



CARLA MARIA CAVALCANTI RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS COMERCIAIS E DA
FERMENTAÇÃO *ON FARM* PARA O CONTROLE DE
PRATYLENCHUS BRACHYURUS EM SOJA**

LAVRAS - MG

2023

CARLA MARIA CAVALCANTI RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS COMERCIAIS E DA FERMENTAÇÃO ON
FARM PARA O CONTROLE DE *PRATYLENCHUS BRACHYURUS* EM SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

Dra. Rafaela Araújo Guimarães
Coorientadora

Dr. Willian César Terra
Coorientadora

LAVRAS-MG

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ribeiro, Carla Maria Cavalcanti.

Caracterização de produtos comerciais e da fermentação *on farm* para o controle de *Pratylenchus brachyurus* em soja / Carla Maria Cavalcanti Ribeiro. - 2023.

106 p. : il.

Orientador(a): Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros.

Coorientador(a): Rafaela Araújo Guimaraes, Willian César

Terra.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Management and metaxonomics. 2. Fermentation. 3. Bacillus spp. I. de Medeiros, Flavio Henrique Vasconcelos. II. Guimaraes, Rafaela Araújo. III. Terra, Willian César.

CARLA MARIA CAVALCANTI RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS COMERCIAIS E DA FERMENTAÇÃO ON FARM PARA O CONTROLE DE *PRATYLENCHUS BRACHYURUS* EM SOJA

CHARACTERIZATION OF COMMERCIAL PRODUCTS AND ON FARM FERMENTATION FOR THE CONTROL OF *PRATYLENCHUS BRACHYURUS* IN SOYBEANS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em: 27/04/2023

Prof. Dr. Adailson Feitosa (UNEB).

Dr. Bernardo Halfeld Vieira (Embrapa Meio Ambiente).

Prof. Dr Ricardo Magela de Souza (DFP/UFLA).

Profa. Dr^a. Mara Rubia Rocha (UFG).

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
(DFP/UFLA)

Dra. Rafaela Araújo Guimarães (DFP/UFLA)

Dr. Willian César Terra (DFP/UFLA)

**LAVRAS-MG
2023**

Dedico à minha família, em especial à minha vó Terezinha. Só eu sei o quanto foi difícil deixá-la em um momento tão difícil para iniciar esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, sabedoria, inspiração e resiliência durante toda a minha caminhada.

Uma jornada como um doutorado não é uma caminhada que se faz só. Os primeiros passos são dados lá na pré-escola. São anos de aprendizado, estudo, conhecimento, experiências, renúncias, e também companhia de muita gente de coração bom, e sem elas eu jamais teria conseguido avançar. Sempre tive apoio e incentivo da minha família, e sou extremamente grata pela educação que recebi, não só aquela quando me colocaram na escola e me fizeram permanecer nela (quem me conhece de longas datas sabe o quanto de trabalho que dei até chegar no ensino médio), mas principalmente a educação relacionada a valores da vida. Meu pai, Cláudio, minha mãe, Conceição, nunca mediram esforços para que eu e meus irmãos tivéssemos acesso ao estudo e sempre nos ensinando a importância da família e o amplo sentido da palavra amor, e que sem ele a vida não tem sentido.

Na minha caminhada, várias vezes fui motivada pelos meus irmãos, Cláudia e Caio, os quais admiro a perseverança, o senso de responsabilidade e de ajuda ao próximo. E não podia deixar de agradecer aos meus sobrinhos Laís, Miguel, e agora a Anna Beatriz. Meus dias com certeza foram mais leves quando podia partilhar com vocês.

Agradeço ao meu companheiro de vida, Victor, por todo apoio e principalmente pela paciência na reta final e, por que não dizer, pelas críticas que contribuíram para a melhoria deste trabalho. Agradeço também por me presentear com a pequena Giovana, sempre me alegrando com tanto carinho e doçura, e me acompanhando aos fins de semana para cuidar dos experimentos.

Agradeço às minhas amigas, em especial Lila, Leilinha, Nicole e Carol, que sempre se fizeram presentes, apesar da distância, me ajudando a superar momentos difíceis encontrados nesse caminho. Agradeço também aos amigos de jornada aqui na UFLA, Jana, Nay, e às Jéssicas, Rembinsky e Lima, juntas na caminhada acadêmica e pessoal. Agradeço aos meus familiares, meus cunhados Lello, Babi, meus tios, tias, primos e primas, que sempre me incentivaram.

Ao orientador, Prof. Flávio Medeiros, pela disposição e atenção dedicadas na elaboração deste trabalho. Por todo o incentivo e principalmente por acreditar em mim, quando muitas vezes eu duvidei. Aos coorientadores Rafaela e William, sem a experiência e os conselhos recebidos este trabalho não teria o sucesso que teve.

À APROSOJA, por acreditar nesse projeto e por financiá-lo. A todos os produtores de soja que participaram ativamente do projeto, que abriram suas portas para nos receber, que compartilharam suas experiências e por toda a troca que pudemos ter durante essa caminhada.

À professora Dra. Livia Soman, e ao Fernando, professores da UNIFESP, por toda orientação e ajuda na condução dos experimentos com os metabólitos.

À professora Dra. Joziana Barçante por ser sempre tão solícita compartilhando a estrutura do seu laboratório para realização das análises, além de me acolher e proporcionar momentos tão agradáveis ao longo dessa caminhada.

Ao professor Dr. Victor Pylro, por toda orientação e ajuda na execução das análises metataxonômicas.

À Luísa, técnica e amiga, sempre presente compartilhando força, experiência e risadas. À equipe GCBio, por toda ajuda, experiência e conhecimento compartilhado. Sem vocês não seria possível a condução desse experimento, em especial Livia, Ana, Otávio, Thiago, Luiz Miguel e Rafael; Ao NEFIT, por tanto aprendizado e crescimento profissional e pessoal.

Aos dirigentes, professores, funcionários e alunos da UFLA, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho; Aos professores e funcionários do PPG Fito, pela atenção e apoio que sempre dispensaram; À secretária e amiga, Ariane. Você sem dúvida foi peça chave para que esse doutorado chegasse ao fim, sempre atenciosa e

dedicada, lembrando período de matrícula, salvando com os prazos apertados e emprestando seu ombro amigo.

Ao NINTEC, por toda compreensão na fase final para conclusão da tese. E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

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

Se eu cheguei até aqui, foi graças a cada um de vocês. Meu muito obrigada!

"Nunca é tarde demais para ser o que você poderia ter sido." George Eliot

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez" George B. Shaw

RESUMO

O manejo do nematoide das lesões radiculares na soja (*Glycine max*), *Pratylenchus brachyurus*, é baseado na integração de fatores culturais, químicos e biológicos, sendo o manejo cultural e o controle biológico considerados ferramentas indispensáveis. Na primeira parte deste estudo é apresentada uma revisão de literatura abordando o patossistema *P. brachyurus*-soja, bem como as principais práticas de manejo. Além disso, faz-se uma abordagem de agentes de biocontrole, com ênfase no gênero *Bacillus* e os possíveis benefícios da adoção desse agente de controle biológico dentro do manejo integrado de nematoides em campo. Na segunda parte do estudo foi realizada uma avaliação da qualidade dos produtos produzidos por fermentação *on farm* em diferentes regiões do Estado do Mato Grosso, durante o período de 2ª safra de 2019/20 e safra 2020/21, totalizando 125 amostras coletadas. Essas amostras foram utilizadas para quantificação de células bacterianas endosporogênicas e para avaliar o desempenho destes fermentados na redução da penetração do *P. brachyurus* em raízes da soja. Foi feita análise da microbiota entre as amostras de dois produtos comerciais, onix e nemacontrol, e suas fermentações obtidas de diferentes sistemas de produção. Para o sequenciamento metaxenômico das amostras foi utilizado fragmento parcial da região 16S do rDNA. Foi obtida a alfa diversidade e beta-diversidade microbiana das amostras avaliadas. Posteriormente foi feita a validação das condições de fermentação e eficiência em campo de cinco ensaios realizados junto aos produtores em áreas com histórico de perdas pelo nematoide das lesões radiculares. Para as células endosporogênicas, apenas 3 produtos se mantiveram com quantificação média de 10^8 UFC mL⁻¹, tanto no produto comercial, quanto no fermentado, sendo que todos eles apresentavam *Bacillus amyloliquefaciens* como base. Dentre as variáveis analisadas para o teste de eficiência, apenas a penetração de nematoides nas raízes apresentou diferença entre as amostras, com destaque para 4 produtos distintos. Observou-se que a utilização de produtos resultantes da fermentação *on farm* em condições otimizadas pode permitir a redução de nematoides. A análise microbiana revelou abundância relativa de 100% nas amostras comerciais, enquanto as fermentadas tiveram uma grande variação na sua composição de gêneros de diferentes bactérias, sem nenhum padrão entre elas. Pela alfa diversidade, foi possível observar separação entre composição de produtos comerciais e *on farm*. Enquanto a beta diversidade mostrou um agrupamento entre as amostras fermentadas e entre as comerciais. Ressalta-se a importância de se entender a composição e a eficiência do sistema de fermentação, sendo o *on farm* uma ferramenta para aumentar a produtividade, e as áreas devem ser manejadas com foco na integração do controle biológico com outras práticas de manejo.

Palavras-chaves: Fermentação. *Bacillus spp.*. *Pratylenchus brachyurus*. Manejo e metaxenômica.

ABSTRACT

The management of soybean root lesion nematode (*Pratylenchus brachyurus*) is based on the integration of cultural, chemical, and biological factors, with cultural practices and biological control considered essential tools. The first part of this study presents a literature review focusing on the pathosystem *P. brachyurus*-soybean, as well as the main management practices. Additionally, biocontrol agents are discussed, with emphasis on the *Bacillus* genus and the potential benefits of adopting this biological control agent within the integrated nematode management in the field. In the second part of the study, the quality of on-farm fermented products in different regions of Mato Grosso State was evaluated during the 2nd crop of 2019/20 and the 2020/21 crop, with a total of 125 collected samples. These samples were used to quantify endospore-forming bacterial cells and assess the performance of these fermentates in reducing *P. brachyurus* penetration in soybean roots. Microbiota analysis was conducted between samples of two commercial products, Onix and Nemacontrol, and their fermentations obtained from different production systems. Metataxonomic sequencing of the samples utilized a partial fragment of the 16S rDNA region. Alpha diversity and beta-diversity of the microbial samples were assessed. Subsequently, the fermentation conditions and field efficiency were validated in five trials conducted with producers in areas with a history of losses due to root lesion nematodes. Concerning endospore-forming cells, only 3 products maintained an average quantification of 10^8 CFU mL⁻¹, both in the commercial product and in the fermentate, with all of them having *Bacillus amyloliquefaciens* as the base. Among the variables analyzed for the efficiency test, only nematode penetration in the roots showed a difference between the samples, with 4 distinct products standing out. It was observed that the use of on-farm fermented products under optimized conditions may allow for nematode reduction. Microbial analysis revealed a relative abundance of 100% in commercial samples, while the fermented samples showed a wide variation in the composition of different bacteria genera, with no discernible pattern among them. Alpha diversity showed separation between the composition of commercial and on-farm products, while beta diversity showed clustering among the fermented and commercial samples. Understanding the composition and efficiency of the fermentation system is essential, with on-farm fermentation being a tool to increase productivity. Areas should be managed with a focus on integrating biological control with other management practices.

Keywords: Fermentation. *Bacillus spp.*. *Pratylenchus brachyurus*. Management and metaxonomics.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Patossistema <i>Pratylenchus brachyurus</i> – soja.....	13
2.2 Controle Biológico.....	16
2.3 <i>Bacillus</i> spp.	18
2.4 Formulação de <i>Bacillus</i>	19
2.5 Produção <i>on farm</i>	21
2.6 Metabólitos envolvidos no controle de nematoides.....	22
3 REFERÊNCIAS.....	25
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	34
ARTIGO 1 - QUALIDADE DE PRODUTOS COMERCIAIS E PRODUZIDOS ON FARM A BASE DE BACILLUS EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E EFICIÊNCIA DE CONTROLE DE PRATYLENCHUS BRACHYURUS.....	34
RESUMO.....	34
1 INTRODUÇÃO.....	35
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Sumarização de dados e coleta de amostra.....	37
2.2 Quantificação de células viáveis.....	37
2.3 Avaliação da eficiência de produtos de fermentação <i>on farm</i> e comerciais na penetração de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em soja em casa de vegetação.....	39
2.4 Validação em campo.....	41
2.5 Desenho experimental e análises estatísticas.....	43
3 RESULTADOS.....	44
3.1 Sumarização de dados e coleta de amostra.....	44
3.2 Quantificação de células viáveis.....	46
3.3 Avaliação da eficiência de produtos de fermentação <i>on farm</i> e comerciais na penetração de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em soja em casa de vegetação.....	46
3.4 Validação em campo.....	47
4 DISCUSSÃO.....	53
5 CONCLUSÃO.....	58

REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A.....	61
APÊNDICE B.....	63
APÊNDICE	64
APÊNDICE	64
ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO METATAXONÔMICA E BIOQUÍMICA DE PRODUTO COMERCIAL E FERMENTADO ON FARM PARA O MANEJO DE PRATYLENCHUS BRACHYURUS.....	69
RESUMO.....	69
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1 Produção de metabólitos bioativos.....	72
2.2 Análise metataxonômica das amostras comerciais e on farm.....	75
2.3 Controle de qualidade do produto nemacontrol.....	77
2.4 Índice de quimiotaxia (IQ).....	79
3 RESULTADOS.....	81
3.1 Produção de metabólitos bioativos.....	81
3.2 Análise metataxonômica das amostras comerciais e on farm.....	87
3.3 Controle de qualidade do produto nemacontrol.....	91
3.4 Índice de quimiotaxia (IQ)	93
4 DISCUSSÃO.....	94
5 CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE A.....	104

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A soja, uma das bases do agronegócio brasileiro, tem se deparado com um aumento crescente em área plantada e produção e com ele, pode ter o seu rendimento afetado por fitopatógenos do solo, com destaque para os do gênero *Pratylenchus*, que aumentaram sua população em um cenário de produção com até três safras no Estado Mato Grosso (soja, milho ou algodão e pastagem), causando grandes perdas de produtividade.

Algumas práticas de cultivo, como o sistema de plantio direto e o cultivo em solos arenosos, favorecem a disseminação e o estabelecimento de grandes populações desse fitoematóide, resultando em maiores perdas. O manejo de *P. brachyurus* é complexo e de difícil execução, devido ao seu hábito endoparasita migrador e polífago

O controle biológico tem sido uma ferramenta fundamental para o manejo desse nematoide nas grandes culturas, através do tratamento de sementes ou aplicação no sulco de plantio. Com a difusão das técnicas de produção massal de bactérias e a oferta dos insumos e equipamentos necessários para a produção, apoiados no decreto nº 6.913, 23 de julho de 2009, Artigo 1º, inciso § 8º, que estabelece: “Ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica produzidos exclusivamente para uso próprio”, houve um aumento na prática de multiplicação de microrganismos nas fazendas para uso próprio, que ficou conhecida por produção *on farm*.

Porém, em decorrência das condições variáveis dessa produção, pouco se sabe sobre a eficiência do processo de multiplicação de células e da capacidade de controle para o alvo e manutenção de sua eficiência após produção. Levando em consideração que as bactérias do gênero *Bacillus* predominam entre os microrganismos empregados na agricultura brasileira, se faz necessário a criação de mecanismos que possam garantir o controle de qualidade dessa produção.

Quando nos referimos às formas de multiplicação e aos sistemas usados pelos produtores é possível perceber que não existe um padrão a ser utilizado. Os sistemas de cultivo, em sua maioria, são realizados em caixa d'água, mas alguns produtores utilizam tanque de inox ou ainda tanques de empresa em comodato, variando de instalações simples a estruturas muito bem elaboradas, o mesmo ocorre com os sistemas de aeração.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo fazer um levantamento das diferentes realidades encontradas no Estado do Mato Grosso, maior produtor Brasileiro de soja, quanto à os tipos de sistemas de produção, meios de cultura e inóculo inicial utilizados, bem como a

eficiência destes produtos fermentados no controle do *Pratylenchus Brachyurus*. Além disso, foram feitos testes para comparar o perfil metataxonomico e metabolomico das amostras comerciais e fermentadas, bem como sua atuação na atração ou repelência deste fitonematoide e seu hospedeiro.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Patossistema *Pratylenchus brachyurus* – soja

Nas duas últimas décadas, o Brasil esteve como segundo maior produtor e exportador de soja. Na safra 2021/22, o país alcançou o título de maior produtor mundial de soja, com 125.552,3 milhões de toneladas produzidas e uma área plantada de **41.452,0** milhões de hectares. O Estado do Mato Grosso ocupa o lugar de maior produtor brasileiro, com uma área cultivada equivalente a **11.108,5** milhões de hectares, produção de **41.490,2 milhões** de toneladas, e produtividade de 3.735 kg ha⁻¹ (CONAB 2022).

Embora seja claro a expansão desta cultura, a soja pode ter seu rendimento afetado por doenças causadas por diferentes agentes fitopatogênicos, como fungos, nematoides, vírus e bactérias (GODOY et al., 2016), resultando em danos econômicos. Nesses cenários, destacam-se os fitonematoides que causam perda de produtividade anual estimada em mais de US\$ 173 bilhões em todo o mundo (ABAD et al., 2008; ELLING, 2013). Nos países de climas tropicais e subtropicais foram estimadas perdas de produção atribuídas a nematoides em 14,6%, em comparação com 8,8% em países temperados (NICOL 2011).

Mundialmente, há relatos de mais de 100 espécies de nematoides de 50 gêneros distintos na cultura da soja (BRIDA et al., 2016). Nas áreas cultivadas no Brasil, e considerando as culturas anuais agrícolas de maior expressão, as cinco espécies de nematoides mais frequentemente envolvidas com perdas na produção são: os nematoides das galhas *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 e *M. javanica* (Treb) Chitwood; o nematoide de cisto da soja *Heterodera glycines* Ichinoe; o nematoide reniforme *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940; e o nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev e Sch. Stekhoven, 1941 (DIAS et al., 2010; GALBIERI et al., 2012). Levantamentos realizados no Cerrado do país indicam que essas espécies estão presentes nas principais áreas de produção de Mato Grosso, Bahia, Goiás e Mato Grosso do Sul (GALBIERI et al., 2012; SILVA et al., 2003).

A maioria dos fitonematoides se desenvolvem rapidamente em condições de alto

enraizamento, temperatura entre 23 a 30°C, umidade acima de 60% da capacidade de campo, textura do solo argiloso-arenoso e em condições de baixo teor de matéria orgânica, completando o ciclo entre 20 e 30 dias (FERRAZ; BROWN, 2016).

Entre as espécies consideradas mais prejudiciais a agricultura, destaca-se *P. brachyurus*, em decorrência da sua distribuição geográfica ampla gama de hospedeiros (GOULART, 2008), ocasionando perdas na ordem de 20% da produção (ANTONIO et al., 2012). Esse ato é potencializado por se tratar de uma espécie polífaga, que se alimenta de diversas culturas (DIAS-ARIEIRA et al., 2009) e com ação destrutiva do sistema radicular, resultando na redução do volume total das raízes, que afeta diretamente o metabolismo das plantas e pode levar à morte (MARTINS, 2016).

O ciclo de vida dos *Pratylenchus* spp. tem em média três a seis semanas, podendo variar conforme a planta hospedeira e temperatura, principalmente (FERRAZ, 1999). A temperatura ótima para o desenvolvimento e reprodução em *P. brachyurus* está na faixa de 29-30 °C. Envolve as fases de ovo, juvenis (J1, J2, J3 e J4) e adultos. A eclosão do ovo ocorre no 2º estágio juvenil (J2) que são infectantes, podendo penetrar e abandonar repetidamente as raízes das plantas, sendo infectivos durante toda a sua vida (J2, J3, J4 e adultos) (FERRAZ E BROWN 2016).

No Brasil, *P. brachyurus* tem sido pesquisado desde a década de 1940, inicialmente pelos evidentes danos à cultura da batata. Na década de 1970, o gênero *Pratylenchus* foi considerado o segundo em importância agrônômica no Brasil, atrás apenas dos nematoides de galhas (FERRAZ; BROWN, 2016). Nos últimos anos tornou-se um sério problema sanitário para a soja, principalmente nos Estados produtores da região Centro-Oeste, onde 96% de suas áreas de cultivo indicavam prevalência do nematoide das lesões (RIBEIRO et al., 2010), registrando perdas de até 50% na produtividade (FRANCHINI et al., 2014).

Mudanças no sistema de produção, como a prática de sucessão de culturas dentro do sistema de plantio direto e incorporação de áreas com solo arenoso, aumentam a vulnerabilidade da cultura. Até pouco tempo, as plantas empregadas na sucessão eram milho e sorgo, dentre outras espécies desfavoráveis a nematoides como *Meloidogyne* spp. e *H. glycines*, os quais por vários anos foram extremamente problemáticos na região. No entanto, as mesmas eram hospedeiras de *P. brachyurus*, favorecendo a sua multiplicação, permitindo que assumisse o lugar de maior preocupação dos sojicultores da região (FERRAZ; BROWN, 2016).

A incidência de *P. brachyurus* em plantações de soja é caracterizada pela mudança de coloração nas folhas, embora sem o amarelecimento típico da maioria das infestações de

nematoides, e presença de lesões marrom-avermelhadas nas raízes, progredindo para necrose (DIAS et al., 2010; INOMOTO, 2008). O intenso ataque às plantações de soja por este nematoide destrói inicialmente a raiz principal e, posteriormente, as raízes laterais (DIAS-ARIEIRA et al., 2018).

Endoparasita migrador, *P. brachyurus* penetra nas raízes, se locomove, se alimenta e, quando a raiz entra em decomposição retorna ao solo para parasitar outra raiz (MICHEREFF, 2001). Durante esse processo, ataca as células do parênquima cortical das raízes de soja, por meio da injeção de toxinas, e também por sua movimentação, desorganizando e destruindo células, o que resulta em áreas necrosadas nas raízes (HENNING et al., 2014), predispondo as plantas a infecções por patógenos secundários, como bactérias e fungos (GOULART, 2008).

O manejo da população de fitonematoides em áreas infestadas é um dos desafios para o cultivo da soja. Uma vez introduzido na área, a erradicação é muito difícil, sendo necessário o uso de diferentes medidas de controle, sendo a rotação de culturas, o uso de cultivares resistentes e o controle químico as medidas mais recomendadas (DIAS et al., 2009).

Embora o uso de cultivares resistentes seja o método mais econômico e eficaz de controlar as doenças, na maioria das vezes, elas não estão disponíveis ou existe pouca disponibilidade no mercado, ou ainda apresentam um baixo nível de resistência, que pode ser quebrado em decorrência da variabilidade do patógeno (YORINORI; KIIHL, 2001). Como a interação de *P. brachyurus* com a soja é menos complexa, não há necessidade de formação de nenhuma célula especializada de alimentação, como ocorre com outros nematoides, diminuindo as chances de encontrar fontes de resistência (DIAS et al., 2010). Seu manejo é desafiador porque os meios disponíveis são limitados (MAY et al., 2016). O manejo cultural, com a rotação de culturas, na prática é inviável, por haver inúmeros hospedeiros alternativos para esse fitonematoide (FERRAZ; BROWN, 2016), e o manejo químico dispõe de poucas moléculas, que por sua vez são muito tóxicas para o ser humano e para o ambiente, além de apresentar elevado custo para o produtor (AGROFIT, 2020).

A utilização de medidas adequadas, bem como o manejo integrado de diferentes formas de controle, possibilita ao agricultor a redução da população ou até mesmo o controle do nematoide a níveis populacionais que permitam a convivência, fitoparasita e hospedeiro, sem que haja perda na produtividade (FERRAZ et al., 2010). Dentre os métodos de controle de nematoides mais utilizados pelos produtores de soja, destacam-se o alqueive do solo, rotação de culturas, uso de cultivares resistentes quando existentes e o tratamento das sementes por meio de nematicidas químicos à base de abamectina ou tioldicarbe (HOMIAK et al., 2017;

RIBEIRO et al., 2014), e biológicos (KLEPADLO et al., 2018). Os dois métodos apresentam limitações e, muitas vezes, não têm sido suficientes para reduzir as perdas. Além disso, existe uma resistência por parte dos produtores em substituir as safras de soja com plantas hospedeiras antagônicas, restringindo-se à cultura secundária, o que nem sempre é suficiente para manter a população abaixo do limiar econômico. Estudos de patogenicidade para o gênero *Pratylenchus* sugerem que, até mesmo com populações extremamente altas no solo, estes não chegam a matar a planta hospedeira. Porém, os níveis de danos são muito variáveis, dependendo da combinação das espécies de *Pratylenchus* e da planta hospedeira, variando entre 0,05 nematoides cm⁻³ a 30 nematoides cm⁻³ de solo (CASTILLO; VOVLAS, 2007).

O tratamento de sementes é a técnica mais utilizada devido a sua praticidade. Apesar dos tratamentos químicos em sementes apresentarem importância estratégica para redução da penetração e reprodução dos nematoides (HOMIAK et al., 2017; RIBEIRO et al., 2014), o efeito residual dos produtos tem baixa persistência e é desfavorável à biota do solo, diferentemente do uso de microrganismos como forma de tratamento das sementes (SOARES et al., 2017). A baixa eficiência dos métodos de controle disponíveis, embora sejam capazes de estimular o crescimento das plantas e de induzir resistência ao ataque desses parasitas (MOURA; CARNEIRO, 2020), tem despertado o interesse e a busca por novas estratégias.

Nesse contexto, a utilização de produtos biológicos é uma opção interessante, visto que apresenta maior persistência no solo, não é tóxico e pode contribuir para sua supressividade. Outro benefício é apresentar custo relativamente baixo, além de ter, em alguns casos, eficiência superior aos produtos químicos disponíveis no mercado, se combinado com boas práticas de manejo do solo (SOARES et al., 2017).

Bactérias do gênero *Bacillus* apresentam grande potencial para supressão de nematoides em área de cultivo de forma sustentável. Presentes na rizosfera, podem ser capazes de matar, e de competir com nematoides por nutriente e espaço (MOURA; CARNEIRO, 2020).

2.2 Controle Biológico

O uso de microrganismos, formulados ou não, para manter as populações de organismos prejudiciais na agricultura em níveis aceitáveis têm se tornado cada vez mais comuns. Esse processo é denominado de controle biológico, caracterizado por promover a redução da densidade de inóculo ou atividades determinantes da doença causada por um patógeno, por um ou mais organismos (COOK; BAKER, 1983). Pode ocorrer de maneira espontânea ou como

resultado da manipulação de organismos pelo homem, sendo condicionado pelo hospedeiro ou meio ambiente (SOGLIO, 2004).

Do ponto de vista econômico, um inimigo natural efetivo é aquele capaz de regular a densidade populacional de uma praga ou patógeno e mantê-lo em níveis abaixo do dano econômico estabelecido para um determinado cultivo. Dentro desse contexto, o uso de microrganismos que antagonizam patógenos de plantas é uma opção sustentável para o controle de doenças na agricultura (RIBEIRO, 2009).

No Brasil, a aplicação de controle biológico não é ainda a primeira opção para os produtores e entre os aspectos que justificam a baixa aplicabilidade desta forma de controle está ainda deficiente difusão de conceitos, princípios e vantagens envolvidos no uso de bioprodutos e a limitação do conhecimento dos consumidores sobre as consequências para a saúde pública e ambiental do uso intensivo de agrotóxicos (MACHADO et al., 2012).

Agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema (ÁVILA et al., 2005) além de uma opção viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos presentes no solo, sem trazer danos ao meio ambiente (MELLO et al., 2007). A eficiência desses agentes em doenças da parte aérea depende da capacidade de sobrevivência e manutenção de populações em alta densidade nesse ambiente (HALFELD-VIEIRA et al., 2004).

Nos grupos mais estudados, promissores e utilizados, entre os organismos antagônicos a nematoides, estão os fungos e bactérias (ASKARY E MARTINELLI 2015). Dentre esses organismos, as bactérias do gênero *Bacillus* merecem destaque por apresentar características distintas, tanto no ponto de vista antagônico, como na promoção de crescimento vegetal, além de apresentarem pouca complexidade no processo de multiplicação em larga escala (XIANG et al., 2018; MHATRE et al., 2019).

Existem vários estudos que correlacionam os diferentes modos de ação de *Bacillus* spp. à supressão de nematoides, podendo se destacar o antagonismo por meio da produção de enzimas líticas, indução de resistência sistêmica, antibiose e redução de estresse oxidativo (KLOEPPER et al., 2004; LIU et al., 2016; XIANG et al., 2017b, 2018; ZHOU et al., 2017).

2.3 *Bacillus* spp.

Dentre os gêneros mais utilizados em biocontrole de doenças de plantas destaca-se *Bacillus*, com grande vantagem em relação a outros agentes de biocontrole, em decorrência da sua atividade biológica contra diversos microrganismos responsáveis por doenças em plantas, sendo considerada um dos mais eficazes para o biocontrole. A atividade pode estar relacionada à produção de lipopeptídeos ativos, a facilidade de colonizar plantas (ASAKA e SHODA, 1996) e também a facilidade na formulação.

O gênero *Bacillus* pode ser utilizado na formulação de produtos mais estáveis e viáveis, aplicação no tratamento por via foliar (KLOEPPER et al., 1989) e produção de compostos antimicrobianos como antibióticos lipopeptídicos (YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012). Outra vantagem deste gênero, se deve ao rápido crescimento em meio líquido e não ser agente de patogenicidade para homens e animais (SHODA, 2000). Além disso, o gênero é caracterizado pela capacidade de formação de endósporos, estrutura de resistência capaz de suportar condições ambientais adversas como dessecação, radiação solar, altas temperaturas, e pela produção de antibióticos de amplo espectro (DE JENSEN et al., 2002; BACON et al., 2001; CAVAGLIERI et al., 2005; ZANOTTO et al., 2016; PEREIRA et al., 2010; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2016).

Bacillus spp. é um agente de biocontrole muito utilizado por agir na natureza de maneira direta ou indireta. O antagonismo direto tem envolvimento na antibiose, por meio da liberação de substâncias tóxicas aos patógenos, na competição por espaço e nutriente e na síntese de compostos voláteis com propriedades inibitórias (RYU et al., 2004; ONGENA et al., 2007; LEELASUPHAKUL et al., 2008). Já o mecanismo indireto é exercido por meio da resistência sistêmica induzida (LEELASUPHAKUL et al., 2008) e formação de biofilme nas raízes, protegendo-as contra patógenos (GOU et al., 2015).

Diferentes cepas bacterianas já foram identificadas com atividade nematicida e 56 produtos registrados para o manejo de nematoides fitopatogênicos, sendo 44 para o alvo *Pratylenchus brachyurus*, e 38 deles compostos por, pelo menos uma espécie pertencente ao gênero *Bacillus* (AGROFIT, 2023).

Bacillus têm sido relatadas como capazes de promover proteção substancial contra o parasitismo de nematóides (SIDDIQUI et al. 2001). Algumas espécies desse gênero apresentam antagonismo direto aos fitonematoides, provocando a redução na frequência de doenças em condições de campo (SHANTI; RAJEDRAN, 2006; OLIVEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2011).

B. subtilis produz metabólitos tóxicos que afetam o movimento de nematoides, podendo inibir a eclosão de juvenis e interferir no processo pelo qual eles penetram nas raízes (ARAÚJO

et al., 2002). Além da produção de 12 proteases e a indução de enzimas de defesa na planta hospedeira são mecanismos atribuídos a *B. subtilis* no controle de nematoides (LIAN et al., 2007; KAVITHA et al., 2007).

Arguelles-Arias et al. (2009), ao estudar o isolado GA1 de *B. amyloliquefaciens* identificaram sua capacidade de produção de antibióticos e outros metabólitos secundários, que podem ser aplicados no biocontrole de patógenos de plantas.

Lanna Filho et al. (2010), afirmaram que *B. subtilis* pode colonizar todos os órgãos vegetativos das plantas, de forma epifítica, endofítica ou na forma de rizobactéria, possibilitando um amplo espectro para o uso agrônômico. Além disso, alguns isolados apresentam facilidades para a manutenção de sua viabilidade em bio formulados, tornando evidente o seu potencial para incremento da produtividade vegetal e redução de doenças.

Ensaio utilizando *B. subtilis* em sementes têm sido realizados desde a década de 80. Recentemente, a inoculação de cepas de *B. subtilis* em sementes de soja foi avaliada por Tavanti et al. (2020), mostrando um aumento de 25% na produtividade de grãos quando comparadas ao controle e um aumento de 70% na germinação. De acordo com estudos Fernandes et al., (2014) observaram uma redução de aproximadamente 60% no número de ovos de *M. incognita* utilizando como controle a microbiolização de sementes com *B. subtilis*.

A eficiência de *Bacillus* spp. para controle de nematoides como *Pratylenchus brachyurus*, *Meloidogyne incognita* e *H. glycines*, considerados de grande importância para a agricultura mundial, também já foram relatadas (HARNI et al., 2007; XIANG et al., 2017a; XIANG et al., 2017b). Xiang et al. (2017a) observaram mortalidade superior a 50% de J2 de *H. glycines*, pelo antagonismo de 13 espécies de *Bacillus*, dentre elas, *B. methylophilus*, *B. subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) em teste realizado in vitro.

2.4 Formulação de *Bacillus*

O uso dos microrganismos na agricultura sustentável possibilitou novos avanços para a agroeconomia, sendo uma das principais inovações permitidas o desenvolvimento de bio inoculantes, visando a promoção de crescimento das plantas e erradicação de patógenos nas culturas de importância econômica. Porém, algumas questões primordiais para uso desses microrganismos como produtos formulados foram sendo negligenciadas, causando obstáculos e atrasos na produção de biofertilizantes quando comparados a seus análogos sintéticos.

Para o desenvolvimento de produtos de biocontrole há necessidade de vários passos, como: coleta, isolamento, identificação e caracterização dos microrganismos; desenvolvimento

da produção dos mesmos em meios de cultivo; otimização do processo fermentativo e escalonamento dos processos; estudos de formulação e aplicação em campo; obtenção do Registro Especial Temporário; registro e comercialização do produto (SILVA; MELLO, 2007).

A produção e comercialização dos produtos biológicos passa pela otimização de sua produção em massa, sendo considerado de grande relevância aqueles oriundos de fermentações. Os processos microbianos ocorrem na fermentação submersa (FSM ou fermentação líquida) e na em estado semi-sólido ou sólido (FES). No entanto, para escala industrial a fermentação submersa é a mais utilizada (CASTRO; FERREIRA, 2010), onde a utilização de água é ilimitada, a alimentação de oxigênio se dá por aeração, o volume da mistura de fermentação é amplo, há um grande consumo de energia e alto investimento (PANDEY et al., 2001).

O uso comercial de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas requer um inóculo com alta viabilidade celular, de fácil transporte e aplicação, para aumentar a sua eficácia (FILHO et al., 2001). Para comercialização, uma vida útil longa é uma vantagem para qualquer inoculante (FAGES, 1992).

Atualmente existe grande empenho nas pesquisas para se chegar a produtos formulados que sejam de utilização mais fácil, com melhor resposta em relação aos fitopatógenos e possam alcançar um maior número de culturas-alvo. Para isso, é necessário levar em consideração todo o processo da bioformulação, desde a triagem dos microrganismos até o desenvolvimento, implementação e validação do produto (ARORA; MISHRA, 2016).

Ainda hoje não existe uma definição consensual para o termo, mas para Arora et al. (2010) bioformulações são preparações com microrganismos que podem substituir parcial ou totalmente os fertilizantes químicos e/ou pesticidas. No entanto, qualquer definição deve incluir um ingrediente ativo, um material transportador e um aditivo. O ingrediente ativo é o organismo vivo ou esporos, sendo sua sobrevivência essencial para o sucesso da formulação desenvolvida (AULD et. al., 2003; HYNES; BOYETCHKO, 2006), ou ainda compostos semioquímicos (feromônios e substâncias aleloquímicas) e bioquímicos (enzimas e hormônios) (CROPLIFE BRASIL, 2021)

O material de transporte adequado precisa ser inerte para suportar o ingrediente ativo (células), assegurar estabilidade das células em torno da planta, fornecendo chances de melhorar o crescimento da planta e atingir o patógeno alvo (BURGES; JONES, 1998). Por fim, os aditivos atuarão na proteção das células às condições ambientais e melhorar as propriedades físicas, químicas e nutricionais das formulações (SCHISLER et al., 2004; HYNES; BOYETCHKO, 2006).

Basicamente existem 2 tipos de bioformulações: sólidas e líquidas (BURGES; JONES, 1998). As sólidas incluem grânulos, pós molháveis ou não e grânulos dispersíveis em água. Já as formulações líquidas podem ser de 2 tipos: Suspensões de concentrações ou concentrações fluidas em óleo. Segundo Brar et al. (2006), uma formulação líquida típica contém de 10-40% de microrganismos, 1-3% ingrediente de suspensão, 1-5% de ingrediente dispersante, 3-8% de surfactante e 35-65% de material de transporte líquido (óleo ou água). Em geral, os agricultores preferem concentrados de suspensões por serem mais fáceis de medir e despejar no tanque de pulverização (ARORA; MISHRA; 2016). No Brasil existe crescente demanda de assistência na formulação de produtos com fermentação líquida, tanto para empresas quanto para produtores, o que torna necessária a oferta de cursos que permitam a formação de recursos humanos capazes preencher esta lacuna.

2.5 Produção *on farm*

Uma alternativa para elevar o uso e a aceitação de um biofertilizante é o desenvolvimento de um inoculante produzido pelo usuário final, no local onde será posteriormente utilizado, evitando os custos associados com a compra de um produto comercial, abordagem conhecida como método *on farm* (SHARMA; ADHOLEYA, 2011).

Resumidamente, a produção *on farm* trata é um método de multiplicação de microrganismos na propriedade rural, permitindo a utilização de seus próprios agentes inoculantes no controle biológico de pragas e doenças (SANTOS et al., 2020; LANA et al., 2019, VALICENTE et al., 2018).

Segundo relato de produtores, o sistema de produção prioriza praticidade na operação, facilidade no manuseio, manutenção e desinfecção, além de obtenção de elevadas concentrações de células bacterianas viáveis, consistindo na utilização de 3 equipamentos básicos: Turbina sopradora, tubos de PVC soldados e uma caixa de água. Além disso, é imprescindível um ambiente com estrutura adequada para o processo de multiplicação de células bacterianas, com piso impermeável e de fácil higienização, abastecimento de água limpa e estéril e condições ideais para estocagem de meio de cultura utilizado (SANTOS et al., 2020; LANA et al., 2019).

Já existem no mercado empresas trabalhando com a produção *on farm*, como Agrobiológica, Fotossíntese Biologic, Profarm, BioBoaVista, Solubio, entre outras, que propõem aos produtores redução de custos nos cultivos de café, soja, milho, trigo, algodão, cana e hortifruti, com o uso de sua tecnologia de produção de defensivos e inoculantes na fazenda.

Elas fornecem assistência aos produtores desde a utilização dos meios de cultura, a utilização do inóculo, o processo de fermentação até a aplicação do produto.

Segundo Valicente et al. (2018), o que se tem visto hoje no Brasil é uma grande quantidade de pessoas tentando produzir biopesticida em sistemas *on farm*, onde as instalações não possuem condições mínimas para manter o ambiente com baixa carga microbiana, esterilização do meio de cultura, além da padronização de todo o sistema de produção e do produto final. Para este sistema de produção, o que se tem observado é a utilização de diferentes fontes de inóculo, meios de cultura e condições de cultivo. Normalmente os *on farm* são produzidos em tanques metálicos ou caixas d'água que não são adequados, pois possuem aberturas que facilitam a contaminação durante todo o processo, inviabilizando o uso do produto final na forma de pulverização. No caso de produção *on farm*, os perigos do crescimento de contaminantes são mais evidentes, uma vez que normalmente não são utilizados produtos esterilizados nem fermentadores adequados, e os contaminantes podem ser mais competitivos no crescimento do que o próprio inoculante.

De acordo com levantamento da consultoria Blink, o mercado de produção on-farm no Brasil na safra 2021/2022 foi de 35% do mercado total de biológicos. Os especialistas estimam que esse número vai decrescer nos próximos anos, mas se estabilizando em torno de 10% do mercado total de bioinsumos (MEDEIROS e BETTIOL, 2023).

Além disso, destaca-se a legislação vigente, onde no Decreto Nº 6.913, de 23 de julho de 2009, o inciso 8º, do “Art. 10-D, lê-se que “Ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica produzidos exclusivamente para uso próprio”. Recomenda-se que ao iniciar o processo de produção *on farm*, o produtor tenha seu próprio microrganismo para multiplicação, o que permite uma maior autonomia.

2.6 Metabólitos envolvidos no controle de nematoides

A produção de bactérias pode gerar resultados no manejo de fitonematoides advindos diretamente das células bacterianas ou dos metabólitos produzidos por elas no meio de cultura. As células colonizam raízes e produzem metabólitos. Estes metabólitos são diretamente tóxicos aos fitonematoides ou indiretamente pela ativação de respostas de defesa, como a desencadeada por lipopeptídeos (RAAIJMAKERS et al., 2010).

Segundo Machado (2012), os produtos metabólicos liberados pelas rizobactérias podem ter efeitos negativos sobre a reprodução, postura e eclosão de ovos, sobrevivência nos estágios iniciais de desenvolvimento dos nematóides e/ou provocar a morte dos indivíduos adultos.

Grande parte do efeito de controle dos nematoides é devido a produção de metabólitos secundários, tais como enzimas e toxinas, que podem inibir a reprodução de nematoides, a eclosão e a sobrevivência de juvenis de *Heterodera glycines* (XIANG et al., 2018).

Os lipopeptídeos são moléculas de superfície ativa que possuem atividade antimicrobiana e podem induzir respostas de imunização nas plantas (YOSHIDA et al., 2001; RICHARDSON et al., 2009; RAAIJMAKERS et al., 2010; CAWOY et al., 2015). Entre muitos compostos ativos produzidos por *Bacillus* spp., surfactinas, fengicinas e iturinas são os que mais frequentemente desempenham papel no controle biológico de fitopatógenos. As surfactinas são bioemulsificantes que apresentam atividade antimicrobiana e agem promovendo o aumento da área de superfície para crescimento em substratos insolúveis em água; e atuam na fixação e desprendimento de bactérias em superfícies (ROSENBERG; RON, 1999). Fengicina e as iturinas apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica, mais especificamente para fungos filamentosos (VANITTANAKOM et al., 1986, STELLER et al., 2004).

Diferentes cepas bacterianas já foram identificadas com atividade nematicida e 56 produtos registrados para o manejo de nematoides fitopatogênicos, destes 44 são registrados para o alvo *Pratylenchus brachyurus*, sendo 38 deles compostos por, pelo menos uma espécie pertencente ao gênero *Bacillus* (AGROFIT, 2023). Algumas bactérias podem produzir substâncias capazes de afetar o desenvolvimento dos nematoides, como antibióticos, sideróforos e enzimas (XIA et al. 2011; TIAN et al. 2007), além de atuar na competição por sítios de colonização e nutrientes com os nematoides (DONG; ZHANG 2006). *B. subtilis* atua interferindo no ciclo reprodutivo do nematoide e na migração do juvenil em direção a planta hospedeira (SHARMA; GOMES 1996).

Estudos realizados por Berlitz et al (2016) avaliaram a eficiência de um produto constituído de cepas de *B. subtilis* e sua interação em ovos e juvenis de *M. javanica* na alface e concluíram que o tratamento com *B. subtilis* reduziu o número de ovos e juvenis em 90%. Este achado pode estar relacionado ao conjunto de antibióticos, enzimas e proteases produzidas por este isolado. Similarmente, estudo realizado por Araújo e Marchesi (2009) indica promoção de crescimento e redução na reprodução de nematoide formador de galhas em raízes de tomateiro tratadas com *B. subtilis*.

Em alguns casos, bactérias antagonistas são capazes de produzir enzimas como proteases, collagenases e lipases que atuam como fatores de patogenicidade e de virulência contra os nematóides. A espécie *Bacillus nematocida* estirpe B16 produz a serina protease

alcalina que degrada a cutícula de juvenil e a casca de ovo de *Panagrellus redivivus* (NIU et al., 2006).

Espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir uma série de compostos com atividade contra nematoides. A protease extracelular aprA da estirpe CHA0 de *P. fluorescens* provoca a morte e inibe a incubação de ovos em *M. incognita* (SIDDIQUI et al., 2005). *Pseudomonas fluorescens*, produz uma substância ativa no controle de *Globodera rostochiensis* em batata, o 2,4-diacetilfloroglucinol (CRONIN et al., 1997).

Bacillus megaterium YFM3.25 produziu vários compostos voláteis, COVs, que mataram os juvenis de *M. incognita* e inibiram a eclosão (Huang et al., 2010; Yang et al., 2012). Várias espécies de *Bacillus* foram capazes de produzir dissulfureto de dimetilo, que apresenta atividade inibitória contra nematoides e estimula a induz resistência sistêmica em plantas (SCHÖLLER et al., 2002; FARUK et al., 2010).

Conhecendo todas as possibilidades de sucesso proporcionadas por *Bacillus* dentro do sistema agrícola, é importante identificar os pontos chaves do seu manejo para que uma correta e eficiente técnica de multiplicação *on farm* seja implementada, com uso de cepas eficientes, sistema de fermentação reprodutível, com as frações bioativas que representam potencial de biocontrole e, portanto, garantindo um aumento na produtividade na cultura da soja.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P., GOUZY, J., AURY, J.M. *et al.* Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnol* v. 26, p. 909–915, 2008.
- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários: consulta aberta. Brasília: Mapa, 2003. Acesso em: 28 jul. 2023.
- ALVES, G. C. S. *et al.* Avaliação in vitro do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zeae*. *Revista Arquivos do Instituto Biológico*, v.78, n.4, p. 557-564, 2011.
- ANTONIO, S. F.; MENDES, F. L.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI H.; DIAS, W. P.; RAMOS-JUNIOR E. U.; GOULART, A. M. C.; SILVA, J. F. V. Perdas de produtividade da soja em área infestada por nematoide das lesões radiculares em Vera, MT. In: Congresso Brasileiro de Soja, 6, 2012, Cuiabá. **Resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 4p.
- ARAÚJO, F. F. *et al.* Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. *Ciência Rural*, v.32, n.2, p.197-202, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000200003>
- ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. (2009). Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. *Ciência Rural*, v. 39, n. 5, p.1558-1561, 2009.
- ARGUELLES-ARIAS, A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8: 1-12, 2009.
- ARORA, N. K.; MISHRA, J. Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, v. 107, p. 405-407, 2016
- ARORA, N. K.; KHARE, E.; MAHESHWAR, I D. K. Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. In: Maheshwari, D. K. Plant growth and health promoting bacteria. **Springer**–Verlag, Berlin, p 97–116, 2010.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Dampingoff of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n.11, p. 4081-4085. 1996.
- ASKARY T. H.; MARTINELLI P.P. **Biocontrol Agents of Phytonematodes**. London: CAB International. P. 469, 2015.
- AULD, B. A.; HETHERINGTON, S. D.; SMITH, H. E. Advances in bioherbicide formulation. *Weed Biol Manag*, v. 3, p. 61–67, 2003
- ÁVILA, Z.R., CARVALHO, S.S., BRAÚNA, L.M., GOMES, D.M.P.A., SILVA, M.C.F.; MELLO, S.C.M. **Seleção de isolados de *Trichoderma spp.* antagonísticos a *Sclerotium rolfsii* e**

Sclerotinia sclerotiorum. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2005. 30p. (Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa 177).

BACON, Charles W. et al. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. Suppl 2, p. 325, 2001.

BERLITZ, D. L. et al. Evaluation of biocontrol of the *Meloidogyne javanica* with *Bacillus subtilis* and *Purpureocillium lilacinus* in greenhouse with lettuce. **International Journal of Research in Engineering**, v. 452, n. August, p. 38–45, 2016.

BRIDA A. L. de GABIA, A. A., PEZZONI FILHO, J. C., et al. Variabilidade espacial de *Meloidogyne javanica* em soja. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p.175–179, 2016.

BURGES, H. D.; JONES, K. A. Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 411, 1998.

CASTILLO, P.; VOVLAS, N. **Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management**. Brill, 2007.

CASTRO, A. M. D.; FERREIRA JR, N. U. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, p.181-188, 2010.

CAVAGLIERI, L. et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5-6, p. 748-754, 2005.

CAWOY, H., DEBOIS, D., FRANZIL, L., PAUW, E., THONART, P., ONGENA, M. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyololiquefaciens*. **Microb. Biotechnol**, v. 8, n. 2, p. 281-295, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento safra brasileira grãos, v. 9, safra 2020/21, n. 9 - nono levantamento. Brasília, DF. p. 1-98, junho de 2022.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: American Phytopathological Society. 1983, p. 539.

CRONIN, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; FENTON, A.; DUNNE, C.; DOWLING, D.N.; O’GARA, F. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonad* strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. **Applied and Environmental Microbiology** v.63, n.4, p.1357-1361, 1997.

CROPLIFE BRASIL. Classificação dos produtos biológicos. 2021. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/publicacoes/classificacao-dos-produtos-biologicos/>. Acesso em: fev. 2021.

DE JENSEN, C. ESTEVEZ; PERCICH, J. A.; GRAHAM, P. H. Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. **Field Crops Research**, v. 74, n. 2, p. 107-115, 2002.

DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S.; GARCIA, A.; ARIAS, C. A. A. Nematóide de cisto da soja: Biologia e manejo pelo uso da resistência genética. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.

DIAS, W.P.; GARCIA, A.; SILVA, J.F.V.; CARNEIRO, G.E.S. **nematóides em soja: Identificação e Controle**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 8p. (Circular Técnica 76).

DIAS-ARIEIRA, C. R; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R. C. F. reação de Gramíneas Forrageiras a *Pratylenchus brachyururs*. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 33, n. 1, p. 90-93, 2009.

DIAS-ARIEIRA, C. R, de ARAUJO, F. G., KANEKO, L. , SANTIAGO, D. C. Controle biológico de *Pratylenchus brachyurus* em lavouras de soja . *Journal of Phytopathology*, v. 166, p. 722 – 728, 2018.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant Soil* v. 288, p. 31-45, 2006.

ELLING, A.A. Major emerging problems with minor Meloidogyne species. *Phytopathology*, 103, p. 1092-1102, 2013.

FAGES, J. Na industrial view on *Azospirillum* inoculantes: formulations and application technology. *Symbiosis*, Rehovot, v. 13, p. 15-26, 1992.

FARUK, M.I., RAHMAN, M.L., MUSTAFA, M.M.H.; COOSEMANS, I.J. Dimethyl disulfide- a potential biopesticide against root-knot nematode of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Journal of Agricultural Research*. v. 36, p. 685-695, 2010.

FERNANDES, R. H. et al. Pochonia chlamydosporia e *Bacillus subtilis* no controle de Meloidogyne incognita e M. javanica em mudas de tomateiro. *Bioscience Journal*, v. 30, n. 1, p. 34-38, 2014.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma Ed., 2016. p. 251.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.D., LOPES, E.A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. Manejo sustentável de fitonematóides. Viçosa: UFV, 2010, p. 306.

FERRAZ, L. C. C. B. Gênero *Pratylenchus*: os nematóides das lesões radiculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1999. p. 157-195.

FILHO, A.B., ALVES, N.T. AUGUST, R.M. PEREIRA and L.F.A. ALVES. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatilis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). *J. Neotrop. Entomol.* 30: 411-416, 2001.

FRANCHINI, J.C.; DEBIASI, H.; DIAS, W.P.; RAMOS JUNIOR, E.U.; SILVA, J.F.V. Perda de produtividade da soja em área infestada por nematóide das lesões radiculares na região médio norte do Mato Grosso. In: BERNARDI, A. C. de C.; NAIME, J. de M.; RESENDE, A. V. de; BASSOI, L. H.; INAMASU, R. Y. (Ed.). **Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2014. p. 274-278.

GALBIERI, R.; INOMOTO, M. M.; SILVA, R. A. da; ASMUS, G. L. Os nematoides na cultura do algodoeiro em Mato Grosso. In: BELOT, J.-L. (Org.). **Manual de boas práticas de manejo do algodoeiro em Mato Grosso**. Cuiabá: IMAmt: AMPA, 2012. p. 150-161.

GODOY, C. V.; UTIAMD, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C.B. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, Circular Técnica, 119, p. 6, 2016.

GOU, W. et al. Accumulation of choline and glycine betaine and drought stress tolerance induced in maize (*Zea mays*) by three plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 2, p. 581-586, 2015.

GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 30p (Documentos – ISSN 1517 – 5111;219).

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de Isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p. 638-643, 2004.

HARNI, R. et al. Potensi Bakteri Endofit Pengendali Nematoda Peluka Akar (*Pratylenchus brachyurus*) pada Nilam. **HAYATI Journal of Bioscience**, v. 14, p. 7–12,2007.. doi: 10.4308/HJB.14.1.7

HENNING, A. A.; ALMEIDA, Á. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M. e DIAS, W. P. (2014). **Manual de identificação de doenças de soja**. Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E).

HOMIAK, J. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; COUTO, E. A. A.; KATH, J.; ABE, V. H. F. Seed treatments associated with resistance inducers for management of *Pratylenchus brachyurus* in soybean. **Phytoparasitica**. v. 45, p. 243-250, 2017.

HUANG, Y., XU, C., MA, L., ZHANG, K., DUAN, C.; MO, M. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM 3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology** 126, 417-422, 2010.

HYNES, R. K.; BOYETCHKO, S. M. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Biol Biochem** v. 38, p.845–849, 2006.

INOMOTO, M. M. Importância e manejo de *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Plantio Direto**. n. 108, p. 4-9, 2008.

KAVITHA, J. et al. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* in sugarbeet. **Journal of Biological Control**, Coimbatore, v. 21, n.1, p. 211-215, 2007.

KLEPADLO M. et al. Evaluation of Soybean Germplasm for Resistance to Multiple Nematode Species. **Crop Science**, v. 58, n. 2511, 2018. doi: 10.2135/cropsci2018.05.0327

KLOEPPER, J. W.; LÍFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Freelifing bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.39-44, 1989.

KLOEPPER JW, RYU C-M, ZHANG S. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology** v. 94, p.1259–1266, 2004. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259

LIANN, L. H. et al. Q. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. **Letter Applied of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 262-269, 2007.

LIU, K. et al. Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control** v. 99, p. 8-13, 2016.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest. **Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

MACHADO, V. et al. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. **Oecologia Australis**. v. 16, n. 2, jun. 2012, p. 165-182.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J.C. et al., Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 75, 2016

MARTINS, G. D. **Inferência dos níveis de infecção por nematoides na cultura cafeeira a partir de dados de sensoriamento remoto adquiridos em multiescala**. Tese (Doutorado em Ciências Cartográficas). Universidade Estadual Paulista. Presidente Prudente - SP. 125p. 2016.

MAY, D. B., JOHNSON, W. A., ZUCK, P.C., CHEN, C. C., DYER, A.T. Assessment and Management of Root Lesion Nematodes in Montana Wheat Production. **Plant Disease**, v.100, n.10, p. 2069-2079, 2016.

MEDEIROS, FHV; BETTIOL, W. 2023. **How has Brazil turned into the largest producer and consumer of biocontrol products?**. IOBC Bulletin. Disponível em: https://event.wur.nl/iobc_wprs_wur_2023, acesso em 06/04/2023 (aceito para publicação)

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11.n.1.P. 3-9, 2007.

MHATRE P. H., et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** v. 17, p.119–128, 2019. doi: 10.1016/J.BCAB.2018.11.009

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 2001. 172 p.

MOURA, R. M. D.; CARNEIRO, J. Fitonematologia Primeiros Passos: Inimigos Naturais Dos nematoides. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, p. 56, 2020.

NICOL, J. M.; TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; NIJS, L. D.; HOCKLAND, S.; TAHNA MAAFI, Z. Current nematode threats to world agriculture. **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode**, p. 21-26, 2011.

- NIU, Q. H., HUANG, X.W., TIAN, B.Y., YANG, J.K., LIU, J., ZHANG, L.; ZHANG, K.Q. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 69, p. 722-730, 2006.
- OLIVEIRA, A. S. et al. Efeito de Bactérias Endofíticas sobre *Meloidogyne javanica* e Métodos de Inoculação em Tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.33, n1, p. 45-53, 2009.
- ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.- L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. **Solid-State fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. 1.ed. New Delhi: Asiatech Publishers, INC, 2001. p. 231.
- PEREIRA, Paola et al. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B 1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **Biological Control**, v. 53, n. 3, p. 258-266, 2010.
- RAAIJMAKERS, J. M.; , DE BRUIJN, I.; NYBROE, O.; & ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1037–1062, 2010.
- RIBEIRO, L. M.; CAMPOS, H. D.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; NEVES, D. L.; RIBEIRO, G. C. Effect of soybean seed treatment on the population dynamics of *Pratylenchus brachyurus* under water stress conditions. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2014.
- RIBEIRO, N. R.; DIAS, W. P.; SANTOS, J. M. **Distribuição de fitonematoides em regiões produtoras de soja do estado de Mato Grosso**. Rondonópolis: Fundação MT, 2010. p. 289-296. (Boletim de Pesquisa de Soja 2010).
- RIBEIRO, T. da S. 2009. 35 f. **Monografia** (Especialização) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009
- RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; Prigent-Combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil** v. 321, n. 1, p. 305-339, 2009.
- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. (1999). High and low-molecular-mass microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.
- RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.-H.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARÉ, P.W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.
- SANTOS, A.; DINNAS, S.; FEITOZA, A. Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados on farm no vale do São Francisco: dados preliminares. **Enciclopédia biosfera**, v. 17, p. 429-443, 2020.
- SCHISLER, D. A.; SLININGER, P. J.; BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, v. 94, p 1267–1271, 2004.

- SHANTHI, A.; RAJENDRAN, G. Induction of systemic resistance in banana against lesion nematodes by biocontrol agents. **International Journal of Nematology**, Luton, v. 16, p. 75-78. 2006.
- SHARMA, M.P.; ADHOLEYA, A. Developing prediction equations and optimizing production of three AM fungal inocula under “on-farm” conditions. **Exp. Agric.**, 47:529-537, 2011
- SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Controle biológico de *Meloidogyne arenaria* com *Pausteria penetrans*. **Nematologia Brasileira** 23(1):47- 52, 1996.
- SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal Bioscience and Bioengineering**, n. 89, p. 515-521, 2000.
- SCHÖLLER, E.G., GÜRTLER, H., PEDERSEN, R., MOLIN, S.; WILKINS, K. Volatile metabolites from actinomycetes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2615-2621, 2002.
- SIDDIQUI, Z. A.; IQBAL, A.; MAHMOOD, I. Efeitos de *Pseudomonas fluorescens* e fertilizantes na reprodução de *Meloidogyne incognita* e crescimento de tomate. **Ecologia Aplicada do Solo**, v. 16, n. 1, pág. 179-185, 2001.
- SIDDIQUI, I.A., HAAS, D.; HEEB, S. Extracellllular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, p. 5646-5649, 2005.
- SILVA, J. B. T. da; MELLO, S. C. M. de. Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v. 241, p.1-17, dez. 2007. Disponível em: Acesso em: 17 jan. 2014.
- SILVA, R. A.; SERRANO, M. A. S.; GOMES, A. C.; BORGES, D. C.; SOUZA, A. A.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. nematoides associados ao algodoeiro no Estado do Mato Grosso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 24., 2003, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Sociedade Brasileira de Nematologia: Embrapa Semi-Árido, 2003. p. 150.
- SOARES, P. L. M. et al. Controle biológico de nematoides. **BALDIN, ELL; KRONKA, AZ; SILVA, IF Inovações em manejo fitossanitário. Botucatu: FEPAF**, p. 167-232, 2017.
- SOGLIO, F. K. D. **Manejo de doenças na perspectiva da transição agroecológica**. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis; CCA/UFSC, p. 293, 2004.
- STELLER, S.; SOKOLL, A.; WILDE, C.; BERNHARD, F.; FRANKE, P.; VATER, J. Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD- Thioesterase protein. **Biochemistry**, v. 43, n. 35, p.11331-11343, 2004.
- TAVANTI, T.R., TAVANTI, R.F.R., GALINDO, F.S., SIMÕES, I., DAMETO, L.S., DE SÁ, M.E. Yield and quality of soybean seeds inoculated with *Bacillus subtilis* strains. **Rev. bras. eng. agríc. ambient**, v. 24, n. 1, 2020.

TIAN, B. Y., YANG, J. K., LIAN, L. H., WANG, C. Y. & ZHANG, K. Q. Role of neutral protease from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 372-380, 2007.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A. Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 isolated from a temperate Himalayan location. **Ind J Microbiol**, 48:342–347, 2008.

VALICENTE, F.H.; LANA, U.G.P.; PEREIRA, A.C.P.; MARTINS, J.L.A.; TAVARES, A.N.G. Riscos à Produção de Biopesticida à Base de *Bacillus thuringiensis*. **Circ Técnica EMBRAPA Milho e Sorgo**. Sete Lagoas, 2018.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **J. Antibiot.** v. 39, n. 7, p. 888-901, 1986.

XIA, Y.; XIE, S.; MA, X.; WU, H.; WANG, X.; GAO, X. The *purL* gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematicidal activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 322, p.99-107, 2011.

XIANG, N. et al (2017a) Biological Control of *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton. **Plant Disease** 101:774–784,2017a doi: 10.1094/PDIS-09-16-1369-RE

XIANG, N. et al (2017b) Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. **PLoS One** n. 12, 2017a. doi: 10.1371/journal.pone.0181201

XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; DONALD, P. A. Biological control potential of plant growthpromoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology** . v.166, p. 449–458, 2018. doi: 10.1111/jph.12712

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V. et al. (2012). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. **European Journal of Plant Pathology**, 132(4), p. 609-619.

YANG, L. et al. *Lysinibacillus mangiferahumi* sp., a new bacterium producing nematicidal volatiles. **Antonie van Leeuwenhoek** 102, 53-59, nov. 2012.

YOSHIDA S, HIRADATE S, TSUKAMOTO T, HATAKEDA K, SHIRATA A (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Biol. Control** 91(2):181-187.

YORINORI, J. T.; KIIHL, R. A. S. Melhoramento de plantas visando resistência a doenças. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap. 23, p. 715-735.

ZANOTTO, E. et al. Effect of integrating fungicide and biocontrol foliar sprays on maize grain yield and fumonisin content. Meeting of the Working Group Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. **Biocontrol and Microbial Ecology**, 12–15 SEPTEMBER 2016, BERLIN.

ZHOU, Y. Management of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with combinations of different rhizobacterial strains on soybean. **PLoS One** v. 12, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0182654

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 - QUALIDADE DE PRODUTOS COMERCIAIS E PRODUZIDOS *ON FARM* A BASE DE *BACILLUS* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E EFICIÊNCIA DE CONTROLE DE *PRATYLENCHUS BRACHYURUS*

RESUMO

Nematoides praga, como *Pratylenchus brachyurus*, aumentaram sua população em um cenário de produção com até três safras no Estado Mato Grosso (soja, milho ou algodão e pastagem), causando perdas de produtividade. Justifica-se assim a necessidade de se integrar métodos de controle para sustentabilidade da produção de grãos onde esta praga é encontrada. Neste contexto, o controle biológico tem sido uma ferramenta fundamental para tratamento de sementes ou aplicação no sulco de plantio. Com a difusão das técnicas de produção massal de bactérias e a oferta dos insumos e equipamentos necessários para a produção, muitos produtores aderiram à multiplicação de microrganismos na própria fazenda, procedimento este denominado de produção *on farm*. Porém, em decorrência das condições variáveis dessa produção, pouco se sabe sobre a eficiência do processo de multiplicação de células e da capacidade de controle para o alvo e manutenção de sua eficiência após produção. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de produtos comerciais formulados a base de *Bacillus* spp. e de seus subprodutos produzidos *on farm*, para o manejo do nematoide das lesões radiculares. As amostras foram coletadas em diferentes propriedades do Estado do Mato Grosso e diferentes condições de produção (caixa d'água, tanque de inox ou sistema comercial de fermentação), na 2ª safra de 2019/20, logo após a safra, e na safra 2020/21. As células endosporogênicas nas amostras foram quantificadas por meio de plaqueamento e o teste de eficiência no controle da penetração do *P. brachyurus* foi conduzido. Em relação à quantificação de células endosporogênicas, três produtos se mantiveram com a concentração média de 10^8 UFC mL⁻¹. Todos esses produtos pertencentes à espécie *Bacillus amyloliquefaciens*, porém de cepas e formulações diferentes (Rudder, cepa referida como da Embrapa e Nemacontrol). No teste de eficiência, não houve diferença quando se comparou as amostras comerciais e fermentadas. Alguns produtos foram capazes de inibir a penetração do nematoide, sendo quatro amostras do produto *Bacillus subtilis* cnpso 2657 (Vult, Tacto Biotecnologia e Agropecuária Ltda), uma do produto Nemacontrol (*B. amyloliquefaciens*) e outra do produto Onix (*B. methilotrophicus*). Para as variáveis de peso fresco da raiz, peso fresco da parte aérea e peso seco da parte aérea, não houve efeito significativo observado entre as amostras. Portanto, existem condições de produção *on farm* que apresentaram eficiência semelhante ao do produto comercial, mas não houve relação entre o número de células produzidas e a eficiência de controle para o alvo.

Palavras-chave: Bioinsumo. *Nematoide das lesões radiculares*. Soja.

1 INTRODUÇÃO

Com um cenário de produção de 2 safras no Estado do Mato Grosso (soja, milho ou algodão e pastagem), há necessidade de se integrar métodos de controle para sustentabilidade da produção de grãos. Além disso, para o manejo de pragas e doenças causadas por patógenos habitantes do solo, apenas o tratamento de sementes, mesmo quando eficiente para um alvo, não garante o controle de outras pragas e doenças e estas têm aumentado em importância na maior parte das regiões produtoras.

Neste contexto, a adoção do controle biológico como ferramenta para manejo de doença tem aumentado, com o uso de fungos e bactérias para o tratamento de sementes, aplicação no sulco de plantio ou aplicação via pulverizador logo após a emergência de plantas e até aplicações no período reprodutivo, visando qualidade de pós-colheita. Dentre as principais doenças, para as quais está sendo recomendado o controle biológico, destacam-se os nematoides e fungos de solo, a saber: nematoide de galhas (*Meloidogyne* spp.) e nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*), fungo da podridão de caule e raiz (*Fusarium solani*), fungo do tombamento de plantas (*Rhizoctonia solani*) e em algumas regiões, de maior altitude e temperatura amena, para o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (FUNDAÇÃO MT, 2019).

Pratylenchus brachyurus é a espécie relatada como mais frequentemente encontrada na maior parte das regiões de produção do Estado do Mato Grosso, causando prejuízos nas diversas lavouras. Não se tem uma métrica específica de perda para os danos trazidos por *P. brachyurus* mas para nematoides fitopatogênicos o prejuízo é estimado em 35 bilhões de reais ao ano (CROP GLOBAL PROTECTION, 2023). Por ser endoparasita migrador, abre também porta de entrada para infecções por fungos habitantes do solo, potencializando ainda mais os prejuízos (OYEKANMI e FAWOLI, 2010).

A comprovada eficiência de controle biológico para manejo destas doenças tem atraído a atenção de produtores rurais, mas muitas vezes, o custo impeditivo de aquisição desses produtos aliado à crescente oferta de serviços de fermentação na fazenda, tem fomentado a expansão desta modalidade de produção, denominada genericamente de fermentação *on farm*. Nesta fermentação, o produtor adquire o produto comercial como inóculo inicial (ou cultura *starter*), multiplica em meio de cultura adquirido comercialmente ou de fabricação artesanal e procede à fermentação em um biorreator, que pode ser fornecido pela mesma empresa do meio de cultivo ou confeccionado por conta própria.

Além da diversidade microbiana, outro ponto a ser considerado é a concentração mínima de células microbianas para que o controle exercido seja efetivo. Análises preliminares de

produtos obtidos por meio da fermentação *on farm* indicaram que a produção de células sempre esteve abaixo daquela do produto usado como inóculo inicial em pelo menos 1.000 vezes, se considerada apenas as células classificadas como ativo responsável pelo controle da doença. Os metabólitos também exercem importante papel no manejo de doenças, mas, apesar de não haver limitações técnicas, ainda não existem metodologias padronizadas de caracterização nem para produtos comerciais, nem para aqueles de produção *on farm* (BETTIOL et al., 2022).

Portanto, justifica-se a necessidade de se estabelecer metodologias para padronização e para avaliação de eficiência dos produtos de fermentação *on farm*, a fim de se garantir as condições adequadas para obtenção de produtos realmente efetivos e seguros, similar ao anteriormente proposto para quantificação de produtos biológicos à base de bactérias e de fungos (BETTIOL et al., 2013; BETTIOL et al., 2022).

Quando nos referimos às formas de multiplicação e aos sistemas usados pelos produtores é possível perceber que não existe um padrão a ser utilizado. Os sistemas de cultivo, em sua maioria, são realizados em caixa d'água, mas alguns produtores utilizam tanque de inox ou ainda tanques de empresa em comodato, variando de instalações simples a estruturas muito bem elaboradas, o mesmo ocorre com os sistemas de aeração.

O inóculo inicial e o meio de cultura utilizados são os mais diversos, desde produtos comerciais legalmente registrados, a produtos sem identificação. Este inóculo costuma ser um produto comercial registrado, outros sem registro, ou ainda cepas do próprio produtor. Um sistema de injeção de ar é instaurado para oxigenar a mistura, e entre 24 a 48h está pronto para uso. Entretanto, o que se costuma ver são ambientes sem o mínimo de assepsia necessário, apresentando riscos, sendo o maior deles a contaminação do produto com patógenos de humanos e de animais, o que inviabiliza a sua aplicação (SANTOS et al, 2020; LANA et al, 2019; VALICENTE et al., 2018).

Valicente et al (2018) avaliaram a composição microbiana de produtos oriundos da fermentação *on farm* de *B. thuringiensis* e foi verificado que predominavam contaminantes, alguns dos quais não tinham efetividade para controle de pragas e podiam representar risco à saúde humana.

Buscando uma metodologia que seja validada como controle para avaliar a eficiência de biocontrole dos produtos de fermentação *on farm* no controle do alvo biológico *P. brachyurus*, utilizou-se a metodologia do teste de penetração, baseado em Byrd et al (1983).

O objetivo com este trabalho foi comparar produtos produzidos na fermentação *on farm* em diferentes condições com os produtos comerciais, quanto à concentração de células, metabólitos, eficiência de controle do *P. brachyurus* e produtividade na soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Sumarização de dados e coleta de amostras

No período da segunda safra do ano de 2020 e da safra 2021/22 da soja, em parceria com a Associação dos Produtores de Soja e Milho do Estado do Mato Grosso (APROSOJA/MT), foi feito um levantamento de informações referentes ao processo de multiplicação de cepas para controle biológico na fazenda por meio de um questionário aplicado junto aos produtores, com informações sobre as condições de cultivo; inóculo inicial; meio de cultura; equipamentos e processos utilizados. Além das informações, foram coletadas amostras biológicas dos produtos fermentados na fazenda, bem como os produtos comerciais usados como inóculo inicial.

As coletas das amostras dos produtos fermentados e comerciais foram feitas em diversas regiões do Estado do Mato Grosso, incluindo também diferentes sistemas utilizados na multiplicação e variados períodos de fermentação das amostras. As primeiras coletas foram nas principais regiões produtoras de soja do Estado Mato Grosso, abrangendo o Centro, Centro Oeste, Norte, Centro Norte e Sudeste, com um total de 31 amostras fermentadas e comerciais coletadas. Na segunda coleta, além das mesmas regiões visitadas anteriormente, incluiu-se as regiões Leste e Sudoeste, coletando mais 94 amostras coletadas. As amostras dos produtos comerciais (inóculo inicial) e dos produtos *on farm* foram mantidas a 4 °C, com objetivo de manter a viabilidade dos produtos e reduzir a taxa de multiplicação. O processamento se deu em até duas semanas após a coleta, a fim de garantir que as amostras não passassem por alterações, no Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Também foram coletadas amostras para análise de metabólitos, os quais foram mantidas congeladas a -6 °C até o processamento.

2.2. Quantificação de células viáveis

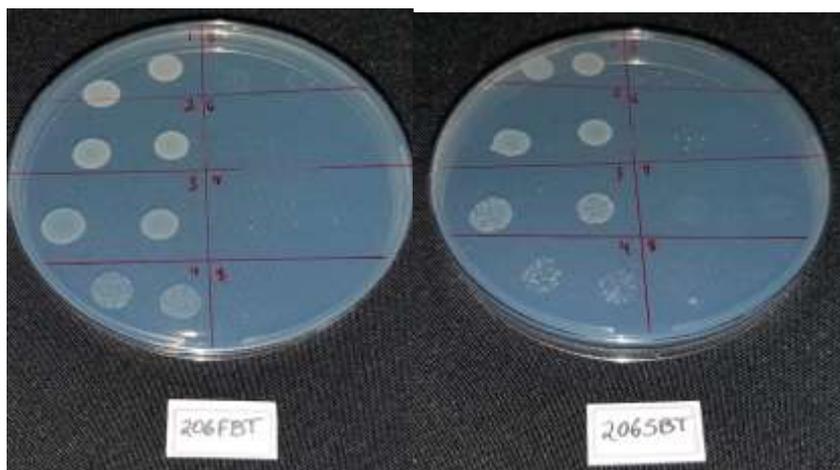
Após a coleta, todas as amostras passaram pelo processo de quantificação de células bacterianas totais (BT) e células bacterianas endosporogênicas (BE). A metodologia foi a mesma utilizada tanto para as amostras fermentadas quanto para as amostras comerciais, fazendo-se uso do banho maria a 80 °C por 12 minutos, para inativação de células vegetativas e quantificação das endosporogênicas, que não são inativadas por altas temperaturas. O número

de células viáveis, de bactérias produtoras de endósporos, foi baseado na metodologia de quantificação de *Bacillus* sp. (EMBRAPA, 2012), com algumas adaptações. As amostras foram diluídas da base inicial do produto (10^{-1}) na proporção de 1:9 com solução de água peptonada. As diluições seriadas foram feitas em tubos de microcentrífuga de 2 mL de capacidade, transferindo 0,1 mL da diluição anterior (10^{-1}), para 0,9 mL de água peptonada, até chegar na diluição de 10^{-8} .

O plaqueamento foi realizado com base na técnica de microgotas (ROMEIRO, 2001), sendo cada placa de Petri dividida em 8 partes devidamente identificadas (FIGURA 1). Com auxílio da micropipeta, as gotas foram depositadas em meio de cultura ágar nutriente (3g L^{-1} de extrato de carne; 5g L^{-1} de peptona bacteriológica; 20g de ágar bacteriológico). Cada diluição foi plaqueada com gotas de 0,01 mL. As células foram incubadas em estufa B.O.D. a 30 ± 2 °C, por um período de 24 h e fotoperíodo de 12 h. Após o período de incubação, as colônias foram contadas para se obter o número de unidades formadoras de colônias (UFC), por meio do seguinte cálculo: $N^{\circ}\text{ UFC mL}^{-1}$: $n^{\circ}\text{ colônias} \times \text{fator diluição} / \text{alíquota (mL)}$ (BETTIOL et al., 2022).

Para padronizar a quantificação, minimizar a probabilidade de haver contaminantes nas amostras e contar apenas os *Bacillus*, optamos por realizar a estatística apenas com as BE.

Figura 1 - Amostras plaqueadas nas diferentes diluições em contendo meio ágar nutriente. 206FBT – Bactérias totais em uma amostra fermentada. 206SBT – Bactérias totais do produto comercial utilizado como inóculo inicial da amostra 206FBT.



Fonte: Do autor (2023)

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa Sisvar, versão 4.0 (FERREIRA, 2008). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%

($P < 0,05$) de probabilidade, quando o efeito do tratamento foi significativo para os produtos comerciais e fermentados (APÊNDICE A).

2.3 Avaliação da eficiência de produtos de fermentação *on farm* e comerciais na penetração de *Pratylenchus brachyurus* em soja em casa de vegetação

O inóculo do nematoide foi obtido a partir de uma população pura de *P. brachyurus* multiplicada por 90 dias em plantas de milho e soja, em casa de vegetação. As raízes foram trituradas em liquidificador, despejadas sobre peneira de 200 mesh, sobreposta a de 500 mesh, para a limpeza e coleta apenas de *P. brachyurus*. A alíquota coletada foi levada para quantificação dos fitonematoides em microscópio óptico invertido, utilizando-se uma câmara de Peters para ajustar a concentração necessária de 100 juvenis e/ou adultos por mL do inóculo.

A cultivar de soja usada neste estudo foi a variedade 6410, Intacta PR2 Pro da Monsoy. Essa variedade é suscetível ao nematoide do cisto (*Heterodera glycines*) e da galha (*Meloidogyne* spp.) e não existem relatos de resistência ao nematoide das lesões, objeto deste estudo. As sementes de soja foram semeadas em tubetes de polietileno com volume de 55 mL, preenchido com areia. Cada tubete recebeu um furo com 2 cm de profundidade, onde foi feita a semeadura das sementes e a aplicação das amostras comerciais e fermentadas.

A aplicação dos tratamentos foi diretamente no sulco de plantio. Para cálculo da quantidade do produto a ser testado considerou-se a aplicação de 5 L ha⁻¹ de cada amostra, diluído em 35 L de água, recomendação que os produtores do Mato Grosso seguem nas aplicações dos seus fermentados. Preparou-se uma diluição de 125 µL do produto a ser testado em 875 µL de água, aplicando 114 µL por semente.

Os tratamentos utilizados nesta etapa foram as amostras fermentadas coletadas na 2ª safra 2019/20 e seus respectivos produtos usados como inóculo inicial (APÊNDICE B). Para o controle negativo, apenas água foi aplicada nos tubetes. Após a aplicação dos tratamentos, os tubetes foram mantidos em casa de vegetação com temperatura controlada (28°C +/-2) e a irrigação realizada uma vez por dia.

Após 14 dias da semeadura (DAS), as plântulas foram infestadas com uma suspensão de 2 mL contendo 200 juvenis e/ou adultos de *P. brachyurus*, distribuída em dois orifícios de aproximadamente 2 cm de profundidade próximos ao caule de cada planta.

A avaliação da penetração de *P. brachyurus* no sistema radicular da soja foi realizada após 11 dias da infestação, utilizando a metodologia de coloração de nematoides no interior das raízes com fucsina ácida, proposta por Byrd et al. (1983) e adaptada por Zamboni et al (2019).

Inicialmente, as raízes foram cuidadosamente lavadas em água corrente sobre uma peneira para evitar perda de pequenos pedaços, secas em papel absorvente e pesadas, para o cálculo do número de nematoides por grama de raízes. Em seguida, foram colocadas em potes plásticos devidamente identificados e cobertas com solução de hipoclorito (50 mL de água; 30 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%), o suficiente para submergir a raiz por inteiro, durante 6 minutos, sob agitação constante com um bastão de vidro. Após esse tempo, foram novamente lavadas em água corrente e deixadas cobertas com água por um período mínimo de 15 minutos e, em seguida, passadas novamente pelo processo de lavagem com água corrente e colocadas no pote, onde foram cobertas com 30 mL de água destilada. Em seguida, foi acrescentado 1 mL do corante (Fucsina ácida: 75 mL de água destilada, 25 mL de Ácido acético e 0,35 g de Fucsina) e a raiz foi levada imediatamente ao micro-ondas para fervura. Após a fervura por um minuto, os potes foram deixados em temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida as raízes foram lavadas novamente em água corrente, colocadas de volta ao pote e cobertas com glicerina suficiente para umedecer e manter as raízes hidratadas (1:1, água e glicerina).

As raízes foram armazenadas em potes com tampas, em câmara fria até o momento da contagem. Para quantificação dos nematoides no interior da raiz foram montadas lâminas de vidro (20 x 6 cm) com as raízes. Uma lâmina foi utilizada como base, onde foi colocada a raiz cortada em segmentos do tamanho da lâmina e comprimida com outra lâmina para fechar. Em seguida, foram observadas em microscópio estereoscópico para a contagem.

Os dados de penetração foram relativizados para a testemunha, ou seja, a penetração obtida na testemunha representou o 100% de penetração, representando o máximo potencial de penetração do inóculo usado e todos os outros tratamentos foram relativizados de acordo com esta testemunha.

Além da avaliação da penetração da população de *P. brachyurus* no sistema radicular da soja e peso fresco das raízes, avaliou-se também o peso fresco e seco da parte aérea. Para avaliação do peso seco da parte aérea o material foi seco em estufa a 70 ± 2 ° C por 48 horas e pesado em balança de precisão, sendo os resultados expressos em gramas (g).

2.4 Validação em campo

O experimento foi conduzido na safra 2021/2022. Das 5 áreas montadas, apenas 3 foram conduzidas até o final. Na área de Querência, o produtor colheu por engano a área onde estava localizado o experimento e, portanto, não pode ser feita a última coleta de nematoides nem a

determinação da colheita. No ensaio de Sorriso, a área não foi manejada adequadamente quanto às plantas invasoras e também não pudemos colher os resultados desta área. Para escolha das áreas, além do interesse em participar do projeto, foi levado em consideração o histórico de incidência de nematoides informado pelo produtor, bem como laudos feitos em laboratórios especializados para a presença de *P. brachyurus* (TABELA 1).

Tabela 1 - Laudos apresentados pelos produtores nas áreas onde foram instalados os experimentos com o Levantamento de *Pratylenchus brachyurus*. Para as análises foram usados 5 g de raízes e 100 cm³ de solo, com base nas metodologias de Jenkins, 1964 e Coolen& D´Herde, 1972).

Área	<i>P. brachyurus</i> 100 cm ³ solo	<i>P. brachyurus.</i> 5 g de raiz	Data do laudo
Campo Novo do Parecis	60	1240	29/09/21
Campo Verde	100	0	01/10/21
Nova Mutum	*	*	*
Sorriso	20	0	30/09/21
Querência	80	180	30/09/21

Fonte: Do autor (2023).

Na safra 2021/22, foram montados 5 experimentos, sendo dois na região Centro (Sorriso e Nova Mutum), um na região Sudeste (Campo Verde), um na região Oeste (Campo Novo do Parecis) e um na Região Leste (Querência) do Estado do Mato Grosso, considerando a as regiões conforme a Lei Estadual 10.340, de 2015.

A escolha do produto comercial *Bacillus subtilis* cepa UFPEDA 764 (Rizos, Lallemand Plant Care) e do meio de cultura Multibacter foi baseada em resultados positivos para o controle de *P. brachyurus*, obtidos trabalhos prévios, desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico da UFLA, em dissertação defendida por Lívia Emmanuelle Simões de Oliveira (OLIVEIRA, L.E.S., 2022) além de ser o produto e o meio de cultura mais utilizados pelos produtores consultados. Já a escolha do produto oriundo do sistema de produção comercial Solubio se deu por este ser um sistema fechado de produção *on farm*, com tanque de multiplicação, meio de cultura e produto comercial usado como inóculo inicial determinados pela empresa que os fornece.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, com 30 parcelas constituídas por 6 linhas de 5 m de comprimento e espaçamento entre linhas de 0,45 m, 0,50 m ou 0,60 m, seguindo as particularidades de cada produtor.

Foram utilizados 6 repetições para cada um dos 5 tratamentos: Testemunha com água (T1), Produto Comercial Rizos *Bacillus subtilis* cepa UFPEDA 764 (Rizos, Lallemand Plant Care) (T2), Produção do fermentado *Bacillus subtilis* cepa UFPEDA 764 (Rizos, Lallemand Plant Care) em caixa d'água sem controle de temperatura (T3), Produção do fermentado *Bacillus subtilis* cepa UFPEDA 764 (Rizos, Lallemand Plant Care) em caixa d'água com controle de temperatura a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (T4) e a produção de fermentado por meio do sistema fechado da Solubio com inóculo inicial e meio de cultura próprios com detalhes da cepa de *Bacillus* e meio de cultura não informados (T5).

Foi feita a fermentação no município de Campo Verde (MT) e utilizada para aplicação em todos os 5 experimentos. O transporte foi feito em caixas térmicas, mantendo-as refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de aplicação por até três dias.

Foram utilizadas plantadeiras para adubar de acordo com o recomendado para a cultura, o plantio das sementes e aplicação no sulco foram feitos à mão de acordo com cada tratamento. Após a aplicação dos tratamentos via sulco de plantio, os sulcos foram fechados manualmente. A aplicação no sulco foi feita com pulverizador costal e bico do mícron de jato dirigido, com pressão em torno de 20 psi e 40L de calda por hectare, sendo a proporção de 5 L de cada tratamento e 35 L de água.

Cada área experimental seguiu as recomendações locais de cada produtor em relação aos tratos culturais para manejo de pragas e doenças, com exceção do nematicida químico que foi excluído em todas as aplicações. As condições edafoclimáticas costumam ser muito diferentes entre as regiões no MT e, conseqüentemente, direciona para diferentes práticas de manejo. Na tabela 2 são apresentadas as cultivares utilizadas, espaçamento, número de sementes por metro, data de plantio e colheita de cada experimento nas diferentes regiões, usando todos os tratos culturais padrão da fazenda.

Tabela 2 - Informações das áreas onde foram montados os experimentos no Estado do Mato Grosso para avaliação da eficiência do controle biológico comercial e produzido *on farm* na dinâmica da população de *Pratylenchus brachyurus* e produtividade de soja realizado na safra 2021/22.

Fazenda	Região	Semente	Espaçamento	Sementes por metro	Colheita
Campo Verde	Sudeste	Desafio	0,60m	20	112 dias após plantio
Sorriso	Centro	Nidera 7901	0,5m	14 a 15	108 dias após plantio
Campo Novo do Parecis	Oeste	Nidera 7901	0,45m	15 a 16	113 dias após plantio
Querência	Leste	Neogen Neo790	0,5m	14	110 dias após plantio
Nova Mutum	Centro	TMG - FT3179	0,5m	11.2	110 dias após plantio

Os parâmetros utilizados foram de acordo com o uso padrão de cada fazenda. A padronização se deu apenas nos tratamentos aplicados.

Fonte: Do autor (2023).

As coletas de amostras compostas de solo e de raízes foram formadas por cinco amostras simples por parcela, desprezando a borda do talhão. As coletas ocorreram nos dias zero (antes da semeadura), 60 (correspondente ao estágio R1) e no momento da colheita (correspondente ao estágio R8), na safra 2021/2022. As coletas de material vegetal e solo foram conservadas em caixa de isopor até chegar ao laboratório para análise.

Uma alíquota de 100 cm³ de solo e o peso de todas as raízes de cada amostra composta foi utilizada para extração dos nematoides *P. brachyurus*. A densidade total dos nematoides foi calculada em função de 100 cm³ de solo e do número por grama de raízes. Para determinar a flutuação populacional de *P. brachyurus*, foram extraídos os nematoides pelos métodos de flotação de centrífuga em solução de sacarose, conforme Jenkins (1964) e o método de extração de nematoides de raiz conforme Coolen e D'Herde (1972), com modificações. Não foi adicionado o caulim em pó no processo de centrifugação. Por fim, a produtividade líquida (kg/ha) da soja, o peso por mil grãos (PMG) e o número de grãos por vagem (NGV) em cada um dos experimentos foram estimados.

2.5 Desenho experimental e análises estatísticas

Os experimentos de campo foram conduzidos em blocos casualizados com seis repetições por tratamento. Para todas as análises, foram realizados o teste de normalidade de

Shapiro-Wilk e o teste de hipótese com teste F para igualdade de variâncias usando o software Sigma Plot. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e para os efeitos significativos as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 5\%$), utilizando o programa Sisvar (Build 72) (FERREIRA, 2008).

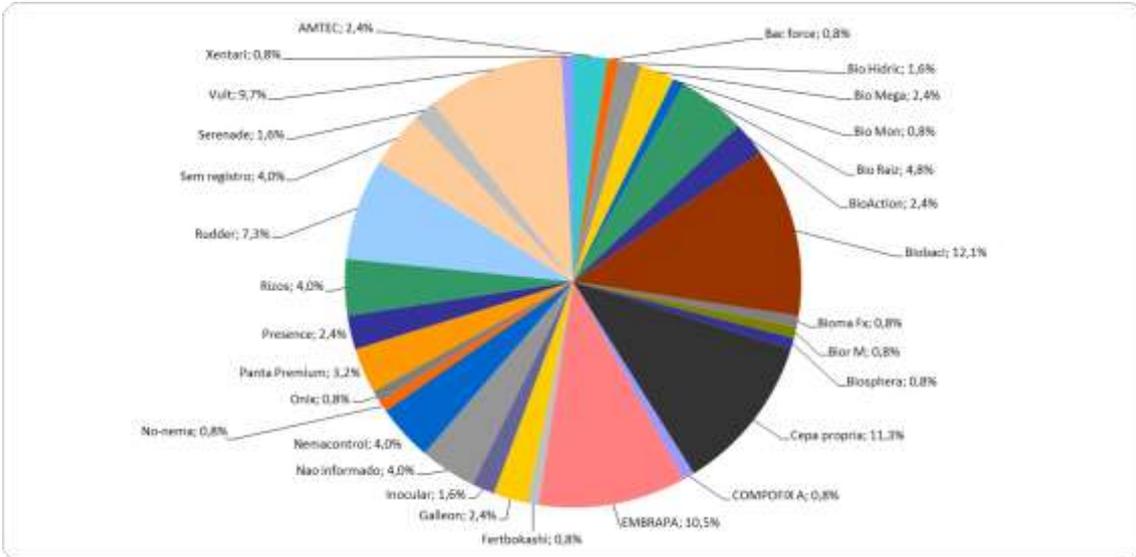
3 RESULTADOS

3.1 Sumarização de dados e coleta de amostras

Com o levantamento realizado, observou-se uma ampla gama de variedade dos produtos comerciais usados como inóculo inicial (FIGURA 2), havendo predominância do produto Biobaci (12,1%); da Cepa do próprio produtor (11,3%) e da Cepa da Embrapa (10,5%). Foi possível perceber que questões como preço do inóculo, indicação de outros produtores e comodato com empresas que forneciam equipamentos para a multiplicação influenciaram na escolha por determinado produto.

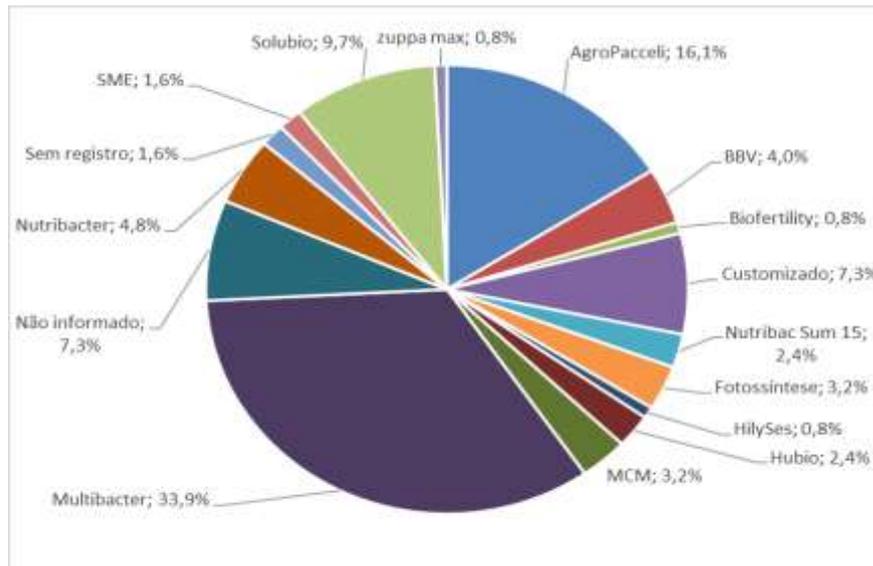
O mesmo critério de escolha também predominou para escolha do meio de cultura utilizado no processo de multiplicação do inóculo, no entanto com um número reduzido de produtos (FIGURA 3). Foi possível determinar uma dominância do meio de cultura Multibacter (42,34%); seguido por Agropacelli (20,16%) e Solubio (9,7%). No Apêndice C é possível consultar os meios de cultura e seus fabricantes.

Figura 2 - Levantamento dos produtos adotados pelos produtores de Soja no Estado do Mato Grosso, nas regiões Centro, Centro Oeste, Norte, Centro Norte e Sudeste, na 2ª safra 2019/20 e safra 2020/21, e usados como inóculo inicial para multiplicação *on farm*. Os produtos que apresentaram maior adesão foram o Biobaci (12,1%); Cepa própria (11,3%) e Cepa da Embrapa (10,5%).



Fonte: Do autor (2023)

Figura 3 - Levantamento dos tipos de meio de cultura adotados pelos produtores de Soja no Estado do Mato Grosso, nas regiões Centro, Centro Oeste, Norte, Centro Norte e Sudeste, na 2ª safra 2019/20 e safra 2020/21, usados na multiplicação *on farm*. Os produtos que apresentaram uma maior adesão foram o Multibacter (42,34%); Agropacelli (20,16%) e Solubio (9,7%)



Do autor (2023).

As principais variáveis qualitativas levantadas durante o período de sondagem e coleta das amostras, na 2ª safra 2019/20, e na safra 2020/21, podem ser consultadas no Apêndice D.

3.2 Quantificação de células

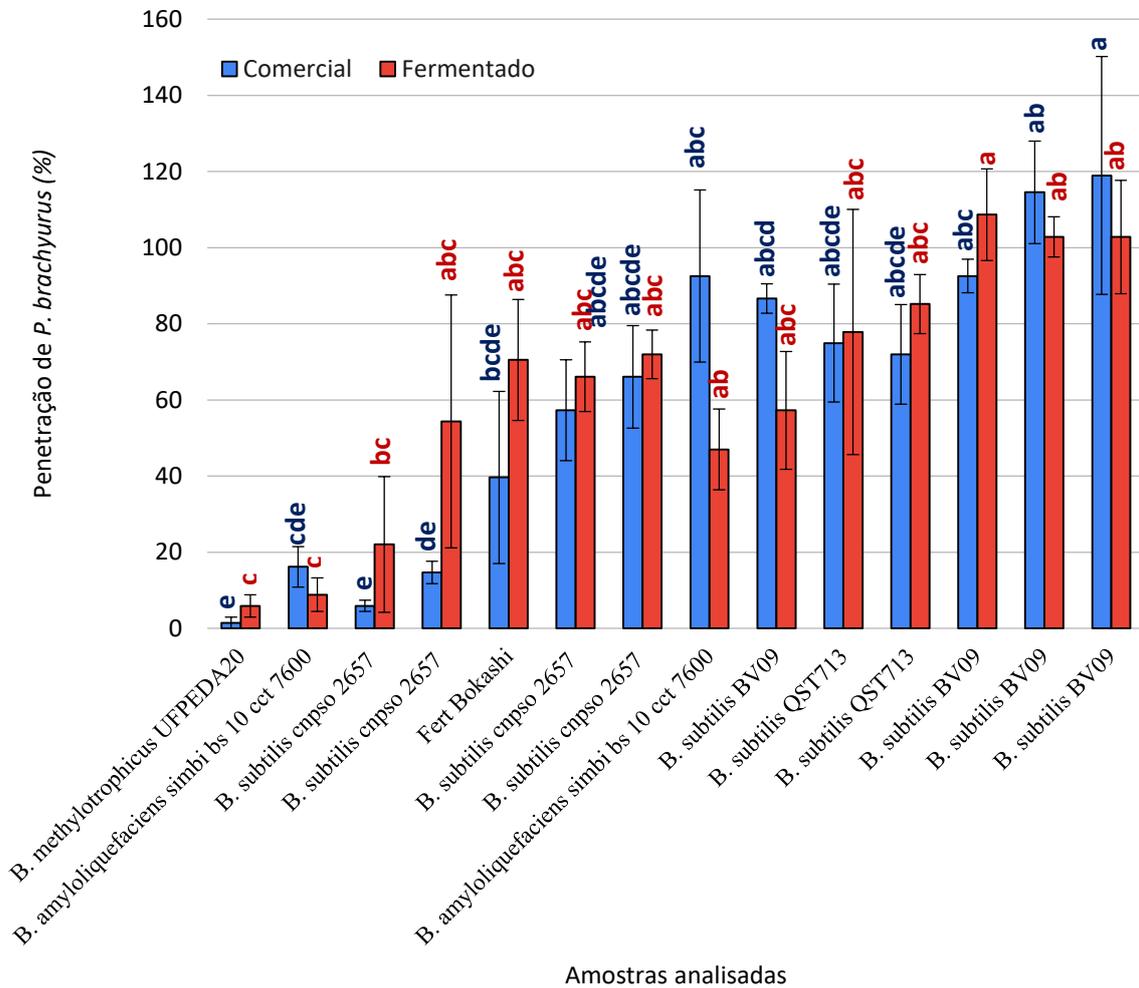
Os melhores produtos comerciais na quantificação de BE foram: 186 e 161, seguido dos produtos 178, 116, 117, 159, 119, 118 e 160, com valores médios variando entre $5,62 \times 10^8$ a $8,12 \times 10^8$ e $3,02 \times 10^8$ a $4,07 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, respectivamente. Já para os produtos fermentados, os que apresentaram melhores resultados foram: 153 e 187, seguidos por 159, 117, 125, 119 e 192, com média de UFC mL⁻¹ variando entre $6,02 \times 10^8$ e $8,51 \times 10^8$ e $3,01 \times 10^8$ a $3,71 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, respectivamente.

Em relação aos produtos comerciais com pior quantificação de BE tiveram destaque o 141 e 182, seguidos dos produtos 170 e 168, com média de $3,01 \times 10^2$ e $4,89 \times 10^2$ UFC mL⁻¹, respectivamente. Neste mesmo quesito, os produtos fermentados com pior desempenho foram os 150 e 149 com média de $1,0 \times 10^3$ UFC mL⁻¹, seguidos por 106, 104, 179, 170, 113, 111, 166, 110, 128, 135, 140, 127, 154, 102, 148, 143, 168, 133, 163, 108, 51, 145, 131, 126, 146, 181 e 114, com média variando entre $3,01 \times 10^3$ e $5,37 \times 10^3$ UFC mL⁻¹.

3.3 Avaliação da eficiência de produtos de fermentação *on farm* e comerciais na penetração de *Pratylenchus brachyurus* em soja em casa de vegetação.

Ao avaliar o teste de eficiência, não houve significância entre a amostra e natureza ($p = 0,3967$), o que significa que a redução de penetração independeu de o produto ter origem comercial ou de fermentação *on farm*. Ao comparar apenas a natureza das amostras (Fermentado ou Comercial) também não houve efeito significativo ($p = 0,7343$). Houve diferença significativa entre as amostras apenas para a variável penetração de nematoides (CV 43,22%). Quatro amostras, 22, 19, 20 e 17, apresentaram maior controle, com porcentagem de penetração variando de 3,67 a 34,5%. Nas amostras com os produtos 11, 13 e 15 foram observados aumento de até 110% na penetração de nematoides nas raízes (FIGURA 4). Para as variáveis de peso fresco da raiz (média de 0,65 a 0,89, CV 25%), peso fresco da parte aérea (0,59 a 0,75, CV 18,4%) e peso seco da parte aérea (0,11 a 0,17, CV 22%) não houve diferença.

Figura 4 - Teste de eficiência no controle penetração de *P. brachyurus* (%) em soja realizado com os produtos fermentados e seus respectivos produtos comerciais.



Do autor (2023).

3.4 Validação em campo

Na Tabela 3 estão apresentados os diferentes efeitos entre os tratamentos nas variáveis estudadas.

Tabela 3 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o número de grãos por vagem (NGV), Peso de mil grãos (PMG) e produtividade (PROD.) MT 2021.

Trat	Área 1- Campo Novo do Parecis (CNP) (Cultivar Nidera 7901)			Área 2 - Campo Verde (CV) (Cultivar Desafio)			Área 3 - Nova Mutum (NM) (Cultivar TMG - FT3179)		
	NGV	PMG	PROD	NGV	PMG	PROD	NGV	PMG	PROD
T1- testemunha	135,3a ^a	169,87a	33,44a	151,00a	187,58ab	47,74a	202,17a	122,99b	23,67 ^a
T2 – comercial Rizos	147,00a	166,87a	35,54a	180,17 ^a	182,09ab	49,08a	198,00a	156,5a	20,51 ^a
T3 – fermentado Rizos sem controle temperatura	142,66a	165,52a	40,79a	152,33 ^a	171,02b	49,94a	188,50a	151,84a	23,36 ^a
T4- fermentado Rizos com controle temperatura	147,33a	166,29a	35,89a	155,67 ^a	189,00a	50,13a	198,33a	152,91a	26,25 ^a
T5 - fermentado por meio do sistema fechado da Solubio.	136,17a	172,17a	33,45a	153,33 ^a	188,67ab	50,37a	227,67a	154,99a	26,28 ^a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). PROD - Produtividade - sc/ha; PMG - Peso de mil grãos (g); NVG – Numero de grãos por vagem (unid.)

Fonte: Do autor (2023).

Para a variável NVG, nenhuma das áreas apresentou diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Para o Peso de Mil Grãos (PMG), na área CNP não houve diferença entre os seus tratamentos, embora foi possível perceber discreto aumento de 1,4% no fermentado por meio do sistema fechado da Solubio, e uma perda de 2,56% no fermentado Rizos sem controle temperatura.

O experimento realizado na área CV expressou diferença entre seus tratamentos em relação a variável PMG ($p \leq 0,05$). A testemunha, o comercial Rizos e o fermentado por meio do sistema fechado da Solubio não diferiram entre si, mas apresentaram diferença quanto ao fermentado Rizos sem controle temperatura, com uma redução de 8,33%, e ao fermentado Rizos com controle temperatura, com aumento de 0,8% em relação à testemunha.

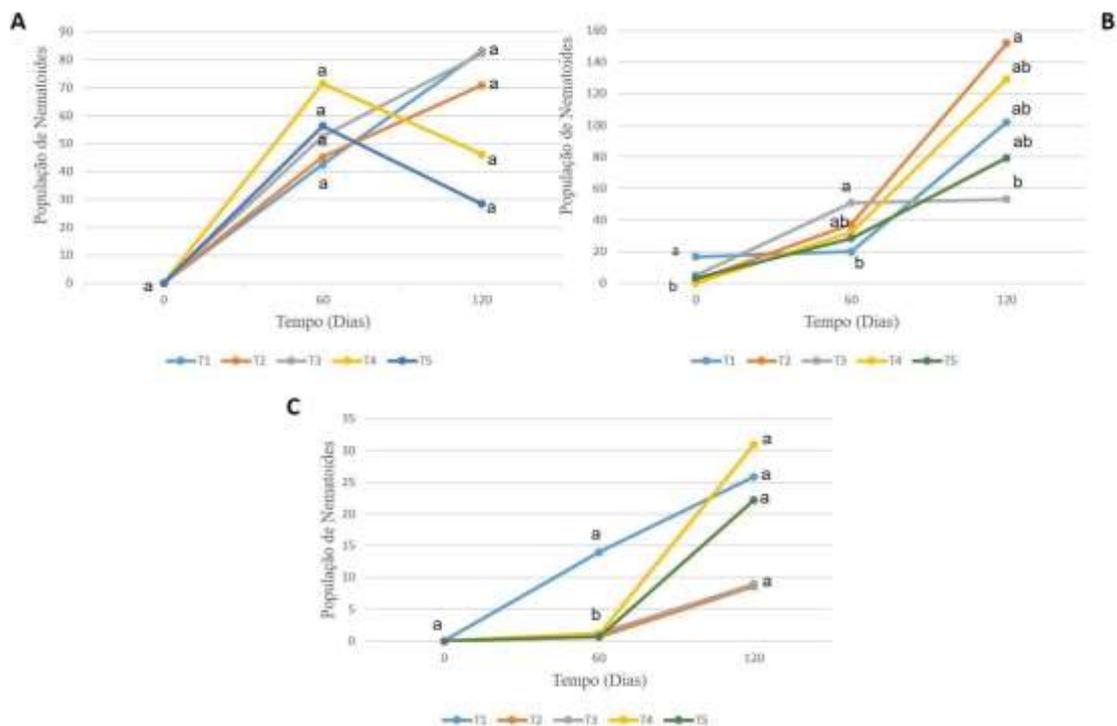
Para a área NM, apenas a testemunha apresentou diferença em relação aos demais tratamentos, que tiveram aumento variando de 23,4 (fermentado Rizos sem controle temperatura) a 27,25% (comercial Rizos) no peso de mil grãos.

Por fim, quanto à produtividade, nenhuma das três áreas apresentaram diferença entre seus tratamentos. Embora o tratamento fermentado Rizos sem controle temperatura tenha apresentado um acréscimo de 22% na sua produtividade líquida, na área CNP. Nas áreas 2 e 3, o fermentado por meio do sistema fechado da Solubio. demonstrou um aumento de 5,5% e

11%, respectivamente.

Com relação a variação da população de *P. brachyurus* (FIGURA 5), nas três áreas experimentais a população inicial, ao zero dia, foi muito baixa. Com exceção da área CV, que apresentou uma pequena população na sua testemunha, diferindo dos demais tratamentos da área ($p < 0,05$).

Figura 5 - Representação gráfica da flutuação da população do *Pratylenchus brachyurus* (Densidade populacional) ao zero dia (0), 60 dias e na colheita (120 dias aproximadamente), nas 3 áreas avaliadas (Solo + raiz). A - Campo Novo do Parecis; B - Campo Verde; C- Nova Mutum. Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (T1). Testemunha com água; (T2) Produto Comercial Rizos; (T3) Produção do fermentado Rizos em caixa d'água sem controle de temperatura; (T4) Produção do fermentado Rizos em caixa d'água com controle de temperatura a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; (T5) Produção de fermentado por meio do sistema fechado da Solubio.



Do autor (2023)

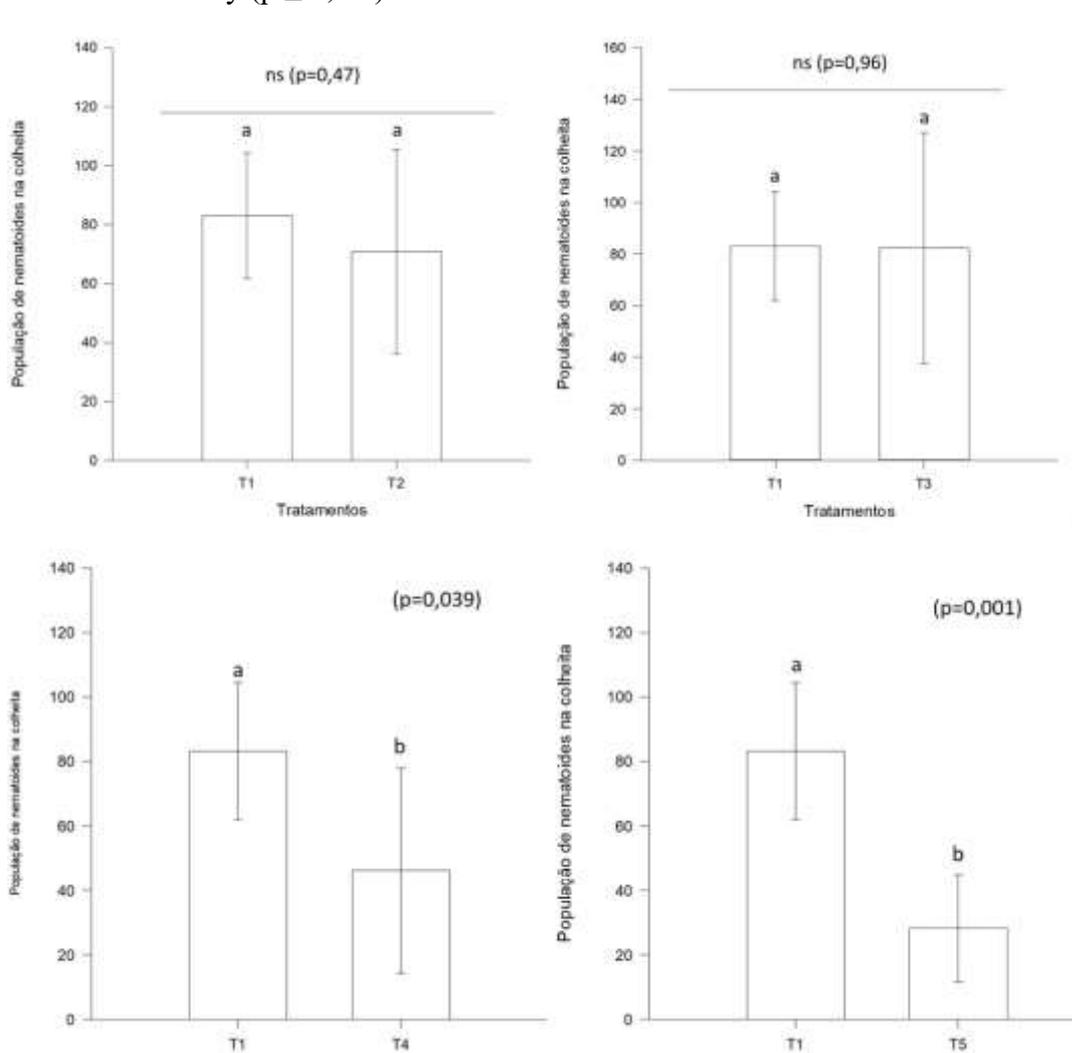
Aos 60 dias, os 3 experimentos apresentaram um comportamento diferente. Na área A - CNP, a população de nematoides, de todos os 5 tratamentos apresentou um grande aumento, de forma que não houve diferenciação entre eles. Na área B - CV, com exceção da testemunha, que se manteve estável, os demais tratamentos também tiveram um aumento na população, diferindo entre eles. O fermentado Rizos sem controle temperatura teve o maior aumento aos

60 dias, seguido dos tratamentos comercial Rizos, fermentado Rizos com controle temperatura e fermentado por meio do sistema fechado da Solubio, e por fim a testemunha. Já na área NM, a Testemunha se diferenciou dos demais tratamentos, apresentando significativo aumento da população de *P. brachyurus*.

Por fim, na colheita, aos 120 dias pós plantio, as áreas CNP e NM não apresentaram diferença entre os tratamentos quanto a densidade populacional. Já na área CV, o tratamento comercial Rizos mostrou um acréscimo significativo na sua população de nematoides, seguido pelos tratamentos testemunha, fermentado Rizos com controle temperatura e fermentado por meio do sistema fechado da Solubio, e por fim do fermentado Rizos sem controle temperatura, com a menor população na fase da colheita.

No entanto, ao comparar cada tratamento de forma isolada com a testemunha (FIGURA 6), podemos ver que existe uma diferença ($p < 0,05$) entre a testemunha e os tratamentos fermentado Rizos com controle temperatura e fermentado por meio do sistema fechado da Solubio. na área experimental de CNP.

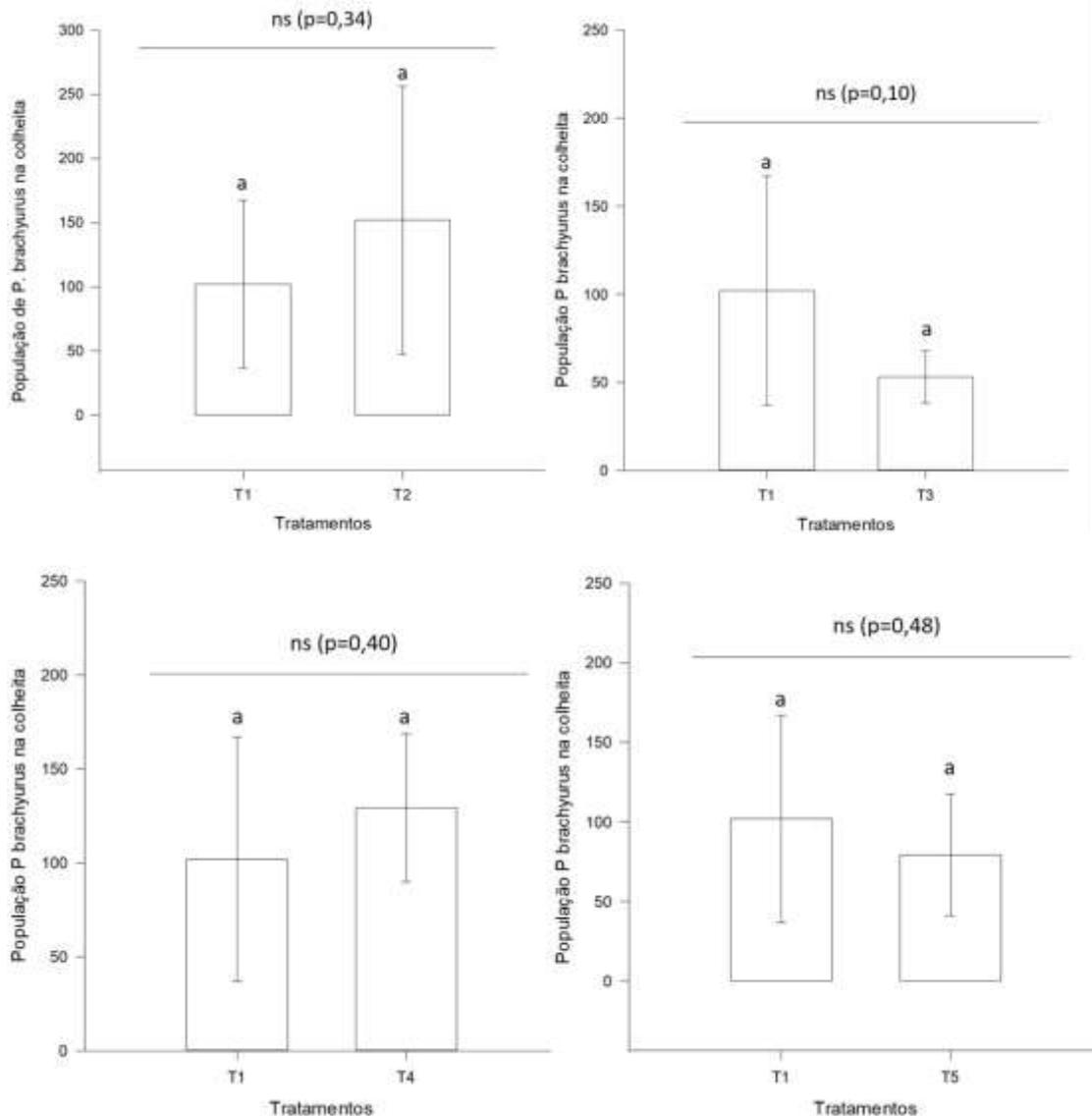
Figura 6 - Comparação entre a testemunha e os demais tratamentos aplicados no ensaio de campo da área de Campo Novo do Parecis para população de *P. brachyurus*. (T1) Testemunha com água; (T2) Produto Comercial Rizos; (T3) Produção do fermentado Rizos em caixa d'água sem controle de temperatura; (T4) Produção do fermentado Rizos em caixa d'água com controle de temperatura a 30 °C + 2°C; (T5) Produção de fermentado por meio do sistema fechado da Solubio. Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Do autor (2023).

Para a área de Campo Verde não houve diferença entre a testemunha e os demais tratamentos (FIGURA 7).

Figura 7: Comparação entre a testemunha e os demais tratamentos aplicados no ensaio de campo da área de Campo Verde para população de *P. brachyurus*. (T1) Testemunha com água; (T2) Produto Comercial Rizos; (T3) Produção do fermentado Rizos em caixa d'água sem controle de temperatura; (T4) Produção do fermentado Rizos em caixa d'água com controle de temperatura a 30 °C + 2°C; (T5) Produção de fermentado por meio do sistema fechado da Solubio. Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

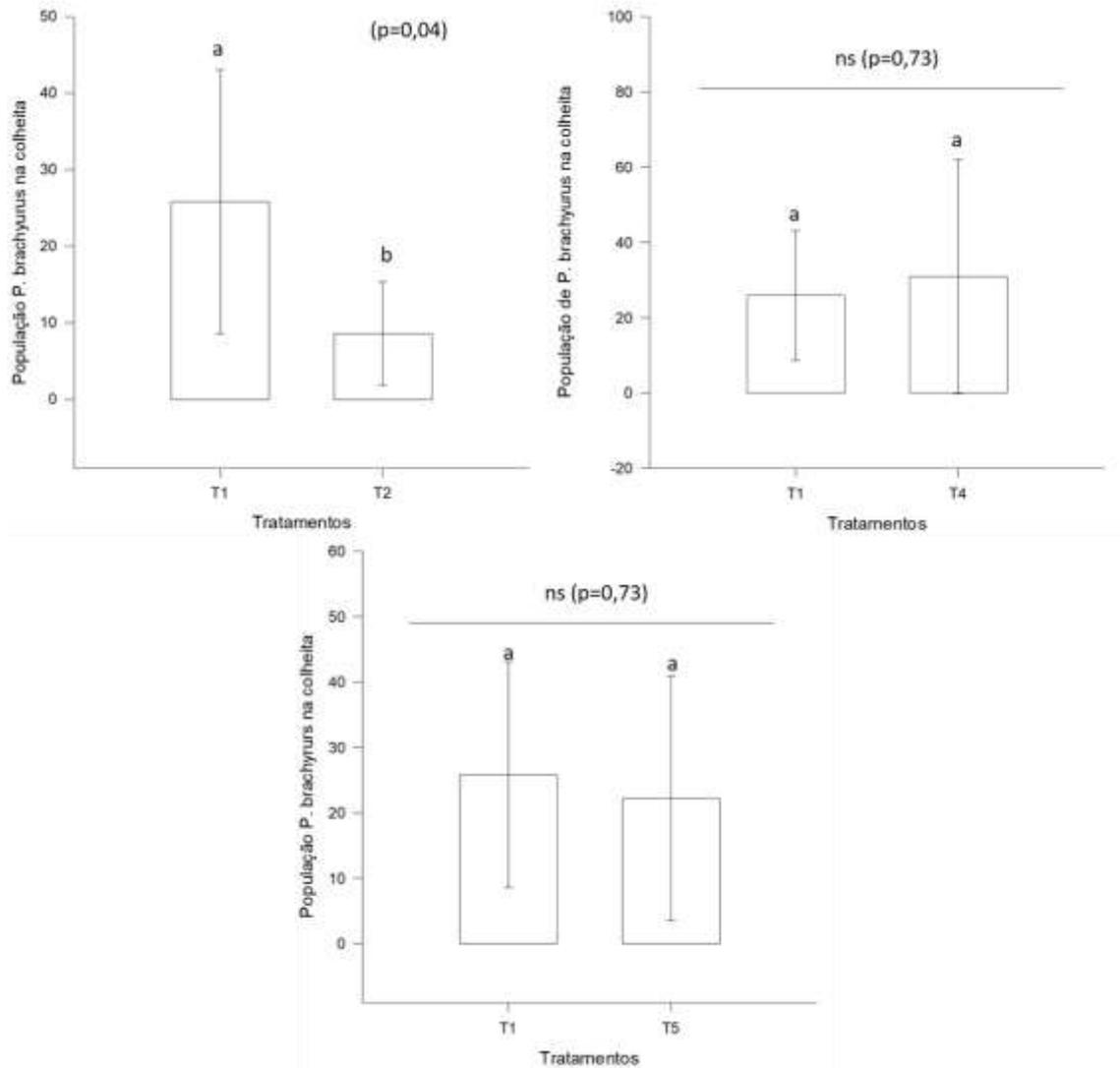


Do autor (2023)

Ao compararmos a testemunha com os demais tratamentos, na área de Nova Mutum, apenas foi possível perceber diferença com o comercial Rizos. Já na comparação com o fermentado Rizos sem controle temperatura, não foi possível observar as premissas estatísticas no teste F (FIGURA 8).

Figura 8 - Comparação entre a testemunha e os demais tratamentos aplicados no ensaio de campo da área de Nova Mutum para população de *P. brachyurus* (T1) Testemunha

com água; (T2) Produto Comercial Rizos; (T4) Produção do fermentado Rizos em caixa d'água com controle de temperatura a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; (T5) Produção de fermentado por meio do sistema fechado da Solubio. Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2023).

4 DISCUSSÃO

Dos produtos analisados, três (117, 119 e 159) se mantiveram com a melhor quantificação de BE, tanto no produto comercial como no fermentado. Os 3 produtos, apesar de apresentarem origem comercial diferente (Rudder, cepa de especificação de referência da Embrapa e *Bacillus amyloliquefaciens* simbi bs 10 cct 7600, Nemacontrol, Simbiose), possuem sua formulação baseada na espécie *Bacillus amyloliquefaciens*. Como não foi realizada uma análise total dos microrganismos a nível molecular, através do gene

ribossomal 16S não há como inferir sobre qualidade e/ou sucesso da multiplicação.

Vários fatores estão envolvidos diretamente no processo de multiplicação, podendo impactar os resultados, tanto de forma positiva como negativa (FLORÊNCIO et. al., 2022). Desde a qualidade do produto usado como inóculo inicial, das condições que enfrenta do momento que sai da fábrica até chegar nas mãos do produtor, a forma de armazenamento a qual é submetida e a dosagem utilizada para iniciar o processo de multiplicação

O sistema de produção, como um todo, também está diretamente relacionado ao sucesso deste processo. E nele temos inúmeras variáveis interferindo, além da qualidade do inóculo inicial, como o tipo de tanque de armazenamento, sistema de aeração, o meio de cultura utilizado, controle de temperatura, pH, tempo de batelada, dose utilizada e condições de assepsia. O fato de o sistema de produção *on farm* não ser estéril, ao adicionar a fonte de microrganismo alvo, haverá a presença de diversos outros provenientes da água, do ar, do açúcar, do antiespumante e do próprio meio de cultura. A esterilização é um processo, físico ou químico, que elimina as formas de vida vegetativas e esporuladas. A presença de uma única célula de um microrganismo contaminante pode ser suficiente para garantir sua multiplicação em taxas, algumas vezes, maior que a do microrganismo alvo, colocando a perder todo um lote do produto (SCHMIDELL et al., 2001), e gerando assim um produto sem efeito agrônômico e com contaminantes que podem representar riscos para humanos.

O gênero *Bacillus* encontra-se praticamente em todos os ambientes, com multiplicação em temperatura ótima entre 25 e 37 °C. Quanto ao pH, suporta também valores extremos, podendo crescer entre um pH 2 a 10. Essa heterogeneidade constitui ampla variedade de nichos ecológicos em que as espécies de *Bacillus* são capazes de ocupar e diferentes substratos que podem ser utilizados no seu crescimento (LOGAN, 2009; ROONEY et al., 2009). Limitações de nutrientes resultam na iniciação de diferentes estratégias de adaptação bacteriana, entre elas a esporulação (BURKHOLDER e GROSSMAN, 2014; PEREGO e HOCH, 2014).

Dos produtos analisados, dois (168 e 170) apareceram com baixa quantificação de BE, tanto nos produtos comerciais como nos fermentados. Ambos de origem distinta (AMTEC e Biobaci), mas oriundos da espécie *B. subtilis*.

Não existe um padrão mínimo entre a produção das amostras que permita afirmar o que pode estar interferindo no processo para um maior ou menor número de unidades formadoras de colônias. Em geral, nos processos de fermentação foi observado que as instalações dos tanques de multiplicadores não possuem a condição necessária para garantir um ambiente livre de contaminação, com aberturas que permitem o contato com o meio

externo, ou sem o uso devido de tampas. Os meios de cultura e tanques usados na multiplicação, em sua maioria, também não são submetidos a processos de esterilização, concordando com resultados encontrados no trabalho de Valicente, et al. (2018). Todos esses fatores podem contribuir para o crescimento de organismos contaminantes, dando condições para que estes tenham um crescimento ainda mais agressivo do que o microrganismo de interesse do produtor (VALICENTE, et al., 2018).

Um fator importante a ser considerado é o número de células endosporogênicas desses produtos fermentados. Mesmo com as condições não sendo favoráveis e com a presença de possíveis contaminantes, muitos produtos mostraram uma concentração de células endosporogênicas elevada.

Na fase de endósporo, o microrganismo tem sua atividade reduzida, sendo considerada uma fase de repouso, mas apresentam uma maior resistência. Quando expostas a uma temperatura de 60 °C, as células vegetativas podem ser destruídas em um tempo menor que 1 minuto. Os esporos podem resistir a 121 °C por vários minutos. Isso pode ser devido a aspectos intrínsecos, desidratação e mineralização, pois os esporos necessitam de íons minerais na sua formação, como cálcio, que podem ajudar na sua resistência térmica (MASSAGUER, 2005).

Ao fim da fase vegetativa, a escassez dos nutrientes do meio de cultura, entre outros fatores, induz o início da esporulação. Múltiplos fatores podem desencadear a diferenciação de células vegetativas em endósporos a partir de mudanças estruturais e metabólicas, no momento em que o microrganismo esporulante se encontra em condições adversas, como esgotamento de nutrientes, alta composição mineral, pH neutro, temperatura, alta densidade ou ainda no final da fase exponencial (MASSAGUER, 2005; CARBALLIDO LÓPEZ; FORMSTONE, 2007; SELLA S.R., et al, 2014).

Os endósporos são resistentes a fatores ambientais, quando comparado com as células vegetativas, sendo este um fator importante para o desenvolvimento de produtos comerciais (ONGENA e JACQUES, 2008; YAN et al., 2011, YU et al., 2011).

A estrutura e composição química dos esporos de *Bacillus* diferem consideravelmente de células vegetativas. Essas diferenças, em grande parte, explicam as propriedades únicas de resistência do esporo ao meio ambiente, estresses ambientais, incluindo calor, radiação, desinfetantes e esterilizantes. O esporo dormente pode sobreviver por longos períodos de tempo, mesmo em estado hidratado (SETLOW, P. I., 2007; LEGGETT et al. 2012).

Quando temos uma predominância de uma bactéria com células totais, não podemos afirmar com segurança que o que tem no fermentado não seja contaminante, se não foi dado

condições para que ela esporulasse, ou simplesmente o tempo de fermentação não permitiu que a bactéria atingisse a curva de esporulação. Isso interfere diretamente na capacidade desse produto fermentado ser ou não eficiente quanto ao organismo alvo, levando em consideração apenas o número de células. O que vai de fato determinar a eficiência deste produto é se ele consegue, e quanto, reduzir os danos causados pelo patógeno. A forma para fazer essa determinação correta é por uma técnica molecular como o PCR quantitativo, conforme realizado por Nunes et al. (2023).

Como não houve diferença entre os produtos fermentados e comerciais, podemos sugerir que existe algum outro fator, além do número de células, que está interferindo na penetração dos nematoides nas raízes, até mesmo os distintos mecanismos de ação que podem estar envolvidos nesse processo. Além disso, na fermentação pode haver bactérias endosporogênicas como contaminantes atuando também na penetração do *P. brachyurus* na raiz, mas esta característica não foi reprodutível, conforme pode ser observado na Figura 5. Para um mesmo produto comercial como o *Bacillus subtilis* CNPSo 2657 (Vult, Tacto Biotecnologia e Agropecuária Ltda), foram obtidos fermentados com redução de penetração em todos os grupos de eficiência de redução de penetração, a saber, no de baixo, médio e até no grupo que aumentou a penetração do nematoide nas raízes de soja.

As bactérias possuem a capacidade de recrutar outras através do *quorum sensing* e, mesmo bactérias não pertencentes à mesma espécie pode participar de uma mesma atividade (KALAMARA et al., 2018), como por exemplo a formação de biofilme (MARTINS et al., 2018), que vai atuar na proteção da raiz contra esses fitonematoides.

A capacidade de redução de penetração do nematoide obtido em algumas fermentações pode ser resultado das substâncias voláteis. *Bacillus* produzem substâncias voláteis com atividade nematicida ou de repelência contra nematoides (CHEN et al., 2022), além de produzirem enzimas hidrolíticas e induzirem resistência no hospedeiro.

As penetrações de *P. brachyurus* variaram de 3,0 a 110,8% quando comparadas à testemunha (Figura 5). Para *M. incognita*, o esperado de redução de penetração para plantas tratadas com *Bacillus megaterium* é de 40% (PADGHAM e SIKORA, 2007) mas até onde buscamos não foram encontrados valores de redução da penetração de *P. brachyurus* mediado por nematicidas como os produtos à base de *Bacillus*. Na verdade, a redução de penetração pode ser o resultado da ação tóxica direta, da indução de resistência sistêmica ou colonização radicular. Essa colonização da bactéria no sistema radicular da planta reduz em até 60% a migração do nematoide para a rizosfera e seus metabólitos reduziram em 60% a eclosão de ovos (PADGHAM e SIKORA, 2007).

Analisando a variável produtividade, não houve diferença estatística entre os tratamentos de nenhum dos 3 ensaios montados. Em todas as áreas onde foram conduzidos os ensaios, a produtividade foi bem inferior a 62 sacas por hectare que é a média obtida no estado do Mato Grosso. Portanto, além da presença de *P. brachyurus*, conforme histórico das áreas, outros fatores podem estar contribuindo para redução da produtividade de plantas como fungos de solo, compactação de solo e estresse hídrico. Na verdade, estes fatores também estão relacionados com o aumento dos danos dos nematoides (DIAS-ARIEIRA et al., 2021).

Em relação à densidade da população do nematoide, a população inicial relatada foi muito baixa em todas as áreas, e aumentou em todos os tratamentos nas amostragens aos 60 dias após o plantio e na colheita, mas esse aumento aconteceu de forma diferente de acordo com a área considerada e o tratamento (Figura 6). O que pode ser um efeito de reboleiras com maior ou menor favorabilidade ao desenvolvimento do nematoide (FREITAS et al., 2019), ou ainda decorrente do próprio desenvolvimento da cultura com um maior sistema radicular. A redução significativa observada foi aos 60 dias para a área de Nova Mutum e apesar da curva menos acentuada de progresso da população para o tratamento com o produto comercial, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Esta variação no desempenho dos tratamentos pode estar relacionada aos fatores abióticos, como altas temperaturas e baixa disponibilidade de água, onde restringem o desenvolvimento das plantas, reduzindo a oferta de raízes para a alimentação e reprodução desses microrganismos e, conseqüentemente, a redução da sua densidade populacional (SOUZA JUNIOR 2020).

Para uma das áreas de estudo (Campo Novo dos Parecis), o solo era de textura mais arenosa dentre todas as áreas do estudo. Esta propriedade por si só já torna a soja mais vulnerável ao parasitismo por *P. brachyurus*, sobretudo em anos com má distribuição de chuvas (DIAS et al., 2007).

Outro fato interessante a ser observado é que ainda há poucas cultivares de soja (BRIDA et al., 2016) e híbridos de milho e até planta daninha, como o capim amargoso, (MATIAS et al., 2018) com baixo fator de reprodução para nematoide das lesões. Ou seja, a população do *P. brachyurus* que já aumentou na safra, que se faça uma segunda safra ou a área esteja a mercê das plantas invasoras que apareçam, tenderá a aumentar e os danos na segunda cultura podem ser ainda maiores, conforme vem sendo observado ano após ano por OLIVEIRA et al. (2022) em vários municípios do Mato Grosso.

Outro fator que pode estar contribuindo para uma variação no progresso do nematoide é o reconhecimento da importância de realizar o manejo adequado das lavouras (INOMOTO e ASMUS, 2010) mas nem sempre o uso exclusivo do produto a base de uma espécie pertencente

ao gênero *Bacillus* pode resultar em controle da população do nematoide (HIGAKI E ARAÚJO, 2012).

5. CONCLUSÃO

Foi possível observar variação na comunidade de bactérias endosporogênicas nos produtos avaliados. Houve redução multiplicação populacional e na penetração do nematóide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*) nas raízes de soja com o uso dos produtos comerciais e na produção *on farm*. Os produtos *B. methylotrophicus* UFPEDA20 e *B. amyloliquefaciens* simbi bs 10 cct 7600 garantiram menor penetração de nematoides. A produtividade obtida nos experimentos de campo não foi satisfatória. Apesar da variação na eficiência de redução na penetração do nematóide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*) na produção *on farm* feita em diferentes condições de cultivo, a multiplicação pode levar a redução na população do nematóide.

REFERÊNCIAS

- BETTIOL, W., MORANDI, M., PINTO, Z., & LUCON, C. Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica. 2022
- BURKHOLDER WF, GROSSMAN AD. Regulation of the initiation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Brun YV, Shinkets LJ (eds) *Prokaryotic Development*. ASM Press, Washington, DC, USA 151–166, 2014.
- CHEN, W., WANG, J., HUANG, D., CHENG, W., SHAO, Z., CAI, M., ... & ZHANG, J. Volatile organic compounds from *Bacillus aryabhattai* MCCC 1K02966 with multiple modes against *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 103, 2022.
- DE O NUNES, P. S., DE MEDEIROS, F. H., DE OLIVEIRA, T. S., DE ALMEIDA ZAGO, J. R., & BETTIOL, W. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* promote tomato growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 397-406, 2023.
- DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G. E. S. nematoides de importância para a soja no Brasil. *Boletim de Pesquisa de Soja, Rondonópolis*, n.11, p. 173-183, 2007.
- FREITAS, J. R. B. et al. Distribuição espacial de *Pratylenchus brachyurus* em área de soja no leste do Maranhão. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2019
- GLOBAL CROP PROTECTION. Prejuízos com nematoides chegam a 35 bilhões de R\$ por ano. Disponível em: <https://globalcropprotection.com/noticias/uso-e-aplicacao/prejuizos-com-nematoides-chegam-a-35-bilhoes-de-r-por-ano/>. Acesso em: 07 abr. 2023.
- HIGAKI, W.A. AND F. F. ARAUJO. 2012. *Bacillus subtilis* e abamectina no controle de nematoides e alterações fisiológicas em algodoeiro cultivado em solos naturalmente infestados. **Nematropica** v. 42, p. 295-303.
- INOMOTO, M. M., ASMUS, G. L. Hoststatusof graminaceous cover crops for *Pratylenchus brachyurus*. *Plant Disease*, n.94, p.1022-1025, 2010.
- KALAMARA, M., SPACAPAN, M., MANDIC-MULEC, I., & STANLEY-WALL, N. R. Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond. **Molecular microbiology**, v. 110, n. 6, p. 863-878, 2018.
- MATIAS, J. P., DA SILVA, A. A. P., HELVIG, E. O., MACIEL, C. D. D. G., DIAS-ARIEIRA, C. R., & KARAM, D. Suscetibilidade de milho, soja e capim amargoso ao nematoide das lesões radiculares. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.17, n. 2, p. 353-358, 2018.
- LOGAN, N. A.; de VOS, P. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v.3. The firmicutes 2nd Edition. 2009.
- MARTINS, S. J., MEDEIROS, F. H., LAKSHMANAN, V., BAIS, H. P. Impact of seed exudates on growth and biofilm formation of *Bacillus amyloliquefaciens* ALB629 in common bean. **Frontiers in Microbiology**, 8, 2631, 2018.

OLIVEIRA, K. C. L. de, et al. Population distribution of root lesion nematode in the state of Mato Grosso, Brazil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 17, 2022.

OYEKANMI, E. O.; FAWOLE, B. Nematodes of soybean and their management. In: The soybean: botany, production and uses. Wallingford UK: CABI, 2010. p. 325-344.

PEREGO M.; HOCH J.A. Two-Component Systems, Phosphorelays, and Regulation of Their Activities by Phosphatases. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds) *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives. **ASM Press**, Washington, DC, USA, pp 473–481, 2014.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV; 2001. p.279.

ROONEY, A. P.; et al.; Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2429–2436, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. Vol.2. Engenharia Bioquímica. São Paulo: Blucher. 2001.

SOUZA JUNIOR, F. J. C. Variabilidade espaço-temporal de *Meloidogyne* e *Pratylenchus* em áreas de cana-de-açúcar sob manejo de irrigação. **Nematropica**, v. 50, n. 2, p. 186-199, 2020.

APÊNDICE A

Tabela 1. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) de bactérias endosporogênicas nos produtos fermentados e comerciais analisados (Contínua).

Amostra	Produto comercial	Microrganismo	Fermentado			Comercial		
			Média	Erro padrão	Scott Knott	Média	Erro padrão	Scott Knott
1	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnpso 2657	4.44	0,05	i	5.23	0,02	I
3	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	4.40	0,07	i	5.19	0,02	I
4	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	5.00	0,04	h	5.16	0,02	I
8	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	4.14	0,07	j	5.83	0,03	G
12	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	4.0	0,00	j	5.83	0,06	G
13	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	5.0	0,00	h	6.04	0,04	F
53	Sem registro	<i>B. amyloliquefaciens</i>	5.72	0,04	f	5.0	0,00	J
60	Serenade	<i>B. subtilis</i>	5.32	0,02	g	5.31	0,04	I
100	Bio Raiz	<i>B. amyloquefacens</i>	4.51	0,03	i	7.48	0,00	D
101	Bio Hidric	<i>B. aryabhattai</i>	7.74	0,07	c	5.48	0,00	H
102	Bio Raiz	<i>B. subtilis</i>	3.48	0,00	k	7.48	0,00	D
103	Bio Mega	<i>B. megaterium</i>	6.48	0,00	e	7.48	0,00	D
104	Bio Mega	<i>B. megaterium</i>	3.48	0,00	k	7.48	0,00	D
105	Bio Mon	<i>Sem descrição</i>	7.67	0,06	c	7.67	0,06	D
106	Bio Raiz	<i>B. subtilis</i>	3.48	0,00	k	7.57	0,03	D
107	Bio Hidric	<i>B. aryabhattai</i>	6.51	0,03	e	6.64	0,06	E
108	BioAction	<i>B. megaterium</i>	3.57	0,05	k	4.54	0,03	K
109	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	6.48	0,00	e	4.565	0,05	K
110	Cepa própria	<i>B. aryabhattai</i>	3.48	0,00	k	5.51	0,03	H
111	Cepa Própria	<i>B. megaterium</i>	3.48	0,00	k	5.54	0,06	H
112	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	5.48	0,00	g	3.48	0,00	M
113	EMBRAPA	<i>B. ariabhattai</i>	3.48	0,00	k	3.48	0,00	M
114	EMBRAPA	<i>B. megaterium</i>	3.73	0,10	k	4.51	0,03	K
115	EMBRAPA	<i>B. subtilis</i>	7.54	0,06	d	7.61	0,03	D
116	Presence	<i>B. subtilis/ licheniformis</i>	7.48	0,00	d	8.57	0,03	B
117	Nemacontrol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	8.48	0,00	b	8.48	0,00	B
118	EMBRAPA	<i>B. methylotropicus</i>	7.51	0,03	d	8.48	0,00	B
119	EMBRAPA	<i>B. amyloliquefaciens</i>	8.48	0,00	b	8.48	0,00	B
120	EMBRAPA	<i>B. megaterium</i>	6.48	0,00	e	7.54	0,06	D
121	EMBRAPA	<i>B. subtilis</i>	5.48	0,00	g	7.54	0,00	D
122	EMBRAPA	<i>B. methylotropicus</i>	7.48	0,00	d	-	-	-
123	EMBRAPA	<i>B. subtilis</i>	7.57	0,05	d	7.48	0,00	D
124	EMBRAPA	<i>B. ariabhattai</i>	7.48	0,00	d	7.48	0,00	D
125	EMBRAPA	<i>B. megaterium</i>	8.48	0,00	b	7.54	0,06	D
126	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnpso 2657	3.63	0,08	k	6.57	0,05	E
127	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	3.48	0,00	k	4.83	0,03	J
128	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	3.48	0,00	k	4.925	0,03	J
129	Bior M	<i>B. megaterium</i>	4.66	0,07	i	3.77	0,10	L
130	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	4.48	0,00	i	5.95	0,00	F
131	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnpso 2657	3.6	0,00	k	5.48	0,00	H
132	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	5.56	0,00	g	5.54	0,06	H
133	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	3.51	0,08	k	4.57	0,05	K
134	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnpso 2657	5.48	0,00	g	5.91	0,04	F
135	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.48	0,00	k	5.54	0,03	H
136	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnpso 2657s	4.51	0,03	i	5.765	0,03	G
137	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	4.48	0,00	i	5.51	0,03	H
138	Bioma Fx	<i>B. subtilis</i>	4.48	0,00	i	7.48	0,00	D
139	Sem registro	<i>B. subtilis</i>	5.595	0,05	f	3.48	0,00	M
140	Sem registro	<i>B. subtilis</i>	3.48	0,00	k	3.48	0,00	M
141	Sem registro	<i>B. amyloliquefaciens</i>	5.75	0,05	f	2.48	0,00	O
142	Zuppa Max	<i>B. subtilis</i>	3.91	0,02	j	6.51	0,03	E
143	Zuppa Max BT	<i>B. megaterium</i>	3.51	0,03	k	6.59	0,06	E
144	Biosphera	<i>B. subtilis</i>	4.48	0,00	i	7.63	0,11	D
145	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.57	0,05	k	6.51	0,03	E

Tabela 1. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) de bactérias endosporogênicas nos produtos fermentados e comerciais analisados (Conclusão).

Amostra	Produto comercial	Microrganismo	Fermentado			Comercial		
			Média	Erro padrão	Scott Knott	Média	Erro padrão	Scott Knott
146	Bacforce	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.66	0,08	k	3.54	0,03	M
147	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	4.48	0,00	i	3.82	0,05	L
148	Cepa Própria	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.48	0,00	k	5.26	0,03	I
149	Cepa própria	<i>B. methylotrophicus</i>	3.0	0,00	l	4.51	0,03	K
150	Cepa própria	<i>B. licheniformis</i>	3.0	0,00	l	7.48	0,00	D
151	Bio Raiz	<i>B. subtilis</i>	3.57	0,05	k	5.73	0,05	G
152	Bio Mega	<i>B. megaterium</i>	6.48	0,00	e	7.28	0,50	D
153	Rizos	<i>B. subtilis</i>	8.93	0,01	a	7.98	0,50	C
154	Nemacontrol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.48	0,00	k	6.48	0,00	E
158	Rizos	<i>B. subtilis</i>	5.6	0,05	f	6.66	0,08	E
159	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	8.57	0,03	b	8.48	0,00	B
160	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnpso 2657	-	-	-	8.48	0,00	B
161	Bio Raiz	<i>B. megaterium</i>	4.85	0,04	h	8.76	0,04	A
162	Bio Raiz	<i>B. licheniformis</i>	6.77	0,06	d	5.57	0,05	H
163	EMBRAPA	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.54	0,03	k	3.64	0,06	L
166	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	3.48	0,00	k	4.715	0,04	K
168	AMTEC	<i>B. subtilis</i>	3.51	0,03	k	2.69	0,06	N
170	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	3.48	0,00	k	2.69	0,06	N
173	Nemacontrol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	4.48	0,00	i	5.63	0,09	H
175	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	5.51	0,03	g	7.54	0,06	D
176	BioAction	<i>B. megaterium</i>	-	-	-	7.48	0,00	D
177	Nao informado	<i>B. subtilis</i>	6.48	0,00	e	6.57	0,05	E
178	Nao informado	<i>B. methylotrophicus</i>	7.70	0,07	c	8.61	0,08	B
179	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	3.48	0,00	k	4.48	0,00	K
181	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	3.7	0,09	k	4.54	0,03	K
182	BioAction	<i>B. amyloliquefaciens</i>	7.61	0,10	c	2.48	0,00	O
186	Presence	<i>B. subtilis/ licheniformis</i>	7.77	0,05	c	8.91	0,02	A
187	Galleon Red	<i>B. subtilis</i>	8.78	0,03	a	7.67	0,06	D
188	Galleon Green	<i>B. amyloliquefaciens</i>	5.67	0,04	f	5.95	0,05	H
189	Galleon Write	<i>B. aryabhattai</i>	4.39	0,13	i	4.48	0,00	K
191	Onix.	<i>B. methylotrophicus</i>	4.48	0,00	i	7.36	0,12	D
192	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	8.48	0,00	b	4.63	0,09	K

(1) Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. (2) Médias na base LOG10. (3) CV (%) = 2.46

Do autor (2023).

APÊNDICE B

Tabela 2 - Identificação dos produtos biológicos coletados no estado do Mato Grosso durante a 2ª safra 2019/20 e a safra 2020/21.

Código	Produto	Ingrediente ativo	Fabricante	Classe
1	Amtec	<i>Bacillus subtilis</i>	Agrobiológica	-
	Bac force			
2	Bio hidric	<i>B. arybhatai</i>	-	-
3	Bio Mega			
4	Bio Mon			
5	Bio Raiz			
6	Bioaction subtilis	<i>Bacillus subtilis</i>	Biosphera Agro solutions	-
7	Biobac®	<i>Bacillus subtilis</i> Y1336	UPL do Brasil	Fungicida, bactericida e Nematicida microbiológico
8	Bioimune®	<i>Bacillus subtilis</i> BV02	Grupo Vittia	Fungicida e bactericida Microbiológico
9	Bioma fx	<i>Bacillus subtilis</i>	Bmf organicos	Aditivo para compostagem
10	Biomon	-	-	-
11	Biosphera			
12	Cepa própria		Produtor	
13	Compofix a	<i>Bacillus arybhatai</i>	-	-
14	Embrapa	<i>Bacillus subtilis</i> 715	-	-
15	Fertbokashi	Extrato de levedura		Fertilizante
16	Galleon		Vector control	-
17	Inocular	<i>Bacillus subtilis</i>	Inocular soluções biológicas	-
18	Não informado			
19	Nemacontrol	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> simbi bs 10 cct 7600	Simbiose	Fungicida e Nematicida microbiológico
20	No-nema	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> bv03	Grupo vittia	Nematicida e fungicida microbiológico
21	Onix®	<i>Bacillus methylotrophicus</i> UFPEDA20	Lallemand	Nematicida microbiológico
22	Panta premium	<i>Bacillus subtilis</i> cepa ufmt pant001	Geoclan	Inoculante promotor de crescimento
23	Presence	<i>Bacillus subtilis</i> fmch002(dsm32155) <i>bacillus licheniformis</i> fmch001(dsm32154)	Fmc	Nematicida microbiológico para tratamento de sementes
24	Rizos®	<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 764	Lallemand	Nematicida microbiológico
25	Rudder	<i>Bacillus velezensis</i>	Biotrop soluções biológicas Ltda	Fungicida e nematicida microbiológico
26	Serenade	<i>Bacillus subtilis</i> linhagem qst 713	Bayer s.a.	Fungicida bactericida microbiológico
27	Sem registro			
28	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnpso 2657	Tacto Biotecnologia e Agropecuária Ltda	Nematicida microbiológico
29	Xentari	<i>Bacillus thuringiensis</i> , subsp. Aizawai	Sumitomo chemical brasil indústria química s.a.	Inseticida microbiológico de ação por ingestão

Do autor (2023).

APÊNDICE C

Tabela 3 - Identificação dos produtos biológicos coletados no estado do Mato Grosso durante a 2ª safra 2019/20 e a safra 2020/21.

Meio de cultura	Fabricante
Agropaceli	Agropaceli
Bbv	Bio Boa Vista
Biofertility	Biogen
Customizado	Padrão do produtor.
Nutribac Sum 15	Fertech
Fotossíntese	Fotossíntese nutrição de planta e controle biológico
Hilyses	Icc Brazil
Hubio	BioPar
MCM	Amazon Bioquim
Multibacter	Agrobiológica
Não informado	-
Nutribacter	Rizosferars
Sem registro	-
Sme	-
Solubio	Solubio Tecnologias Agrícolas Onfarm
Zuppa max	Amdagro

Fonte: Do autor (2023).

APÊNDICE D

Tabela 4 - Variáveis qualitativas levantadas durante o período de sondagem e coleta das amostras, na 2ª safra 2019/20, e na safra 2020/21 (Contínua).

Amostra	Produto comercial	Microrganismo	Sistema de produção	Método de esterilização	Tempo cultivo	Meio de cultura
1	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Tanque com aerador	Fervura do meio	24 h	Customizado
10	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Tanque com aerador	As caixas são lavadas com água e sabão e em seguida esterilizadas com iodo por 20 minutos.	48 h	Nutribacter
11	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Inox	Pastilha da multibacter	48 h	Multibacter
16	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Inox	Pastilhas de cloro	24 h	Multibacter
17	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Inox	Sabao e cloro	24 h	Multibacter
20	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Caixa d'agua aeração	Iodo	24 h	Multibacter
126	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Caixa d'água/Turbina	Pastilha de cloro multibacter	24 h	Multibacter
131	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Caixa d'água, aerador	Fertech (limpador alcalino/)	48 h	
134	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Caixa d'água, aerador	iodo 1h	48 h	SME
136	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Inox	Pastilha de cloro multibacter	48 h	Fotossíntese
155	Vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	Inox	Cloro	24 h	Multibacter
160	vult	<i>Bacillus subtilis</i> cnps0 2657	caixa d'agua com aerador	padrão multibacter	24 h	Multibacter
2	Nemacontrol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	caixa d'agua com aerador	Pastilha de cloro e lava com sabão	24 h	Multibacter
19	Nemacontrol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'agua com sistema de aeração.	Iodo	48 h	Sem registro
117	Nemacontrol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inox, Caixa d'água com aerador	Não informado	48 h	ICC HilySes H (pó)
154	Nemacontrol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água com aerador	Não informado	48 h	Fotossíntese
173	Nemacontrol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água com aerador	Não informado	48 h	MCM
15	Nonema	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	-	-	-
3	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	caixas d'água com aeradores	Lava com detergente de cozinha. Estereliza o meio por fervura	72 h	Caseiro
4	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	caixas d'água, aerador	Lava com detergente de cozinha. Estereliza o meio por fervura	72 h	Caseiro
5	Biobac	<i>B. subtilis</i>	caixas d'água, aerador	Desinfesta as caixas com hipoclorito 10%. Enxagua, enche água e multiplica novamente.	72 h	Caseiro
13	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Sistema Multibacter	Lava sob pressão, esfrega com sabão de soda e depois passa jato sob pressão novamente. Completa a água, adiciona cloro da multibacter e deixa por 1 hora.	24 h	Multibacter
109	Biobaci	<i>B. subtilis</i> (BV09)	Sistema Multibacter	Pastilha de cloro	24 h	Multibacter
127	Biobaci	<i>B. subillis</i>	caixa d'água turbina	Pastilha de cloro multibacter	24 h	Multibacter

Tabela 4 - Variáveis qualitativas levantadas durante o período de sondagem e coleta das amostras, na 2ª safra 2019/20, e na safra 2020/21 (Contínua).

Amostra	Produto comercial	Microrganismo	Sistema de produção	Método de esterilização	Tempo cultivo	Meio de cultura
128	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Sistema Multibacter	Pastilha de cloro multibacter	24 h	Multibacter
132	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, venturi	Pastilha de cloro multibacter	24 h	Multibacter
133	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, aerador	iodo 1h	72 h	Não informado
166	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, aerador	Nao informado	48 h	Multibacter
170	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, aerador	Usa pastilha de cloro	24 h	Multibacter
179	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água Venturi	Sabão e cloro	24 h	Multibacter
180	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água Venturi	Sabão e cloro	24 h	Multibacter
181	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Sistema Multibacter	Água e sabão,e uso da pastilha multibacter	24 h	Multibacter
183	Biobaci	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água Venturi	Cloro e Sabão	24 h	Multibacter
109	Biobaci	<i>B. subtilis (BV09)</i>	Sistema Multibacter	Pastilha de cloro	24 h	Multibacter
6	fertbokashi		Caixa d'água, aerador	Para limpar a caixa após a produção ele usa iodo	48 h	Caseiro.
7	Xentari	<i>B. thuringiensis</i>	Caixa de água	Iodo	48 h	Nutribacter
8	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	Fermentadores de inox	esterilização por ozônio (meio)	48 h	Caseiro
12	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	Caixa de água e inox	Água sanitária e pastilha	48 h	Multibacter
59	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	Caixa d' água e bomba de aeração	Utiliza Iodo para a esterilização dos tanques	24 h	Multibacter
147	Cepa Própria	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água com aerador	Cloro	12 h	Multibacter
192	Cepa própria	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, aerador	pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
112	Cepa própria	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água	Ácido Peracético	48 h	Hubio
52	Cepa Própria	<i>B. megaterium</i>	Caixa d'água com aerador	lava e passa iodo	48 h	AgroPacceli
111	Cepa própria	<i>B. megaterium</i>	Inox,	Ácido Peracético	48 h	Hubio
148	Cepa Própria	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água com aerador	Cloro	24 h	Multibacter
193	Cepa própria	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água, aerador	pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
149	Cepa própria (Onix)	<i>B. methylotrophicus</i>	Caixa d'água com aerador	Cloro	48 h	Multibacter
150	Cepa própria	<i>B. licheniformis</i>	Caixa d'água com aerador	Cloro	48 h	Multibacter
110	Cepa própria	<i>B. aryabattae</i>	Caixa d'água	Ácido Peracético	48 h	Hubio
9	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Fermentadores de inox	Pastilha da multibacter	48 h	Multibacter
21	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'agua com sistema de aeração	Iodo	24 h	Multibacter
130	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água, aerador	Fertech (limpador alcalino/)	48 h	
135	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água, aerador	iodo 1h	48 h	SME
137	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inox	Pastilha de cloro multibacter	48 h	Fotossíntese
145	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água com turbina	Iodo	48 h	Nutribacter
156	Rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	caixa de inox com aerador	Cloro	24 h	Multibacter
159	rudder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	caixa d'agua com aerador	Lavagem com sabao	24 h	Multibacter

Tabela 4 - Variáveis qualitativas levantadas durante o período de sondagem e coleta das amostras, na 2ª safra 2019/20, e na safra 2020/21 (Contínua).

Amostra	Produto comercial	Microrganismo	Sistema de produção	Método de esterilização	Tempo cultivo	Meio de cultura
175	Ruder	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Tanque com aeração	nao informado	28 h	Nutribacter
14	Rizos	<i>B. subtilis</i>		Lavagem das caixas com iodo após o uso	48 h	MSM
18	Rizos	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água com sistema de aeração.	Iodo	48 h	Sem registro
153	Rizos	<i>B. subtilis</i> UFPEDA 764	Caixa d'água com aerador	Nao informado	48 h	Fotossíntese
158	Rizos	<i>B. subtilis</i>	caixa d'água com aerador	Lavagem com sabao	24 h	zuppa max
172	Rizos	<i>B. subtilis</i> UFPEDA 764	Caixa d'água com aerador	nao informado	48 h	MCM
22	Onix.	<i>B. methylotrophicus</i>	Caixa d'água, aerador	Iodo	24 h	Multibacter
51	Onix.	<i>B. methylotrophicus</i>	Caixa d'água aerador	lava e passa iodo	48 h	AgroPacceli
171	Onix	<i>B. metylotrophicos</i>	Caixa d'água com aerador	nao informado	48 h	MCM
191	Onix	<i>B. metylotrophicos</i>	Caixa d'água, aerador	pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
57	Serenade	<i>B. subtilis</i>	Tanque multibacter	Utiliza pastilha de cloro para desinfecção dos tanques e hidrosan para desinfetar a agua	24 h	Multibacter
60	Serenade	<i>B. subtilis</i>	Biorreator inox com sistema de aeração,	Utiliza Iodo para a esterilização dos tanques	36 h	Caseiro
53	Sem registro	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água aerador	lava e passa iodo	48 h	AgroPacceli
54	Sem registro	<i>B. aryabhatai</i>	Caixa d'água aerador	lava e passa iodo	48 h	AgroPacceli
58	Sem registro	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d' água aeração	Utiliza Iodo para a esterilização dos tanques	24 h	Multibacter
139	Sem registro	<i>B. substillis</i>	Caixa d'água aeração	Cloro	48 h	BBV
140	Sem registro	<i>B. substillis</i>	Caixa d'água	Cloro e uv	48 h	BBV
141	Sem registro	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água	Cloro e uv	48 h	BBV
61	Presence	<i>B. subtilis/ licheniformis</i>	Caixa d'água aeração	Pastilha de cloro na água faz o descarte e coloca outra água	24 h	Multibacter
116	Presence	<i>B. subtilis/ licheniformis</i>	Sistema Multibacter	Pastilha de cloro	48 h	Multibacter
113	EMBRAPA	<i>B. ariabhatai</i>	Caixa d'água	Pastilha de cloro	48 h	Fertech
124	EMBRAPA	<i>B. ariabhatai</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
114	EMBRAPA	<i>B. megaterium</i>	Caixa d'água	Pastilha de cloro	48 h	Fertech
120	EMBRAPA	<i>B. megaterium</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
125	EMBRAPA	<i>B. megaterium</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
115	EMBRAPA	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água	Pastilha de cloro	48 h	Fertech
121	EMBRAPA	<i>B.substillis (715)</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
123	EMBRAPA	<i>B.substillis (715)</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
165	EMBRAPA	<i>B.substillis (715)</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
118	EMBRAPA	<i>B. methylotropicus</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
122	EMBRAPA	<i>B. methylotropicus</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
119	EMBRAPA	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli
163	EMBRAPA	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água, aerador	Pastilha de cloro	48 h	AgroPasseli

Tabela 4 - Variáveis qualitativas levantadas durante o período de sondagem e coleta das amostras, na 2ª safra 2019/20, e na safra 2020/21 (Conclusão).

Amostra	Produto comercial	Microrganismo	Sistema de produção	Método de esterilização	Tempo cultivo	Meio de cultura
101	Bio Hidric	<i>B. aryabhatai</i>	Sistema Solubio	Ácido Peracético	24 h	Solubio
107	Bio Hidric	<i>B. aryabhatai</i>	Sistema Solubio	Ácido Peracético	24 h	Solubio
167	AMTEC	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, aerador	Nao informado	48 h	Caseiro
168	AMTEC	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, aerador	Hipoclorito	48 h	Caseiro
169	AMTEC	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, aerador	água sanitária	53 h	Multibacter
184	Nao informado	<i>B. Subtilis</i>	Caixa d'água, Venturi	Cloro e luz UV	48 h	BBV
185	Nao informado	<i>B. megaterium</i>	Caixa d'água, Venturi	Cloro e luz UV	48 h	BBV
146	Bacforce	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Tanque inox, venturi	Hipoclorito/pastilha para piscina	48 h	Não informado
103	Bio Mega	<i>B. megaterium</i>	Sistema Solubio	Ácido Peracético	24 h	Solubio
104	Bio Mega	<i>B. megaterium</i>	Sistema Solubio	Ácido Peracético	24 h	Solubio
152	Bio Mega	<i>B. megaterium</i>	Sistema Solubio	Ácido piracético	24 h	SoluFarm Bac
105	Bio Mon	Sem descrição	Sistema Solubio	Ácido Peracético	24 h	Solubio
102	Bio Raiz	<i>B. subtilis</i>	Sistema Solubio	Ácido Peracético	24 h	Solubio
106	Bio Raiz	<i>B. subtilis</i>	Sistema Solubio	Ácido Peracético	24 h	Solubio
151	Bio Raíz	<i>B. subtilis</i>	Sistema Solubio	Acido piracético	24 h	SoluFarm Bac
100	Bio Raíz	<i>B. amyloquefacens</i>	Sistema Solubio	Ácido Peracético	24 h	Solubio
108	BioAction	<i>B. megaterium</i>	Sistema Multibacter	Pastilha de cloro	24 h	Multibacter
176	Bioaction	<i>B. megaterium</i>	Tanque com aeração	Não informado	28 h	Nutribacter
182	BioAction	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água, venturi	Cloro e Sabão	24 h	Multibacter
138	Bioma Fx	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água, aeração	Biofor	24 h	Biofertility
129	Bior M	<i>B. Megaterium</i>	Caixa d'água, aerador	Iodo	52 h	Não informado
162	Bio Raiz	<i>B. licheniformis</i>	biorreator de inox	ácido piracético	24 h	Solubio
161	Bio Raíz	<i>B. megaterium</i>	biorreator de inox	ácido piracético	24 h	Solubio
144	Biosphera	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água	Iodo	48 h	Nutribacter
190	COMPOFIX A	<i>B. aryabhatai</i>	Caixa d'água	cloro	48 h	Multibacter
188	Galleon Green	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Caixa d'água	iodo	12 h	Agropaceli
187	Galleon Red	<i>B. subtilis</i>	Caixa d'água	iodo	12 h	Agropaceli
189	Galleon Write	<i>B. aryabhatai</i>	Caixa d'água	iodo	12 h	Agropaceli
142	Zuppa Max	<i>B. subtilis</i>	Inox aeração	Cloro e ozônio	24 h	Não informado
143	Zuppa Max BT	<i>B. megaterium</i>	Inox aeração	Cloro e ozônio	24 h	Não informado
157	Panta Premium	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Não informado	Não informado	-	Não informado
177	Não informado	<i>B. Subtilis</i>	Caixa d'água aerador	ozônio e luz UV	48 h	Caseiro
178	Não informado	<i>B. methylotrophicus</i>	Caixa d'água aerador	Lavagem com sabão	48 h	Caseiro

Fonte: Do autor (2023).

ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO METATAXONÔMICA E BIOQUÍMICA DE PRODUTO COMERCIAL E FERMENTADO *ON FARM* PARA O MANEJO DE *PRATYLENCHUS BRACHYURUS*

RESUMO

A soja, uma das bases do agronegócio brasileiro, vem em um aumento crescente e junto com ele, pode ter seu rendimento afetado por fitopatogenos, com destaque para os do gênero *Pratylenchus*. A adesão por produção *on farm* no Brasil vem crescendo como estratégia para controle deste fitonematoide e, levando em consideração que as bactérias do gênero *Bacillus* predominam entre os microrganismos empregados na agricultura brasileira, se faz necessário a criação de mecanismos que possam garantir o controle de qualidade dessa produção. Assim objetivou-se comparar o perfil metataxonômico e metabolômico das amostras comerciais e fermentadas e avaliar sua atuação no controle de *Pratylenchus brachyurus* na soja. Para extração e identificação de grupos químicos dos metabólitos ligados a biossíntese de micromoléculas de *Bacillus* spp. nas amostras (produto comercial e fermentados), foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS). Amostras dos produtos comerciais *B. methylotrophicus* (Onix, Lallemand) e *B. subtilis* (Nemacontrol, Simbiose) e de produtos derivados de sua fermentação *on farm* foram submetidas a análise metataxonômica para avaliar se existia conformidade dos produtos comerciais e se a estrutura da comunidade microbiana nos produtos *on farm* se mantinha similar a do produto comercial utilizado como inóculo inicial. Foi feito um teste de penetração em casa de vegetação com fermentação otimizada em laboratório do Nemacontrol, bem como com os produtos que tiveram seus metabólitos e perfil de microbiota avaliados, visando estabelecer padrões de qualidade em relação aos metabólitos para cada um dos produtos. Por fim foi realizado um teste de quimiotaxia com os produtos para verificar a capacidade de influenciar na atração ou repelência do nematoide. Os resultados indicam redução na penetração de *P. brachyurus* nas raízes pela aplicação dos produtos comercial e fermentado, porém não se pôde afirmar o que está causando este efeito. As amostras do produto fermentado não mantiveram a mesma abundância relativa encontrada nas amostras do produto comercial analisadas, enquanto a análise metataxonômica revelou a presença de espécies contaminantes em todas as amostras fermentadas. O índice de quimiotaxia apresentou uma atividade de resposta aleatória para todos os tratamentos avaliados.

Palavras-chave: Comunidade microbiana. Quimiotaxia. Metabólitos.

1 INTRODUÇÃO

A soja é uma das bases do agronegócio brasileiro, com expressivo crescimento da produção total colhida. Segundo a Conab (2022) houve incremento de 1,8 milhão de hectares de soja plantada no país e, no estado do Mato Grosso, o aumento foi de 6,3% na safra 21/22 em comparação à 20/21. No entanto, junto com sua expansão, a soja pode ter seu rendimento afetado devido a infestação por agentes patogênicos e outras pragas (GODOY et al., 2016; MACHADO; AMARO; SILVA, 2019), destacando-se os fitonematóides. No Brasil, merecem destaque os nematoides do gênero *Pratylenchus*, conhecidos por causarem lesões radiculares nas plantas e, conseqüentemente, perdas na produtividade (GOULART, 2008; DIAS-ARIEIRA et al., 2018).

Algumas práticas de cultivo, como o sistema de plantio direto e o cultivo em solos arenosos, favorecem a disseminação e o estabelecimento de grandes populações desse patógeno, resultando em maiores perdas (CRUZ; ASMUS; GARCIA, 2020). O manejo de *P. brachyurus* é complexo e de difícil execução, devido ao seu hábito endoparasita migrador e polífago (GOULART 2008). Em áreas infestadas, recomenda-se a integração de diferentes estratégias de controle, como produtos químicos, rotação de culturas, produtos biológicos, tratamentos culturais e uso de cultivares resistentes, quando houver, (LOPES et al., 2017; BERNARDES et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019), possibilitando ao agricultor a redução da população do nematoide a níveis populacionais que permitam a convivência do fitoparasita e hospedeiro, sem que haja perda na produtividade (FERRAZ et al., 2010).

A baixa eficiência dos métodos de controle disponíveis, embora sejam capazes de estimular o crescimento das plantas e de induzir a sua resistência ao ataque desses parasitas (MOURA; CARNEIRO, 2020), têm despertado o interesse e a busca por novas estratégias. O uso de produtos biológicos surge como uma ferramenta interessante de controle, apresentando maior persistência no solo, não é tóxico e pode contribuir para um solo mais supressivo, e, em alguns casos, tem eficiência superior aos produtos químicos disponíveis no mercado, principalmente se combinado com boas práticas de manejo do solo (SOARES et al., 2017).

Presentes na rizosfera, bactérias do gênero *Bacillus* apresentam grande potencial para supressão de nematoides em áreas de cultivo de forma sustentável, sendo capazes de predação, matar, e de competir com nematoides por nutriente e por espaço (MOURA; CARNEIRO, 2020).

A indústria disponibiliza vários produtos compostos por agentes de controle biológico, eficientes contra os nematoides, reduzindo danos causados por eles (BARBOSA et al., 2019).

Segundo Agrofit (2023), atualmente existem 56 produtos biológicos registrados para uso como nematicidas. Destes, 44 têm como alvo o *P. brachyurus*, sendo 38 deles formulados com ao menos uma espécie de bactéria pertencente ao gênero *Bacillus*. ZHENG et al. (2016) afirmam que esse gênero, contra nematoides, apresenta como mecanismos de ação a produção de metabólitos tóxicos que afetam negativamente os ovos de nematoides e juvenis de segundo estágio (J2); a alteração da comunidade microbiana da rizosfera; competição por sítios de penetração; colonização do rizoplano e indução de defesa da planta contra nematoides.

A partir do decreto nº 6.913, 23 de julho de 2009, Artigo 1º, inciso § 8º, que estabelece: “Ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica produzidos exclusivamente para uso próprio”, houve um aumento na prática de multiplicação de microrganismos nas fazendas para uso próprio, que ficou conhecida por produção *on farm* (SANTOS et al., 2020; LANA et al., 2019).

Existe uma variedade quanto a essa forma de multiplicação e sistemas utilizados entre os produtores. Em sua maioria, consiste em uma caixa d'água, com água, adição de um meio de cultura e do inóculo com o microrganismo. Este inóculo costuma ser um produto comercial registrado, outros sem registro, ou ainda cepas do próprio produtor. Um sistema de injeção de ar é instalado para oxigenar a mistura, e entre 24 a 48h está pronto para uso. Entretanto, o que se costuma ver são ambientes sem um mínimo de assepsia necessária, apresentando riscos, sendo o maior deles a contaminação do produto com patógenos para humanos e outros animais, o que inviabiliza a sua aplicação (SANTOS et al., 2020; VALICENTE, 2018; LANA et al., 2019).

Levando em consideração que as bactérias do gênero *Bacillus* predominam entre os microrganismos empregados na agricultura brasileira, se faz necessário a criação de mecanismos que possam garantir o controle de qualidade dessa produção, através da padronização de metodologias, protegendo a saúde dos produtores e dos consumidores. Nesse sentido, foi delineado um projeto de pesquisa, iniciado em 2008, denominado “Projeto Qualibio: Desenvolvimento de metodologia analítica e amostral para avaliação de conformidade e da inocuidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos”, focando no desenvolvimento de metodologias para análise da qualidade de produtos formulados com bactérias do gênero *Bacillus* e com fungos do gênero *Trichoderma*, que são os principais agentes de controle biológico de doenças de plantas no Brasil.

Sentindo a necessidade de ampliar a difusão desses conhecimentos, foi publicado um documento para apresentar um método para análise da qualidade de produtos à base de *Bacillus*, para produtos registrados junto ao Mapa, ou obtidos via fermentação caseira ou “*on farm*”, ou

ainda em instituições públicas ou privadas, contribuindo para que seja mantida a qualidade dos produtos à base de *Bacillus* produzidos no país, e na ampliação do mercado e da adoção de agentes de biocontrole no Brasil. (BETTIOL et al. 2022).

Considerando o alvo biológico *P. brachyurus*, também existe a necessidade de padronização e multiplicação de metodologia que comprove a eficiência do produto multiplicado na inibição ou diminuição da penetração do nematoide nas raízes, pelo método de coloração de nematoides em raízes (BYRD et al., 1983). Já se sabe que *B. subtilis* interfere no ciclo reprodutivo do nematoide, atuando na migração do juvenil em direção a planta hospedeira (SHARMA; GOMES 1996).

Com o advento das técnicas moleculares de sequenciamento de alto rendimento (*Next Generation Sequencing*, NGS) é possível avaliar a estrutura da comunidade microbiana e abundância relativa de seus membros em amostras diversas, por meio da amplificação de marcadores filogenéticos de bactérias/arquéias (rDNA 16S) e fungos (ITS) e posterior sequenciamento, abordagem essa conhecida como metataxonômica (MARCHESI e RAVEL, 2015). Tal abordagem tem permitido o conhecimento da diversidade em relação à presença de patógenos humanos e vegetais, bem como os microrganismos benéficos e estabelecer hipóteses sobre o impacto desses organismos na supressão a fitopatógenos radiculares (SILVA et al., 2021).

A produção de bactérias pode gerar resultados de manejo de fitonematoides advindos diretamente das células bacterianas ou dos metabólitos produzidos por elas no meio de cultura. As células colonizam raízes e produzem metabólitos. Estes metabólitos podem atuar diretamente aos fitonematoides por toxidez, ou indiretamente pela ativação de respostas de defesa na planta, como a desencadeada por lipopeptídeos (TIAN et al. 2007; RAAIJMAKERS et al., 2010; XIA et al. 2011; DONG; ZHANG 2006).

Assim objetivou-se comparar o perfil metataxonômico e metabolômico das amostras comerciais e fermentadas e avaliar sua atuação no controle de *Pratylenchus brachyurus* na soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção de metabólitos bioativos

Para extração e identificação de grupos químicos dos metabólitos ligados a biossíntese de micromoléculas de *Bacillus* spp. nas amostras (produto comercial e fermentados), foi

utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS).

De acordo com os resultados obtidos no teste prévio de penetração de nematoides, foram selecionadas as amostras (TABELA 1) dos produtos *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA 20 (ONIX, Lallemand) e *Bacillus amyloliquefaciens* SIMBI BS 10 CCT 7600 (NEMACONTROL, Simbiose) que apresentaram resultados variados de alta e baixa eficiência no controle, além de serem produtos com recomendação técnica para tratamento do nematoide *Pratylenchus brachyurus*. Também foram selecionados os meios de cultura que foram usados para as fermentações dessas amostras.

Dada a ausência de conhecimento prévio sobre os possíveis metabólitos presentes nas amostras, optou-se por utilizar dois tipos de extração: a liofilização, que nos permite verificar os compostos como um todo, porém com um direcionamento voltado aos compostos polares; e a extração por partição LL, que nos permite identificar os compostos lipofílicos. As amostras foram enviadas em tubos tipo microcentrífuga de 2,0 mL ao Laboratório de Química Bio-orgânica Otto Richard Gottlieb (LaBiORG), do Departamento de Química da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, para processamento.

Tabela 1 - Especificação das amostras para análise de metabólitos via HPwLC.

Tratamento	Descrição
UFLA1	Meio de cultura Multibacter LL
UFLA2	Meio de cultura MCM LL
UFLA3	Meio de Fotossíntese LL
UFLA4	Meio de cultura Agropaccelli LL
UFLA5	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) fermentado fazenda A22 LL
UFLA6	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) fermentado fazenda A51 LL
UFLA7	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) fermentado fazenda A102/149 LL
UFLA8	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) fermentado fazenda A123/171 LL
UFLA9	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado fazenda A2 LL
UFLA10	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado fazenda A19 LL
UFLA11	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado fazenda A173 LL
UFLA12	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado fazenda A154 LL
UFLA13	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) comercial LL
UFLA14	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) comercial LL
UFLA15	Meio de cultura Multibacter LF
UFLA16	Meio de cultura MCM LF
UFLA17	Meio de Fotossíntese LF
UFLA18	Meio de cultura Agropaccelli LF
UFLA19	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) fermentado fazenda A22 LF
UFLA20	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) fermentado fazenda A51 LF
UFLA21	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) fermentado fazenda A149 LF
UFLA22	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) fermentado fazenda A171 LF
UFLA23	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado fazenda A2 LF
UFLA24	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado da fazenda A19 LF
UFLA25	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado fazenda A173 LF
UFLA26	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado fazenda A154 LF
UFLA27	<i>B. methylotrophicus</i> UFPEDA20 (Onix, Lallemand) LF
UFLA 28	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10 cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) LF

* LL - extração da amostra por partição líquido-líquido; LF - Extração da amostra por liofilização.
Fonte: Do autor (2023).

As amostras foram transferidas para ampolas de 1,5 mL, sendo cada amostra posteriormente analisada em sistema de cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS). O equipamento abrange um cromatógrafo líquido Nexera X2 (Shimadzu, Japão) com detector de arranjos de diodos (DAD) - SPD M20A acoplado a um espectrômetro com analisador tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (QTOF), MicroTOF-QII (Bruker Daltonics, EUA), equipado com fonte eletrospray (ESI), operando no modo positivo de ionização, com tempo de transferência de íons de 70 μ s e prepulse de 5 μ s. O intervalo de massas selecionado foi de m/z 50-1200, modo AutoMS, com energia de colisão variando de 20-65 eV de acordo com m/z 50 - 700, mantendo-se a energia constante em 65 eV para valores de massa acima de m/z 700. Foi adquirido o máximo de cinco íons precursores por ciclo. Os parâmetros de funcionamento do equipamento foram: capilar 4500 V, gás nebulizador (nitrogênio) 4 bars, gás secante (nitrogênio) 9,0 L min⁻¹ e temperatura da fonte de 200 °C. Para calibração interna do sistema foi utilizada solução de

formiato de sódio 10 mM em isopropanol/água (1:1 v/v).

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna analítica Kinetex C18 (100 x 2,1mm, 2.6 µm) (Phenomenex, EUA) mantida em 50 °C, com vazão de 0,35 mL min⁻¹. A fase móvel (A) foi constituída de água deionizada enquanto a fase (B) constituída de acetonitrila, ambas grau HPLC, contendo 20 mM de ácido fórmico como aditivo. Inicialmente foi aplicada eluição isocrática de 0 - 2 min em 15 % de (B), com posterior gradiente de eluição de 2-12 min de 15 % até 95 % de (B) e novamente eluição isocrática de 12-17 min a 95 % de (B). 5 µL de amostra foram injetados em cada análise.

Para a desrepliação das amostras através dos espectros obtidos de MS/MS via análise de rede molecular (GNPS), foi utilizado o modo AutoMS e feita a conversão para o formato mzXML utilizando-se o software MS-Convert, que faz parte do programa ProteoWizard (Palo Alto, CA, EUA).

As redes foram geradas usando a plataforma online (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>) (WANG, M., et al., 2016). Todos os picos de MS/MS que atingirem desvios de 17 Da dos íons precursores serão filtrados. Os espectros de MS/MS foram selecionados apenas entre os seis melhores picos, considerando uma faixa de 50 Da em todo o espectro. Os dados foram agrupados com uma tolerância de 0,02 Da para íons precursores e 0,02 Da para íons fragmentos na construção de espectros de “consenso” para cada precursor, combinados para criar o nó visualizado. Espectros de consenso com menos de dois espectros não foram considerados.

Conexões entre nós foram filtradas para valores maiores que 0,7 do parâmetro cosseno, com compatibilidade para mais de seis picos. Pela desrepliação de compostos, os espectros de rede gerados serão consultados nas bibliotecas GNPS, usando o mesmo critério de seleção para as amostras analisadas. Os dados do GNPS foram analisados e visualizados usando o Cytoscape 3.7.0 (Instituto Nacional de Ciências Médicas Gerais dos EUA, Bethesda, MD, EUA).

2.2 Análise metataxonômica das amostras comerciais e *on farm*

Amostras dos produtos comerciais *B. methylotrophicus* (Onix, Lallemand) e *B. subtilis* (Nemacontrol, Simbiose) e de produtos derivados de sua fermentação *on farm* foram submetidas a análise metataxonômica (TABELA 2). Tal análise objetivou avaliar se existia conformidade dos produtos comerciais e se a estrutura da comunidade microbiana nos produtos

on farm se mantém como esperado, ou seja, similar a do produto comercial utilizado como inóculo inicial.

Tabela 2 - Descrição das amostras utilizadas na análise de HPLC e metataxonômica.

Amostra	Produto	Natureza	Sistema de produção	Meio de cultura	Esterilização	Tempo de cultivo	Coleta	Produtor
UFLA 37	Onix	Fermentada	Caixa d'água c/ aerador	Multibacter	Iodo	24h	2ª safra 2019/20	A
UFLA 38	Onix	Fermentada	Caixa d'água c/ aerador	Agropaceli	Iodo, Água e sabão	48h	2ª safra 2019/20	B
UFLA 39	Onix	Fermentada	Caixa d'água c/ aerador	Multibacter	Cloro	48h	Safra 2020/21	C
UFLA 40	Onix	Fermentada	Caixa d'água c/ aerador	MCM	N. I.	48h	Safra 2020/21	D
UFLA 29	Nemacontrol	Fermentada	Caixa d'água c/ aerador	Multibacter	Cloro e água e sabão	24h	2ª safra 2019/20	E
UFLA 30	Nemacontrol	Fermentada	Caixa d'água c/ aerador	N.I.	Iodo	48h	2ª safra 2019/20	D
UFLA 31	Nemacontrol	Fermentada	Caixa d'água c/ aerador	MCM	N. I.	48h	Safra 2020/21	D
UFLA 32	Nemacontrol	Fermentada	Caixa d'água c/ aerador	Fotossíntese	N. I.	48h	Safra 2020/21	D
UFLA 36	Onix	Comercial	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A.
UFLA 33	Nemacontrol	Comercial	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A.

*N.I- Não informado; N.A – Não se aplica.
Fonte: Do autor (2023).

O DNA genômico foi extraído das amostras utilizando o DNeasy PowerSoil kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. A região V4 do gene codificador do rRNA 16S foi amplificada com os primers 515F e 806R (CAPORASO et al. 2012) e posteriormente sequenciada usando uma plataforma PGM Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras foram amplificadas por PCR usando iniciadores fusionados com os barcodes. As reações de PCR foram realizadas conforme proposto por DOBBLER et al., 2017. Os produtos de PCR foram purificados com Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), quantificados com o kit Qubit Fluorometer - DNA High Sensitivity

Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e combinados em proporções equimolares. Esta amostra composta foi utilizada para a preparação da biblioteca com o sistema Ion OneTouch™ 2 utilizando o kit Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O sequenciamento foi realizado usando o Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit em um sistema Ion PGM™, usando o Ion 318™ Chip v2.

O pré-processamento dos dados do gene ribossomal 16S e as estimativas de diversidade foram realizados usando VSEARCH ver. 2.3.4 (ROGNES et al., 2016) e o QIIME ver. 1.9.1 (CAPORASO et al., 2010), respectivamente. Brevemente, agrupamento de sequências foi realizado usando o método UPARSE com corte de similaridade de 97% seguindo o método UPARSE (EDGAR, 2013), conforme recomendado pelo Brazilian Microbiome Project (PYLRO et al. 2014) usando o Sistema Operacional BMPOS (PYLRO et al. 2016). Após o agrupamento, as sequências foram alinhadas contra o banco de dados de referência SILVA (QUAST et al., 2013). Os conjuntos de dados de rRNA 16S foram rarefeitos para o mesmo número de sequências (LEMOS et al., 2011) e usados para construir matrizes de dissimilaridade geradas por distâncias Binárias e Bray-Curtis. O conjunto de dados foi sumarizado em nível de gênero para cada amostra, as mudanças na diversidade microbiana foram medidas usando métricas de alfa-diversidade e de beta-diversidade entre as amostras avaliadas.

2.3 Controle de qualidade do produto nemacontrol

Foi feito um teste em casa de vegetação com a fermentação otimizada em laboratório do Nemacontrol, bem como com os produtos que tiveram seus metabólitos e perfil de microbiota avaliados, visando estabelecer padrões de qualidade em relação aos metabólitos para cada um dos produtos.

O inóculo de *P. brachyurus* foi obtido através da empresa C.L. empreendimentos biológicos, a qual garantiu a qualidade do mesmo.

No Laboratório de Controle Biológico de Doenças em Plantas (DFP/UFLA), foi realizada a multiplicação do produto biológico comercial selecionado, o Nemacontrol, para obtenção do seu produto fermentado sob condições controladas.

A fermentação se deu através de frascos de Erlenmeyer (250 mL) tampados com algodão e papel alumínio, contendo 90mL de meio de cultura multibacter (1,5 g de meio, 0,95 g de açúcar; 90 mL de água destilada) e autoclavados por 15 minutos a 121°C. Foi preparada uma suspensão do produto biológico comercial, na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹ bactérias endosporogênicas do produto, pipetando-se 10 mL da suspensão nos frascos

contendo 90 mL do meio de cultura (1:10). Foi adicionado um sistema de oxigenação com bomba e filtro de aquário aos Erlenmeyers e estes mantidos em mesa de agitação orbital (TECNAL) a 200 RPM e 28 °C por 48h.

Após transcorridas as 48h de cultivo do produto comercial, foi realizada a contagem de células endosporogênicas, seguindo o método de quantificação proposto por ROMEIRO (2001).

Para os demais tratamentos, as amostras fermentadas coletadas nas fazendas, não foram realizados novo processo fermentativo após a coleta, apenas foram submetidas a extração por partição líquido-líquido, liofilização ou mantidas no congelador.

O ensaio foi montado usando a cultivar M 6410 IPRO da Monsoy. As sementes de soja foram semeadas em substrato para plantas (Turfa Sphagnum, Vermiculita e Perlita), em bandejas com compartimentos de volume de 55 mL. Cada compartimento recebeu um furo com 2 cm de profundidade onde foi feita a semeadura e aplicação das amostras comerciais e fermentadas em cima das sementes, diretamente no sulco de plantio.

Para cálculo da quantidade do produto a ser testado considerou-se a aplicação de 5 L por hectare de cada amostra, diluído em 35 L de água, recomendação que os produtores do MT seguem nas aplicações dos seus fermentados.

Após aplicação dos tratamentos (TABELA 3), as bandejas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada (28°C +/-2) e a irrigação realizada uma vez por dia, ou conforme necessidade. O procedimento seguiu conforme descrito no item 2.3 (capítulo 1). O experimento foi realizado duas vezes, com seis repetições em cada tratamento.

Tabela 3 - Especificação dos tratamentos utilizados durante o teste.

Tratamento	Descrição	Código
T1	Água autoclavada esterilizada	UFLA34
T2	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) comercial	UFLA 33
T3	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A2 congelado	UFLA 29
T4	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A19 congelado	UFLA 30
T5	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A125/173 congelado	UFLA 31
T6	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A107/154 congelado	UFLA 32
T7	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) comercial LF	UFLA 28
T8	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A2 LF	UFLA 23
T9	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A19 LF	UFLA 24
T10	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A125/173 LF	UFLA 25
T11	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A207/154 LF	UFLA 26
T12	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) comercial LL	UFLA 14
T13	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A2 LL	UFLA 9
T14	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A19 LL	UFLA 10
T15	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A125/173 LL	UFLA 11
T16	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) fermentado na fazenda A207/154 LL	UFLA 12
T17	<i>B. amyloliquefaciens</i> simbi bs 10cct 7600 (Nemacontrol, Simbiose) comercial fermentado no Laboratório	UFLA 35

* LL - extração da amostra por partição líquido-líquido; LF - Extração da amostra por liofilização.
Fonte: Do autor (2023).

2.4 Índice de quimiotaxia (IQ)

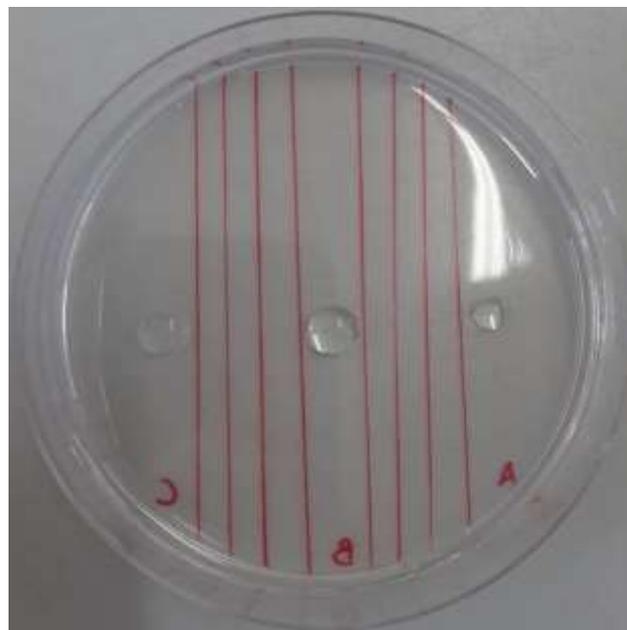
O inóculo foi obtido através da extração da população pura de *P. brachyurus* de plantas de soja mantidas em casa de vegetação (Coolen e D'Herde, 1972). A suspensão foi ajustada para a concentração de 100 espécimes de *P. brachyurus* em até 40 μ L.

Para os tratamentos, foram selecionados os que apresentaram melhores características no controle de qualidade in vitro do produto Nemacontrol (UFLA34, UFLA 33, UFLA 30, UFLA 32, UFLA 28, UFLA 23, UFLA 24, UFLA 10, UFLA 11, UFLA 29).

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados de acordo com Bargmann et

al. (1993) e Wang et al. (2019) com algumas modificações. Placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo meio água-ágar (20 g ágar; 1 L de água destilada), foram divididas em três áreas: A) área de controle; B) área neutra, localizada no centro da placa; C) área de teste (FIGURA 1). A área neutra foi padronizada em 1 cm, as áreas de controle e teste tiveram uma distância de 1,5 cm até as bordas da área neutra (B). Aproximadamente 100 espécimes foram depositados no centro da placa, com até 40 μ L (B). Uma gota contendo 10 μ L do produto testado e outra apenas com água foram depositados nas posições C e A, respectivamente. Em seguida, as placas foram deixadas em temperatura ambiente e, após 30 h, foi contabilizado o número de indivíduos nas áreas teste (C) e controle (A), com o auxílio de um microscópio óptico invertido.

Figura 1 - Desenho do teste de quimiotaxia usando J2 e adultos de *P. brachyurus* em placa de Petri (9 cm) contendo meio ágar-água. Três áreas distintas foram definidas: A) área de controle, B) área neutra e C) área de teste. Aproximadamente 100 espécimes foram depositados no centro da placa, com até 40 μ L (B). Uma gota contendo 10 μ L do produto testado e outra apenas com água foram depositados nas posições C e A, respectivamente. Decorridas 30 h, o número de espécimes em cada área foi determinado separadamente. Os nematoides que permaneceram na área B não foram contabilizados.



Do autor (2023)

O índice de quimiotaxia (IQ) foi obtido através da subtração do número de indivíduos presentes na área de teste (C) pelo número de indivíduos na área de controle (A) e dividido pelo número total de indivíduos colocados na área neutra (B) (BARGMMAN et al., 1993). Para

interpretação de resultados foi considerado um $IQ \geq 0,2$ como altamente atraente, um $IQ \geq 0,1$ mas $< 0,2$ como ligeiramente atraente, um $IQ \geq -0,1$ mas $< 0,1$ como uma resposta aleatória, um $IQ > -0,2$ mas $< -0,1$ como ligeiramente repelente e um $IQ \leq -0,2$ como altamente repelente (WANG et al., 2019). O experimento foi realizado duas vezes, com cinco repetições em cada tratamento.

Na Tabela 1 (Apêndice A) pode ser consultado todos os tratamentos usados nos teste de HPL, Metataxonômica e Quimiotaxia.

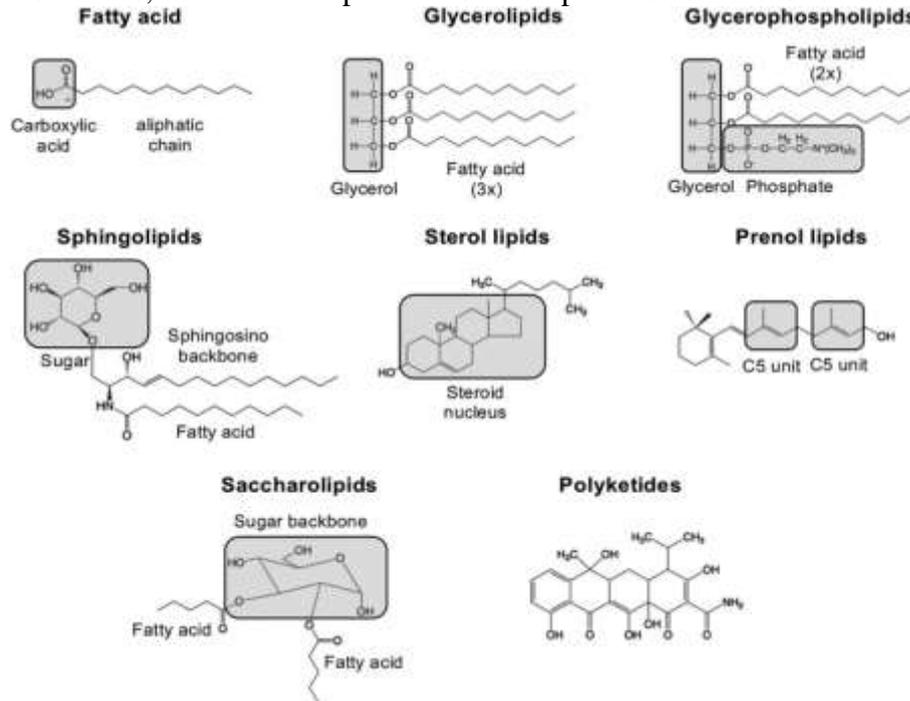
3. RESULTADOS

3.1 Produção de metabólitos bioativos

As bactérias do gênero *Bacillus* produzem comumente moléculas com grupo dos lipopeptídeos, mas neste estudo, nenhuma das bactérias foi capaz de produzir estas moléculas, nem mesmo no produto comercial. Cabe ressaltar que parte destas moléculas são provenientes do metabolismo secundário e são produzidas em condições nutricionais e ambientais específicas. Tendo em vista que ambos os produtos estudados são voltados para o manejo de fitonematoides, a diversidade de moléculas produzidas pode ser diferente daquelas normalmente reportadas como de ação anti-fúngica.

Em relação a cromatografia realizada por HPLC-HRMS para *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) não foram encontrados lipopeptídeos tanto no produto comercial quanto nos fermentados com base deste produto. As moléculas encontradas eram predominantemente lipídeos (esfingolipídeos, esteroides, fenol lipídeo) ou uma combinação de lipídios com um núcleo de carbono (glicerolipídeos e glicerolfosfolipídeos), conforme apresentado na Figura 2, que não são tão comuns ao gênero *Bacillus* como lipopeptídeos do tipo surfactinas, iturinas e fengicinas (KEARNS, et al., 2004; CHOWDHURY et al., 2015).

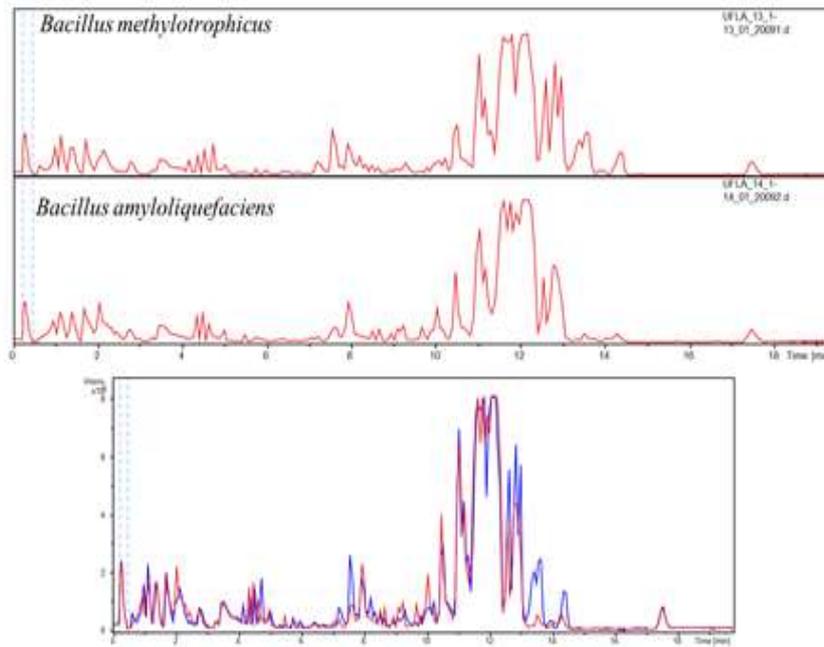
Figura 2 - Principais moléculas encontradas nos produtos bionemáticos comerciais e on farm estudados, determinados por HPLC e comparadas com a base de dados Sirius.



Do autor (2023).

Quando se observa os perfis cromatográficos derivado das bactérias presentes no produto comercial, ou seja, colônias puras, apesar de pertencerem a espécies diferentes têm perfis muito semelhante (FIGURA3) com exceção para o pico de absorção de 12 minutos e esta pode ser a diferença predominante no perfil metabólico de ambos os produtos.

Figura 3 - Análise de cromatograma: Comparativo de metabólitos encontrados nos produtos comerciais *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) e *B. amyloliquefaciens* (Nemacontrol, Simbiose).

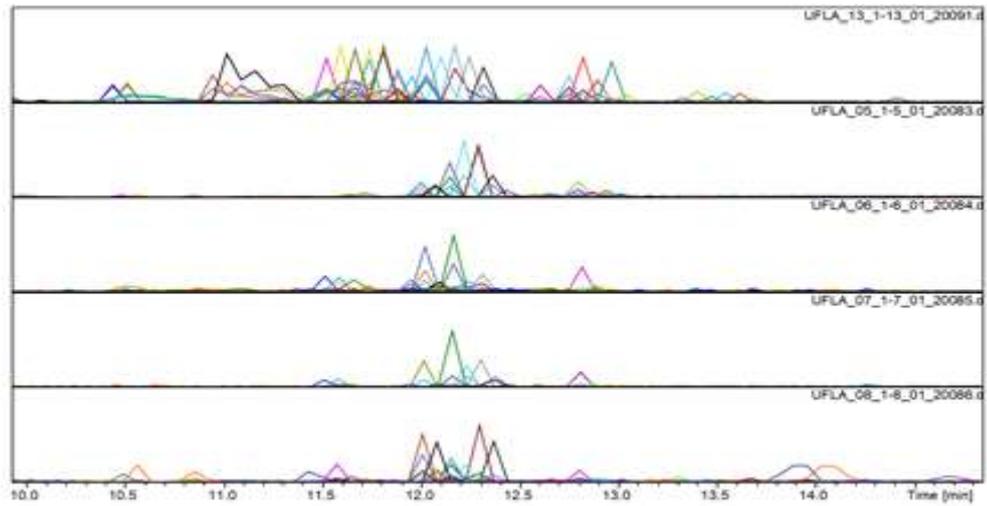


Do

autor (2023).

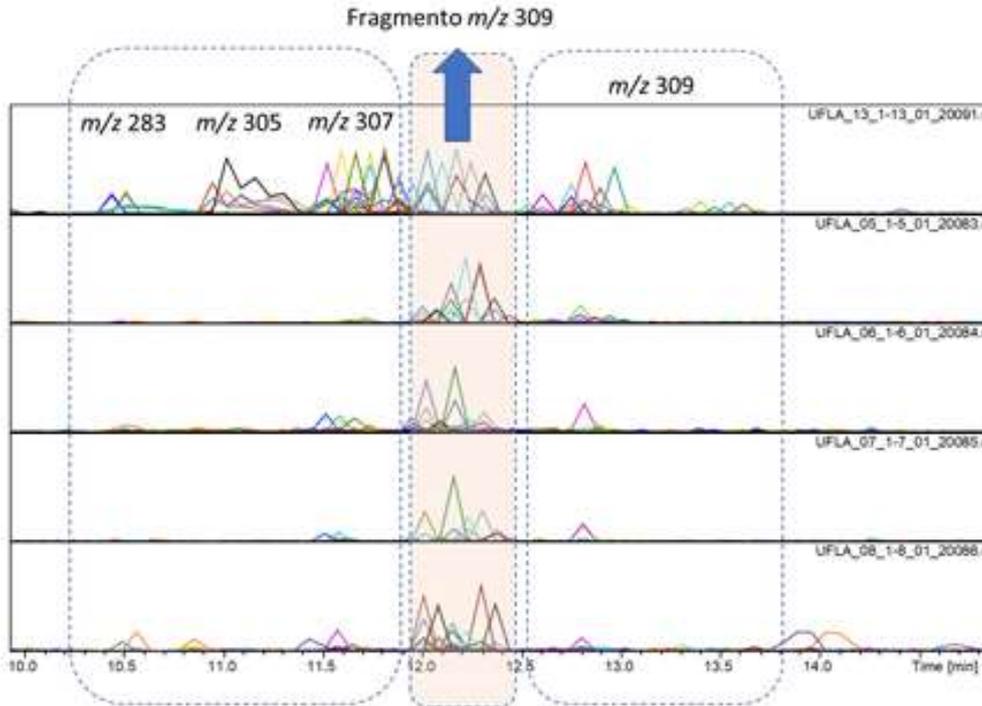
No entanto, o cromatograma é diferente do perfil dos produtos comerciais (FIGURA 3) quando se consideram os produtos fermentados (FIGURA 4), ou seja, são metabólitos produzidos completamente diferentes do ponto de vista de composição química ou eventualmente são os mesmos, mas que sofrem alteração durante o processo fermentativo com culturas não axênicas, já que esses metabólitos são produzidos de acordo com fatores nutricionais e ambientais específicos. Entretanto, para alguns compostos há mudanças sutis na composição, como o pico dos 13 minutos de retenção encontrado em todas as quatro amostras de produtos fermentados a partir da cultura pura de *B. methylotrophicus*. Houve um pico exclusivo da amostra da bactéria produzida no meio MCM não encontrado na produção nos demais meios de cultura, mas também uma sobreposição de diversas amostras que puderam ser encontradas em todas as amostras, comerciais e fermentadas desta mesma bactéria (FIGURA 5) e estas foram identificadas predominantemente como poliéteres com níveis de saturação diferentes (FIGURA 6). No entanto, uma variação na estrutura do poliéter pode ser identificado exclusivamente na amostra de maior eficiência para redução na penetração (UFLA05) e amostra comercial do produto com a presença de um grupamento pentose na cadeia de poliéter ao invés de um grupamento fostato (FIGURA 7).

Figura 4. Cromatograma da amostra de *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) do produto comercial (amostra 13) e amostras fermentadas em diferentes meios de cultura UFLA 5: ONIX + AGROBIOLÓGICA, UFLA 6: ONIX + AGROPACCELLI, UFLA 7: ONIX + MULTIBACTER, UFLA 8: ONIX + MCM



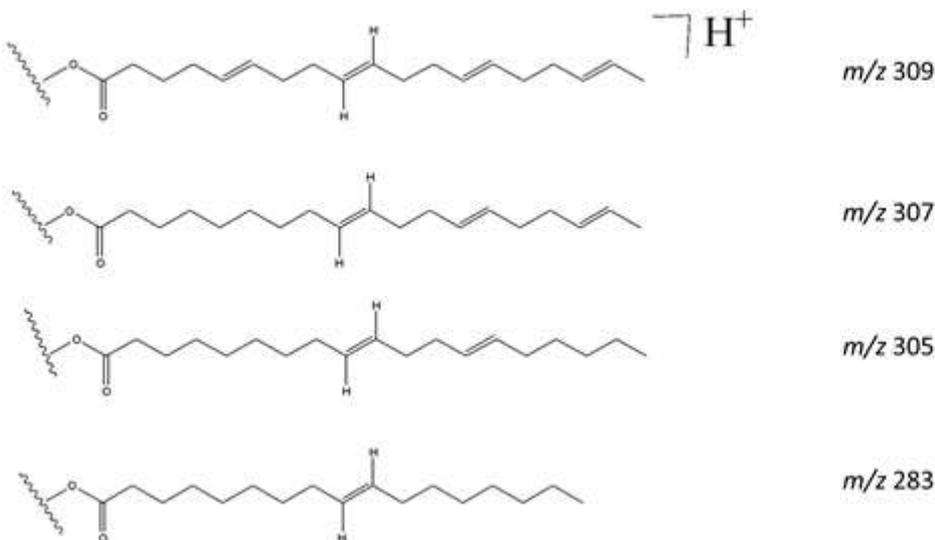
Do autor (2023).

Figura 5. Cromatograma da amostra de *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) do produto comercial (amostra 13) e amostras fermentadas em diferentes meios de cultura UFLA 5: ONIX + AGROBIOLÓGICA, UFLA 6: ONIX + AGROPACCELLI, UFLA 7: ONIX + MULTIBACTER, UFLA 8: ONIX + MCM com detalhe para os picos com maior sobreposição entre as amostras para um mesmo pico de retenção.



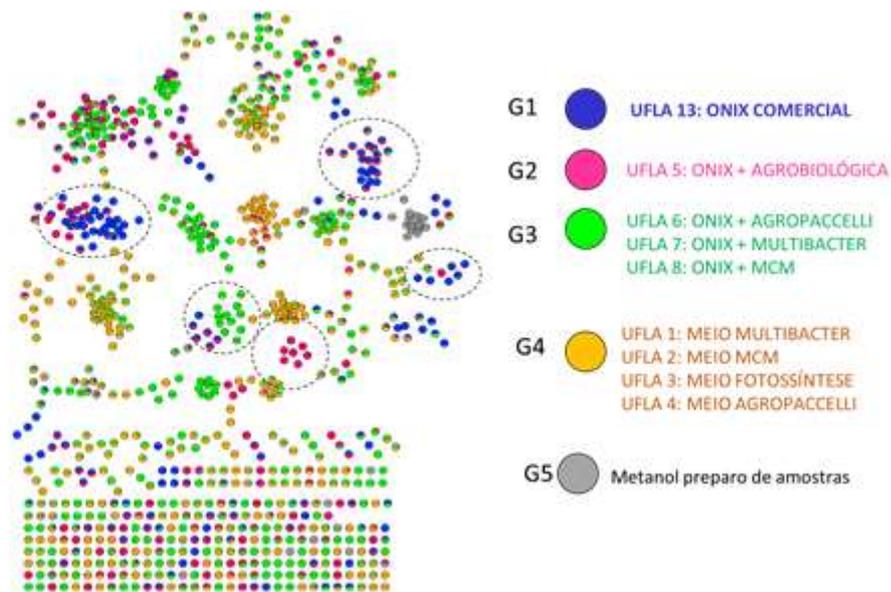
Do autor (2023).

Figura 6 - Principais poliéteres produzidos em comum entre todas as amostras de produtos comerciais e fermentados.

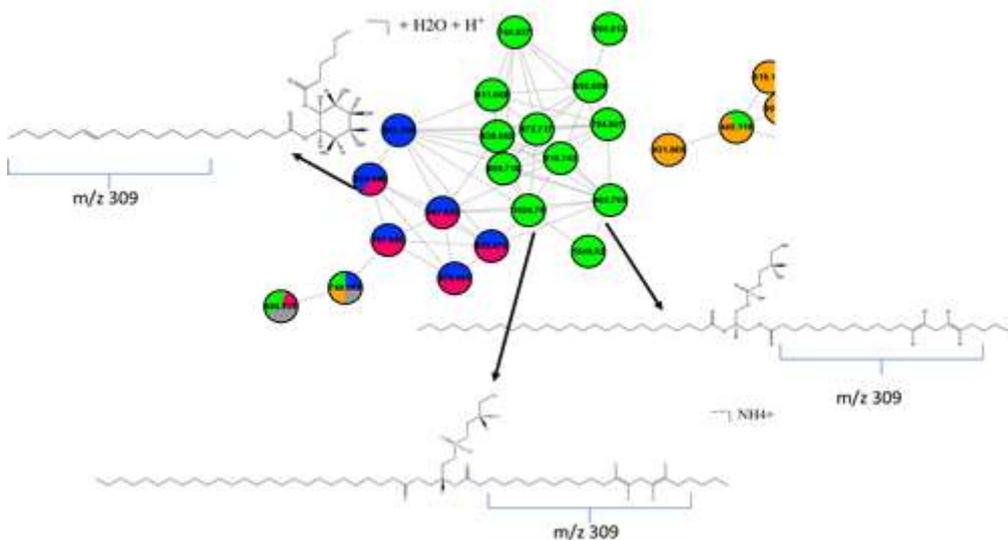


Do autor (2023).

Figura 7 - Agrupamento de amostras de acordo com diversidade de moléculas obtidas de *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) do produto comercial (amostra 13) e amostras fermentadas em diferentes meios de cultura do mesmo produto como inóculo inicial UFLA 5: produção no meio AGROBIOLÓGICA, UFLA 6: produção no meio AGROPACCELLI, UFLA 7: produzido meio meio MULTIBACTER, UFLA 8: produzido no meio MCM e os controles UFLA 1: MEIO MULTIBACTER, UFLA 2: MEIO MCM, UFLA 3: MEIO FOTOSÍNTESE, UFLA 4: MEIO AGROPACCELLI. A. Panorama geral de agrupamento das amostras. B. Detalhe para agrupamento com molécula em comum entre a amostra fermentada em produto comercial.



A



B

3.2 Análise metataxonômica das amostras comerciais e *on farm*

Após a filtragem por qualidade foram obtidas 610.093 sequências parciais do gene ribossomal 16S de entre as 10 amostras analisadas (Tabela 4).

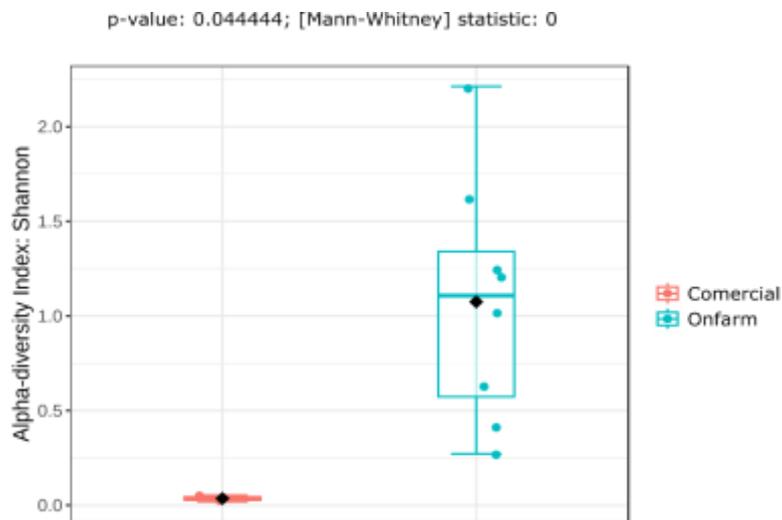
Tabela 4 - Descrição das amostras analisadas por metataxonômica Número de sequências parciais do gene ribossomal 16S obtidas em cada uma das amostras analisadas.

Amostra	Produto	Nº reads
UFLA 37	<i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A22 on farm congelado	48852
UFLA38	<i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A51 on farm congelado	47500
UFLA39	<i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A102/149	68698
UFLA40	<i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A123/171 on farm congelado	56363
UFLA29	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A2 on farm congelado	58866
UFLA30	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A19 on farm congelado	72015
UFLA31	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A125/173 on farm congelado	53111
UFLA32	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A107/154 on farm congelado	58094
UFLA36	Comercial <i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand)	72605
UFLA33	Comercial <i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol,Simbiose)</i>	73989

Fonte: Do autor (2023).

De acordo com a alfa-diversidade, mesmo com número de *reads* da mesma ordem de grandeza ou até superior (Tabela 4), as amostras dos dois produtos comerciais possuem baixa diversidade, amostras praticamente homogêneas (ao nível gênero), o que não ocorre com as amostras fermentadas (FIGURA 8).

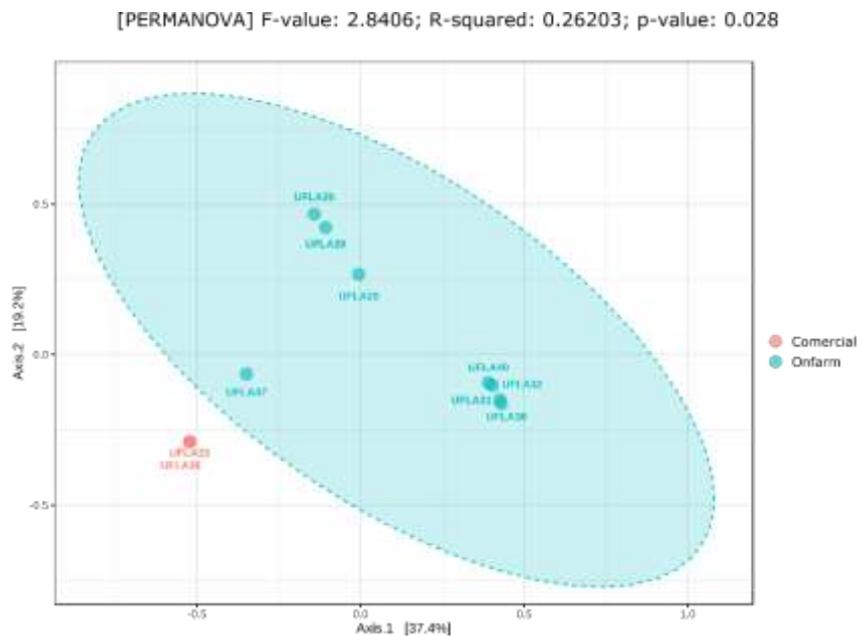
Figura 8 - Alfa-diversidade das amostras comerciais e de produção *on farm* calculadas pelo índice de Shannon. (p-value: 0.044444). UFLA33 - Comercial *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)*; UFLA30 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A19 *on farm* congelado; UFLA31 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A125/173 *on farm* congelado; UFLA32 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A107/154 *on farm* congelado; UFLA29 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A2 *on farm* congelado; UFLA36 - Comercial *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand); UFLA 37 - *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A22 *on farm* congelado; UFLA38 - *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A51 *on farm* congelado; UFLA39 - *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A102/149 *on farm* congelado; UFLA40 - *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A123/171 *on farm* congelado.



Do autor (2023).

De acordo com a PERMANOVA, houve diferença significativa ($p= 0,028$) entre as amostras comerciais e as produzidas *on farm*. Os resultados da taxonomia revelam abundância relativa de cada gênero bacteriano identificado nas amostras dos produtos comerciais e dos seus derivados na produção *on farm* (FIGURA 9).

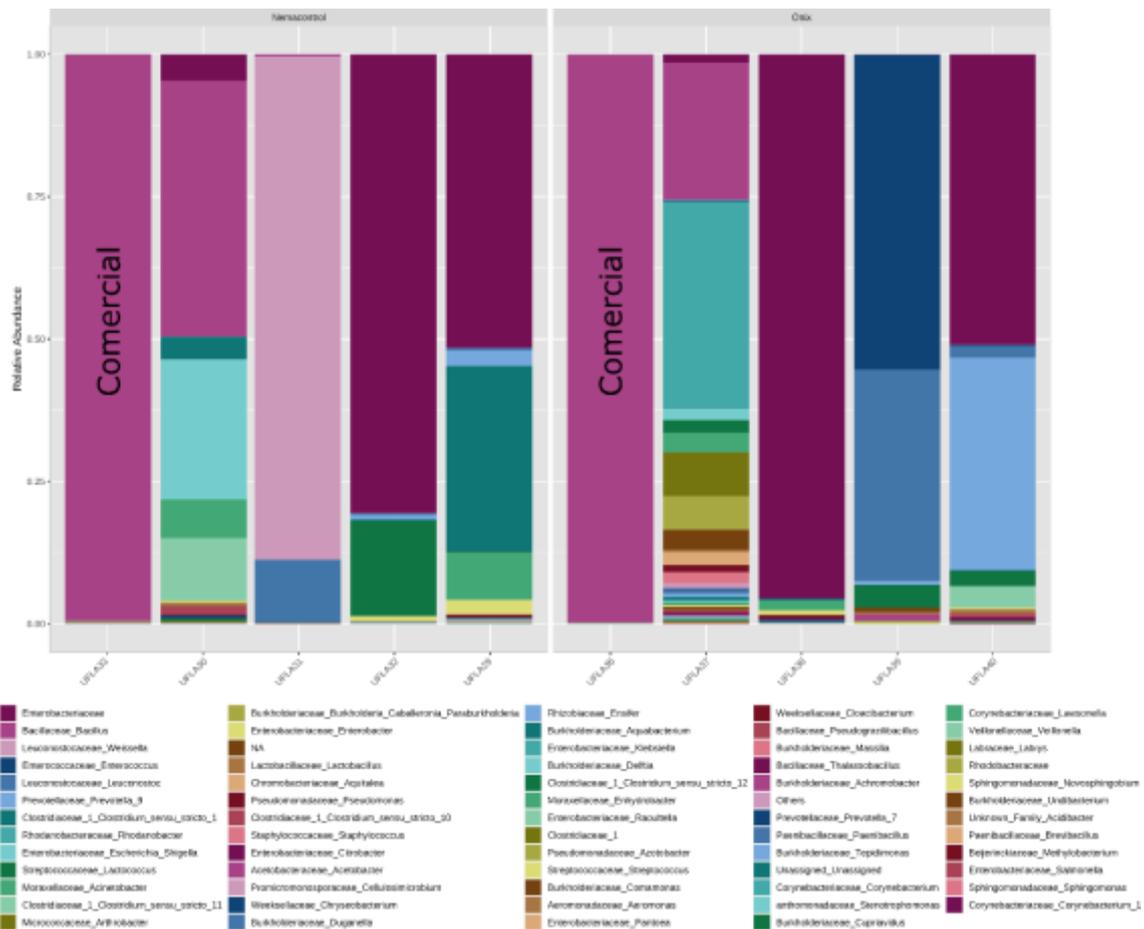
Figura 9 - Beta-diversidade das amostras de produtos comerciais e de produção *on farm* calculada pelo índice de Bray-Curtis.



Do autor (2023).

Apenas nas amostras comerciais é possível perceber a predominância do gênero de interesse do produto comercial usado como inóculo inicial (*Bacillus*). Das amostras fermentadas avaliadas, todas revelaram contaminação com outros gêneros e mesmo quando o gênero *Bacillus* foi encontrado na amostra, o contaminante perfazia uma abundância relativa maior que ele (FIGURA 10). De fato, para duas delas, UFLA30 oriunda da produção de *B. amyloliquefaciens* e UFLA37 oriunda da produção de *B. methylotrophicus* foi encontrada uma abundância relativa superior a 25% de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*. Para todas as outras amostras, a abundância relativa de bactérias pertencentes ao gênero da bactéria usada como inóculo semente foi inferior a 1%. Os gêneros de bactérias encontrados com maior abundância relativa nas amostras foram *Weissella* (UFLA31), *Enterococcus* (UFLA39), *Enterobacter* (UFLA30, 32, 29,38 e 40), *Paenibacillus* (UFLA39), *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Streptococcus* e *Salmonella*.

Figura 10 - Metataxonômica realizada com dois produtos comerciais registrados para controle de nematoides, *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) e Nemacontrol, e seus respectivos produtos fermentados em fazendas do estado do Mato Grosso, com coleta ente a 2ª safra^a 2019/20 e safra de 2020/21. Abundância relativa a nível de gênero. UFLA33 - Comercial *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600*(Nemacontrol,Simbiose); UFLA30 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600*(Nemacontrol, Simbiose) A19 on farm congelado; UFLA31 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600*(Nemacontrol, Simbiose) A125/173 on farm congelado; UFLA32 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600*(Nemacontrol, Simbiose) A107/154 on farm congelado; UFLA29 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600*(Nemacontrol, Simbiose) A2 on farm congelado; UFLA36 - Comercial *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand); UFLA 37 - *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A22 on farm congelado; UFLA38 - *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A51 on farm congelado; UFLA39 - *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A102/149 on farm congelado; UFLA40 - *Bacillus methylotropicus* UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A123/171 on farm congelado.



Do autor (2023)

3.3 Controle de qualidade do produto nemacontrol

Os testes para avaliar a eficiência da penetração dos nematoides nas raízes foram realizados duas vezes. A Tabela 5, apresenta a comparação das médias dos tratamentos, onde observa-se que o UFLA 34, a testemunha, com o pior resultado, visto que obteve a maior média de penetração de *P. brachyurus*, juntamente com o tratamento UFLA 11, apenas no primeiro ensaio. O tratamento UFLA 23 apresentou os melhores resultados com menor penetração do fitonematoide em relação aos demais tratamentos, nos dois ensaios, juntamente com o tratamento UFLA 10 no primeiro ensaio e UFLA 26 e UFLA 30, no ensaio 2. Os demais tratamentos não diferenciam entre si.

Sendo assim, selecionou-se os tratamentos: UFLA 10; UFLA 11; UFLA 23; UFLA 24; UFLA 25; UFLA 28; UFLA 30; UFLA 32; UFLA 33 e UFLA 34 para a etapa do teste de quimiotaxia, visando elucidar a existência de algum composto responsável por atrair ou repelir os nematoides na penetração das raízes.

Tabela 5: Teste para avaliar a eficiência dos produtos na penetração do *P. brachyurus* na raiz. Dados significantes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) para os tratamentos estudados na seleção do produto comercial.

Tratamentos	Repetição 1		Repetição 2	
	% de Penetração	Grupo	% de Penetração	Grupo
UFLA34	23,5	a	16,2	A
UFLA 33	15,3	ab	8,0	Cd
UFLA 29	19,3	ab	8,0	Cd
UFLA 30	14,3	ab	6,7	D
UFLA 31	15,3	ab	11,8	Bc
UFLA 32	12,0	ab	7,7	Cd
UFLA 28	13,8	ab	7,7	Cd
UFLA 23	13,8	b	4,5	D
UFLA 24	13,0	ab	8,2	Cd
UFLA 25	13,2	ab	8,5	Cd
UFLA 26	13,5	ab	6,7	D
UFLA 14	16,5	ab	8,0	Cd
UFLA 9	19,0	ab	7,8	Cd
UFLA 10	8,7	b	8,0	Cd
UFLA 11	2,2	a	11,8	Bc
UFLA 12	14,2	ab	15,2	Ab
UFLA 35	17,8	ab	8,2	Cd

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). UFLA9 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A2 on farm LL; UFLA10 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A19 on farm LL; UFLA11 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A173 on farm LL; UFLA12 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A154 on farm LL; UFLA14 - Comercial *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* LL; UFLA23 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A2 on farm LF; UFLA24 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A19 on farm LF; UFLA25 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A173 on farm LF; UFLA26 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A154 on farm LF; UFLA28 - Comercial *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* LF; UFLA29 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A2 on farm congelado; UFLA30 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A19 on farm congelado; UFLA31 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A125/173 on farm congelado; UFLA32 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A107/154 on farm congelado; UFLA33 - Comercial *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)*; UFLA34 - Água autoclavada esterilizada.

Fonte: Do autor (2023).

3.4 Índice de quimiotaxia (IQ)

No índice de quimiotaxia, em ambos os ensaios realizados, não houve atratividade ou repelência aos nematoides durante o período avaliado. A resposta foi semelhante ao tratamento de água. Portanto, a resposta foi considerada aleatória ($-0,1 \leq IC < 0,1$) para todos os tratamentos, incluindo o controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Respostas quimiotáticas de indivíduos de *P. brachyurus* a tratamentos oriundos de fermentação *on farm*.

Tratamento	IQ Ensaio 1	IQ Ensaio 2	Legenda do índice
UFLA34	0,024	-0,030	$IQ \geq 0,2$ -altamente atraente
UFLA33	-0,090	-0,064	$IQ \geq 0,1$ mas $< 0,2$ - ligeiramente atraente
UFLA30	-0,038	-0,046	$IQ \geq -0,1$ mas $< 0,1$ como uma resposta aleatória
UFLA32	0,052	-0,086	$IQ > -0,2$ mas $< -0,1$ - ligeiramente repelente
UFLA28	0,016	-0,072	$IQ \leq -0,2$ como altamente repelente
UFLA23	-0,054	-0,084	
UFLA24	0,072	-0,014	
UFLA25	0,080	0,020	
UFLA10	-0,020	0,020	
UFLA11	-0,032	-0,006	

UFLA10 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A19 on farm LL; UFLA11 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A173 on farm LL; UFLA23 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A2 on farm LF; UFLA24 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)*A19 on farm LF; UFLA25 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)*A173 on farm LF; UFLA28 - Comercial *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* LF; UFLA30 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A19 on farm congelado; UFLA32 - *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)* A107/154 on farm congelado; UFLA33 - Comercial *B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)*; UFLA34 - Água autoclavada esterilizada.

Fonte: Do autor (2023).

4 DISCUSSÃO

A espécie *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. methylotrophicus* possuem capacidade de se associar às raízes da planta estimulando seu crescimento e favorecendo a supressão de patógenos, e inibindo outras bactérias competitivas dentro da rizosfera da planta. Seu genoma está constituído por um grupo de genes implicados nas sínteses de lipopeptídeos e policetídeos com atividade antifúngica, antibacteriana e nematicida (DIAZ, 2018). De acordo com Lisbôa (2016), muitas bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem peptídeo antimicrobiano de amplo espectro de ação, que inibe bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo importantes patógenos. No entanto, para nenhuma das amostras dos produtos comerciais ou fermentados este grupo de moléculas foi identificado. Tendo em vista o registro destes produtos ser como bionematicida, as moléculas predominantes não são necessariamente aquelas comumente reportadas para o manejo de doenças fúngicas e bacterianas. Boa parte das moléculas produzidas pelos microrganismos que são o ingrediente ativo do produto comercial, só serão sintetizadas quando eles estiverem colonizando o solo e/ou sistema radicular. Invariavelmente, dependendo da formulação do produto, poderemos sim ter metabólitos ativos presentes, mesmo isso não sendo uma garantia.

De fato, o perfil metabólico dos produtos, as moléculas encontradas como produzidas por ambos os produtos estudados foi muito semelhante (Figura 3), o que pode representar a característica intrínseca de biocontrole.

Dentre as moléculas encontradas, aquelas mais frequentemente reportadas entre as amostras avaliadas destacaram-se glicerolipídeos, policetonas, fenol-lipídeos, esterol-lipídeos, esfingolipídeos e ácido graxo ligado a ácido carboxílico. Estas moléculas são pouco relatadas como de ação tóxica direta a fitopatógenos mas tem um papel de regulação gênica. A miriocina por exemplo é uma molécula produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* com ação anti-fúngica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* e estudos de transcriptômica e proteômica revelaram que sua produção está associada a genes relacionados ao metabolismo de esfingolipídeo, glicerofosfolipídeo e biosíntese de esteróis (WANG et al., 2021). Em função do período de amostragem do crescimento bacteriano, moléculas sinalizadoras podem ter predominado em relação às com atividade tóxica direta a fitopatógenos. O que pode inclusive representar se a fermentação está sendo eficiente, não apenas em relação a concentração de células, mas também a presença de metabólitos bioativos, como por exemplo a miriocina.

Considerando um dos mecanismos de ação dos metabólitos, resultados obtidos por Araújo et al (2002), indicam que o uso de *Bacillus* reduz a migração do nematoide, afetando a

orientação e interferindo na produção de exsudatos das raízes. Os exsudatos específicos das raízes de plantas hospedeiras atraem nematoides parasitas de plantas, enquanto substâncias de plantas não hospedeiras podem repeli-los (BIRD 1959; PAPADEMETRIOU e BONE, 1983; DIEZ e DUSENBERY, 1989; HALLEM et al., 2011; YANG ET AL. 2016).

Esta alteração na atratividade pode ser resultado da interação da bactéria e ou metabólitos com a raiz da soja, tendo em vista que não foi identificada ação direta de atratividade ou repelência dos produtos ao verme (TABELA 6). Bactérias do gênero *Bacillus* são rizobactérias que podem sintetizar metabólitos secundários, intervindo no ciclo dos nematoides e/ou transformando os exsudados das raízes, ocasionando interferências no processo de reconhecimento do nematoide à planta. (ARAUJO, 2018).

Segundo Araújo et al., (2002), *Bacillus subtilis* interfere na produção de exsudados das raízes que servem como orientação para nematoides, alterando a reprodução e orientação do fitoparasita em direção as raízes. Além disso, podem produzir proteases e induzir enzimas de defesa da planta hospedeira (KAVITHA et. al., 2007).

Trabalho realizado por Lana et al. (2019) encontraram, entre os diversos contaminantes identificados, espécies com potencial risco para humanos e animais. Foi o caso de espécies de *Enterococcus*, frequentemente presentes na microbiota intestinal de seres humanos e animais, e amplamente distribuídas no ambiente (BIAVASCO et al., 2007; CAMPOS et al., 2013) e também de bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella*. Por mais rápido que seja o crescimento de *Bacillus* em meio de cultura e a diversidade de metabólitos por eles produzida reduzir as chances de contaminantes se proliferarem, os produtos comerciais estão na fase de endósporo e este germina de forma mais lenta que células vegetativas (PETRAS e CASILDA, 1985; COLLINS e JACOBSEN, 2003; HASHMI et al., 2019). Esta desvantagem competitiva de crescimento pode levar os contaminantes como as bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter*, crescerem mais rapidamente e não permitirem o desenvolvimento do *Bacillus* introduzido. Por outro lado, bactérias pertencentes a este gênero *Bacillus* tem a competição pela colonização da rizosfera como um dos mecanismos de biocontrole e, mesmo com um contaminante, com risco de ser um potencial patógeno a animais (DE CHAMPS et al., 1996; ALLERBERGER et al., 1996; AKBARI, BAKHSHI e PEERYEH, 2016), pode desempenhar um papel de biocontrole dos nematoides encontrados (OLIVEIRA et al., 2007; MUNIF, HALLMANN e SIKORA, 2013).

Pseudomonas aeruginosa e outras bactérias patogênicas humanas, como *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, produzem moléculas com atividade tóxica

contra nematoides. Estas moléculas incluem a fenazina e cianeto de hidrogênio de *P. aeruginosa*, e uma endotoxina neuromuscular, uma citolisina, duas proteases extracelulares (gelatinase e serina protease) e uma variedade diversa de toxinas de outras bactérias (KURZ e EWBANK, 2000; QIN et al., 2000; GARSIN et al., 2001; SIFRI et al., 2002), fato que pode nortear a redução da penetração de nematoides em amostras contaminadas com bactérias pertencentes a gêneros de patógenos humanos.

Esta colonização de raízes por microrganismos pode modular a produção ou secreção de compostos quimiotáticos em torno das plantas, ou a rede de sinalização de hormônios vegetais para aumentar a resistência contra nematoides das galhas (DABABAT e SIKORA, 2007; VOS et al., 2013; SELIM et al., 2014; MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2017). Até onde se sabe, este tipo de estudo ainda não foi reportado para *Pratylenchus brachyurus*.

5. CONCLUSÃO

Os resultados indicam redução na penetração de *P. brachyurus* nas raízes pela aplicação dos produtos comercial e fermentado, porém não se pode afirmar se o que está causando este efeito é apenas a concentração de células, sendo que temos dentro deste tipo de fermentação não só a multiplicação de células de *Bacillus* como também a produção de metabólitos secundários, que pode atuar também na defesa das plantas na redução dos danos causados por *P. brachyurus*.

As amostras do produto fermentado não mantiveram a mesma abundância relativa encontrada nas amostras do produto comercial analisadas, enquanto a análise metataxonômica revelou a presença de espécies contaminantes em todas as amostras fermentadas. O perfil metabólico do produto comercial não é o mesmo obtido na amostra fermentada. O índice de quimiotaxia apresentou uma atividade de resposta aleatória para todos os tratamentos avaliados. O tempo de avaliação do experimento pode ter sido insuficiente para verificar diferença entre os tratamentos.

A recorrente presença de contaminantes nas amostras estudadas somadas a eventual capacidade de redução da penetração de nematoides pela comunidade bacteriana e/ou seus metabólitos, pede uma revisão nas métricas de controle de qualidade e sistemas de produção, para que a produção nas fazendas possa garantir estabilidade de controle e sustentabilidade no manejo do nematoide das lesões e redução dos danos.

Tendo em vista a recorrente presença de contaminante nas amostras estudadas mas a eventual capacidade de redução da penetração de nematoide pela comunidade bacteriana

predominante, seus metabólitos ou ambos, métricas de controle de qualidade e sistema de produção precisam ser revistas para que a produção do bioinsumo realizado pelos produtores possa garantir estabilidade de controle e sustentabilidade no manejo do nematoide das lesões e redução dos danos causados por estes fitonematoídeos à soja e às culturas plantadas na sequência no sistema de produção de grãos com culturas susceptíveis.

REFERÊNCIAS

- AKBARI, M., BAKHSHI, B., & PEERAYEH, S. N. Particular distribution of *Enterobacter cloacae* strains isolated from urinary tract infection within clonal complexes. **Iranian biomedical journal**, v. 20, n. 1, p. 49, 2016.
- ALLERBERGER, F., KOEUTH, T., LASS-FLÖRL, C., DIERICH, M. P., PUTENSEN, C., SCHMUTZHARD, E., ... & LUPSKI, J. R. Epidemiology of infections due to multiresistant *Enterobacter aerogenes* in a university hospital. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 517-521, 1996.
- ARAÚJO, F.F. et al. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.197-203, 2002.
- ARAÚJO, F.V. **Novas moléculas e produtos biológicos no manejo de fitonematoides em soja**. Trabalho apresentado no XXXV Congresso Brasileiro de Nematologia. Bento Gonçalves, RS. Embrapa Brasília, DF. 239. p. 2018.
- BARGMANN, C. I., HARTWIEG, E., & HORVITZ, H. R. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. **Cell**, v. 74, n. 3, p.515-527, 1993.
- BERNARDES, R.; BORGES, A.; LIMA, C.; MONTEIRO, E.; SILVA, W.; RIBEIRO, L. Management of the nematode *Pratylenchus brachyurus* in soybean culture using chemical and biological assets. **Documentos-Embrapa Soja**, n. 413, p. 136-138, 2019.
- BETTIOL, W. et al. Metodologia para controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Trichoderma*. Embrapa Meio Ambiente, Curso Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*, 52p., 2013. Acesso: 30 de mar, 2019. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2013/Trichoderma/ApostilaTrichoderma2013.pdf>.
- BETTIOL, W., MORANDI, M., PINTO, Z., e LUCON, C. Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica. 2022
- BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C.; ZANDRI, G.; MAGI, G.; GUAGLIANONE, E.; SUNDS-FJORD, A.; PRUZZO, C.; DONELLI, G.; FACINELLI, B. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3307-3319, 2007.
- BIRD A. F. The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. **Nematologica**, v. , p. 322–35, 1959.
- CAMPOS, A. C. F. B.; SOUZA, N. R.; SILVA, P. H. C. da; SANTANA, A. P. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 575-580, 2013.
- CAPORASO, J.G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F.D., COSTELLO, E.K., FIERER, N., PÊA, A.G., GOODRICH, J.K., GORDON, J.I., HUTTLEY, G.A., KELLEY, S.T., KNIGHTS, D., KOENIG, J.E., LEY, R.E., LOZUPONE, C.A.,

MCDONALD, D., MUEGGE, B.D., PIRRUNG, M., REEDER, J., SEVINSKY, J.R., TURNBAUGH, P.J., WALTERS, W.A., WIDMANN, J., YATSUNENKO, T., ZANEVELD, J., KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat. Methods** v. 7, p. 335–336, 2010.

CARBALLIDO-LÓPEZ, R.; FORMSTONE, A. Shape determination in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, p. 611–616. 2007.

CHOWDHURY, P. S., HARTMANN, A., GAO, X. and BORRIS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. **Frontiers in Microbiology**, v.780,p. 1-11, 2015.

COLLINS, D. P., & JACOBSEN, B. J. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. **Biological control**, v. 26, n. 2, p. 153-161, 2003.

CRUZ, T. T.; ASMUS, G. L.; GARCIA, R. A. Crotalaria species in succession to soybean for the management of *Pratylenchus brachyurus*. **Ciência Rural**, v.50, n. 7. Santa Maria, 2020.

DABABAT AA, SIKORA RA. Influence of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* 162 on *Meloidogyne incognita* attraction and invasion. **Nematology**, v. 9, p. 771–6, 2007.

DE CHAMPS, C. et al. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2887-2890, 1989.

DIAS-ARIEIRA, C.R., CECCATO, F. J., MARINELLI, E.Z., VECCHI, L. B., ARIEIRA, G. de O., Santana-Gomes, S. de M. Correlations between nematode numbers, chemical and physical soil properties, and soybean yield under different cropping systems. **Rhizosphere**, v. 19, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100386>

DIAS-ARIEIRA, C. R, de ARAUJO, F. G.; KANEKO, L.; SANTIAGO, D. C. Controle biológico de *Pratylenchus brachyurus* em lavouras de soja . **Journal of Phytopathology**, v. 166, p. 722 – 728, 2018.

DIEZ JA, DUSENBERY DB. Repellent of root-knot nematodes from exudate of host roots. **J Chem Ecol.** v. 15, p.2445–55, 1989.

DIAZ, P. A. E. *Bacillus* spp. como promotores de crescimento na cultura do algodão. 2018. 61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal/SP.

DOBLER, P. C. T.; LAUREANO, Á. M.; SARZI, D. S. et al. Differences in bacterial composition between men’s and women’s restrooms and other common areas within a public building. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 551–561, 2018.

EDGAR, R. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nat Methods** v. 10, p. 996–998, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -EMBRAPA. Quantificação e identificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Disponível

em:<http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf> Acesso em: 24 fev. 2021

FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, n. 6, p. 36–41, 2008.

FLORENCIO, C. et al. Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos visando uma agricultura mais sustentável. **Quim. Nova**, v 45, n. 9, p. 1133-1145, 2022.

FUNDAÇÃO MT (2019). Boletins de pesquisa. Disponível em: <https://www.fundacaomt.com.br/boletim-de-pesquisa>. Acesso: 10/09/2019.

GARSIN, D.A., SIFRI, C.D., MYLONAKIS, E., QIN, X., SINGH, K.V.; MURRAY, B.E. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America** v. 98, p.10892-10897, 2001.

GODOY, C. V.; UTIAMDA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C.B. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, Circular Técnica, 119, p. 6, 2016.

HALLEM EA, DILLMAN AR, HONG AV et al. . A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. **Curr Biol**. v. 21, p. 377–83, 2011.

HASHMI, I., PAUL, C., AL-DOUROBI, A., SANDOZ, F., DESCHAMPS, P., JUNIER, T., & BINDSCHEDLER, S. Comparison of the plant growth-promotion performance of a consortium of Bacilli inoculated as endospores or as vegetative cells. **FEMS microbiology ecology**, v. 95, n.11, 2019.

KAVITHA, J. et al. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* in sugarbeet. **Journal of Biological Control**, Coimbatore, v. 21, n.1, p. 211-215, 2007.

KEARNS, D. B., CHU, F., RUDNER, R. AND LOSICK, R. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for phase variation mechanism controlling surface motility. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 357-369, 2004.

KURZ, C. L.; EWBANK, J. J. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. **Trends Microbiol** v. 8, p. 142-144, 2000.

LANA, U. G. de P. et al. Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema "on farm". Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 21 p. il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 191)

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, 2010.

LEGGETT, M.J., MCDONNEL, L G., DENYER SP, SETLOW P, Maillard Jo-Y. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. **J Appl Microbiol** v. 13, p. 485–98, 2012.

LEMOS, L. N.; FULTHORPE, R. R.; TRIPLETT, E. W.; ROESCH, L. F. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **J Microbiol Methods**, v. 86, p. 42–51, 2011.

LISBÔA, M. P.; Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/7475/000545908.pdf?sequence=1&isAllowed=>.

LOPES, A. P. M.; CARDOSO, M. R.; PUERARI, H. H.; FERREIRA, J. C. A.; DIASARIEIRA, C. R. Manejo de *Pratylenchus brachyurus* em soja usando tratamento de sementes e indutor de resistência. **Nematropica**, v. 47, n. 1, p. 1-7, 2017.

MACHADO, A. C. Z.; AMARO, P. M.; SILVA, S. Two novel potential pathogens for soybean. **PLoS ONE** n. 14, v. 8, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221416>

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 31, 2015.

MARTÍNEZ-MEDINA A, FERNANDEZ I, LOK GB et al. . Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New Phytol.** v. 213, p. 1363–77, 2017.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, p. 77-88, 2005.

MUNIF, A., HALLMANN, J., & SIKORA, R. A. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* infection and tomato plant growth. **Journal ISSAAS**, v. 19, n. 2, p. 68-74, 2013.

OLIVEIRA, K. C. L. D.; MENESES, A. C. D.; SILVA, J. M.; TAVARES, R. L. C. Manejo biológico de *Pratylenchus brachyurus* na cultura da soja. **Caatinga**, v. 32, n. 1, p. 41-51, 2019.

OLIVEIRA, D. F., CAMPOS, V. P., AMARAL, D. R., NUNES, A. S., PANTALEÃO, J. A., & COSTA, D. A. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 477-479, 2007.

OLIVEIRA, L. E. S. Otimização do cultivo de *Bacillus* spp. em diferentes meios de cultura. Dissertação de mestrado. Departamento de Fitopatologia – UFLA. Lavras, MG. 2022
ONGENA, M; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiology**, v. 16, p. 115-125. 2008.

PADGHAM, J. L.; SIKORA, R. A. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop protection**, v. 26, n. 7, p. 971-977, 2007.

PAPADEMETRIOU MK, BONE LW. Chemotaxis of larval soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Race 3, to root leachates and ions. **J Chem Ecol.** 1983;9:387.

PETRAS, S. F., & CASIDA JR, L. E. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1496-1501, 1985.

PYLRO, V.S., MORAIS, D.K., DE OLIVEIRA, F.S., DOS SANTOS, F.G., LEMOS, L.N., OLIVEIRA, G., ROESCH, L.F.W.W., BMPOS: A flexible and user-friendly tool sets for microbiome studies. **Microb. Ecol.** v. 72, p. 443–447, 2016.

PYLRO, V.S., ROESCH, L.F.W., MORAIS, D.K., CLARK, I.M., HIRSCH, P.R., TÓTOLA, M.R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **J. Microbiol. Methods** v. 107, p. 30–37, 2014.

QIN, X., SINGH, K.V., WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* Genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infection Immunity**. v. 68, p. 2579-2586, 2000.

QUAST, C., PRUESSE, E., GERKEN, J., PEPLIES, J., YARZA, P., YILMAZ, P., SCHWEER, T., GLÖCKNER, F.O., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., PEPLIES, J., GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Res.** v. 41, p 590–596, 2013.

ROGNES, T., FLOURI, T., NICHOLS, B., QUINCE, C., MAHÉ, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ** v. 4, e2584, 2016

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV; 2001. p.279.

SIFRI, C.D., MYLONAKIS, E., SINGH, K.V., QIN, X., GARSIN, D.A., MURRAY, B.E., AUSUBEL, F.M.; CALDERWOOD, S. B. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorumsensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. **Infection Immunity**. v. 70, p. 5647–5650, 2002

SANTOS, A.; DINNAS, S.; FEITOZA, A. Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados on farm no vale do São Francisco: dados preliminares. **Enciclopédia biosfera**, v. 17, p. 429-443, 2020.

SELLA S.R., VANDENBERGHE, L.P., SOCCOL C.R. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. **Microbiological Research**, v. 169, n. 12, p. 931-9, 2014.

SELIM M. E, MAHDY M. E, SORIAL ME et al. . Biological and chemical dependent systemic resistance and their significance for the control of root-knot nematodes. **Nematology**, v. 16, p. 917–27, 2014.

SETLOW P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **Trends Microbiol**, v. 15, p. 72–80,2007.

SILVA, J.C.P., NUNES, T.C.S., GUIMARÃES, R.A. et al. Organic practices intensify the microbiome assembly and suppress root-knot nematodes. **Journal of Pest Science**, v. 95, p. 709–721, 2021.

SIKORA, R. A. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. **Annual review of phytopathology**, n. 30, p. 245-270, 1992.

VALICENTE, F.H.; LANA, U.G.P.; PEREIRA, A.C.P.; MARTINS, J.L.A.; TAVARES, A.N.G. Riscos à Produção de Biopesticida à Base de *Bacillus thuringiensis*. **Circ Técnica EMBRAPA Milho e Sorgo**. Sete Lagoas, 2018.

VOS C, SCHOUTEDEN N, TUINEN DV et al. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. **Soil Biol Biochem**. 2013;60:45–54.

WANG, H., WANG, Z., LIU, Z., WANG, K., & XU, W. (2021). Membrane disruption of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* induced by myriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01. **Microbial Biotechnology**, 14(2), 517-534.

YAN, L.; JING, T.; YUJUN, Y.; BIN, L.; HUI, L.; CHUN, L. Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an Antifungal Chitinase. **Biotechnology and Bioengineering**. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p.128-134. 2011.

YANG G, ZHOU B, ZHANG X et al. Effects of tomato root exudates on *Meloidogyne incognita*. **PLoS One**. n.11, 2016.

YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 138-145. 2011.

ZHENG, Z.; ZHENG, J.; ZHANG, Z.; PENG, D.; SUN, M. Nematicidal spore-forming *Bacilli* share similar virulence factors and mechanisms. **Scientific Reports**, v.6, 31341, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep31341>

APÊNDICE A

Tabela 1 - Identificação de todas as amostras usadas nas etapas de metataxonômica, quimiotaquia, HPLC e teste de penetração (Contínua).

Amostra	Descrição	Coleta
UFLA1	Meio de cultura Multibacter LL	Safra 2020/21
UFLA2	Meio de cultura MCM LL	Safra 2020/21
UFLA3	Meio de Fotossíntese LL	Safra 2020/21
UFLA4	Meio de cultura Agropaccelli LL	Safra 2020/21
UFLA5	<i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A22 on farm LL	2ª safra 2019/2020
UFLA6	<i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A51 on farm LL	2ª safra 2019/2020
UFLA7	<i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A149 on farm LL	Safra 2020/21
UFLA8	<i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A171 on farm LL	Safra 2020/21
UFLA9	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A2 on farm LL	2ª safra 2019/2020
UFLA10	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A19 on farm LL	2ª safra 2019/2020
UFLA11	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A173 on farm LL	Safra 2020/21
UFLA12	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A154 on farm LL	Safra 2020/21
UFLA13	Comercial <i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) LL	N.A
UFLA14	Comercial <i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> LL	N.A
UFLA15	Meio de cultura Multibacter LF	Safra 2020/21
UFLA16	Meio de cultura MCM LF	Safra 2020/21
UFLA17	Meio de Fotossíntese LF	Safra 2020/21
UFLA18	Meio de cultura Agropaccelli LF	Safra 2020/21
UFLA19	<i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A22 on farm LF	2ª safra 2019/2020
UFLA20	<i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A51 on farm LF	2ª safra 2019/2020
UFLA21	<i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) on farm LF	Safra 2020/21
UFLA22	<i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A171 on farm LF	Safra 2020/21
UFLA23	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A2 on farm LF	2ª safra 2019/2020
UFLA24	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A19 on farm LF	2ª safra 2019/2020
UFLA25	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A173 on farm LF	Safra 2020/21
UFLA26	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A154 on farm LF	Safra 2020/21
UFLA27	Comercial <i>Bacillus methylootropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) LF	N.A
UFLA28	Comercial <i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> LF	N.A
UFLA 29	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A2 on farm congelado	2ª safra 2019/2020

Tabela 1 - Identificação de todas as amostras usadas nas etapas de metataxonômica, quimiotaxia, HPLC e teste de penetração (Conclusão).

Amostra	Descrição	Coleta
UFLA 30	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A19 on farm congelado	2ª safra 2019/2020
UFLA 31	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A125/173 on farm congelado	Safra 2020/21
UFLA 32	<i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> A107/154 on farm congelado	Safra 2020/21
UFLA 33	Comercial <i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i>	N.A
UFLA34	Água autoclavada esterilizada	N.A
UFLA 35	Comercial <i>B. amyloliquefaciens simbi bs 10 cct 7600(Nemacontrol, Simbiose)</i> fermentado no Laboratório	N.A
UFLA 36	Comercial <i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand)	
UFLA 37	<i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A22 on farm congelado	2ª safra 2019/2020
UFLA 38	<i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A51 on farm congelado	2ª safra 2019/2020
UFLA 39	<i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A102/149 on farm congelado	Safra 2020/21
UFLA 40	<i>Bacillus methylotropicus</i> UFPEDA 20 (Onix, Lallemand) A123/171 on farm congelado	Safra 2020/21

Fonte: Do autor (2023).