias, pois cada cepa utilizada terá um valor ótimo de pH na qual deverá ser cultivada para maior crescimento ou produção de enzimas. A produção de rizobactérias em meios de cultura mais barata é de grande importância para aplicação no campo. Diante do exposto, objetivou-se avaliar meios de cultura com diferentes matérias primas vegetais, diferentes níveis de pH e de fontes de açúcar para o desenvolvimento de rizobactérias.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, *Campus* Janaúba, no período de outubro de 2016 a outubro de 2017. Os ensaios foram realizados separadamente para *B. subtilis*-34 e *P. lentimorbus*-24. Ambas rizobactérias pertencem a bacterioteca do Laboratório de Fitopatologia.

1.2.1 Produção de meios de cultura sólidos com matérias primas alternativas e diferentes pH

Para a confecção dos meios de cultura foram utilizados os seguintes materiais vegetais: mandioca (amarela), abóbora madura (moranga “cabotiá”), feijão (carioquinha), arroz (branco polido), banana madura (Prata-Anã), polpa de coco verde e arroz + feijão na proporção de 30%. Ao caldo adicionou-se açúcar, sais e ágar na proporção de 3%, 2% e 1%, respectivamente. Os meios tiveram seus pH ajustados para 3, 5, 7 e 9 ($\pm 0,2$). Para ajustar o pH para 3 e 5 foi utilizado acetato de potássio e para calibrar o pH foi utilizado o ácido acético.

Para o ajuste do pH 7 usou-se fosfato de potássio e para a calibração hidróxido de sódio. Para ajustar o pH 9 usou-se carbonato de sódio e a solução bicarbonato de sódio para calibrar este pH. Os meios com pH 3 não solidificaram, assim não puderam ser utilizados. Os meios com os diferentes pH foram vedados com papel filme e etiquetados. Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 120 ° C, 1 atm por 20 minutos.

1.2.2 Multiplicação dos isolados bacterianos e obtenção das suspensões bacterianas

Alíquotas *B. subtilis*-34 e *P. lentimorbus*-24 mantidos em água mineral esterilizada em eppendorfs foram repicados com alça de Drigalski para placas contendo meio TSA em seguida foram acondicionados em BOD a 28°C por 48 horas. Após este período, acrescentou-se às placas contendo as colônias bacterianas solução salina e com alça de Drigalski colocou-se as

células bacterianas em suspensão. Esta suspensão foi transferida para tubos e estes foram centrifugados a uma rotação de 10.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e ao pélete adicionou-se 90 mL de solução salina (NaCl) a 0,85% ficando com um volume final de 100 mL. Para agitação da suspensão utilizou-se o vórtex e durante esse período a solução foi diluída de 10^{-1} até 10^{-10} . Desta nova solução calibrada para 10^{-5} foram retiradas alíquotas de 100 μ L que foram colocadas em placas de Petri com os meios de cultura formulados.

1.2.3 Teste de crescimento bacteriano

Em placas de Petri contendo os meios de cultura (mandioca, abóbora, feijão, arroz, banana, polpa de coco verde, arroz com feijão) adicionou-se uma alíquota da suspensão bacteriana previamente diluída a 10^{-5} . Com alça de Drigalski fez-se o espalhamento. As placas foram vedadas com filme plástico e em seguida incubadas em BOD em escuro contínuo a uma temperatura de 28° C. Após 24 horas procedeu-se a avaliação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

1.2.4 Delineamento e análise estatística

Foram montados experimentos separados para as duas rizobactérias. Cada experimento foi montado em esquema fatorial $7 \times 3 + 1$ (7 meios de cultura, 3 pH e tratamento adicional: meio de cultura TSA). Os tratamentos consistiram na combinação dos meios de cultura alternativos e os três pH, totalizando 22 tratamentos. Cada tratamento constou de 5 repetições totalizando 110 unidades experimentais.

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$). As médias dos meios de cultura e dos pH foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os tratamentos pareados (meios de cultura x pH) foram comparados ao meio de cultura TSA por meio do teste de Dunnett a 5%. As análises estatísticas foram realizadas pelo software “Sisvar” versão 5.6 (FERREIRA, 2008).

1.2.5 Produção de meios de cultura sólidos com matérias primas alternativas e diferentes fontes de açúcar

Os meios de cultura foram produzidos como no item 1.2.1, com exceção que neste ensaio foram testadas três fontes de açúcar (melaço, açúcar cristal e dextrose). Foi utilizada a mesma quantidade citada no item 1.2.1. O pH do meio foi ajustado com hidróxido de sódio para 7 ($\pm 0,2$). A multiplicação dos isolados bacterianos e a obtenção das suspensões bacterianas foi realizado segundo a mesma metodologia do item 1.1.2. O teste de crescimento bacteriano foi realizado segundo a metodologia do item 1.2.3.

1.2.6 Delineamento e análise estatística

Foram montados experimentos separados para as duas rizobactérias. Cada experimento foi montado em esquema fatorial $7 \times 3 + 1$ (diferentes meios de cultura, e diferentes fontes de açúcares e tratamento adicional: meio de cultura TSA). Os tratamentos consistiram na combinação dos meios de cultura alternativos e das fontes de açúcar, totalizando 22 tratamentos. Cada tratamento constou de 5 repetições totalizando 110 unidades experimentais.

Os dados foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$). As médias dos meios de cultura e dos pH foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os tratamentos pareados (meios de cultura x fontes de açúcar) foram comparados ao meio de cultura TSA por meio do teste de Dunnett a 5%. As análises estatísticas foram realizadas pelo software “Sisvar” versão 5.6 (FERREIRA, 2008).

1.2.7 Formulação de meios de cultura líquidos

Para a confecção dos meios de cultura líquidos foram utilizados os seguintes materiais: arroz (5g), mandioca picada em pedaços de 1,0x1,0 cm (5g), água com incrementos (água destilada; açúcar; sais). Os meios foram autoclavados a 121° C. Os meios tiveram seus pH ajustados para 7 ($\pm 0,2$). A todos os meios foram adicionados alíquotas de cada isolado bacteriano, e estes foram incubados por 28 horas a 28° C em um agitador orbital. Após esse período, o meio foi filtrado em peneira. Em seguida, os meios com as bactérias foram diluídos até 10^{-5} e plaqueados em meio TSA. Após 28 horas foram determinados os números de UFC das rizobactérias. O experimento foi montado em delineamento inteiramente ao acaso com 4 tratamentos (meio líquido de arroz, meio líquido de abóbora, água + incrementos, tryptic soy broth (TSB) com cinco repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

1.3 RESULTADOS

Por meio do teste Dunnett a 5% comprova-se que o meio de mandioca ajustado para o pH 7 não diferiu significativamente do TSA no número de UFC de *B. subtilis* em relação ao TSA. Os demais meios ajustados para os pH 5, 7 e 9 foram inferiores na promoção da multiplicação da rizobactéria (Tabela 1). Houve interação significativa entre os meios de cultura e os pH. Desdobrando o fatorial observa-se que no pH 5 não houve desenvolvimento da bactéria. No pH 7, o melhor meio de cultura foi o de mandioca e no pH 9, o meio de coco. O meio de coco proporcionou maior crescimento da bactéria no pH 9 e nos demais meios, o pH 7 mostrou-se mais eficiente (Tabela 1).

Os meios de cultura de abóbora, arroz, arroz + feijão e banana ajustados ao pH 7 proporcionaram maior número de UFC de *P. lentimorbus*-24 que o meio sintético TSA. Os meios de coco, feijão e mandioca também ajustados para pH 7 foram tão eficientes quanto o TSA (Dunnett a 5%) (Tabela 2). Fixando-se o fator pH verifica-se que nos pH 5 e 9 não houve crescimento da bactéria. No pH 7, os meios mais eficientes na multiplicação da bactéria foram abóbora, arroz, arroz + feijão e banana. Fixando-se os meios constata-se que o pH 7 foi o mais eficiente na multiplicação da bactéria ao passo que os pH 5 e 9 não houve desenvolvimento de *P. lentimorbus*-24 (Tabela 2).

Por meio do teste Dunnett a 5% verifica-se que o meio que promoveu maior crescimento de *B. subtilis*-34 em relação ao TSA foi o de abóbora suplementado com dextrose. Houve interação significativa entre os fatores, meios de cultura e fontes de açúcar. Fixando-se os meios observa-se que nos meios de mandioca, feijão, arroz e banana a fonte de açúcar que proporcionou maior número de UFC foi o açúcar cristal ($p \leq 0,05$). No meio de abóbora, a dextrose foi mais eficiente na multiplicação da bactéria. Nos meios de arroz + feijão e coco, o açúcar cristal e a dextrose não diferiram significativamente entre si. Fixando-se as fontes verifica-se para o açúcar cristal maior número de UFC de *B. subtilis*-34, para a dextrose, o meio de mandioca. No melão, em nenhum dos meios avaliados a bactéria se desenvolveu ($p=0,05$) (Tabela 3).

Com relação a *P. lentimorbus*-24, os tratamentos pareados arroz + açúcar cristal, abóbora + açúcar cristal, arroz + feijão + açúcar cristal e arroz + dextrose promoveram maior número de UFC em relação ao meio de cultura sintético TSA (Dunnett a 5%). Houve interação significativa entre os fatores meios e fontes de açúcar. Para os meios de abóbora e arroz + feijão, houve maior número de UFC quando foram suplementados com açúcar cristal (Tabela 4). Para os meios de arroz, banana e coco não houve diferença para o número de colônias quando se

utilizou açúcar cristal ou dextrose. Para a mandioca não houve diferença significativa do crescimento da bactéria em relação às fontes de açúcar. Fixando-se a fonte de açúcar verifica-se que no açúcar cristal a bactéria se desenvolveu mais nos meios de arroz e abóbora, respectivamente. No melaço, o meio que promoveu maior número de UFC foi o de feijão ($p=0,05$) (Tabela 4).

Tabela 1. Número de unidades formadoras de colônia de *Bacillus subtilis*-34 por mililitro em diferentes meios de cultura e diferentes valores de pH.

Meios de cultura	pH		
	5	7	9
Mandioca	0aB ^x	1696000aA	0cB ^x
Feijão	0aC ^x	710000bA ^x	102000bB ^x
Abóbora	0aB ^x	668000bA ^x	0cB ^x
Arroz	0aB ^x	390000cA ^x	0cB ^x
Arroz + Feijão	0aB ^x	178000dA ^x	0cB ^x
Coco	0aC ^x	124000dB ^x	218000aA ^x
Banana	0aB ^x	44000eA ^x	0cB ^x
CV (%)	25,35		
TSA	1854000		

Para análise os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$, Médias seguidas da mesma letra minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela letra x diferem significativamente do TSA pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Número de unidades formadoras de colônia de *Paenibacillus lentimorbus*-24 por mililitro em diferentes meios de cultura e diferentes valores de pH.

Meios de cultura	pH		
	5	7	9
Abóbora	0aB ^x	566000aA ^x	0aB ^x
Arroz	0aB ^x	47000aA ^x	0aB ^x
Arroz + Feijão	0aB ^x	452000aA ^x	0aB ^x
Banana	0aB ^x	390000aA ^x	0aB ^x
Coco	0aB ^x	140000bA	0aB ^x
Feijão	0aB ^x	146000bA	0aB ^x
Mandioca	0aB ^x	62000bA	0aB ^x
CV (%)	47,66		
TSA	132000		

Para análise os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$, Médias seguidas da mesma letra minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela letra x diferem significativamente do TSA pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Número de unidades formadoras de colônia de *Bacillus subtilis*-34 por mililitro em diferentes meios e diferentes fontes de açúcar.

Meio de Cultura	Fonte de Açúcar		
	Açúcar cristal	Dextrose	Melaço
Mandioca	1512000aA ^x	36000cB ^x	0aC ^x
Abóbora	744000bB ^x	3054000aA ^x	0aC ^x
Feijão	622000bcA ^x	140000bB ^x	0aC ^x
Arroz	496000cA ^x	116000bB ^x	0aC ^x
Arroz + Feijão	106000dA ^x	8000cA ^x	0aB ^x
Coco	90000dA ^x	140000bA ^x	0aB ^x
Banana	42000dA ^x	0cB ^x	0aB ^x
CV (%)		22,42	
TSA		2418000	

Para análise os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela letra x diferem significativamente do TSA pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Número de unidades formadoras de colônia de *Paenibacillus lentimorbus*-24 por mililitro em diferentes meios e diferentes açúcares em meio sólido

Meios de Cultura	Fonte de Açúcar		
	Cristal	Dextrose	Melaço
Arroz	502000aA ^x	448000aA ^x	0dB ^x
Abóbora	408000abA ^x	156000bB ^x	6000cdC
Arroz + Feijão	286000bcA ^x	0cC ^x	72000abB
Banana	226000cdA	172000bA	0dB ^x
Feijão	16600cdA	180000bA	172000aA
Coco	140000dA	114000bA	0dB ^x
Mandioca	20000eA ^x	14000cA ^x	36000bcA ^x
CV (%)		26,43	
TSA		124000	

Para análise os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela letra x diferem significativamente do TSA pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

De um modo geral maior crescimento das rizobactérias ocorreu em meios de cultura ajustados para o pH 7. No pH 5, em nenhum dos meios, as bactérias se desenvolveram e no pH 9, apenas nos meios de cultura feijão e coco *B. subtilis* se desenvolveu, sendo que no meio de coco, houve um número de UFC 75% maior que no pH 7. Assim, dependendo dos componentes nutricionais existentes nos meios de cultura, a bactéria, no caso *B. subtilis*-34 pode crescer em outros valores de pH.

O caldo de arroz proporcionou os maiores valores de UFC.mL⁻¹ para os dois isolados utilizados (Tabela 5 e 6), mostrando assim maior viabilidade deste para meio de veiculação dos isolados bacterianos.

Tabela 5. Número de unidades formadoras de colônia de *Bacillus subtilis*-34 por mililitro em diferentes meios líquidos.

Meios Líquidos	Número de UFC mL ⁻¹
Caldo de arroz	1752,6 a
Caldo de mandioca	830,4 b
TSB	29,1 c
Água + incrementos	7,2 d
CV (%)	15,19

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Número de unidades formadoras de colônia de *Paenibacillus lentimorbus*-24 por mililitro em diferentes meios líquidos.

Meios Líquidos	Número de UFC mL ⁻¹
Caldo de arroz	1405,4 a
TSB	97,2 b
Caldo de mandioca	69,6 b
Água + incrementos	0,4 c
CV (%)	15,99

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

1.4 DISCUSSÃO

O pH é uma variável importante, a ser considerada em um cultivo de microrganismos.. Muis (2006) descreve que para a maioria das bactérias, o pH ótimo está próximo do ponto neutro (pH 7). Os resultados encontrados corroboram com os de Khalilian et al. (2015) e Iqbal e Rehman (2015) que verificaram maior desenvolvimento de *Bacillus* sp. e *B. subtilis* respectivamente, no pH 7 e diferem dos obtidos por Montealegre (2003) em que *B. subtilis* 639 se desenvolveu mais no meio de cultura com pH 5 ao passo que no presente trabalho nenhuma das rizobactérias avaliadas se desenvolveu no pH 5. É importante avaliar o pH para cada isolado de bactéria, pois existe variabilidade intra específica para esta característica. Montealegre et al. (2003) verificaram que *B. lentimorbus* isolado 640 cresceu melhor a pH 5,0, enquanto *P.lentimorbus*629 cresceu melhor a pH 5,5 e no pH 8, nenhum deles se desenvolveu. No presente ensaio, o não crescimento das bactérias no pH 5 pode ser explicado por Carlsen et al. (1996) que atribuem esse efeito ao fato de que a amônia, resultante de reações, é capaz de

aceitar um próton, levando à acidificação substancial do meio de cultivo. Essa acidificação pode causar uma redução no crescimento do microrganismo ou mesmo cessá-lo, resultando numa inativação da α -amilase enzima responsável pela degradação do amido. A acidez ou alcalinidade do ambiente afeta a atividade e a estabilidade de enzimas que podem afetar o metabolismo das bactérias (KONI et al., 2017). O pH do meio de cultura influencia os processos enzimáticos e transporte de componentes nas membranas celulares (WALEED et al., 2015).

O pH afeta a estrutura de todas as macromoléculas. As ligações de hidrogênio que mantêm juntos filamentos de DNA se quebram em pH abaixo de 7. Os lipídios são hidrolisados por um pH extremamente básico acima de 9. A força motora do próton responsável pela produção de ATP na respiração celular depende do gradiente de concentração de H^+ através da membrana plasmática. As proteínas também são afetadas por mudanças no pH que modificam a ionização de grupos funcionais de aminoácidos e interrompem a ligação de hidrogênio, que, por sua vez, promove mudanças no enrolamento da molécula, promovendo desnaturação e atividade destruidora (MULKIDJANIAN et al., 2006).

O metabolismo dos microrganismos é direcionado, principalmente, de acordo com o meio em que são cultivados. Considerando um crescimento balanceado, o microrganismo utilizará o substrato como fonte de energia e/ou para manutenção/formação de material celular (VALAPPIL et al., 2007). O meio de mandioca foi tão eficiente quanto o TSA na multiplicação de *B. subtilis*-34. As raízes de mandioca apresentam uma composição média de 68,2% de umidade, 30% de amido, 2% de cinzas, 1,3% de proteínas, 0,2% de lipídios e 0,3% de fibras (ALBUQUERQUE et al., 1993). As raízes de mandioca são, portanto, essencialmente energéticas, apresentando elevados teores de carboidratos, principalmente polissacarídeos, nutrientes esses essenciais ao desenvolvimento bacteriano.

Os meios de cultura de abóbora, arroz, arroz + feijão e banana ajustados ao pH 7 proporcionaram maior número de UFC de *P. lentimorbus*-24 que o meio sintético TSA. O valor nutricional da banana é evidenciado por alguns nutrientes, dentre eles destacam-se os carboidratos, o potássio e algumas vitaminas como C e E (NEPA, 2011). A abóbora é rica em proteínas, carboidratos, cálcio, magnésio, fósforo e potássio e alguns outros micronutrientes. O feijão é rico em proteínas, ferro, cálcio, magnésio, zinco e vitaminas, principalmente do complexo B, carboidratos e fibras. O valor nutritivo da proteína do feijão é baixo, porém quando combinada com a proteína do arroz, forma uma proteína mais nutritiva (MESQUITA et al., 2006). Os carboidratos são importantes para o crescimento bacteriano, assim como as vitaminas do complexo B, que também são fatores de crescimento e o magnésio na síntese de proteínas. O arroz é constituído principalmente por amido, apresentando quantidades menores de

proteínas, lipídios, fibras e cinzas. A concentração de amido no arroz pode variar de 72 e 82% (FREI et al., 2003). Essa porcentagem de amido o torna uma fonte de carbono de alta qualidade para o crescimento de microrganismos (STAZZONELLI et al., 2017). O arroz é utilizado na formulação de estirpes de *Trichoderma* por melhorar a porcentagem de viabilidade de esporos no período de armazenamento (CHAVES-GRACIA et al., 2009).

O crescimento eficiente de bactérias pode ser alcançado em culturas com fontes de carbono prontamente metabolizáveis (CARVALHO et al., 2010). No entanto no presente trabalho a dextrose foi a fonte de carbono mais eficiente no meio de abóbora para *B. subtilis*-34. Esses resultados estão de acordo com os de Allos e Hussein (2015). Os autores verificaram que a dextrose foi a melhor fonte de carbono para *Bacillus cereus*. De um modo geral, verifica-se que para *P. lentimorbus*-24, a melhor fonte de açúcar foi o açúcar cristal. Estudos demonstram que tal fonte é efetiva na multiplicação de outras espécies de bactérias. Reis et al. (2004) analisaram o efeito das seguintes fontes de carbono: açúcar cristal, caldo de cana-de-açúcar e melação de cana, suco de cana-de-açúcar, glicerol, manitol e óleo de soja no crescimento celular de *B. subtilis* ATCC 6633. Todas as fontes de carbono utilizadas foram favoráveis ao crescimento, embora os valores máximos tenham sido obtidos para o açúcar cristal.

A adição de melação aos meios de cultura não permitiu a multiplicação de *B. subtilis*-34 e no caso de *B. lentimorbus*-24 se mostrou mais eficiente apenas quando adicionado ao meio composto por arroz + feijão. Segundo Cazetta et al. (2005), o melação apresenta alguns sais e outras substâncias que afetam o crescimento de alguns microrganismos. A baixa concentração de nitrogênio no melação pode ter sido responsável pela não formação de UFCs das bactérias, uma vez que esse nutriente é essencial aos processos metabólicos de desenvolvimento da célula bacteriana. Muitos autores relatam a necessidade da adição de uma fonte de nitrogênio ao melação (RASHEDI et al., 2005). Sepahy et al. (2005) descreveram que *B. subtilis* necessita de uma concentração mínima de 0,5 g/L de nitrogênio total para seu crescimento. A concentração de nitrogênio presente no melação é de 0,12 g/L, valor 24 vezes menor que a concentração requerida pela bactéria. Diez e Yokoya (1996) afirmam que em virtude da composição do melação é necessário suplementá-lo com nitrogênio e alguns minerais. Feltrin et al. (2000) afirmaram que o baixo teor de nitrogênio no melação torna obrigatório a adição deste elemento para o desenvolvimento de microrganismos. O meio líquido de arroz foi mais eficiente que o TSB na multiplicação de *B. subtilis*-34 e *B. lentimorbus*-24 (Tabelas 5 e 6), enquanto o meio sólido de mandioca foi o mais eficiente para *B. subtilis*-34. Nos meios sólidos, as matérias primas foram inicialmente cozidas em água e após o término dos meios, estes foram autoclavados. A cocção prévia pode ter degradado algumas substâncias importantes presentes

no arroz para o metabolismo de *B. subtilis*. O cozimento do arroz branco promove a gelatinização e retrogradação do amido. Esses fenômenos sequenciais permitem um rearranjo das moléculas, com a desestruturação dos grânulos de amido, gerando uma massa homogênea que ao resfriar-se perde água e apresenta interação bastante forte entre as moléculas, o que impede em certas regiões o acesso de enzimas amilolíticas, formando assim o amido resistente (HELBIG et al., 2008).

1.5 CONCLUSÕES

O meio de cultura a base de mandioca cozida, suplementado com açúcar e ajustado para pH 7 é o mais eficiente para multiplicação de *Bacillus subtilis*-34.

Maior multiplicação de *Paenibacillus lentimorbus*-24 é promovida pelos meios de cultura a base de abóbora, arroz, arroz + feijão e banana ajustados para pH 7.

O açúcar cristal adicionado aos meios de arroz, abóbora arroz + feijão permite maior crescimento de *Paenibacillus lentimorbus*-24.

O caldo de arroz é mais eficiente na multiplicação de *Bacillus subtilis*-34 e *Paenibacillus lentimorbus*-24.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A.; HASNAIN, S. Auxin producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth *Solanum tuberosum*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, p.313 - 319, 2010.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, M. A.; ELSHAFIE, A.E.; AL-BEMANI, A.S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H.S.; AL-SULAIMANI, H.S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.81, p.141 – 146, 2013.

ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G.; SALIM, J.; TELLES, F.F.F.; QUIRINO, J. G. Composição centesimal da raiz de 10 variedades de mandioca (*Manihote sculenta* Crantz) cultivadas em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.12, p.7-12, 1993.

ALLOS, M. M.; HUSSEIN, A.A. Optimum conditions for laccase production by local isolate of *Bacillus cereus* B5. **Journal of Al-Nahrain University**, v.18, p.133 – 140, 2015.

CAMPOS, P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência Agrotécnica**, v.34, p.525 – 535, 2010.

- CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p.1283 – 1288, 2011.
- CARLSEN, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Growth and α -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations. **Journal of Biotechnology**, v.45, p.81 - 93, 1996.
- CARVALHO, A. L. U.; OLIVEIRA, F. H. P. C.; MARIANO, R. L. R.; GOUVEIA, E. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Growth sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.643 – 652, 2010.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P.C. Aproveitamento do melaço para a produção de biomassa proteica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina**, v.26, p.105 – 112, 2005.
- CHÁVEZ GARCÍA, M.; MONTAÑA- LARA, J.S.; MARTÍNEZ-SALGADO, M.M.; MERCADO-REYES, M.; RODRÍGUEZ, M.X.; QUEVEDO-HIDALGO, B. Efecto Del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. **Universitas Scientiarum**, v.13, p.245-251, 2009.
- DIAS, B. C. O.; CARVALHO, T. M.; SANTOS, H. C. P.; SILVA, A. M. M. S.; GAZZINELI, S. E. P. Produção e avaliação de meios de cultura alternativos para estudo e ensino de microbiologia. **Revista Eletrônica Acadêmica**, v.1, p.56 – 60, 2014.
- DIEZ, J. C.; YOKOYA, F. Fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar por processo descontínuo utilizando *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.39, p.419-426, 1996.
- FELTRIM, V. P.; SANT'ANNA, E. S.; PORTO, A. C.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, 2000.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p. 36- 41, 2008.
- FREI, M.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Studies on in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v.83, p.395-402, 2003.
- GUPTA, S.; MEENA, M. K.; DATTA, S. Isolation, Characterization of Plant Growth Promoting Bacteria from the Plant *Chlorophytum borivilianum* and In-Vitro Screening for Activity of Nitrogen Fixation, Phosphate Solubilization and IAA Production. **International Journal Current Microbiology Applied Science**, v.3, p.1082 - 1090, 2014.
- HELBIG, E.; ROMANO, C. M.; RADÜNZ, A. L.; RUTZ, D.; DIAS, A. R. G.; ELIAS, M. C. Efeitos da Amilose e do Processamento na Formação e Estabilidade do Amido Resistente em Arroz. Campinas: **Brazilian Journal Food Technology**, v. 10, p. 296-301, 2008.

IQBAL, S. A.; REHMAN, A. Characterization of lipase from *Bacillus subtilis* I-4 and its potential use oil contaminated wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.58, p.789-797, 2015.

KHALILIAN, M.; ZOLFAGHARI, M. R.; SOLEIMANI, M.; MONFARED, M. R. Z. *Bacillus* sp. Strain QW90, a bacterial strain with a high potential application in bioremediation of selenite. **Report of Health Care**, v.1, p.6 -10, 2015.

KHAN, A.L.; WAQAS, M.; KANG, S.M. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal Microbiology**, v.52, 689 - 695, 2014.

KONI, T. N. I.; RUSMAN.; HANIM, C.; ZUPRIZAL. Effect of pH and temperature *Bacillus subtilis* FNCC0059 oxalate decarboxylase activity. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.29, p. 436 – 441, 2017.

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; ZAMBALDI, R. A.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica. **Ciência Agrotécnica**, v.31, p.1114 – 1121, 2007.

MONTEALEGRE, J. R.; REYES, R.; PEREZ, L. M.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.6, p.115-127, 2003.

MUIS, A. Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. MULKIDJANIAN, A.Y.; HEBERLE, J.; CHEREPANOV, D. A. 2006. Protons interfaces: implications for biological energy conversion. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1757, p.913-30, 2006.

NEPA- Nucleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação. Universidade Federal de Campinas – UNICAMP. TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Ed. 4, 2011

NIVYA, R. M. A Study on Plant Growth Promoting Activity of the Endophytic Bacteria Isolated from the Root Nodules of Mimosa pudica Plant. **International Journal Innovative Research Science Engineering Technology**, v.4, p.6959–6968, 2015.

RASHEDI, H.; ASSADI, M.; BONAKDARPOUR, B.; JAMSHIDI, E. Enviromental importance of rhamnolipid from molasses as carbon surce. **International Journal of Enviromental Science and Technology**, v.2, p. 59- 62, 2005.

REIS, F.; SÉRVULO, E.; DE FRANÇA, F. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.115, 899-912, 2004.

SEPARY, A. A.; ASSADI, M.M.; SAGGADIAN, V.; NOOHI, A. Production of biosurfactant from Iranian oil fields by isolated Bacilli. **International Journal of Enviromental Science and Technology**, v.1, p.287 – 293, 2005.

SHI, F.; ZHU, Y. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. **Biocontrol**, v.52, p.845 -853, 2007.

SHRIDHAR, B. S. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. **International Journal Microbiology Research**, v.3, p.46 - 52, 2012.

SOKOLOVA, M.G.; AKIMOVA, G.P.; VAISHLIA, O.B. Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, v.47, p.302–307, 2011.

STAZZONELLI, E.A.; ROMERO, Y.M.G.; PLOPERI, L. D Substrate evaluation for *Trichoderma* spore production and rice growth study in TPT03, TPT02, MRT35 and MRT40 antagonist strains. **Revista Agronomica Noroeste Argentina**, v.37, p.57-66, 2017.

SURESHBABU, K.; AMARESAN, N.; KUMAR, K. Amazing Multiple Function Properties of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere Soil. **International Journal of Current Microbiology Applied and Sciences**, v.5, p.661–683, 2016.

VALAPPIL, S.P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G.J.; HERNIMAN, J.M.; BOCCACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROYA, I. Polyhydroxyalkanoate(PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. **Journal of Biotechnology**, v.127, p. 475 - 487, 2007.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMALL, S.; BOYCE, A. N. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – A review. **Molecules**, v.21, p.573, 2016.

WALEED, M.; FAIZA, A. A.; INIZAR, I. Production optimization of pullulanase enzyme produced by *Bacillus cereus* isolated from syrian sources. **International Food Research Journal**, v.22, p.1824-1830, 2015.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Synergistic effect of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on performance of field-grown chickpea. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v.170, p.283–287, 2007.

CAPITULO 2: FORMULAÇÃO LÍQUIDA DE *Bacillus subtilis*-34, EM ARROZ, NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* E DESENVOLVIMENTO DE ALFACE

RESUMO

Desenvolver uma formulação líquida a base de *B. subtilis*-34 utilizando arroz, avaliar o tempo de prateleira em condição ambiente e refrigerado e avaliar o efeito de diferentes épocas de aplicação da formulação no controle de *M. javanica* e no crescimento de plantas de alface, foram os objetivos do trabalho. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. O experimento foi montado em casa de vegetação. Os tratamentos consistiram da aplicação da formulação como: rega no substrato dos tubetes aos oito e quinze dias; rega no substrato dos tubetes aos oito e quinze dias e no solo do vaso aos 25 e 35 dias; rega somente no vaso aos 25 e 35 dias e duas testemunhas (Onix® e testemunha absoluta). Todos os vasos com as plantas foram infestadas com 5.000 ovos do nematoide. Aos 45 de transplântio foram avaliadas as variáveis nematológicas: número de galhas, número de massa de ovos, número de ovos por grama e fator de reprodução e variáveis agrônomicas de biomassa fresca e seca. As aplicações no tubete e no vaso e somente no vaso foram eficientes para a redução da reprodução de *M. javanica* e para o desenvolvimento de plantas de tomate. *B. subtilis*-34 se mantém viável até os nove meses na formulação armazenada em geladeira e até os sete meses em ambiente.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L.; rizobactéria; nematoide-de-galhas, tecnologia, tempo de prateleira.

ABSTRACT

To develop a liquid formulation based on *B. subtilis*-34 using rice to evaluate the shelf life under refrigerated and room conditions and to evaluate the effect of different application times of the formulation on the control of *M. javanica* and growth of lettuce plants. The design was completely randomized, with five treatments and eight replicates. The results were submitted to analysis of variance and the means compared by the Scott Knott test with 5% error probability. The experiment was set up during the period from 02/13/2018 to 03/20/2018 in greenhouse located at the State University of Montes Claros, municipality of Janaúba, MG, Brazil. The treatments consisted of irrigation in the substrate of tubes at eight and fifteen days; irrigation in the substrate of tubes at 8 and 15 days and in pot at 25 and 35 days; irrigation in pot only at 25 and 35 days and two controls (Onix® and absolute control). All pots with plants were infested with 5,000 nematode eggs. At 45 days of transplanting, the following nematological variables were evaluated: number of galls, number of egg mass, number of eggs per gram and reproduction factor, and agronomic variables fresh and dry biomass. Applications in the tube and pot and in the pot only were efficient for the reduction in the reproduction of *M. javanica* and for the development of tomato plants. *B. subtilis* - 34 remains viable until nine months in formulation stored under refrigerator and up to seven months under room conditions.

Keywords: *Lactuca sativa* L., rhizobacteria, root-knot nematode, technology, shelf life.

2.1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça importante economicamente para o Brasil, sendo cultivada em praticamente todas as regiões do país (CARVALHO FILHO et al., 2009). A alface é uma boa fonte de fibras, vitaminas, especialmente B, A, C e K, baixa em calorias, bem como uma rica fonte de pigmentos benéficos para a saúde humana (MATRASSEK et al., 2016). A cultura possui inúmeros problemas fitossanitários, dentre os quais se destacam os fitonematoides. Espécies de *Meloidogyne* são consideradas como limitantes ao cultivo comercial de várias hortaliças, pois estas possuem ciclo curto e sempre são cultivadas na mesma área o que favorece o aumento populacional do nematoide. As perdas causadas por fitonematoides em olerícolas são estimadas em 12,3% nos países desenvolvidos e 14,6% nos países em desenvolvimento (ANWAR e MCKENRY, 2012). Plantas de alface, atacadas por nematoides, apresentam-se menos desenvolvidas, devido à densa formação das galhas no sistema radicular e seu controle é uma tarefa difícil.

Várias estratégias são utilizadas para seu controle e dentre elas estão: a rotação de culturas, solarização, uso de cultivares resistentes e o controle químico. A maioria das cultivares de alface apresenta alta suscetibilidade a espécies de *Meloidogyne* (FIORINI et al., 2007). As espécies desse gênero mais importantes à cultura da alface e demais olerícolas folhosas são *M. javanica* e *M. incognita* (PINHEIRO et al., 2013). Os danos causados por agroquímicos, a inviabilidade da rotação de culturas em pequenas áreas e o custo do plástico para a solarização evidenciam a necessidade do uso de agentes de controle biológico dos quais se destacam as rizobactérias (KILLANI et al., 2011).

Dentre as rizobactérias destaca-se o gênero *Bacillus* que possui a capacidade de produzir antibióticos, enzimas e toxinas, que agem diretamente, causando a mortalidade de juvenis e/ou indiretamente afetando o comportamento, alimentação ou a reprodução destes. Podem ainda atuar no processo de reconhecimento planta-hospedeiro, na indução de resistência e/ou na promoção de crescimento de plantas (TIAN et al., 2007). Além disso, *Bacillus* produzem endósporos que são esporos que sobrevivem em condições de privação de nutrientes e em condições de elevada temperatura o que favorece a manutenção da viabilidade das formulações (FORMSTONE et al., 2008).

Resultados promissores têm sido obtidos no controle de *M. javanica* por *B. subtilis* em bananeira e tomateiro (ARAÚJO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2012). *Bacillus* tem sido descrito por produzir enzimas hidrolíticas como lipases, quitinases e proteases capazes de degradar

componentes estruturais do *Meloidogyne* (SHARMA et al., 2018; LEE e KIM, 2016; ZHANG et al., 2014).

A formulação de agentes de biocontrole como rizobactérias ou outro microrganismo é uma fase essencial para seu uso comercial (BERNINGER et al., 2018). A formulação deve permitir tempo de prateleira visto que os agentes de biocontrole são organismos vivos, também deve ser efetiva nas condições do ambiente a ser empregado. Além disso, a formulação deve ser econômica e conter número suficiente de unidades formadoras de colônias (UFC) viáveis e ser de fácil aplicação ao solo ou às plantas (SHARMA et al., 2009).

Vários agricultores têm multiplicado bactérias provenientes de produtos biológicos em suas propriedades. Assim é importante o desenvolvimento de formulações de baixo custo para serem utilizadas em grande escala.

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a aplicação de uma formulação líquida de *B. subtilis* produzida em caldo de arroz e determinar a eficiência da mesma no controle de *M. javanica* e na promoção de crescimento de alface.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Desenvolvimento de formulação de *B. subtilis* em caldo de arroz e estabelecimento da curva de crescimento

Foi utilizado o isolado de *B. subtilis*-34 mantido em água mineral em tubos de vidro em condição ambiente. A partir desta suspensão retirou-se uma alíquota e colocou-se em erlenmeyers de um litro contendo água destilada. Foram adicionados os seguintes componentes em %arroz cru (30%), açúcar cristal (3%) e sais (2%). Os compostos químicos, o açúcar, a água e o arroz foram autoclavados a 1,0 atm a 120°C por 30 minutos. A formulação apresentou pH final de 7(\pm 0,2).

Para a determinação do número de unidade formadora de colônia (UFC) inicial, uma alíquota de um mililitro da formulação líquida foi submetida à diluição de 10^{-5} e desta retirou-se 100 μ L para plaqueamento em placas de Petri contendo Tryptic Soy Agar (TSA). Estas placas foram incubadas a 25°C por 24 horas, quando avaliou-se o número inicial de UFC/mL. Para o estabelecimento da curva de crescimento da bactéria, a formulação foi incubada por 44 horas em agitador orbital a 28°C a 220 rpm e a intervalos de 4 horas realizou-se o mesmo procedimento para a determinação do número de UFC. Determinou-se também a curva de crescimento da bactéria em meio Tryptic Soy Broth (TSB) seguindo a mesma metodologia citada para a formulação líquida de arroz.

2.2.2 Avaliação de diferentes épocas de aplicação da formulação líquida de *B. subtilis*, em arroz, no controle de *M. javanica* e desenvolvimento da alface

O experimento foi montado em casa vegetação da Universidade Estadual de Montes Claros, campus Janaúba, com as seguintes coordenadas geográficas (43°16'18,2" W e 15°49'51,5" S) e altitude média de aproximadamente 540 m). Para avaliação da promoção de crescimento e redução de variáveis nematológicas foi utilizado o isolado bacteriano 34 de *B. subtilis*. A formulação foi feita como mencionado no item 2.2.1. O crescimento do isolado foi interrompido às 28 horas após o início da incubação. Neste momento realizou-se a diluição a 10^{-5} e o plaqueamento em TSA para determinação do número inicial de UFCs por mL. Para avaliar o período de sobrevivência da bactéria na formulação líquida, um volume de 50 mL desta foi mantida em temperatura ambiente no laboratório de fitopatologia sobre a bancada com temperatura média 26,05°C (máxima 29,1°C e mínima de 23°C) e outros 50 mL mantidos em refrigerador a 9°C. A intervalos de um mês por um período de dez meses foi realizada a diluição a 10^{-5} e o plaqueamento em TSA para determinação do número de UFC.

As mudas de alface Aurélia cultivar manteiga foram obtidas a partir da semeadura em tubetes de isopor contendo substrato Bioplant®. Após 17 dias, as mudas foram transplantadas para vasos de três litros contendo: substrato, composto por solo (argila pesada, 26,6% silte, 60% argila, 13,4% areia, pH=5) areia, na proporção de 3:1, respectivamente, previamente autoclavado a 1 atm a 120° C por 30 minutos, três vezes em intervalos de 24 horas. O substrato foi adubado conforme recomendação agrônômica para a cultura. Antes da montagem do ensaio, o substrato foi submetido à calagem e este foi incubado por 30 dias.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado contendo cinco tratamentos e oito repetições. Os tratamentos consistiram de: T1- rega da formulação da bactéria ao substrato nos tubetes aos oito e quinze dias, T2 -aplicado via rega ao substrato dos tubetes aos oito e quinze dias e no vaso aos 25 e 35 dias, T3- rega da formulação ao solo dos vasos aos 25 e 35 dias após o transplântio e duas testemunhas; T4-Onix® (Produto comercial a base de *Bacillus methylotrophicus* – Isolado UFPEDA 20) e T5- sem aplicação de bactéria e sem produto comercial. No tratamento Onix® cada planta recebeu 250 mL do produto comercial, previamente diluído em água na proporção de 4 mL.L, um dia após o transplântio. Com relação à formulação de arroz, o volume utilizado por aplicação no tubetes e nos vasos foi de dois mililitros e 150 mL, respectivamente. A cada aplicação uma nova formulação foi produzida.

A inoculação de *M. javanica* ocorreu 24 horas após o transplântio das mudas para o vaso, sendo que cada uma recebeu cinco mililitros de suspensão contendo 5.000 ovos e eventuais J2 calibrados em câmara de Peters, aplicados em três orifícios ao redor do colo de cada planta. Aos 45 dias após o transplântio avaliaram-se: número de galhas por grama de raiz (NG/g), massa de ovos por grama de raiz (MO/g), número de ovos por grama de raiz (NO/g) e determinou-se o fator de reprodução conforme Oostenbrink (1996) calculado pela fórmula: $FR = Pf./Pi$, onde Pf é a população final de nematoide e Pi é a população inicial aplicada à planta.

Para a contagem do número de massas de ovos procedeu-se a imersão das raízes das plantas em solução de floxina B (150 mg.L^{-1}). O número de ovos foi determinado após a extração nas raízes segundo metodologia proposta por Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981). O número de J2 do solo foi determinado após extração pela técnica de Jenkins (1964). Ovos e J2 de *M. javanica* foram quantificados em câmara de contagem de Peters em microscópio de objetivo invertido.

Avaliaram ainda o número de folhas, a altura, o diâmetro da cabeça, a massa fresca da parte aérea (MFPA), a massa seca da parte aérea (MSPA) e o peso da raiz (PR). Para a determinação da massa seca de parte aérea, as folhas foram colocadas em sacos de papel e estes foram acondicionados em estufa de secagem com ventilação forçada a temperatura de 65°C por 72 horas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada por meio do software “Sisvar” (FERREIRA, 2008).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Desenvolvimento de formulação de *B. subtilis* em caldo de arroz e estabelecimento da curva de crescimento

Na figura 1 e 2 estão representadas as curvas de crescimento de *B. subtilis*-34 na formulação líquida de arroz e TSB, respectivamente. Na formulação líquida de arroz observa-se que a bactéria se manteve na fase de adaptação até 20 horas após o plaqueamento. A partir de 24 horas inicia-se a fase exponencial de crescimento culminando com maior número de UFC ($6,14 \times 10^8$) às 32 horas após a incubação. A partir de 36 horas inicia-se a fase de declínio. A queda brusca deste valor é justificada pelo esgotamento de nutrientes do meio de cultura e pelo aumento dos produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo bacteriano (ICSS, 2009).

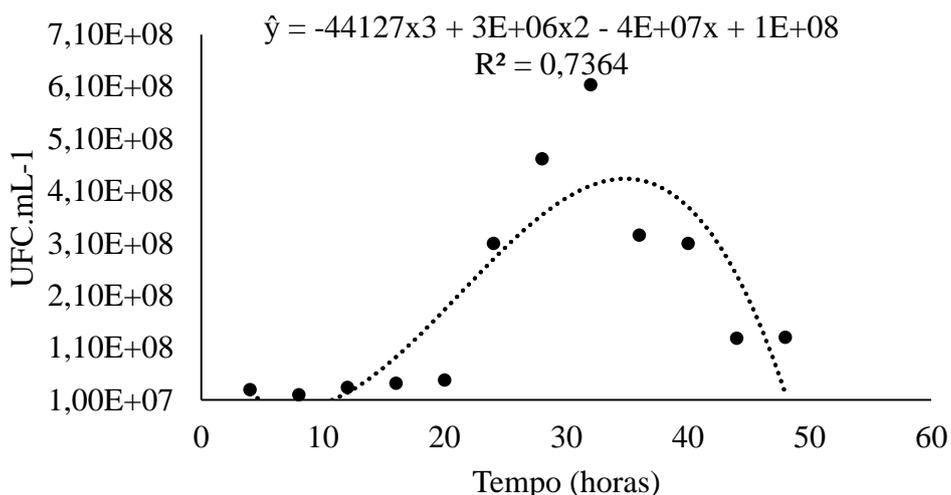


Figura 1. Curva de crescimento de *Bacillus subtilis*-34 em formulação líquida de arroz.

Já em TSB, maior número de UFC ocorreu às 40 horas após a incubação ($6,41 \times 10^7$), ou seja, oito horas após o ocorrido na formulação líquida e com diferença no número de UFC de $5,5 \times 10^8$ em relação à formulação líquida de arroz (Figura 2). Para o ensaio em casa de vegetação, a formulação foi incubada até 28 horas por já se encontrar na fase de crescimento logarítmico. É importante salientar que às 28 horas do início da incubação, a formulação líquida de arroz proporcionou um número de UFC de $4,72 \times 10^8$, enquanto o meio TSB o número de UFC foi de $3,49 \times 10^7$.

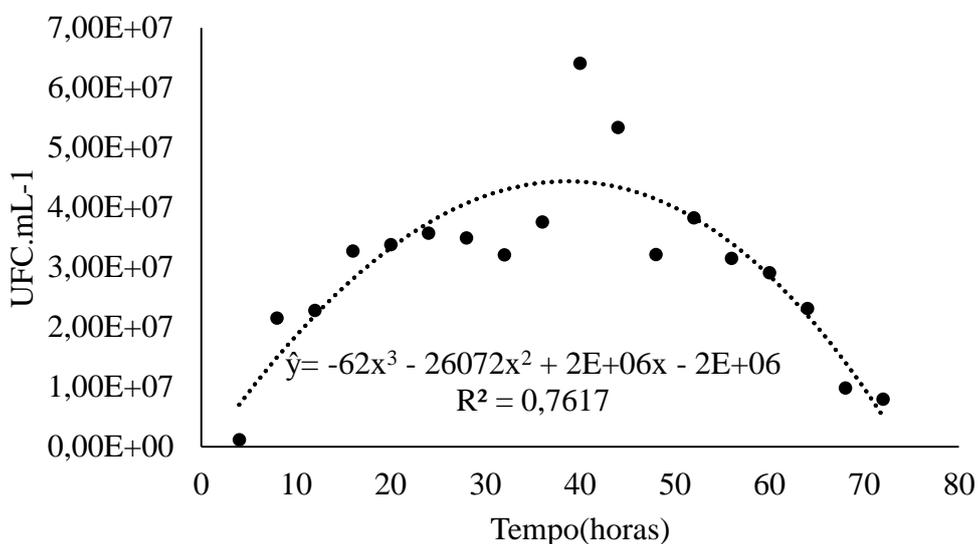


Figura 2. Curva de crescimento de *Bacillus subtilis*-34 em meio TSB.

2.3.2 Avaliação de diferentes épocas de aplicação da formulação líquida de *B. subtilis*, em arroz, no controle de *M. javanica* e desenvolvimento da alface

As plantas de alface que receberam a formulação líquida de *B. subtilis*-34 em arroz, aplicada ao vaso e ao tubete+ vaso apresentaram menores valores de número de galhas por grama de raiz, número de massa ovos por grama de raiz. O número de ovos por grama de raiz foi significativamente menor em todos os tratamentos que receberam a formulação líquida de *B. subtilis*-34 em relação ao Onix® e a testemunha. O fator de reprodução de *M. javanica* foi menor no tratamento de rega aplicada ao tubete seguido da aplicação em vaso e vaso + tubete.

A aplicação em tubete reduziu o fator de reprodução do nematoide em 30,55% e 36,07% em relação ao Onix® e testemunha respectivamente (Tabela 1). Resultados positivos de *B. subtilis* em reduzir populações de nematoides, principalmente com espécies de *Meloidogyne*, em culturas como arroz, tomateiro e bananeira têm sido constatados em outros trabalhos (LUDWIGE et al., 2013; FERNANDES et al., 2014; ARAÚJO et al. 2007). Não houve ocorrência de juvenis de segundo estágio no solo em nenhum dos tratamentos, provavelmente, os J2 que eclodiram infectaram novamente as raízes.

Tabela 1. Número de galhas por grama de raiz (NG/g), massas de ovos, por grama de raiz (MO/g), número de ovos por grama de raiz (NO/g) e fator de reprodução (FR) de *M. javanica* em alface submetida à aplicação em diferentes épocas de *B. subtilis*-34 via formulação líquida de arroz.

Tratamentos	NG/g	MO/g	NO/g	FR
Vaso	8,00a	2,25a	1.686,52a	2,90b
Tubete + Vaso	8,12a	3,00a	1.562,07a	3,07b
Tubete	21,75b	7,75b	2.173,50a	2,41a
Testemunha Absoluta	36,50c	11,62b	4.784,71b	3,77c
Onix®	47,00c	9,62b	5.800,99b	3,47c
CV (%)	41,85	61,54	40,00	15,37

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Espécies de *Bacillus* interrompem o ciclo de vida do nematoide por meio da produção de metabolitos tóxicos que restringem sua mobilidade, impedem a eclosão e penetração do juvenil nas raízes das plantas (KAVITHA et al., 2007). Alguns autores evidenciaram a redução da população de *M. incognita* em tomateiro inoculado com espécies de *Bacillus* (SILVA et al., 2017), outros observaram que os metabolitos produzidos por *B. subtilis* desencadeiam reações de hipersensibilidade nas células vegetais e afetam a oviposição, impedindo que as fêmeas dos nematoides consigam energia suficiente para produzir ovos (SHARMA e GOMES 1996).

O gênero *Bacillus* é descrito como um dos principais grupos microbianos com capacidade de agir no controle de fitopatógenos por meio da síntese de metabólitos secundários,

que, em geral, apresentam ampla gama de inibição às diversas espécies de fitopatógenos (SANSINENEA e ORTIZ 2011). *Bacillus* secretam muitos metabólitos secundários, incluindo antibióticos, antifúngicos e sideróforos. Os metabólitos produzidos por *Bacillus* podem também afetar a microflora na rizosfera, fornecendo um ambiente antagônico aos patógenos, ou podem desencadear respostas de defesa do hospedeiro (VELUSAMY e GAMA-MANICHAN 2008). As proteínas cry produzidas por espécies de *Bacillus* são tóxicas a nematoides, tanto os de vida livre como os fitoparasitas, a produção de proteases por parte desse grupo de bactérias têm sido propostas como fatores de virulência em sua patogênese contra nematoides (LIAN et al., 2007).

B. subtilis-34 aplicado por meio de rega no vaso e aplicado via rega no vaso + tubete promoveram um número maior de folhas, diâmetro de cabeça e MSPA significativamente superior as aplicações no tubete, a testemunha e o produto comercial Onix[®]. As aplicações via vaso e vaso + tubete aumentaram o número de folhas em relação à testemunha em torno de 80,02 e 73,56 %. Já em relação ao Onix[®] o aumento foi de 83,52 e 76,94%. A variável diâmetro da cabeça aumentou 81,98 e 75,42% quando se aplicou a formulação no vaso e vaso + tubete, respectivamente em relação à testemunha; quando se comparou com o Onix[®] o aumento foi de 94 e 87,73%. Na variável MSPA, considerando as aplicações no vaso e no vaso + tubete, o aumento foi de 21,74 e 17,94% em relação à testemunha e em relação ao Onix[®] foi de 23,38 e 19,54%.

A altura e a MFPA das plantas de alface que receberam *B. subtilis*-34 no vaso foi significativamente superior aos demais tratamentos, tendo um acréscimo de cerca de 119 e 322,22% respectivamente em relação a testemunha. Já a aplicação via vaso e vaso + tubetes proporcionou aumento de 98,61 e 155% da MFR em relação à testemunha e ao produto comercial Onix[®]. O efeito *in situ* pela exposição de células vivas de *B. subtilis* pode ocasionar também aumento na biometria vegetal (HAMMANI et al., 2009), refletindo em ganhos de produtividade, sendo a bactéria usada comercialmente para ambos os fins (NGUGI et al., 2005; YAO et al., 2006).

Tabela 2. Número de folhas (NF), altura (A) (cm), diâmetro de cabeça (DC), matéria fresca de parte aérea (MFPA) (g), matéria seca de parte aérea (MSPA) (g) e matéria fresca de raiz (MFR) (g) de alface, infectada por *M. javanica*, submetida à aplicação em diferentes épocas de *B. subtilis*-34 via formulação líquida de arroz.

Tratamentos	NF	A (cm)	DC(cm)	MFPA (g)	MSPA (g)
Vaso	34,87a	7,12a	41,62a	76,00a	11,87a
Tubete + Vaso	33,62a	6,25b	40,12a	64,12b	11,50a
Tubete	26,25b	5,00c	28,12b	23,50c	9,87b
Testemunha Absoluta	19,37c	3,25c	22,87c	18,00c	9,75b

Onix®	19,00c	3,62c	21,37c	17,12c	9,62b
CV (%)	11,39	15,32	5,53	22,235	9,76

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

B. subtilis tem sido usado comercialmente para o biocontrole de doenças de plantas, assim como para aumentar a produtividade das culturas (NGUGI et al., 2005; YAO et al., 2006). *B. subtilis* (PRBS-1) aplicado sobre o tomateiro reduziu a reprodução do nematoide das galhas e promoveu o crescimento das plantas sob condições de casa de vegetação (ARAUJO e MARCHESI, 2009). Mudanças de bananeira tratadas com Nemathel® reduziram a reprodução de *Radopholus similis*, *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. e *Helicotylenchus* spp. com eficiência equiparada ao nematicida carbofurano (ARAUJO et al., 2018). Plantas de tomate que receberam aplicações de *B. subtilis* apresentaram maior crescimento de parte aérea, caracterizando a bactéria como promotora de crescimento de plantas e esse efeito pode ser devido, em parte, a produção de fitorreguladores de vegetais na rizosfera (ARAUJO e BETTIOL, 2005).

2.3.3 Avaliação da viabilidade de *B. subtilis* em formulação líquida arroz, em temperatura ambiente e geladeira

Ao longo do período de armazenamento em ambas as condições houve oscilações na concentração do número de células bacterianas, com valores maiores e menores se alternando (Figura 3). Aos 4 meses, o número de UFC da formulação armazenada em condições ambiente e em geladeira foi de $12,5 \times 10^8$ e $6,3 \times 10^8$, respectivamente. Aos 6 meses, o número de células viáveis se aproxima nas duas condições de armazenamento $7,7 \times 10^8$ em ambiente e $6,7 \times 10^8$ em geladeira. Aos 7 meses verifica-se que o número de UFC permanece aproximadamente constante $7,8 \times 10^8$ em condições ambiente, enquanto em refrigeração ocorre uma redução para $3,8 \times 10^8$ UFC, este valor se mantém aproximadamente constante até aos 9 meses.

A partir de 8 meses, o número de UFC da bactéria armazenada em ambiente se torna mínimo, enquanto em geladeira o número de UFC é de aproximadamente 4×10^8 aos 9 meses. O ambiente refrigerado prolongou a “vida de prateleira” da bactéria em dois meses. Baixas temperaturas são geralmente utilizadas para preservar microrganismos garantindo o metabolismo em baixa atividade e evitando que a contaminação com outros microrganismos possa afetar a estabilidade do microrganismo de controle biológico (ALVES et al., 2011).

Um produto de controle biológico para ser economicamente viável precisa ter uma concentração mínima de 1×10^8 UFC/mL com 85% de viabilidade (D’AGOSTINI e MORANDI,

2009) o que foi alcançada pela formulação líquida de *B. subtilis*-34, em arroz, armazenada em ambiente até os sete meses e na geladeira por até nove meses.

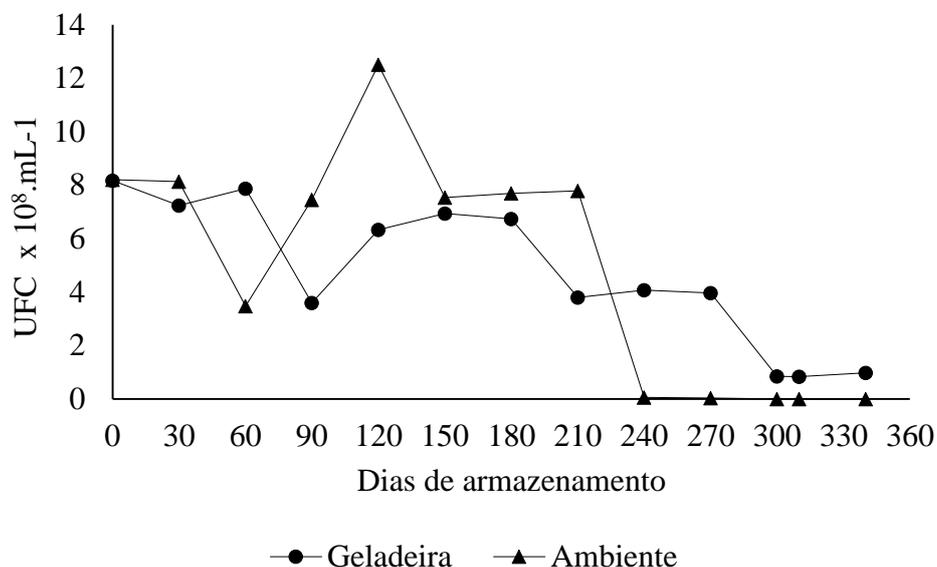


Figura 3. Número de UFCs de *B. subtilis*-34 em formulação líquida de arroz armazenada em temperatura ambiente e geladeira por doze meses.

Os resultados verificados no controle do nematoide e na promoção de crescimento da alface demonstram que a formulação líquida da bactéria, em arroz, foi efetiva. Também apresentou custo inferior ao meio de cultura sintético TSB visto que para a produção de um litro do TSB são necessários US\$128,00 ao passo que para a formulação líquida de arroz são necessários US\$11,64.

2.4 CONCLUSÕES

A aplicação da formulação líquida de *B. subtilis*-34 duas vezes ao solo no vaso : controle *M. javanica* e promove maior crescimento de alface : controle.

B. subtilis-34 se mantém viável na formulação líquida de arroz até os nove meses armazenada em geladeira e até os sete meses em ambiente em condições de laboratório.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. F. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; AUGUS, N. T. Estabilidade de uma formulação de *Bacillus sphaericus* armazenada sob diferentes temperaturas. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 21-26, 2001.

ANWAR, S. A.; MCKENRY, M. V. Incidence and population density of plant parasitic nematodes infecting vegetable crops and associated yield losses. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, p. 327-333, 2012.

ARAUJO, F. F.; BETTIOL, W. Supressividade dos nematoides *Meloidogyne javanica* e *Heteroderaglycines* em soja por adição de lodo de esgoto ao solo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 806-812, 2005.

ARAÚJO, F. F.; MARCHESII, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, v. 39, p.1558-1561, 2009.

ARAÚJO, J. J. S.; MUNIZ, M. F. S.; FILHO, G. M.; ROCHA, F. S.; CASTRO, J. M. C. *Bacillus subtilis* no tratamento de mudas de bananeira infectadas por fitonematoides. **Revista Ceres**, v. 65, p.99-103, 2018.

ARAÚJO, J. J. S.; MUNIZ, M. F. S.; FILHO, G. M.; ROCHA, F.S.; CASTRO, J. M. C. *Bacillus subtilis* no tratamento de mudas de bananeira infectadas por fitonematoides. **Revista Ceres**. 2018; 65: 99-103. 2018.

BERNINGER, T.; LÓPEZ, O. G.; BEJARANO, A.;PREININGER, C.; SESSITSCH, A. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of no-sporulating bacterial inoculants. **Microbial Biotechnology**, v. 11, p. 277 - 301, 2018.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exiguae* cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 553,1981.

CARVALHOFILHO, J. L. S. de.; GOMES, L. A. A.; MALUF, W. R. Tolerância ao florescimento precoce e características comerciais de progênies F4 de alface do cruzamento Regina 71 x Salinas 88. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, p. 37-42, 2009.

D` AGOSTINO, F.; MORANDI, M. A. B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para controle de fitopatógenos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2009.

FERNANDES, R. H.; VIEIRA, B. S.; FUGA, C. A. G.; LOPES, E. A. *Pochonia chlamydosporiae* *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 194-200, 2014.

FERREIRA, D. F. SISVAR: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p. 36- 41, 2008.

FIORINI, C. V. A.; GOMES, L. A. A.; LIBÂNIO, R. A.; MALUF, W.R.; CAMPOS, V. P.; LICURSI, V.; MORETO, P.; SOUZA, L. A. de.; FIORINI, I, V.A. Identificação de famílias F2:3 de alface homozigotas resistentes aos nematoides das galhas. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p.509-513, 2007.

FORMSTONE, A.; CARBALLIDO-LOPEZ, P.; NOIROT, J.; ERRINGTON, D.; SCHEFFERS, J. Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. **Journal Bacteriology**, v. 190, p. 1812-1821, 2008.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAODU, B.; REBAI, A.; NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14 B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.253-260, 2009.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. A. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028, 1973.

Instituto Superior de Ciências da Saúde do Sul. Manual Prático de microbiologia. 2018. Acessado em 07 de julho de 2018. Disponível: <http://www.codigopostal.cibeforma.pt/dir/0/instituto-superior-de-ciencias-da-saude-sul/>.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, 1964.

KAVITHA, J.; JONATHAN, E. I.; UMAMAHESWARI, R. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood on sugarbeet. **Journal of Biological Control**, v. 21, p. 211-215, 2007.

KILLANI, A.S.; ABAIDOO, R.C.; AKINTOKUN, A.K.; ABIALA, M. A. Antagonistic effect of indigenous *Bacillus subtilis* on root-/soil-borne fungal pathogens of cowpea. **Researcher**, v.3, p. 11-18, 2011.

LEE, Y. S.; KIM, K. Y. Antagonistic potential of *Bacillus pumilus* L1 against root-Knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. **Journal Phytopathology**, v. 164, p.29-39, 2016.

LIAN, L. H.; TIAN, B. Y.; XIONG, R.; ZHU, M. Z.; XUL, J.; ZHANG, K. Q. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 262 - 269, 2007.

LUDWIGI, J.; MOURÃO, A. B.; GOMES, C. B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 264-268, 2013.

MATRASZEK, R.; NOWAK, B. H.; CHWIL, S.; CHWIL, M. Macroelemental composition of cadmium stressed lettuce plants grown under conditions of intensive sulphur nutrition. **Journal of Environmental Management**, v. 180, p. 24-34, 2016.

NGUGI, H. K.; DEDEJ, S.; DELAPLANE, K. S.; SVELLE, A. T.; SCHERM, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v. 33, p.32-38, 2005.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouwhogeschule Wageningen**, v.66, n.4, p.1-46, 1966.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R.B.; CARVALHO, A.D.F.; RODRIGUES, C.S.; SUINADA, F.A. **Manejo de nematoides na cultura do alface**. 1ed. Embrapa: Brasília. 2013.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V.P.; XAVIER, A. A.; ROCHA, L. S.; RIBEIRO, H.B.; AGUIAR, F. M.; SOUZA, E. H.; MIZOBUTSI, E. H.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica* e mal do Panamá em bananeira. **Nematropica**, v. 42, p. 218-226, 2012.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letters**, v. 33, p.1523–1538, 2011.

SHARMA, A.; MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Molecular characterization and bioinformatics studies of a lipase from *Bacillus thermoamylovorans* BHK67. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p.2131-2140, 2018.

SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Effects of *Bacillus* spp. Toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, v. 20, p. 53-62, 1996.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, v. 50, p. 205-211, 2009.

SILVA, J. O.; SANTANA, M.V.; FREIRE, L. L.; FERREIRA, B. S.; ROCHA, M. R. Biocontrol agents in the management of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Ciência Rural**, v. 47, p. 1-7, 2017.

TIAN, B.; YANG, J.; LIAN, L.; WANG, C.; LI, N.; ZHANG, K. Q. Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p.372-380, 2007.

VELUSAMY, P.; GNANAMNICKAM, S. S. The Effect of bacterial secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens of rice. In: KARLOVSKY, P. **Secondary Metabolites in Soil Ecology**. 14ed. Berlin: Springer, 2008.

YAO, B. H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. Effect of FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 39, p. 323-328, 2006.

ZHANG, L.; YU, J.; XIE, Y.; LIN, H.; HUANG, Z.; XU, L.; GELBIC, I.; GUAN, X. Biological activity of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) chitinase against *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida: Rhabditidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 551-558, 2014.

CAPITULO 3: EFEITO DE *Bacillus subtilis* SOBRE *Meloidogyne javanica* E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar em condições controladas a ação de formulação líquida alternativa a base de *Bacillus subtilis* isolado 34 sobre *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e oito repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. O experimento foi montado em casa de vegetação. Os tratamentos constituíram de diferentes épocas de aplicação das bactérias nas mudas de tomate: aplicação da bactéria no tubete aos oito e quinze dias após emergência; aplicação da bactéria no tubete aos oito e quinze dias após emergência e no vaso aos 25 e 35 dias após transplântio; aplicação da bactéria aos 25 e 35 dias após transplântio para o vaso; produto comercial Onix[®] (*Bacillus methylophilicus*-UFPEDA20) e a testemunha. Após 60 dias de transplântio avaliou-se o número de massas de ovos, número de galhas, número de ovos, número de J2 e fator de reprodução, altura, massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca da raiz de plantas de tomate. Houve redução do número de J2, ovos por raiz e ovos por grama de raiz quando a formulação da bactéria foi aplicada no tubete + vaso e no vaso. A aplicação da bactéria no tubete + vaso e no vaso apresentaram os maiores valores de incremento de massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca da raiz. A aplicação da formulação líquida de *B. subtilis* isolado 34 ao solo no vaso e no tubete + vaso reduziu a reprodução de *M. javanica* e promoveu maior desenvolvimento do tomateiro.

Palavras-chave: Controle biológico, nematoide das galhas, tomate.

ABSTRACT

To evaluate under controlled conditions the effect of alternative liquid *Bacillus subtilis* isolate 34 formulation on *Meloidogyne javanica* and on tomato growth promotion. The design was completely randomized with five treatments and eight replicates. The results were submitted to the analysis of variance and the averages compared by the Tukey test with 5% error probability. The experiment was set up during the period from 02/13/2018 to 04/20/2018 in greenhouse located at the State University of Montes Claros, municipality of Janaúba, MG, Brazil. The treatments consisted of different times of application of bacteria in tomato seedlings: application of bacteria in the tube at eight and fifteen days after emergence; application of bacteria in the tube at eight and fifteen days after emergence and in pots at 25 and 35 days after transplanting; application of bacteria at 25 and 35 days after transplantation in the pot; Onix[®] commercial product (*Bacillus methylophilicus*-UFPEDA20) and control. After 60 days of transplanting, the number of egg masses, number of galls, number of eggs, number of J2 and reproduction factor, height, fresh and dry shoot mass and fresh root mass of tomato plants were evaluated. There was a reduction in the number of J2, eggs pre root, and eggs per gram of root when the bacteria formulation was applied in the tube + pot and in pot only. The application of the bacteria in the tube + pot and in only pot only presents the highest increase of fresh and dry shoot mass and fresh root mass. The application of the liquid *B. subtilis* isolated 34 formulations to the soil in the pot and tube + pot reduced the reproduction of *M. javanica* and promoted greater tomato development.

Keywords: Biological control, root-knot nematode, tomato.

3.1 INTRODUÇÃO

Os fitonematoides são pragas que atacam a maioria das espécies de plantas cultivadas e causam perdas agrícolas consideráveis em todo o mundo (LI et al., 2015). Estima-se que 10% da produção mundial de vegetais é afetada por nematoides e 50% dessas perdas são causadas por espécies de *Meloidogyne* denominados de nematoides-de-galhas (PERRY e MOENS, 2013). Em tomateiro no Brasil, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* são considerados como uns dos principais nematoides dentre as 43 espécies em 21 gêneros associadas à cultura. (BALI et al., 2018;CAMPOS et al., 2000).

Durante o parasitismo o nematoide modifica o metabolismo de células vasculares, induzindo a sítios de alimentação denominados galhas, estas galhas abrigam de 5 a 9 células gigantes hipertrofiadas e multinucleadas, que resultam de numerosos eventos mitóticos na ausência de citocinese e tornam-se poliploides, possivelmente por sucessivos ciclos de endorreduplicação (ENGLER et al., 2012). As galhas abrigam o nematoide deste seu estágio juvenil, até o final do seu ciclo de vida (fêmea adulta), privando a planta de seus nutrientes (CHENG et al., 2015). Externamente o que se verifica são sintomas de amarelecimento e murcha (LAMOVSSEK et al., 2017).

Durante décadas o controle baseou-se em nematicidas químicos, no entanto, estes estão sendo retirados do mercado devido sua alta toxicidade para a saúde humana, contaminação ambiental, efeitos deletérios sobre microrganismos benéficos e seleção de cepas do patógeno resistentes ao nematicida (LI et al., 2015). A rotação de cultura embora seja uma técnica amplamente difundida, é limitada a alguns sistemas de cultivo por causa da característica cosmopolita e de sobrevivência a longo prazo do fitopatógeno (VAGELAS e GOWEN, 2012). A diversidade genética entre populações de fitonematoides limita o uso de cultivares resistentes (LAQUALE et al., 2018).

Alternativas não químicas e ecológicas tais como o controle biológico de nematoides por meio de rizobactérias têm sido investigadas e já existem produtos comerciais formulados a base dos referidos antagonistas. Rizobactérias são bactérias colonizadoras de raízes que formam relações simbióticas com plantas. Podem se estabelecer na rizosfera independentemente das populações de nematoides, o que confere uma vantagem sobre o fitopatógeno (XIANG et al., 2018). O gênero *Bacillus* se destaca em trabalhos de biocontrole de nematoides parasitas de plantas (CETINTAS et al., 2018).

O modo de ação de *Bacillus* spp. para biocontrole de nematoides endoparasitas sedentários e migradores incluem redução da penetração do juvenil, inibição da eclosão,

competição por nutrientes, antibiose associados a bioatividade de metabolitos e produção de enzimas líticas (MENDOZA et al., 2008). Também desencadeiam reação de resistência sistêmica nas plantas pelo fortalecimento mecânico e físico da parede celular, deposição de calos e acumulação de compostos fenólicos ou síntese de compostos bioquímicos supra reguladores na reação de defesa (ALJAAFR et al., 2017). Além do controle de fitopatógenos, *Bacillus* pode melhorar o crescimento das plantas pela produção de várias substâncias que aumentam a absorção de nutrientes e rendimento das plantas (KUMAR et al., 2016), ajudar na absorção de água e, portanto, melhorar a capacidade de sobreviver a estresse hídrico (VILLAH et al., 2016).

Espécies de *Bacillus* spp. podem melhorar o crescimento radicular (LIU et al 2017) e têm sido descritas como opção ecológica para restaurar e/ ou aumentar a disponibilidade de nutrientes para numerosas espécies vegetais, incluindo o tomateiro (VAIKUNTAPU et al., 2014). Geralmente os produtos biológicos formulados disponíveis no mercado são bastante caros e oneram o custo de produção das culturas. Diante do exposto acima, objetivou-se avaliar a ação de formulação alternativa de *Bacillus subtilis* sobre *M. javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Produção das mudas de tomate

As mudas de tomate cultivar “Kada Gigante” foram obtidas pela semeadura em tubetes de isopor contendo substrato Bioplant[®]. Após 15 dias, as mudas foram transplantadas para vaso de 3 dm³ contendo substrato composto por solo e areia na proporção 3:1. Este foi previamente autoclavado a 1 atm e 121°C por trinta minutos por três vezes consecutivas a intervalos de 24 horas. O solo foi corrigido com calcário dolomítico para correção do pH e após 40 dias de incubação, o solo foi adubado conforme a recomendação para a cultura.

3.2.2 Produção e aplicação do isolado bacteriano

Foi utilizado o isolado de *B. subtilis*-34 mantido em água mineral em tubos de vidro em condição ambiente. A partir desta suspensão retirou-se uma alíquota e colocou-se em erlenmeyers de um litro contendo água destilada. Foram adicionados os seguintes componentes em % arroz cru (30%), açúcar cristal (3%) e sais (2%). Os compostos químicos, o açúcar, a

água e o arroz foram autoclavados a 1,0 atm a 120°C por 30 minutos. A formulação apresentou pH final de 7(±0,2). Este foi incubado por 48 horas, após esse período realizou-se a filtragem em peneira de 2 mm.

3.2.3 Multiplicação do inóculo de *Meloidogyne javanica*

Meloidogyne javanica foi cultivado em tomateiro “Kada Gigante”, durante 90 dias. Após esse período as raízes foram retiradas do solo, lavadas e os ovos foram extraídos e quantificados em câmara de Peters segundo método proposto por Hussey e Barker (1973) modificado por Bonetti e Ferraz (1981). A suspensão de ovos foi ajustada para 1000 ovos + eventuais J2 por mililitro. A inoculação de *M. javanica* ocorreu 24 horas após o transplântio das mudas para o vaso. Cada planta recebeu cinco mL de suspensão contendo 5000 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J2). A aplicação foi feita em três orifícios ao redor de cada planta.

3.2.4 Montagem do ensaio

O experimento foi montado em blocos inteiramente casualizado com cinco tratamentos (T1- aplicação nos tubetes aos oito e quinze dias, T2- aplicação nos tubetes aos oito e quinze dias e nos vasos aos 25 e 35 dias após transplântio, T3- nos vasos aos 25 e 35 dias após transplântio, T4- Onix® produto comercial (*Bacillus methylotrophicus* - UFPEDA 20 isolado) e T5- Controle (sem aplicação de rizobactéria, sem aplicação do produto comercial) e oito repetições.

Um dia após o transplântio de mudas de tomateiro para vasos realizou-se a aplicação de 5 mL de suspensão de ovos + eventuais J2 em três furos de 0,5 cm de profundidade no solo ao redor das mudas. Cada aplicação da formulação da rizobactéria nos tubetes e nos vasos foi feita por meio de rega de 2 mL e 150 mL no solo no entorno das mudas, respectivamente. No tratamento Onix, o solo de cada vaso recebeu um volume de calda de 250 mL, a partir da diluição de 4 mL do produto em 1000 mL de água, conforme instruções no rótulo.

Após 60 dias de transplântio avaliou-se: o número de galhas por raiz e por grama de raiz; número de ovos por raiz e por grama de raiz; juvenis de segundo estágio (J2) /200cm³; e o fator de reprodução foi calculado por meio da fórmula: $FR = Pf/Pi$, onde Pf é a população final e Pi é a população inicial (Oostenbrink, 1966). As massas de ovos foram quantificadas após imersão das raízes em floxina B (150 mg.L⁻¹). O número de J2 e o número de ovos foram

quantificados após a extração de acordo com as técnicas de Jenkins (1964) e Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981), respectivamente. A quantificação dos J2 e de ovos foi feita em câmara de Peters em microscópio invertido. Foram avaliadas também variáveis agrônômicas: altura de plantas, massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca da raiz. Para determinação da massa seca, as plantas foram colocadas em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingirem peso constante.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% e 1% de probabilidade. As análises foram realizadas no software “Sisvar” (FERREIRA, 2008).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos, aplicação da formulação de *B. subtilis* isolado 34 no tubete, no tubete e no vaso e apenas no vaso não reduziram o número de galhas e massas de ovos por grama de raiz em relação ao Onix® e a testemunha (Tabela 1).

Tabela 1. Número de galhas (NG/g) e massas de ovos por grama de raiz (MO/g) em mudas de tomate submetidas à aplicação de *M. javanica* e *B. subtilis* isolado 34.

Tratamentos	NG/g	MO/g
Tubete	10,28a	1,78ab
Tubete + Vaso	19,40b	1,97ab
Vaso	12,31ab	1,21a
Onix®	10,67a	1,50ab
Testemunha Absoluta	13,82ab	2,03b
CV (%)	43,28	24,71

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O número de J2, ovos e ovos por grama de raiz foi influenciado pela forma de aplicação da bactéria, sendo que, quando esta foi aplicada em tubete + vaso e em vaso apresentaram os menores valores dessas variáveis (Tabela 2). As reduções de J2 em relação à testemunha foram de 93,35% para aplicação no tubete + vaso e de 94,50 quando a aplicação foi apenas no vaso. O número de ovos por raiz reduziu em 73,27% quando a aplicação foi feita no tubete + vaso e em 73,42% quando apenas no vaso.

Quando a formulação a base de *B. subtilis* foi aplicada no tubete + vaso, a redução de ovos por grama de raiz foi de 90% e quando aplicada apenas no vaso, a redução foi de 90,64%. Em consequência o fator de reprodução também foi afetado, sendo que as aplicações da formulação da bactéria no tubete + vaso e no vaso reduziram em 73,20% e 73,38%,

respectivamente em relação a testemunha. A formulação de *B. subtilis* isolado 34 aplicada no tubete + vaso e apenas no vaso foi tão eficiente quanto o produto Onix®.

Tabela 2. Número juvenis de segundo estágio (J2), ovos por raiz (NO/raiz), ovos por grama de raiz (NO/g) e fator de reprodução de *M. javanica* em tomateiro submetido ao tratamento com formulação líquida de *B. subtilis* isolado 34 em épocas diferentes.

Tratamentos	J2	NO/raiz	NO/g	FR
Tubete	43,73ab	27,065,00b	927,50b	5,41b
Tubete + Vaso	7,25a	7,441,00a	130,18a	1,49a
Vaso	6,00a	7,397,75a	121,88a	1,48a
Onix®	56,12ab	13,890,37ab	589,01ab	2,78ab
Testemunha Absoluta	109,12b	27,841,00b	1,302,92c	5,56b
CV (%)	85,57	64,76	83,18	64,75

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A altura das plantas de tomate não foi influenciada pela presença da formulação líquida a base de *B. subtilis* -34 ($p < 0,05$) (Tabela 3). Já as variáveis massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca da raiz foram influenciadas pela aplicação da bactéria. A aplicação da bactéria no tubete + vaso e no vaso, proporcionaram incrementos de 168,99% e 168,51% da massa fresca da parte aérea das plantas de tomate em relação à testemunha.

O incremento na massa seca da parte aérea foi de 130,60% e 124,25% para aplicação no tubete + vaso e no vaso, respectivamente. A aplicação da bactéria no tubete + vaso e no vaso aumentaram a massa fresca da raiz em 168,99% e 168,51% respectivamente. A formulação a base de *B. subtilis* aplicada no tubete + vaso e no vaso promoveram maior desenvolvimento do tomateiro quando comparado ao produto comercial Onix®. O aumento da massa fresca de parte aérea, massa seca de parte aérea e massa fresca de raiz de plantas submetidas à aplicação da formulação no vaso em relação ao Onix® foi de 169,78%, 124,13% e 133,15%, respectivamente.

Tabela 3. Altura de plantas (A), massa fresca (MFPA) e seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca da raiz (MFR) de plantas de tomateiro submetidas a aplicação de *M. javanica* e *B. subtilis* isolado34.

Tratamentos	A (m)	MFPA(g)	MSPA (g)	MFR (g)
Tubete + Vaso	1,03a	181,92a	38,88a	62,92a
Vaso	1,62a	181,59a	37,81a	62,74a
Tubete	1,10a	70,67b	18,10b	31,39b
Onix®	1,12a	67,31b	16,87b	26,91b
Testemunha Absoluta	1,18a	67,63b	16,86b	26,79b
CV (%)	10,48	21,48	20,83	40,92

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As rizobactérias promotoras de crescimento são bactérias de vida livre que colonizam as raízes e estimulam o crescimento das plantas. Muitas dessas bactérias secretam uma série de metabólitos extracelulares que podem estar envolvidas no controle biológico de patógenos de plantas (CETINTAS et al., 2018). Por meio dos testes em condições controladas foi possível verificar que a rizobactéria *B. subtilis* isolado 34 é capaz de reduzir a severidade de *M. javanica* e promover crescimento das mudas tomate. O ciclo de vida e o desenvolvimento de *M. javanica* ocorrem em parte na rizosfera das plantas hospedeiras, onde eles interagem com as rizobactérias antagonistas existentes que colonizam a zona da rizosfera e conseqüentemente promovem a o controle de *M. javanica* (CAWOY et al., 2011).

A redução da massa de ovos quando da aplicação da bactéria realizada antes da aplicação do nematoide (tubete) sugere que pode ter ocorrido indução de resistência sistêmica nas plantas de tomate. Rizobactérias do gênero *Bacillus* podem ativar sistemas de defesa das plantas (VAN LOON et al., 2007). A percepção das plantas pelos agentes indutores inicia o processo e a expressão da resistência é verificada por meio da produção de fitoalexinas, proteínas ligadas a patogênese, lignificação de paredes, morte das células adjacentes, entre outros (EL-HADAD et al., 2010).

No presente trabalho, a população de J2 foi significativamente menor nos tratamentos onde a formulação líquida a base de *B. subtilis*-34 foi aplicada no tubete+ vaso e no vaso em relação a testemunha. De acordo com Tefere et al. (2009), espécies de *Bacillus* são responsáveis pela secreção de enzimas como protease e quitinase que estão ligadas a atividade nematicida contra os juvenis de *Meloidogyne* spp. Esses autores ressaltam que se atividade microbiana da bactéria ocorrer na rizosfera de plantas implicará na redução de nematoides patogênicos, criando um ambiente favorável ao crescimento radicular (TEFERE et al., 2009). A capacidade de *B. subtilis* inibir a eclosão de juvenis é extremamente significativo, pois cerca de 500 juvenis podem eclodir a partir de uma única massa de ovos e em seguida iniciar um novo ciclo de vida (BURKETT-CADENA et al., 2008).

A redução do número de ovos também foi significativa com aplicação da bactéria. Formulações contendo cepas de *Bacillus* reduziram o número de ovos de *M. incognita* em tomate (BASYON e ABO-ZAID, 2018). Atividade de *B. subtilis* sobre os ovos de *M. incognita* está relacionada à capacidade da bactéria em produzir enzimas líticas que afetam a cutícula e os ovos do nematoide (MENDONZA et al., 2008). Outros autores relatam que a inibição do

desenvolvimento de ovos e infecção das raízes por *Meloidogyne* podem estar ligados a produção de compostos secundários bioativos por espécies de *Bacillus* (QUIAO et al., 2017).

A massa fresca e seca da parte aérea do tomate, bem como a massa fresca da raiz foram aumentadas com a aplicação do isolado 34 de *B. subtilis*. Estes resultados sugerem que a colonização das raízes de tomateiro pelo isolado 34 foi bem sucedida, o que é um requisito fundamental para ação de biocontrole e promoção de crescimento de plantas (KUMAR et al., 2015). A promoção de crescimento é uma importante característica para agentes utilizados na agricultura sustentável. Espécies de *Bacillus* são conhecidas pela produção de fitormônios, sideróforos, ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de fosfato e na fixação biológica de nitrogênio (MARIN-BRUZOS E GRAYSTON, 2019).

B. subtilis mostra-se como agente promissor na redução de *M. javanica* e na promoção de crescimento de plantas de tomate e pode ser considerado como uma alternativa ao nematicidas químicos presentes no mercado. Porém alcançar um desempenho eficiente e consistente de agentes de biocontrole requer um conhecimento de técnicas de formulação, tempo de prateleira, forma de veiculação além de estudos a campo.

3.4 CONCLUSÃO

A aplicação da formulação líquida de *B. subtilis* isolado 34 ao solo no vaso e no tubete + vaso reduziu a reprodução de *M. javanica* e promoveu maior desenvolvimento do tomateiro.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJAAFRI, W. A. R.; MCNEECE, B.T.; LAWAJU, B.R.; SHARMA, K.; NIRUALA, P. N.; PANT, S. R.; LONG, D. H.; LAWRENCE, . S.; LAWRENCE, G. W.; KLINK, V. P. A harpin elicitor induces the expression of a coiled-coil nucleotide binding leucine richrepeat (CC-NB-LRR) defense signaling gene and others functioning during defense to parasitic nematodes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 121, p.161-175 2017.

BALI, S.; KAUR, P.; SHARMA, A.; OHRI, P.; BRARDWAJ, R.; ALEMENI, M.N.; WIJAVA, L.; AHMAD, P. Jasmonic acid-induced tolerance to root-knot nematodes in tomato plants through altered photosynthetic and antioxidative defense mechanisms. **Protoplasma**, v. 255, p. 471-484, 2018.

BASYONY, A.G.; ABO-ZAID, G. A. Biological of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, using an eco-friendly formulation from *Bacillus subtilis*, lab. and greenhouse studies. **Egyptian Journal of Biological Peste Control**, v. 28, p. 1-13, 2018.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exiguae* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p.553, 1981.

BURKETT-CADENA, M.; KOKALIS-BURELLE, N.; LAWRENCE, K.S.; VAN-SANTEN, E.; KLOEPPER, J. W. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. **Biological Control**, v. 47, p. 55-59, 2008.

CAMPOS, V. P. Doenças causadas por nematoides em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de Doenças de Plantas-Hortaliças**. 2 ed. Viçosa: 2000.

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. *Bacillus* based biological control of plant diseases. In: STOYTICHEVA, M. **Pesticides in the Modern World**. Intech Open. 2011.

CETINTAS, R.; KUSEK, M.; FATEH, A. S. Effect of some plant growth-promoting rhizobacteria strains on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomatoes. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, p. 1-5, 2018.

CHENG, X.; LIU, X.; WANG, H.; JI, X.; WANG, K.; WEI, M.; QIAO, K. Effect of emamectin benzoate on root-knot nematodes and tomato yield. **Plos One**, v. 10, p. 1-9, 2015.

COLLANGE, B.; NAVARRETE, M.; PEYRE, G.; MATEILLE, T.; TCHAMITCHAIAN, M. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection**, v. 30, p.1251-1262, 2011.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMOER, C. Suggestions four unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, p. 387- 400, 2001.

EL-HADAD, M.; MUSTAFA, M.I.; SELIM, S. M.; MAHGOOB, A. E.A.; EL-TAYEB, T. S.; AZIZ, N. H A. In vitro evaluation of some bacterial isolates as biofertilizers and biocontrol agents against the second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 2249-2256, 2010.

ENGLER, J.A.; KYND, T.; VIEIRA, P.; VAN CAPELLE, E.; BOUDOF, V.; SANCHES, V.; ESCOBAR, C.; DE VEVLDER, L.; ENGLER, G.; ABAP, P.; GHEYSEN, G. CCS52 and DEL1 genes are key components of the endocycle in nematode-induced feeding sites. **The Plant Journal**, v. 72, p.85-189, 2012.

FERREIRA, D. F. SISVAR: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p. 36- 41, 2008.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. A. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

KUMAR, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Plant growth-promoting traits of phosphate solubilizing bacteria isolated from *Hippophae rhamnoides* L. (Sea-buckthorn) growing in cold desert Trans-Himalayan Lahul and Spiti regions of India. **Acta Physiology Plant**, v. 37, p. 1-12, 2015.

- KUMAR, A.; VANDANA.; SINGH, M.; SINGH, P.P.; SINGH, S.K.; SINGH, P. K. Isolation of plant promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma long* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.8, p. 1-7, 2016.
- LAMOVSEK, J.; STARE, B.G.; PLESKO, I. M.; SIRCA, S.; UREK, G. *Agrobacterium* enhance plant defense against root-knot nematodes on tomato. **Biological Control**, v. 107, p. 681-691, 2017.
- LAQUALE, S.; CANDIDO, V.; D'ADDABBO, T. Side effects of biostimulants against root-knot nematodes on tomato. **Acta Horticulturae**, v. 1207, p.223-228, 2018.
- LI, J.; ZOU, C.; XU, J.; JI, X.; NIU, X.; YANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, K. Q. Molecular Mechanism of nematode- nematophagous microbe interactions: Basis for biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review Phytopathology**, v. 53, p.67-95, 2015.
- LIU, K.; MCLNROY, J.A.; HU, C. H.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion on the presence of pathogens. **Plant Disease**, v. 102, p. 67-72, 2018.
- LIU, K.; NEWMAN, M.; MCLNROY, J.A.; HU, C. H.; KLOEPPER, J. W. Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of multiple plant diseases. **Phytopathology**, v. 107, p. 928-936, 2017.
- MENDOZA, A. R.; KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis* the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, p. 377-389, 2008.
- OOSTENBRINK, M. **Major characteristic of the relation between nematodes and plants.** Mededlingen van de Landbouwhogeschool 1966.
- PERRY, R. N.; MOENS, M. **Plant Nematology**. 2. ed. Boston: Oxfordshire, 2013.568p.
- QIAO, J.; YU, X.; LIANG, X.; LIU, Y.; BORRIS, R.; LIU, Y. Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. **BMC Microbiology**, v. 17, p. 1-13, 2017.
- RAMALHO, R.; AFONSO, A.; CUNHA, J.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Survival characteristics of pathogens inoculated into bottled mineral water. **Food Control**, v. 12, p. 311-316, 2001.
- TEFERE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P. K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 94-99, 2009.
- TIAN, B.; YANG, J.; ZHANF, K. Q. Bacteria used the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanism of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, v.61, p. 197-213, 2007.

ULLAH, U.; ASHRAF, M.; SHAHZAD, S.M.; SIDDIQUI, A. R.; PIRACHA, M. A.; SULEMAN, M. Growth behavior of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under drought stress in the presence of silicon and plant growth promoting rhizobacteria. **Soil Environment**, v. 35, p. 65-75, 2016.

VAGELAS, I.; GOWEN, S.R. Control *Fusarium oxysporum* and root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) with *Pseudomonas oryzihabitans*. Pakistan Journal of **Phytopathology**, v. 24, p. 32-38, 2012.

VAIKUNTAPU, P.R.; DUTTA, S.; SAMUDRALA, R.B.; RAO, V. R. V.N.; KALAM, S.; PODILE, A. R. Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated. **Indian Journal Microbiology**, v.54, p. 403-412, 2014.

VAN LONN, L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal Plant Pathology**, v. 119, p. 243-254, 2007.

XIANG, N.; LAWRENCE, K.S.; DONALD, P. A. Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 166, p. 449- 458, 2018.