



LÍVIA EMANUELLE SIMÃO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA COMERCIAIS PARA
PRODUÇÃO DE *Bacillus* spp: PRODUÇÃO DE CÉLULAS E
PENETRAÇÃO DE *Pratylenchus brachyurus* EM RAÍZES DE SOJA**

LAVRAS-MG

2025

LÍVIA EMANUELLE SIMÃO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA COMERCIAIS PARA PRODUÇÃO DE
Bacillus spp: PRODUÇÃO DE CÉLULAS E PENETRAÇÃO DE *Pratylenchus brachyurus*
EM RAÍZES DE SOJA**

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

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

Dra. Rafaela Araújo Guimarães
Coorientadora

LAVRAS-MG

2025

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

Emanuelle Simão de Oliveira, Lívia.

Avaliação de meios de cultura comerciais para produção de bacillus spp: produção de células e penetração de pratylenchus brachyurus em raízes de soja / Lívia Emanuelle Simão de Oliveira. - 2022.

46 p. : il.

Orientador: Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

Coorientadora: Rafaela Araújo Guimarães

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Cultivo de bacillus spp. 2. Controle de pratylenchus brachyurus. 3. Controle biológico. I. Henrique Vasconcelos de Medeiros, Flávio . II. Araújo Guimarães , Rafaela. III. Universidade Federal de Lavras. IV. Título.

LÍVIA EMANUELLE SIMÃO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA COMERCIAIS PARA PRODUÇÃO DE *Bacillus* spp: PRODUÇÃO DE CÉLULAS E PENETRAÇÃO DE *Pratylenchus brachyurus* EM RAÍZES DE SOJA

EVALUATION OF COMMERCIAL CULTURE MEDIA FOR *Bacillus* spp: Production: CELL YIELD AND PENETRATION OF *Pratylenchus brachyurus* IN SOYBEAN ROOTS

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

APROVADA em 30 de maio de 2022.

Dr. Wagner Bettiol, EMBRAPA.

Dr. Bernardo, de Almeida Halfeld Vieira, EMBRAPA.

Dra. Rosângela Aparecida Silva, Fundação Mato Grosso.

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

Dra. Rafaela Araújo Guimarães
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2025**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, pelo grande exemplo, apoio e por todo o esforço e dedicação para com nossa família.

Ao meu marido por todo apoio e companheirismo.

Aos meus filhos, que me apoiaram e foram meu maior incentivo.

Ao professor Flávio Medeiros, pelos valiosos ensinamentos, dedicação e confiança ao longo dos anos de orientação.

À equipe do Laboratório Controle Biológico, pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

Aos queridos amigos, cuja companhia tornou ainda mais especial minha jornada na Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia na UFLA.

Muito obrigada!

RESUMO

O controle biológico tem papel importante na proteção de raízes reduzindo a penetração e danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em soja. As boas práticas de multiplicação de organismos biológicos utilizados no manejo contra doenças em plantas proporcionam aumento na produção de células e maior efetividade contra patógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de cultivo para *Bacillus* spp. na produção de células e penetração de *Pratylenchus brachyurus* em raízes de soja. Inicialmente produtos registrados contendo *Bacillus* spp. foram multiplicados sob condições controladas e avaliados no controle de *P. brachyurus* em soja. Em seguida, o produto selecionado *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 foi multiplicado nos meios de cultura comerciais: Agropacelli; Multibacter e MCM+Micronutrientes. Para o estudo das variáveis temperatura(°C) e pH nos diferentes meios de cultura, os efeitos foram estudados através da técnica Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Uma matriz com 11 ensaios, oito tratamentos e três pontos centrais para cada meio de cultura foi utilizada. Foram investigados os níveis de temperatura (24,7; 26; 29; 32 e 33,3°C) e pH (5,8; 6; 6,6; 7,2 e 7,4). Para os meios de cultura comerciais as estimativas de todas as variáveis respostas: bactérias totais; bactérias endosporogênicas; peso da parte aérea verde; peso da parte aérea seca; peso da raiz; e número de *P. brachyurus* penetrado por grama de raiz, correlacionadas aos modelos lineares e quadráticos e as análises separadas dos efeitos de cada variável foram realizadas aos tratamentos e nenhuma destas combinações apresentaram significância ($p < 0,10$), exceto em DCCR do meio de cultura Agropacelli para a variável peso seco da parte aérea. Os níveis de temperatura e pH estudados nos meios de cultura comerciais para o cultivo de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 são eficientes na multiplicação sob condições controladas em laboratório. O *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 produzido nos diferentes meios de cultura reduziu a penetração de *P. brachyurus* em comparação ao controle negativo.

Palavras-chave: Cultivo de *Bacillus* spp.; Controle de *Pratylenchus brachyurus*; Controle biológico.

ABSTRACT

Biological control plays an important role in protecting roots by reducing penetration and damage caused by *Pratylenchus brachyurus* in soybean. Good practices for the multiplication of biological organisms used in the management of plant diseases provide an increase in cell production and greater effectiveness against pathogens. The objective of this work was to evaluate the cultivation conditions for *Bacillus* spp. on cell production and penetration of *Pratylenchus brachyurus* into soybean roots. Initially registered products containing *Bacillus* spp. were multiplied under controlled conditions and evaluated in the control of *P. brachyurus* in soybean. Then, the selected product *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 was multiplied in commercial culture media: Agropacelli; Multibacter and MCM+Micronutrients. To study the variables temperature (°C) and pH in different culture media, the effects were studied using the Central Composite Rotational Design (CCRD) technique. A matrix with 11 assays, eight treatments and three central points for each culture medium was used. Temperature levels (24.7; 26; 29; 32 and 33.3°C) and pH (5.8; 6; 6.6; 7.2 and 7.4) were investigated. For commercial culture media, estimates of all response variables: total bacteria; endosporegenic bacteria; green shoot weight; dry shoot weight; root weight; and number of *P. brachyurus* penetrated per gram of root, correlated to linear and quadratic models and separate analyzes of the effects of each variable were performed on the treatments and none of these combinations showed significance ($p < 0.10$), except in CCRD of the medium of Agropacelli culture for the variable dry weight of the aerial part. The temperature and pH levels studied in commercial culture media for the cultivation of *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 are efficient in multiplication under controlled laboratory conditions. *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 produced in different culture media reduced the penetration of *P. brachyurus* compared to the negative control.

Keywords: Cultivation of *Bacillus* spp.; Control of *Pratylenchus brachyurus*; Biological control.

INDICADORES DE IMPACTO

O trabalho teve como objetivo avaliar a multiplicação de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 em meios de cultura comerciais (Multibacter, Agropaceli e MCM+Micronutrientes) e seu efeito na redução da penetração do nematoide *Pratylenchus brachyurus* em raízes de soja, sob condições laboratoriais. Todos os meios foram eficientes, com destaque para o Agropaceli, que aumentou significativamente o peso seco da parte aérea das plantas. Observou-se redução expressiva na penetração do nematoide nas raízes tratadas com os produtos fermentados, o que representa um avanço tecnológico no controle biológico. Este resultado é particularmente relevante para o estado do Mato Grosso, onde o patógeno está presente em até 94% das amostras e pode causar perdas de até 50% na produção de soja. A pesquisa contou com cerca de 10 participantes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre docentes, estudantes e técnicos. O estudo tem caráter extensionista, ao propor soluções práticas e sustentáveis para agricultores e técnicos, promovendo o uso de biotecnologia no manejo fitossanitário. Os impactos se concentram nas áreas de Meio Ambiente, Tecnologia e Produção, e Trabalho, conforme a Política Nacional de Extensão, e estão alinhados aos ODS 2, 8, 12 e 15 da ONU, ao incentivar práticas agrícolas mais eficientes, seguras e sustentáveis. Os resultados obtidos têm aplicação direta na produção agrícola e potencial de replicação em outras regiões produtoras do Brasil.

IMPACT INDICATORS

This study aimed to evaluate the multiplication of *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 in commercial media (Multibacter, Agropaceli, and MCM+Micronutrients) and its effect on reducing *Pratylenchus brachyurus* penetration in soybean roots under laboratory conditions. All media proved effective, with Agropaceli significantly increasing plant dry weight. A marked reduction in nematode penetration was observed in roots treated with fermented products, indicating a technological advance in biological control. This is particularly relevant in Mato Grosso, where the pathogen affects up to 94% of sampled areas, with productivity losses reaching 50%. The study involved about 10 participants from the Federal University of Lavras (UFLA), including faculty, students, and technicians. The research has an extensionist focus, offering practical and sustainable solutions for farmers and technicians through accessible biotechnology for crop protection. The impacts are within the thematic areas of Environment, Technology and Production, and Labor, and align with SDGs 2, 8, 12, and 15, by supporting more efficient, safe, and sustainable farming practices. The results are directly applicable to agriculture and can be replicated in other soybean-producing regions of Brazil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
REFERÊNCIAS	13
PRIMEIRA PARTE - SELEÇÃO DO PRODUTO COMERCIAL (<i>Bacillus</i> spp.) COM MAIOR EFICIÊNCIA PARA O CONTROLE DE <i>Pratylenchus brachyurus</i> EM RAÍZES DE SOJA	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Seleção dos inóculos (<i>Bacillus</i> spp.) para fermentação em laboratório.....	15
2.2 Multiplicação dos produtos biológicos comerciais selecionados em laboratório sob condições controladas.....	17
2.3 Método de quantificação de bactérias totais e endosporogênicas.....	18
2.4 Teste de eficiência de controle de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	18
3. RESULTADOS	19
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS	25
ANEXO I	26
SEGUNDA PARTE - Estudo das variáveis temperatura (°C) e pH na multiplicação líquida do produto biológico comercial (<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 764) em meios de cultura comerciais	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Seleção de variáveis para a multiplicação líquida do produto semente.....	27
2.2 Método de quantificação de bactérias totais e endosporogênicas.....	29
2.3 Teste de eficiência de controle de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	29
3. RESULTADOS	30
3.1 Análises do DCCR (delineamento composto central rotacional).....	30
3.2 Comparação da eficiência de <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 764 multiplicado nos diferentes meios de cultura comerciais.....	41
4.DISCUSSÃO	42
5.CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Conab (2022) houve incremento de 1,8 milhão de hectares de soja plantada no Brasil e no estado do Mato Grosso o aumento foi de 6,3%, na safra 21/22 em comparação à 20/21. Os avanços em extensão da área plantada para novas regiões somados aos cultivos sucessivos, ampla janela de plantio e mudanças climáticas podem intensificar o aparecimento de doenças que incidem na cultura. Dentre os fatores determinantes ao crescimento e desenvolvimento da soja destaca-se os problemas de emergência e estabelecimento das plântulas como dificuldades enfrentadas no Brasil. Os nematoides causadores de doenças radiculares compõem um dos grupos de patógenos que prejudicam a cultura da soja.

Nematoides parasitas de plantas são organismos altamente especializados que habitam preferencialmente a rizosfera e são responsáveis por perdas econômicas expressivas na agricultura mundial (WEN-KUN et al., 2016). Dentre os nematoides estudados de maior impacto econômico destacam-se os endoparasitas sedentários e migradores: *Pratylenchus* spp. (JONES; FOSU-NYARKO, 2014; VIEIRA et al., 2015), seu ataque tem sido relatado em muitas espécies de plantas cultivadas (MACHADO et al., 2012), especialmente na cultura da soja (DIAS et al., 2010). Em levantamento realizado no estado do Mato Grosso por Silva et al. (2004), foi verificado a presença de *Pratylenchus brachyurus* (nematóide das lesões radiculares), em 94% das amostras coletadas em 18 municípios. O dano do *P. brachyurus* na soja ocasiona nanismo, amarelecimento e perda de rendimento que pode chegar a 50%, a depender da densidade populacional do nematóide e do tipo de solo (DIAS et al., 2010). A penetração deste patógeno pode ocorrer por meio da ação mecânica ou enzimática (inter e intracelular) através das células do córtex, as lesões provocadas podem ocasionar rompimento superficial e destruição do sistema radicular.

O manejo do *Pratylenchus brachyurus* é complexo em função do seu hábito migrador, polífago e endoparasita (GOULART, 2008) e seu controle envolve o manejo integrado com rotação e/ou sucessão de culturas, em combinação com métodos de controle químico ou biológico (FAVORETO et al., 2019). As práticas estão associadas a diminuir os danos e procuram interromper a dispersão do nematóide as áreas de cultivo, segundo Freitas et al. (2001). O controle biológico demonstra-se como método importante no manejo contra nematoides, de acordo com Vaz (2011), bactérias e fungos são descritos como os principais agentes de controle biológico (ACB) e a indústria disponibiliza vários destes ABC eficientes na redução dos danos causados por nematoides (BARBOSA et al., 2019). Sahebani e Hadavi (2008), sugerem que os mecanismos prováveis na aplicação de microrganismos para controle

de nematoides causadores de doenças radiculares, estão ligados à produção de enzimas extracelulares que promovem o biocontrole ou, até mesmo, a indução de resistência direta na cultura por acelerar a produção de metabólitos secundários. Além disto, populações de microrganismos benéficos associados ao sistema radicular das plantas com alto teor de matéria orgânica favorecem a decomposição dos restos vegetais e a ciclagem de nutrientes (OLIVEIRA et al., 2019) e isto beneficia também a supressividade do solo. O manejo do solo, a forma de introdução e as práticas culturais para o estabelecimento dos ACB no campo são peças fundamentais para a eficiência do controle biológico. De acordo com Lopes et al. (2008), o equilíbrio do solo é importante para controlar as populações de nematoides através de mecanismos de competição, parasitismo e produção de compostos tóxicos.

Bactérias utilizadas no controle biológico do gênero *Bacillus* destacam-se devido a sua atividade biológica contra diversos microrganismos responsáveis por doenças em plantas. A espécie *Bacillus subtilis* já é usada há mais de 50 anos no biocontrole de diversas doenças (YAN et al., 2011). Os mecanismos de ação dos *Bacillus* spp. são diversos, podendo auxiliar no aumento de absorção de nutrientes, indução de resistência, antibiose, competição e a promoção de crescimento (BETTIOL et al., 2012). Compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus*, como: lipopeptídeos cíclicos, podem ser classificados de acordo com as seguintes famílias químicas: surfactinas, iturinas e fengicinas (PÉRES-GARCIA et al., 2011). Atualmente, diversos produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* estão disponíveis no mercado. Seu modo de ação em nematoides envolvem a produção de metabólitos tóxicos que afetam negativamente os ovos de nematoides e juvenis de segundo estágio (J2), alteração da comunidade microbiana da rizosfera, competição por sítios de penetração, colonização do rizoplano e indução de defesa da planta contra nematoides (ZHENG et al., 2016).

O gênero *Bacillus* é composto de bactérias Gram positivas, integrantes do filo Firmicutes, apresentam aspecto de bastonete, formam endósporos, e podem se encontrar de forma isolada, em pares ou agrupadas em filamentos, a maioria é aeróbia, podem ser imóveis ou se movimentar por flagelos peritríquios (LOGAN, 2009). Este gênero, encontra-se praticamente em todos os ambientes, crescem em temperatura que variam entre 25° e 37° C, apesar de algumas espécies se desenvolverem em faixas de temperatura muito altas ou muito baixas. Em relação ao pH, este gênero suporta também valores extremos, determinadas espécies podem crescer entre pH 2 a 10. A grande heterogeneidade de ambientes e condições de crescimento constituem a variedade de nichos ecológicos que as espécies de *Bacillus* são capazes de ocupar e os diferentes substratos que podem ser utilizados no seu crescimento. (LOGAN, 2009; ROONEY et al., 2009).

A obtenção de bactérias destinadas ao controle biológico de doenças de plantas é efetuada através da fermentação onde se deseja obter grande número de células com características uniformes, que crescem sob condições definidas e controladas. A otimização do cultivo de micro-organismos demonstra ser uma ferramenta prática e preciosa para a indústria e processos fermentativos na fazenda, pois melhora o rendimento do produto. Em *Bacillus* condições de crescimento com limitações de nutrientes resultam na iniciação de diferentes estratégias de adaptação bacteriana, entre elas a esporulação (BURKHOLDER; GROSSMAN, 2014; PEREGO; HOCH, 2014). E a produção de metabólitos nas fases do crescimento microbiano dependem principalmente da cepa, da composição do meio de cultura e das condições de cultivo.

O aperfeiçoamento do cultivo de *Bacillus* pode ser realizado através da otimização estatística que permite investigar determinadas variáveis significativas em um grande planejamento experimental (SAAVEDRA et al., 2021). Segundo Rodrigues e Iemma (2014), as variáveis que obtêm maiores influências no processo são selecionadas para estudos, podendo então ser empregada a técnica conhecida por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que explora todo o espaço experimental. Esta técnica possibilita a avaliação dos efeitos de cada variável individualmente e de suas interações sobre uma dada resposta.

Com isso, estudos relacionados a avaliação de meios de cultura comerciais utilizados por produtores para a multiplicação de *Bacillus* spp. na fazenda são de grande importância. Assim, este trabalho objetivou avaliar as variáveis temperatura e pH no cultivo de *Bacillus* spp. em diferentes meios de cultura comerciais, tendo sido verificado a produção de células e a penetração de *Pratylenchus brachyurus* em raízes de soja.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, R.T.; T.S.A. MONTEIRO, R.R.; COUTINHO, J.G.; SILVA, L.G. FREITAS. *Pochonia chlamydosporia* no controle do nematoide de galhas em bananeira. **Nematropica** 49:99-106, 2019.
- BETTIOL, W. *et al.* Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, Documentos 88, p.155, 2012.
- BURKHOLDER WF, GROSSMAN AD. Regulation of the initiation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Brun YV, Shimkets LJ (eds) **Prokaryotic Development**. ASM Press, Washington, DC, USA 151–166, 2014
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/> Acesso em jun de 2022.
- DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. D. S. Nematoides em soja: identificação e controle. **Embrapa Soja. Circular Técnica 76**, 2010.
- FAVORETO, L.; MEYER, M.C.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; MACHADO, A.C.Z.; SANTIAGO, D.C.; RIBEIRO, N.R. Diagnose e manejo de fitonematoides na cultura da soja. **Informe Agropecuário**, v.40, p.18-29, 2019.
- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. **Introdução a Nematologia**. Viçosa: Editora UFV, 84p. 2001.
- GOULART, A. M. C., Aspectos gerais sobre nematoides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*). **Embrapa Cerrados/documentos** 30p., ISSN 1517-5111), 2008.
- JONES, M. G. K.; FOSU-NYARKO J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. **Annals of applied biology**, v. 164(2): 163-181, 2014.
- LOGAN, N. A.; de VOS, P. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 174AL. Vol3. **The firmicutes 2nd Edition**. 2009.
- LOPES, E. A., FERRAZ, S., FERREIRA, P. A., FREITAS, L. G.; GARDIANO, C.G., DHINGRA, O. D. & DALLAMOLE-GIARRETA, R. Efeito da incorporação da parte aérea de quatro espécies vegetais sobre *Meloidogyne javanica*. **Nemat. Bras.** 32:76-80. 2008.
- MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. D. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E. D.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis**, v. 16(2): 165-182, 2012.
- OLIVEIRA, K.C.L.; D.V. ARAÚJO, A.C.; MENESES, J.M.; SILVA, R.L.C. Biological management of *Pratylenchus brachyurus* in soybean crops. **Revista Caatinga**. 32(1): 41-51. 2019.

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.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187–193. 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: Cárita, 2014.

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** 59, p. 2429–2436. 2009.

SAHEBANI, N. AND HADAVI, N. (2008) Biological control of the root knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, 40, 2016–2020.

SILVA, L. H. C. P., J. R. CAMPOS, M. R. DUTRA, E V. P. CAMPOS. Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações do acibenzolar-s-metil. **Nematologia Brasileira** 28:199-206. 2004.

VAZ, M.V.; CANEDO, E.J.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S.; LOPES, E.A.; Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Revista do núcleo interdisciplinar de pesquisa e extensão**. Patos de Minas, UNIPAM, n.8, vol. 1, p. 203-212, jul.2011.

VIEIRA, P.; EVES-VAN D. A., S.; VERMA, R.; WANTOCH, S.; EISENBACK, J. D.; KAMO, K. The *Pratylenchus penetrans* transcriptome as a source for the development of alternative control strategies: Mining for putative genes involved in parasitism and evaluation of in planta RNAi. **Plos One**, v. 10(12):146-151, 2015.

WEN-KUN, H.; JIANG-KUAN, C.; SHI-MING, L.; LING-AN, K.; QING-SONG, W.; HUAN, P.; WEN-TING, H.; JIAN-HUA. S.; DE-LIANG, P. Testing various biocontrol agents against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber plants identifies a combination of *Syncephalastrum racemosum* and *Paecilomyces lilacinus* as being most effective, **Biological Control**, Volume 92, 2016, p.31-37.

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.

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.

PRIMEIRA PARTE

SELEÇÃO DO PRODUTO COMERCIAL (*Bacillus* spp.) COM MAIOR EFICIÊNCIA PARA O CONTROLE DE *Pratylenchus brachyurus* EM RAÍZES DE SOJA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos inóculos (*Bacillus* spp.) para fermentação em laboratório

A seleção dos inóculos para fermentação utilizados neste trabalho foi realizada no Laboratório de Controle Biológico de Doenças em Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (MG) em parceria com a produtores de soja do Mato Grosso. Os agricultores realizaram o processo da multiplicação de *Bacillus* spp. nas propriedades rurais para controle do *Pratylenchus brachyurus* em lavouras de soja na safra 20/21. Em outubro de 2020, nos municípios de Campo Verde, Cláudia, Gaúcha do Norte, Ipiranga, Ipiranga do Norte, Itanhanguá, Itiquira, Jaciara, Marcelândia, Nova Canaã do Norte, Nova Maringá, Nova Mutum, Nova Ubiratan, Nova Xavantina, Querência, Rondonópolis, Sapezal, Sorriso, Trivelato, União do Sul e Vera do estado do Mato Grosso, foram coletadas nos produtores: cento e oitenta e duas (182) amostras de trinta e oito (38) diferentes produtos biológicos comerciais (*Bacillus* spp.) e cento e oitenta e duas (182) amostras provenientes das fermentações realizadas pelos produtores dos mesmos produtos biológicos comerciais coletados.

Figura 1. Esquemática da coleta: produto biológico comercial e produto fermentado na multiplicação *on farm*.



Fonte: o autor

*Produto semente = produto biológico comercial (*Bacillus* spp.)

Concomitantemente, coletaram-se dados junto aos produtores através de um questionário que conteve informações referentes às condições de cultivo do produto biológico comercial; produto fermentado; tempo de armazenamento do produto fermentado; meio de cultura e equipamentos utilizados. De acordo, com as respostas obtidas no questionário realizou-se um estudo sobre a adesão dos produtores aos produtos biológicos e meios de cultura, ambos comerciais. Para a coleta, a solução proveniente da fermentação foi agitada por cinco minutos no recipiente de armazenamento e coletada de maneira asséptica, com luvas de látex descartáveis. Foram retiradas 2 alíquotas de 50mL do produto comercial e produto fermentado por batelada, as quais foram acondicionadas em frascos plásticos com capacidade de 100mL previamente esterilizados e identificados. As amostras foram acomodadas em caixas térmicas com gelo para preservação dos organismos e encaminhadas ao laboratório (já referenciado) para avaliação. Em uma das alíquotas de cada amostra, realizou-se o método de diluição seriada para quantificação de bactérias totais e endosporogênicas (item 2.3). Os produtos biológicos comerciais e os meios de cultura que obtiveram maiores concentrações de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de bactérias endosporogênicas (BE) e também nas concentrações de UFC/mL de BE no produto fermentado próximo aos de seus respectivos produtos biológicos comerciais, sugerindo padrão de resposta da multiplicação, foram selecionados.

De acordo com a sumarização dos dados de bactérias totais (BT) e bactérias endosporogênicas (BE) das amostras dos produtos biológicos (*Bacillus* spp.) selecionados, observou-se as médias nas fermentações feitas pelos produtores na fazenda: Biobac[®]: $1,91 \times 10^8$ UFC/mL BT e $1,31 \times 10^6$ UFC/mL BE; Fermentado de Biobac[®]: $1,10 \times 10^8$ UFC/mL BT e $1,17 \times 10^5$ UFC/mL BE; Onix[®]: $7,24 \times 10^8$ UFC/mL BT e $5,69 \times 10^6$ UFC/mL BE; Fermentado de Onix[®]: $1,41 \times 10^8$ UFC/mL BT e $1,46 \times 10^6$ UFC/mL BE; Rizos[®]: $5,04 \times 10^9$ UFC/mL BT e $5,07 \times 10^7$ UFC/mL BE e Fermentado de Rizos[®]: $1,35 \times 10^9$ UFC/mL BT e $6,76 \times 10^7$ UFC/mL BE. O produto Bioimune[®] foi somado aos testes, pelo fato de os produtores de soja realizarem sua multiplicação na fazenda para utilizar em vários alvos patogênicos da cultura, incluindo *Pratylenchus brachyurus*. Contudo, amostras do produto comercial e dos seus produtos fermentados não foram coletadas, pois Bioimune[®] não possui registro para controle de nematoides no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA).

Tabela 1. Identificação dos produtos biológicos comerciais.

Produtos	Ingrediente ativo	Lote	Fabricante	Classe¹
Onix[®]	<i>Bacillus methylotrophicus</i> UFPEDA20	012/20/8678	Lallemand, (Patos de Minas-MG)	Nematicida microbiológico
Rizos[®]	<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 764	006/20/8800	Lallemand, (Patos de Minas-MG)	Nematicida microbiológico
Bioimune[®]	<i>Bacillus subtilis</i> BV02	005-21- 3.700	Grupo Vittia, (São Joaquim da Barra-SP)	Fungicida e bactericida microbiológico
Biobac[®]	<i>Bacillus subtilis</i> Y1336	001-20- 15200	UPL do Brasil, (Salto do Pirapora-SP)	Fungicida, bactericida e nematicida microbiológico

* Classe de registro do produto no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento – MAPA.

2.2 Multiplicação dos produtos biológicos comerciais selecionados em laboratório sob condições controladas.

No Laboratório de Controle Biológico de Doenças em Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (MG), foi realizado a multiplicação dos produtos biológicos comerciais selecionados (Tabela 1) para obtenção dos seus produtos fermentados sob condições controladas. Para tal, utilizou-se frascos de Erlenmeyer tampados com algodão e papel alumínio, com capacidade 250mL, previamente identificados, esterilizados e contendo 90mL de meio de cultura padrão (5g de peptona bacteriológica, 3g de extrato de carne; 1000mL de água destilada e pH = 6,8). Foi formulado uma suspensão do inóculo ou produto biológico comercial, na concentração de 1×10^8 UFC/mL bactérias endosporôgenicas de cada produto e pipetou-se 10mL das suspensões nos frascos contendo 90mL do meio de cultura (1:10). Sendo assim, a taxa inicial da concentração do inóculo no meio de cultura foi de 0,10, esses foram mantidos em mesa de agitação orbital (TECNAL) a 200rpm e 28°C por 48h. Após transcorridos as 48h de cultivo dos produtos comerciais (*Bacillus* spp.) foi realizado a contagem de células bacterianas e endosporogênicas nas amostras das fermentações através do métodos de quantificação (ROMEIRO, 2007), item 2.3.

Para avaliar a penetração de *Pratylenchus brachyurus* em raízes de soja, foi realizado o teste de eficiência de controle de *P. brachyurus* (item 2.4) com os produtos biológicos comerciais Onix[®]; Rizos[®]; Bioimune[®] e Biobac[®] e seus respectivos produtos fermentados em laboratório sob condições controladas OT1 (fermentado de Onix[®]); RT2 (fermentado de Rizos[®]); BIOT3 (fermentado de Bioimune[®]) e BACT4 (fermentado de Biobac[®]).

2.3 Método de quantificação de bactérias totais e endosporogênicas

A técnica de plaqueamento e contagem de colônias (UFC) em microgotas consistiu na diluição seriada (10^{-2} até 10^{-8}) em solução tamponada ou peptonada e no plaqueamento de 0,1 µl de cada diluição em meio de cultura ágar nutriente (ROMEIRO, 2007). Para a quantificação de células endosporogênicas, o mesmo processo de diluição seriada foi feito, porém as amostras ficaram por 12 minutos em banho-maria á 80°C para eliminação de células vegetativas. Após a gota secar, a placa foi mantida em estufa com temperatura de 28°C para crescimento das colônias. Posteriormente (24 h), realizou-se a contagem de 3 a 30 colônias em cada microgota e se estimou a concentração de bactérias. Foram plaqueadas quatro microgotas de cada amostra, isto totalizou quatro repetições.

2.4 Teste de eficiência de controle de *Pratylenchus brachyurus*

Efetuuou-se, previamente o teste de germinação e vigor conforme prescrições da Regra para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009) nas sementes de soja da variedade 75174RSF/IPRO Dom Mario. As sementes de soja foram colocadas em profundidade aproximada de 1,5 cm em tubos falcon com 55mL de areia autoclavada e logo após, tratadas com os produtos fermentados e os produtos comerciais (20 µl de cada produto e 140 µl de água esterilizada). Esta pesquisa foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado (DIC), cada parcela conteve uma planta e foram utilizadas seis parcelas por tratamento. Para os produtos comerciais se utilizou solução estoque a 1×10^8 UFC/mL para ajustar a concentração dos produtos utilizados neste teste.

Os produtos comerciais e os seus respectivos produtos fermentados foram aplicados diretamente no substrato, simulando a aplicação no sulco de plantio. O controle negativo consistiu na aplicação de água autoclavada. Após aplicação dos tratamentos, as plantas foram mantidas a $\pm 28^\circ\text{C}$ com irrigação de maneira a manter a capacidade de campo.

O patógeno foi inoculado dez dias após a montagem do teste. A extração da população pura de *P. brachyurus* foi baseado na metodologia de Coolen e D'Herde (1972). A suspensão foi ajustada para a concentração de 200 espécimes de *P. brachyurus* para cada 1,5mL. As espécimes do nematoide foram distribuídas em dois orifícios de aproximadamente 2cm de profundidade, próximos ao caule de cada planta, utilizando pipeta automática.

A avaliação e o processo de coloração do *P. brachyurus* nas amostras ocorreu 14 dias após a inoculação, baseado na metodologia de Byrd et al. (1983) com adaptações. A contagem

do número de *Pratylenchus brachyurus* penetrado por planta foi efetuada com auxílio de uma lupa microscópio estereoscópio.



Figura 2. Avaliação da penetração do *P. brachyurus* 14 dias após a inoculação.

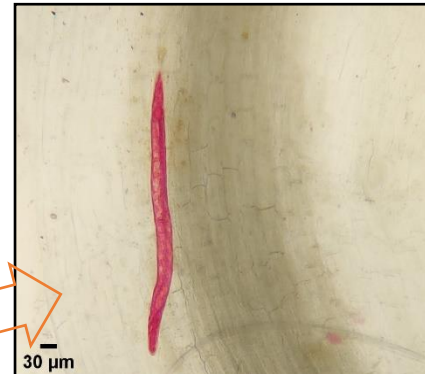
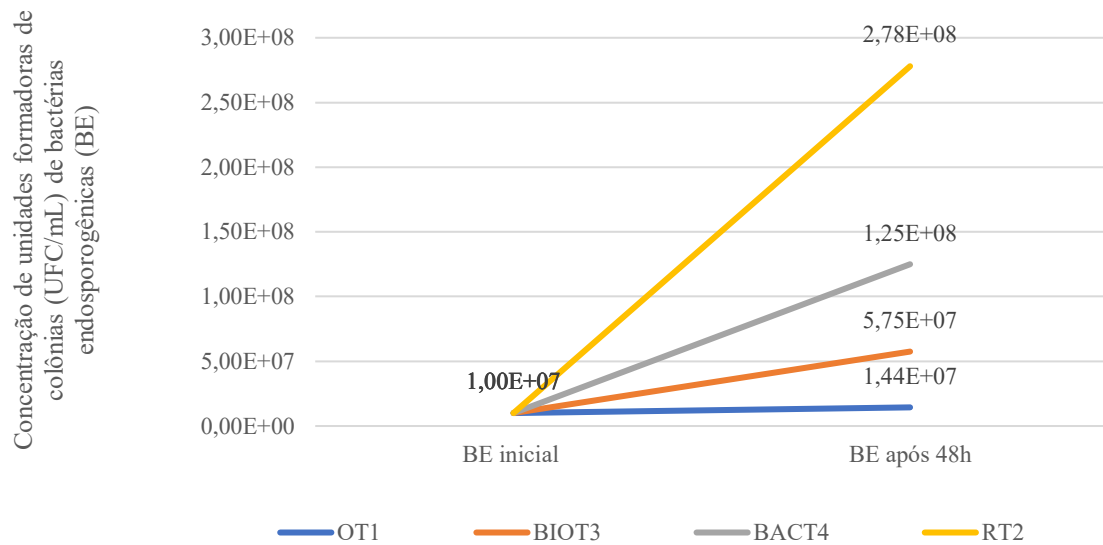


Figura 3. Espécimes de *P. brachyurus* (J2/J3) pelo método de coloração baseado em Byrd et al. (1983) no córtex do sistema radicular de plantas de soja, visualizada no microscópio óptico 100X.

3. RESULTADOS

A concentração inicial de 1×10^7 UFC/mL bactérias endosporogênicas no meio de cultura padrão representou o ponto de partida da multiplicação de todos os produtos comerciais contendo *Bacillus* sob condições controladas em laboratório. Foi observado os resultados das análises de quantificação de bactérias totais e endosporogênicas das fermentações ao final das 48h. E o produto fermentado de *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA20 (OT1) obteve $2,08 \times 10^9$ UFC/mL de bactérias totais (BT) e $1,44 \times 10^7$ UFC/mL de bactérias endosporogênicas (BE). Em *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (RT2), constatou-se $4,94 \times 10^9$ UFC/mL BT e $2,78 \times 10^8$ UFC/mL BE. No produto fermentado de *Bacillus subtilis* Y1336 (BACT4) a concentração de $7,91 \times 10^8$ UFC/mL BT e $1,25 \times 10^8$ UFC/mL BE foi observada ao final das 48h. E por fim, foi constatado em *Bacillus subtilis* BV02 (BIOT3) a concentração de $3,63 \times 10^8$ UFC/mL BT e $5,75 \times 10^7$ UFC/mL BE às 48h de cultivo.

Figura 4. Concentração de bactérias endosporogênicas (BE) ao final das 48h de fermentação dos produtos biológicos comerciais em laboratório.



OT1 – Fermentado de *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA20 (Onix®); RT2 - Fermentado de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (Rizos®); BACT4 - Fermentado de *Bacillus subtilis* Y1336 (Biobac®) e BIOT3 - Fermentado de *Bacillus subtilis* BV02 (Bioimune®).

Segundo a concentração inicial de 1×10^7 UFC/mL de bactérias endosporogênicas (BE) do inóculo (produtos biológicos comerciais) em todas as fermentações sob condições controladas. Foi constatado no fermentado de *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA20 (OT1) o resultado da concentração BE ($1,44 \times 10^7$ UFC/mL) após as 48h muito próximo ao inóculo inicial utilizado (1×10^7 UFC/mL BE). Para o fermentado de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (RT2) houve acréscimo de 26,8% na concentração de BE ($2,78 \times 10^8$ UFC/mL) no final do cultivo em comparação com o inicial. Em fermentado de *Bacillus subtilis* Y1336 (BACT4), verificou-se a multiplicação de bactérias endosporogênicas ($1,25 \times 10^8$ UFC/mL BE) com aumento de 11,5% da concentração inicial. E no fermentado *Bacillus subtilis* BV02 (BIOT3) o resultado final encontrado após 48h da fermentação demonstrou pequeno acréscimo de 4% em BE ($5,75 \times 10^7$ UFC/mL) quando comparado a concentração do inóculo no início.

A porcentagem de germinação (G): calculada pela fórmula $G = (N/A) \times 100$, em que: N = número de sementes germinadas (159); A = número de sementes na amostra ($A = 200$) $\times 100$ foi de $G = 79,5\%$. Foram realizadas análises estatísticas ao teste de eficiência de controle do *P. brachyurus* em plantas de soja para cada tratamento utilizando o produto comercial Onix® (*Bacillus methylotrophicus* UFPEDA20); Rizos® (*Bacillus subtilis* UFPEDA 764); Bioimune®

(*Bacillus subtilis* BV02) e Biobac[®] (*Bacillus subtilis* Y1336) e seus respectivos fermentados OT1 (fermentado de *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA20); RT2 (fermentado de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764); BIOT3 (fermentado de *Bacillus subtilis* BV02) e BACT4 (fermentado de *Bacillus subtilis* Y1336). A tabela 2 (anexo I), apresenta os dados onde se observa que houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de significância de 5%. De acordo com o teste de Bartlett a 5%, o valor-p: 0.07509483 há homocedasticidade das respostas. Assim, foi realizado o teste Tukey de comparação das médias. Todas as análises foram realizadas no software R.

A Tabela 3, apresenta a comparação das médias dos tratamentos, o tratamento controle negativo-CN (somente água esterilizada) (a) obteve o pior resultado na penetração de *P. brachyurus*, seguindo por BACT4 (ab). Os tratamentos Bioimune[®], Rizos[®], Onix[®] e Biobac[®] (abc) não diferenciaram entre si. O tratamento BIOT3 (bc) obteve a mesma resposta de c e b. E RT2 e OT1 (c) apresentaram a menor penetração do fitonematoide em relação aos demais tratamentos. Sendo assim, selecionou-se o produto Rizos[®] (*Bacillus subtilis* UFPEDA 764) para a etapa de otimização do cultivo em diferentes meios de cultura para bactérias, por apresentar controle superior aos tratamentos CN; BACT4; BIOIMUNE[®]; RIZOS[®]; ONIX[®]; BIOBAC[®]; BIOT3 e conter a espécie *Bacillus subtilis* utilizada em larga escala pelos produtores, a qual não se encontra em OT1 que obteve o mesmo resultado que RT2.

Tabela 3. Dados significantes pelo teste de Tukey (P<0.05) para os tratamentos estudados na seleção do produto comercial.

Tratamentos	Médias	Grupos
CN	4.580	a
BACT4	4.468	ab
BIOIMUNE®	3.274	abc
RIZOS®	2.938	abc
ONIX®	2.666	abc
BIOBAC®	2.258	abc
BIOT3	2.104	bc
RT2	2.078	c
OT1	1.854	c

CN – controle negativo (somente água esterilizada); BACT4 – fermentado de *Bacillus subtilis* Y1336; BIOT3 – fermentado de *Bacillus subtilis* BV02; RT2 – fermentado de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764; OT1 – fermentado de *Bacillus methylotrophicus* UFPEDA20; Bioimune® (*Bacillus subtilis* BV02); Rizos® (*Bacillus subtilis* UFPEDA 764); Onix® (*Bacillus methylotrophicus* UFPEDA20) e Biobac® (*Bacillus subtilis* Y1336).

4. DISCUSSÃO

A diferença dos valores da multiplicação de bactérias endosporogênicas (BE) e bactérias totais (BT) em laboratório, podem ser entendidas como resultado de possíveis contaminações, quer seja, durante o processo de multiplicação, quantificação ou mesmo do inóculo. Também, pode ocorrer da amostra proveniente da fermentação conter células vegetativas que ainda não sofreram o processo de endosporogênese, resultando assim em valores diferentes de BT (bactérias totais) e BE (bactérias endosporogênicas). Esta última afirmação, demonstra-se mais assertiva nesse estudo, pelo fato de durante o processo de quantificação não ter sido observado colônias com morfologias diferentes nas placas.

O uso de produtos biológicos para controlar fitonematoides é uma alternativa viável; esses produtos são seletivos e têm baixo custo, segundo Araújo e Marchesi (2009). Os produtos comerciais Onix®; Rizos®; Bioimune® e Biobac® demonstraram eficiência na diminuição de *Pratylenchus brachyurus* penetrado em raízes de soja. O uso de *Bacillus* também foi verificado por Araújo et al. (2002) e houve redução da migração do nematoide, afetou a orientação e

interferiu na produção de exsudatos das raízes. Assim, os nematoides morrem por gastar sua energia se movimentando no solo para encontrar o hospedeiro. A redução em 42% da penetração do *P. brachyurus* ocasionada com o produto Onix[®] quando comparado ao controle negativo (somente água esterilizada), correlaciona o encontrado por Mazzuchelli et al. (2020) onde taxa média de controle do nematoide encontrada para cana-planta foi próxima a 40%, observando-se que o uso de *B. subtilis* no sulco permitiu cerca de 53% de controle para três safras.

Em um estudo com *Rotylenchus reniformis* e *P. brachyurus* os autores (HIGAKI; ARAUJO, 2012) relataram diminuição de juvenis e aumento do crescimento de plantas com o uso de abamectina. A redução da população de *P. brachyurus* também foi observada com aplicação de abamectina e imidacloprido + tiodicarbe aplicados no tratamento de sementes, segundo Bortolini et al. (2013). Cabrera et al. (2009), demonstrou eficiência da abamectina no tratamento de sementes para reduzir a infestação inicial de nematoides no solo. O controle químico demonstra eficiência no tratamento de sementes assim como o biológico, mas por outro lado, o controle biológico tem benefício pela possibilidade de maior persistência do microorganismo no solo e na rizosfera das plantas. A característica migradora de *Pratylenchus* spp. oferece também dificuldade as moléculas químicas encontrarem o alvo, isto vou visto por Corte et al. (2014), uma vez que a não formação do sítio de alimentação radicular prejudicou a eficácia do controle químico para este gênero. Todavia, a introdução de bactérias no solo pode garantir controle a longo prazo além do tratamento de sementes, em cana conforme citado por Dinardo-Miranda, (2008) no verão o efeito dos nematicidas químicos pode durar 90 dias após o plantio.

A redução da penetração de *P. brachyurus* em RT2 e OT1 nas raízes de soja pode ter ocorrido, pelo fato de *Bacillus* spp. produzirem lipopeptídeos ativos ou metabólitos secundários durante sua multiplicação que podem ter diferenciado sua composição dos produtos comerciais. Segundo Araújo (2018), bactérias do gênero *Bacillus* são rizobactérias que podem sintetizar metabólitos secundários que interferem no ciclo dos nematoides e/ou transformam os exsudatos das raízes interferindo no processo de reconhecimento do nematoide a planta.

5. CONCLUSÕES

O produto fermentado de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (Rizos[®]) sob condições controladas de laboratório reduz a penetração de *P. brachyurus* em raízes de soja análogo ao fermentado de Onix[®] (*Bacillus methylotrophicus* UFPEDA20); superior aos produtos

comerciais e fermentados de Bioimune[®] (*Bacillus subtilis* BV02) e Biobac[®] (*Bacillus subtilis* Y1336) e também superior aos produtos comerciais Rizos[®] e Onix[®]. Todos os produtos comerciais e seus respectivos fermentados reduzem a penetração de *P. brachyurus* em raízes de soja quando comparados ao controle negativo (somente água esterilizada)

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F.F.; MARCHESI, G. V. P. Use of *Bacillus subtilis* in the control of root-knot nematode and the growth promotion in tomato, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1558-1561, ago, 2009.

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.

BRASIL (2009). **Regras para análises de sementes**. Disponível. em: <
https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf> . Acesso em: 03 de novembro de 2021.

BORTOLINI, G. L.; ARAÚJO, D. V. de; ZAVISLAK, F. D.; JUNIOR, J. R.; KRAUSE, W. Controle de *Pratylenchus brachyurus* via tratamento de semente de soja. **Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer**, v. 9, n. 17, p. 818–830, 2013.

BYRD, DW, Jr., T. Kirkpatrick and KR Barker. An improved technique for cleaning and staining plant tissue for nematode detection. **Journal of Nematology** 14: p.142-143, 1983.

CABRERA, J. A.; KIEWNICK, S.; GRIMM, C.; DABATAT, A. A.; SIKORA, R. A. Efficacy on abamectin seed treatment on *Pratylenchus zae*, *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 116 (3), 124- 128, 2009.

COOLEN, W. A., D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Agriculture Research Center – GHENT**, Belgium. p.77, 1972.

CORTE, G. D.; PINTO, F. F.; STEFANELLO, M. T.; GULART, C; RAMOS, J. P. de; BALARDIN, R. S. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos no controle de fitonematoides em soja. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1534–1540, 2014.

DINARDO-MIRANDA, LUCI, L.; PIVETTA, J. P., VILELA, J. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematóides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia [online]**. 2008, v. 67, n. 91. Disponível em: <[HTTPS://DOI.ORG/10.1590/S0006-87052008000100022](https://doi.org/10.1590/S0006-87052008000100022)>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HIGAKI, W.A. AND F. F. ARAUJO. *Bacillus subtilis* and abamectin for nematode control and physiological changes in cotton grown in soil naturally infested. **Nematropica** 42:295-303. 2012.

MAZZUCHELLI, R.C.L.; MAZZUCHELLI, E.H.L.; ARAUJO, F.F. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. **Biological Control**. Volume 143, April 2020, 104185.

ROMEIRO, R.S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2007.

ANEXO I

Tabela 2. Análises de variância do teste eficiência de controle de *P. brachyurus* em raízes de soja para seleção do produto comercial.

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	8	41.455	5.1819	3.9508	0.0019346
Resíduo	36	47.218	1.3116		
Total	44	88.674			

CV = 39,31%

SEGUNDA PARTE

Estudo das variáveis temperatura (°C) e pH na multiplicação líquida do produto biológico comercial (*Bacillus subtilis* UFPEDA 764) em meios de cultura comerciais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção de variáveis para a multiplicação líquida do produto semente

Para o estudo das variáveis significativas na multiplicação líquida do produto semente *Bacillus subtilis* UFPEDA 764, foram selecionados meios de cultura destinados a multiplicação de *Bacillus* spp. nas propriedades. Sendo assim, elegeu-se por quantificação (item 2.2) das amostras do produto fermentado pelos produtores *in loco* os meios de cultura utilizados na multiplicação de *Bacillus* spp. que obtiveram maiores concentrações de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de bactérias endosporogênicas, de acordo com levantamento feito nos agricultores do Mato Grosso. Foram selecionados os meios de cultura: Agropaceli; MSM + Micronutriente e Multibacter. Os meios Agropaceli e Multibacter são os mais utilizados pelos produtores de soja. Foi verificado nas empresas fabricantes dos meios de cultura que a composição ou matéria prima utilizada na fabricação dos mesmos é segredo industrial sendo está informação restrita da indústria.

Neste estudo, para seleção das variáveis significativas aos diferentes meios de cultura A; B; M (tabela 1) utilizou-se a técnica conhecida por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Segundo Rodrigues e Iemma (2014), as variáveis que obtêm maiores influências no processo são selecionadas para novos estudos e otimização, podendo então serem empregadas. As variáveis estudadas temperatura(°C) e pH nas faixas propostas dessa pesquisa correspondem os níveis praticados pelos agricultores na multiplicação de *Bacillus* spp. nas propriedades.

Tabela 1. Meios de cultura selecionados

Códigos	Meio de cultura	Fabricante	Localização
A	Agropaceli	Agropaceli	Campo Verde, MT
B	MCM + Micronutrientes	Amazon Bioquim	Primavera do leste, MT
M	Multibacter	Agrobiológica	Leme, SP.

Tabela 2. Apresenta as variáveis e seus valores codificados e reais estudados neste planejamento.

Variável	Níveis					
	Código	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	X ₁	24,7	26	29	32	33,3
pH	X ₃	5,8	6	6,6	7,2	7,4

Quadro 1. Matriz do DCCR

Ensaio Tratamento	X ₁	X ₂
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

*x₁ = temperatura (°C) e x₂ = pH

O produto comercial selecionado *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 foi multiplicado em 11 ensaios para cada meio de cultura estudado por 48h em mesa de agitação orbital (TECNAL) a 200rpm. Primeiramente, preparou-se os meios de cultura em frascos de Erlenmeyer de acordo com as concentrações recomendadas (Quadro 2), fez-se a correção do pH aos níveis propostos da variável independente e levou-se à autoclave por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento, foram retirados 10mL de uma solução contendo o inóculo *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (1,55x10¹⁰UFC/mL de bactérias totais e 2,53x10⁸UFC/mL de bactérias endosporogênicas) e colocou-se em frascos de erlenmeyer autoclavados com 190mL de cada meio de cultura estudado. Sendo assim, a taxa inicial da concentração do inóculo no meio de cultura foi de 0,05.

Estes, foram mantidos fechados com algodão e papel alumínio em mesa agitação orbital (TECNAL) por 48h nas temperaturas propostas.

Quadro 2. Concentração utilizada dos meios de cultura selecionados nos erlenmeyer.

		Meio de cultura (g)	Micronutriente (g)	Sacarose (g)	mL/água
M	Multibacter	2,85		1,9	190
A	Agropacelli	1,52			190
B	MCM	2,85	0,38		190

*recomendação das quantidades dos meios de cultura, de acordo com o fabricante.

Ao final das 48 h, coletou-se uma amostra de cada produto fermentado e realizou a contagem de bactérias totais e endosporogênicas através do método de quantificação de bactérias totais e endosporogênicas “item 2.2”

O teste de eficiência do controle de nematoides e a avaliação da penetração do *P. brachyurus* em raízes de soja, foram realizados seguindo o procedimento descrito no “item 2.3” com onze amostras propostas na matriz do DCCR (Quadro 1) provenientes das fermentações de cada meio de cultura (Multibacter; Agropacelli e MCM+MICRO).

2.2 Método de quantificação de bactérias totais e endosporogênicas

A técnica de plaqueamento e contagem de colônias (UFC) em microgotas consistiu na diluição seriada (10^{-2} até 10^{-8}) em solução tamponada ou peptonada e no plaqueamento de 0,1µl de cada diluição em meio de cultura ágar nutriente (ROMEIRO, 2007). Para a quantificação de células endosporogênicas, o mesmo processo de diluição seriada foi feito, porém as amostras ficaram por 12 minutos em banho-maria á 80°C para eliminação de células vegetativas. Após a gota secar, a placa foi mantida em estufa com temperatura de 28°C para crescimento das colônias. Posteriormente (24 h), realizou-se a contagem de 3 a 30 colônias em cada microgota e se estimou a concentração de bactérias. Foram plaqueadas quatro microgotas de cada amostra, isto totalizou quatro repetições.

2.3 Teste de eficiência de controle de *Pratylenchus brachyurus*

Efetou-se, previamente o teste de germinação e vigor conforme prescrições da Regra para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009) nas sementes de soja da variedade

75174RSF/IPRO Dom Mario. As sementes de soja foram colocadas em profundidade aproximada de 1,5cm em tubos falcon com 55mL de areia autoclavada e logo após, tratadas com onze tratamentos de cada meio de cultura (Multibacter; Agropacelli e MCM+Micronutrientes), aplicou-se 20 μ l de cada fermentação com 140 μ l de água esterilizada por tubo falcon. Esta pesquisa foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado (DIC), cada parcela conteve uma planta e foram utilizadas seis parcelas por tratamento.

Os fermentados foram aplicados diretamente no substrato, simulando a aplicação no sulco de plantio. O controle negativo consistiu na aplicação de água autoclavada. Após aplicação dos tratamentos, as plantas foram mantidas a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ com irrigação de maneira a manter a capacidade de campo.

O patógeno foi inoculado dez dias após a montagem do teste. A extração da população pura de *P. brachyurus* foi baseado na metodologia de Coolen e D'Herde (1972). A suspensão foi ajustada para a concentração de 200 espécimes de *P. brachyurus* para cada 1,5mL. As espécimes do nematoide foram distribuídas em dois orifícios de aproximadamente 2cm de profundidade, próximos ao caule de cada planta, utilizando pipeta automática.

A avaliação e o processo de coloração do *P. brachyurus* nas amostras ocorreu 16 dias após a inoculação, baseado na metodologia de Byrd et al. (1983) com adaptações. Fez-se a pesagem da parte aérea verde; do sistema radicular e posteriormente da parte aérea seca das plantas de soja. Para pesagem da parte aérea seca, esta foi levada a estufa de esterilização e secagem com ventilação de ar forçada a 70°C , por 8h/dia. As amostras foram pesadas uma vez ao dia até obterem peso constante e assim realizou-se o peso seco da parte aérea. A contagem do número de *Pratylenchus brachyurus* penetrado por planta foi efetuada com auxílio de uma lupa microscópio estereoscópio

3. RESULTADOS

3.1 Análises do DCCR (delineamento composto central rotacional)

Considerando o projeto rotativo composto central (DCCR; oito pontos axiais e três pontos centrais), com total de 11 ensaios e duas variáveis Temperatura e pH selecionadas para este projeto fracionário, o nível de significância $\alpha=0,10$ foi utilizado as análises DCCR. As variáveis dependentes analisadas foram número de bactérias totais (UFC/mL) e bactérias endosporogênicas (UFC/mL); peso verde da parte aérea (g); peso seco da parte aérea (g); peso da raiz (g) e número de *P. brachyurus* penetrado por grama de raiz.

O Quadro 3, demonstra os resultados obtidos para as seis variáveis respostas analisadas no estudo com o meio de cultura Multibacter. Neste planejamento utilizou-se três pontos centrais, nos quais se estimou o valor do puro erro.

Quadro 3. Valores codificados e reais (entre parênteses) e valores experimentais obtidos das variáveis respostas no DCCR para o meio de cultura Multibacter.

	X1	X2	BT	BE	PA PV	PA OS	P RAIZ	Nº <i>P.</i> <i>brachyurus</i> por g de raiz
M1	-1 (26)	-1 (6)	9,120	4,982	0,667	0,108	0,734	9,54
M2	1 (32)	-1 (6)	10,865	4,815	0,906	0,126	0,857	11,20
M3	-1 (26)	1 (7,2)	8,785	5,612	0,604	0,114	0,689	4,36
M4	1 (32)	1 (7,2)	8,508	4,976	0,769	0,104	0,748	5,35
M5	-1,41 (24,7)	0 (6,6)	8,982	4,472	0,901	0,121	0,577	4,04
M6	1,41 (33,3)	0 (6,6)	9,434	3,737	0,524	0,098	0,632	3,17
M7	0 (29)	-1,41 (5,8)	7,868	3,722	0,690	0,135	0,739	10,01
M8	0 (29)	1,41 (7,4)	7,602	3,341	0,668	0,122	0,756	9,26
M9	0 (29)	0 (6,6)	8,339	5,661	0,593	0,108	0,666	10,82
M10	0 (29)	0 (6,6)	9,309	5,171	0,700	0,127	0,652	3,45
M11	0 (29)	0 (6,6)	8,771	4,542	0,696	0,117	0,733	9,09

X1-temperatura(°C); X2-pH; Bactérias totais-BT (UFC/mL LOG10); bactérias endosporogênicas-BE (UFC/mL LOG10); peso verde da parte aérea- PA PV (g); peso seco da parte aérea- PA PS (g); peso da raiz-P RAIZ (g); número de *P. brachyurus* penetrado na raiz- (Nº *P. brachyurus*) e número de *P. brachyurus* penetrado por grama de raiz (Nº *P. brachyurus* por g de raiz).

De acordo com o quadro 3, observou-se no ensaio M6 a menor penetração do *P. brachyurus* (3,17) por grama de raiz de soja em relação aos demais ensaios, nota-se também que M6 conteve 3,737 UFC/mL LOG10 de células endosporogênicas de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764. Em M2, ocorreu o maior peso de parte aérea verde e peso da raiz (0,906 g PA PV e 0,857 g P RAIZ).

A partir da Tabela 3 da estimativa dos efeitos, observa-se que os valores de “p” das variáveis Temperatura e pH não apresentaram significância nos modelos lineares e quadráticos nos diferentes tratamentos para o número de bactérias totais (BT) (p linear temp.= 0,265 e p linear pH = 0,155) (p quadrático temp.= 0,179 e p quadrático pH=0,256) (p interação temp. e pH linear = 0,173) no meio de cultura Multibacter, ou seja, a hipótese H_0 em que todos os tratamentos são iguais é aceita a $\alpha=0,10$ para BT. De acordo com o $R^2=65\%$ (tabela 3) o modelo com as variáveis independentes (temperatura e pH) não explicou a variação experimental que foi observada nas respostas, sendo assim, houve falta de ajuste do modelo.

Tabela 3. Efeitos estimativas da variável resposta BT (bactérias totais) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Multibacter, $R^2 = 65\%$ e Puro Erro = 0,2365.

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

	EFEITO	PURO ERRO	T (3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	8,803	0,281	31,348	0,001	7,983	9,623
(1)TEMPERATURA (L)	0,528	0,344	1,532	0,265	-0,478	1,533
TEMPERATURA (Q)	0,835	0,411	2,032	0,179	-0,365	2,035
(2) PH (L)	-0,769	0,344	-2,232	0,155	-1,775	0,237
PH (Q)	-0,647	0,411	-1,573	0,256	-1,847	0,553
1L BY 2L	-1,011	0,486	-2,078	0,173	-2,431	0,409

Para as variáveis resposta: bactérias endosporogênicas (BE) (tabela 4) (p linear temp.= 0,365 e p linear pH = 0,887) (p quadrático temp.= 0,512 e p quadrático pH=0,183) (p interação temp. e pH linear = 0,716). PA PV (Peso verde da parte aérea) (tabela 5) (p linear temp.= 0,532 e p linear pH = 0,310) (p quadrático temp.= 0,302 e p quadrático pH=0,546) (p interação temp. e pH linear = 0,600). PA PS (Peso seco da parte aérea) (tabela 6) (p linear temp.= 0,458 e p linear pH = 0,306) (p quadrático temp.= 0,290 e p quadrático pH=0,418) (p interação temp. e pH linear = 0,276). N° *P. brachyurus* por grama de raiz (tabela 7) (p linear temp.= 0,895 e p linear pH = 0,382) (p quadrático temp.= 0,368 e p quadrático pH=0,540) (p interação temp. e pH linear = 0,939) também foi verificado que os valores de “p” sobre a Temperatura e pH não apresentaram significância nos modelos lineares e quadráticos nos diferentes tratamentos. Em BE o $R^2 = 29\%$; PA PV o $R^2 = 12\%$; PA PS o $R^2 = 64\%$ e N° *P. brachyurus* por grama de raiz o $R^2 = 55\%$, todos representam falta de ajuste do modelo.

Tabela 4. Efeitos estimativas da variável resposta BE (bactérias endosporogênicas) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Multibacter, $R^2 = 29\%$ e Puro Erro = 0,314.

	EFEITO	PURO ERRO	T (3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	5,120	0,324	15,808	0,004	4,174	6,065
(1) TEMPERATURA (L)	-0,462	0,397	-1,162	0,365	-1,622	0,698
TEMPERATURA (Q)	-0,374	0,474	-0,790	0,512	-1,758	1,010
(2) PH (L)	0,064	0,397	0,161	0,887	-1,096	1,224
PH (Q)	-0,951	0,474	-2,006	0,183	-2,335	0,433
1L BY 2L	-0,235	0,561	-0,418	0,716	-1,873	1,403

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Tabela 5. Efeitos estimativas da variável resposta PA PV (peso verde da parte aérea) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Multibacter, $R^2 = 12\%$ e Puro Erro = 0,0036.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	0,663	0,035	18,891	0,003	0,560	0,765
(1)TEMPERATURA (L)	-0,032	0,043	-0,749	0,532	-0,158	0,093
TEMPERATURA (Q)	0,071	0,051	1,379	0,302	-0,079	0,221
(2) PH (L)	-0,058	0,043	-1,348	0,310	-0,184	0,068
PH (Q)	0,037	0,051	0,720	0,546	-0,113	0,187
1L BY 2L	-0,037	0,061	-0,617	0,600	-0,215	0,140

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Tabela 6. Efeitos estimativas da variável resposta PA PS (peso seco da parte aérea) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Multibacter, $R^2 = 64\%$ e Puro Erro = 0,00089.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	0,118	0,005	21,592	0,002	0,102	0,134
(1)TEMPERATURA (L)	-0,006	0,007	-0,912	0,458	-0,026	0,013
TEMPERATURA (Q)	-0,011	0,008	-1,426	0,290	-0,035	0,012
(2) PH (L)	-0,009	0,007	-1,363	0,306	-0,029	0,010
PH (Q)	0,008	0,008	1,012	0,418	-0,015	0,031
1L BY 2L	-0,014	0,009	-1,482	0,276	-0,042	0,014

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Tabela 7. Efeitos estimativas da variável resposta N° *P. brachyurus* por g/raiz utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Multibacter, $R^2 = 55\%$ e Puro Erro = 14,84.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	7,781	2,225	3,498	0,073	1,286	14,277
(1)TEMPERATURA (L)	0,406	2,729	0,149	0,895	-7,561	8,374
TEMPERATURA (Q)	-3,754	3,256	-1,153	0,368	-13,261	5,753
(2) PH (L)	-3,032	2,729	-1,111	0,382	-10,999	4,936
PH (Q)	2,385	3,256	0,732	0,540	-7,122	11,892
1L BY 2L	-0,335	3,853	-0,087	0,939	-11,586	10,916

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

O Quadro 4, demonstra os resultados obtidos das seis variáveis respostas analisadas para o meio de cultura Agropaceli. Neste planejamento utilizou-se três pontos centrais, nos quais se estimou o valor do puro erro.

Quadro 4. Valores codificados e reais (entre parênteses) e valores experimentais obtidos das variáveis respostas no DCCR para o meio de cultura Agropaceli.

	X1	X2	BT	BE	PA PV	PA PS	P RAIZ	Nº <i>P. brachyurus</i> por g de raiz
A1	-1 (26)	-1 (6)	6,438	5,414	0,694	0,246	1,026	5,68
A2	1 (32)	-1 (6)	6,929	6,619	0,784	0,104	0,803	2,74
A3	-1 (26)	1 (7,2)	6,433	6,258	0,536	0,898	0,638	11,36
A4	1 (32)	1 (7,2)	9,945	9,945	0,812	0,127	0,715	8,39
A5	-1,41 (24,7)	0 (6,6)	9,933	9,933	0,621	0,196	0,425	17,63
A6	1,41 (33,3)	0 (6,6)	8,321	6,508	0,609	0,125	0,919	7,98
A7	0 (29)	-1,41 (5,8)	6,212	6,124	0,671	0,122	0,485	35,03
A8	0 (29)	1,41 (7,4)	6,145	5,936	0,691	0,110	0,908	4,59
A9	0 (29)	0 (6,6)	6,413	5,330	0,550	0,100	0,523	30,58
A10	0 (29)	0 (6,6)	10,329	7,639	0,696	0,112	0,947	20,07
A11	0 (29)	0 (6,6)	9,905	7,045	0,809	0,109	0,830	15,67

X1-temperatura(°C); X2-pH; Bactérias totais-BT (UFC/mL LOG10); bactérias endosporogênicas-BE (UFC/mL LOG10); peso verde da parte aérea- PA PV (g); peso seco da parte aérea- PA PS (g); peso da raiz-P RAIZ (g); número de *P. brachyurus* penetrado na raiz- (Nº *P. brachyurus*) e número de *P. brachyurus* penetrado por grama de raiz (Nº *P. brachyurus* por g de raiz).

Conforme no Quadro 4, o ensaio A2 apresentou o menor número de *P. brachyurus* (2,74) por g de raiz em comparação aos outros ensaios. Nos ensaios do ponto central (29°C e pH 6,6) foi observado grande variância na penetração do fitonematoide e o segundo pior resultado (A9 - 30,58 *P. brachyurus* por g de raiz) para esta variável resposta.

Segundo as tabelas das estimativas dos efeitos, nota-se que, pelos valores de “p” das variáveis Temperatura e pH, não houve significância nos modelos lineares e quadráticos nos diferentes tratamentos para o número de BT (bactérias totais) (tabela 8) (p linear temp.= 0,803 e p linear pH = 0,678) (p quadrático temp.= 0,946 e p quadrático pH=0,260) (p interação temp. e pH linear = 0,555). BE (bactérias endosporogênicas) (tabela 9) (p linear temp.= 0,987 e p linear pH = 0,368) (p quadrático temp.= 0,272 e p quadrático pH=0,571) (p interação temp. e pH linear = 0,409). PA PV (Peso verde da parte aérea) (tabela 10) (p linear temp.= 0,439 e p linear pH = 0,805) (p quadrático temp.= 0,745 e p quadrático pH=0,837) (p interação temp. e pH linear = 0,547). Nº *P. brachyurus* por grama de raiz (tabela 11) (p linear temp.= 0,462 e p linear pH = 0,282) (p quadrático temp.= 0,162 e p quadrático pH=0,393) (p interação temp. e pH linear = 0,998). Para o meio de cultura Agropaceli, ou seja, a hipótese H₀ em que todos os tratamentos são iguais é aceita a $\alpha=0,10$.

De acordo com o R² foi verificado a falta de ajuste do modelo, em: BT – R² = 51%; BE – R² = 35%; PV PA – R² = 32%; Nº *P. brachyurus* por g/raiz- R² = 41%.

Tabela 8. Efeitos estimativas da variável resposta BT (bactérias totais) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Agropaceli, $R^2 = 51\%$ e Puro Erro = 4,61.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95, %	+95, %
MÉDIA	8,883	1,241	7,159	0,019	5,260	12,506
(1)TEMPERATURA (L)	0,433	1,522	0,285	0,803	-4,010	4,877
TEMPERATURA (Q)	0,140	1,816	0,077	0,946	-5,163	5,443
(2) PH (L)	0,731	1,522	0,480	0,678	-3,713	5,175
PH (Q)	-2,826	1,816	-1,556	0,260	-8,129	2,477
1L BY 2L	1,510	2,149	0,703	0,555	-4,765	7,786

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Tabela 9. Efeitos estimativas da variável resposta BE (bactérias endosporogênicas) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Agropaceli, $R^2 = 35\%$ e Puro Erro =1,40.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95, %	+95, %
MÉDIA	6,672	0,692	9,639	0,011	4,651	8,693
(1)TEMPERATURA (L)	0,016	0,849	0,019	0,987	-2,463	2,495
TEMPERATURA (Q)	1,523	1,013	1,504	0,272	-1,435	4,481
(2) PH (L)	0,979	0,849	1,153	0,368	-1,500	3,458
PH (Q)	-0,680	1,013	-0,672	0,571	-3,638	2,278
1L BY 2L	1,241	1,199	1,035	0,409	-2,260	4,741

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Tabela 10. Efeitos estimativas da variável resposta PA PV (peso verde da parte aérea) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Agropaceli, $R^2 = 32\%$ e Puro Erro = 0,0167

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95, %	+95, %
MÉDIA	0,685	0,075	9,162	0,012	0,467	0,903
(1)TEMPERATURA (L)	0,088	0,092	0,958	0,439	-0,180	0,356
TEMPERATURA (Q)	-0,041	0,109	-0,373	0,745	-0,360	0,279
(2) PH (L)	-0,026	0,092	-0,281	0,805	-0,293	0,242
PH (Q)	0,026	0,109	0,233	0,837	-0,294	0,345
1L BY 2L	0,093	0,129	0,719	0,547	-0,285	0,471

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Tabela 11. Efeitos estimativas da variável resposta N° *P. brachyurus* por g/raiz utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Agropaceli, $R^2 = 41\%$ e Puro Erro = 58.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95, %	+95, %
MÉDIA	22,143	4,421	5,009	0,038	9,235	35,051
(1)TEMPERATURA (L)	-4,897	5,422	-0,903	0,462	-20,731	10,936
TEMPERATURA (Q)	-14,035	6,470	-2,169	0,162	-32,928	4,858
(2) PH (L)	-7,920	5,422	-1,461	0,282	-23,754	7,913
PH (Q)	-6,989	6,470	-1,080	0,393	-25,882	11,905
1L BY 2L	-0,017	7,657	-0,002	0,998	-22,376	22,341

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Conforme os resultados da variável PA PS (peso seco da parte aérea) os valores de "p" são significativos e a análise da variável foi dada pelos coeficientes de determinação, os quais são demonstrados na tabela 12. Nota-se, que o efeito da temperatura é negativo ao aumento do nível inferior ao mais alto estudado no modelo linear. Ou seja, neste modelo quanto maior os níveis da temperatura durante a fermentação menor será o peso da parte aérea seca. Diferente do modelo quadrático para a temperatura e do modelo linear e quadrático para pH, onde as respostas demonstraram que a mudança do menor nível estudado das variáveis para o maior nível há incremento de peso da parte aérea seca das plantas de soja. Contudo, uma análise de variância não é gerada devido o R^2 ser 58%.

Tabela 12. Coeficientes de regressão da variável resposta PA PS (peso seco da parte aérea) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura Agropaceli, $R^2 = 58\%$ e Puro Erro = 0,0000386.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95, %	+95, %
MÉDIA	0,106	0,004	29,648	0,001	0,096	0,117
(1)TEMPERATURA (L)	-0,127	0,002	-57,684	0,000	-0,133	-0,120
TEMPERATURA (Q)	0,079	0,003	30,076	0,001	0,071	0,087
(2) PH (L)	0,083	0,002	37,508	0,001	0,076	0,089
PH (Q)	0,056	0,003	21,463	0,002	0,049	0,064
1L BY 2L	-0,157	0,003	-50,634	0,000	-0,166	-0,148

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

O quadro 5 demonstra os resultados obtidos das seis variáveis resposta analisadas para o meio de cultura MSM+Micronutrientes. Neste planejamento utilizou-se três pontos centrais, os quais se estimou o valor do puro erro.

Quadro 5. Valores codificados e reais (entre parênteses) e valores experimentais obtidos das variáveis respostas no DCCR para o meio de cultura MCM+Micro.

	X1	X2	BT	BE	PA PV	PA PS	P RAIZ	Nº P. brachyurus por g de raiz
B1	-1 (26)	-1 (6)	6,311	4,058	0,673	0,130	0,386	20,73
B2	1 (32)	-1 (6)	7,700	5,194	0,734	0,081	0,604	8,27
B3	-1 (26)	1 (7,2)	5,017	3,743	0,482	0,105	0,520	3,84
B4	1 (32)	1 (7,2)	6,972	5,657	0,703	0,083	0,428	17,54
B5	-1,41 (24,7)	0 (6,6)	7,221	5,037	0,815	0,099	0,642	4,67
B6	1,41 (33,3)	0 (6,6)	7,459	3,306	0,731	0,110	0,855	3,90
B7	0 (29)	-1,41 (5,8)	7,795	5,864	0,724	0,114	0,651	3,46
B8	0 (29)	1,41 (7,4)	7,564	3,108	0,360	0,141	0,230	37,04
B9	0 (29)	0 (6,6)	7,096	3,175	0,661	0,074	0,775	5,59
B10	0 (29)	0 (6,6)	7,714	3,306	0,383	0,098	0,626	4,26
B11	0 (29)	0 (6,6)	9,290	5,343	0,537	0,103	0,435	21,15

X1-temperatura(°C); X2-pH; Bactérias totais-BT (LOG10 UFC/mL); bactérias endosporogênicas-BE (LOG10 UFC/mL); peso verde da parte aérea- PA PV (g); peso seco da parte aérea- PA PS (g); peso da raiz-P RAIZ (g); número de *P. brachyurus* penetrado na raiz- (Nº *P. brachyurus*) e número de *P. brachyurus* penetrado por grama de raiz (Nº *P. brachyurus* por g de raiz).

No quadro 5, observa-se no ensaio B7 o maior número obtido de BE (5,864 LOG10 UFC/mL) de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 com a menor penetração de 3,46 *P. brachyurus* por grama de raiz, no que se refere aos demais tratamentos. Em B6, as plantas apresentaram o sistema radicular com peso 0,855 g e penetração de 3,9 *P. brachyurus* por grama de raiz. Verificou-se grande variação no ponto central deste estudo.

Para o meio de cultura MSM+Micronutrientes, se analisou através do valor de “p” as estimativas dos efeitos para as variáveis respostas BT (bactérias totais) (tabela 13) (p linear temp.= 0,369 e p linear pH = 0,539) (p quadrático temp.= 0,334 e p quadrático pH=0,460) (p interação temp. e pH linear = 0,826). BE (bactérias endosporogênicas) (tabela 14) (p linear temp.= 0,875 e p linear pH = 0,390) (p quadrático temp.= 0,735 e p quadrático pH=0,558) (p interação temp. e pH linear = 0,826). PA PV (peso verde da parte aérea) (tabela 15) (p linear temp.= 0,716 e p linear pH = 0,202) (p quadrático temp.= 0,176 e p quadrático pH=0,942) (p interação temp. e pH linear = 0,624). PA PS (peso seco da parte aérea) (tabela 16) (p linear temp.= 0,330 e p linear pH = 0,763) (p quadrático temp.= 0,729 e p quadrático pH=0,167) (p interação temp. e pH linear = 0,494). N° *P. brachyurus* por grama de raiz (tabela 17) (p linear temp.= 0,996 e p linear pH = 0,273) (p quadrático temp.= 0,533 e p quadrático pH=0,330) (p interação temp. e pH linear = 0,298). Estes também apresentaram valores de “p” para temperatura e pH em que não houve significância nos diferentes tratamentos. A hipótese H_0 é aceita a $\alpha=0,10$.

Tabela 13. Efeitos estimativas da variável resposta BT (bactérias totais) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura MCM+Micro, $R^2 = 44\%$ e Puro Erro = 1,28025.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	8,038	0,653	12,304	0,007	6,130	9,945
(1)TEMPERATURA (L)	0,922	0,801	1,151	0,369	-1,417	3,262
TEMPERATURA (Q)	-1,208	0,956	-1,263	0,334	-4,000	1,584
(2) PH (L)	-0,589	0,801	-0,735	0,539	-2,928	1,751
PH (Q)	-0,867	0,956	-0,907	0,460	-3,659	1,925
1L BY 2L	0,283	1,131	0,250	0,826	-3,021	3,587

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Tabela 14. Efeitos estimativas da variável resposta BE (bactérias endosporogênicas) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura MCM+Micro, $R^2 = 23\%$ e Puro Erro = 1,477.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	3,940	0,702	5,614	0,030	1,891	5,989
(1)TEMPERATURA (L)	0,153	0,861	0,178	0,875	-2,361	2,666
TEMPERATURA (Q)	0,400	1,027	0,389	0,735	-2,599	3,399
(2) PH (L)	-0,937	0,861	-1,089	0,390	-3,451	1,576
PH (Q)	0,716	1,027	0,697	0,558	-2,283	3,715
1L BY 2L	0,283	1,131	0,250	0,826	-3,021	3,587

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Tabela 15. Efeitos estimativas da variável resposta PA PV (peso verde da parte aérea) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura MCM+Micro, $R^2 = 70\%$ e Puro Erro = 0,193.

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	0,527	0,080	6,563	0,022	0,293	0,761
(1)TEMPERATURA (L)	0,041	0,098	0,419	0,716	-0,246	0,329
TEMPERATURA (Q)	0,242	0,118	2,060	0,176	-0,101	0,585
(2) PH (L)	-0,184	0,098	-1,871	0,202	-0,472	0,103
PH (Q)	0,010	0,118	0,082	0,942	-0,333	0,353
1L BY 2L	0,080	0,139	0,573	0,624	-0,326	0,486

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	0,091	0,009	10,365	0,009	0,066	0,117
(1)TEMPERATURA (L)	-0,014	0,011	-1,278	0,330	-0,045	0,018
TEMPERATURA (Q)	0,005	0,013	0,398	0,729	-0,033	0,043

(2) PH (L)	0,004	0,011	0,344	0,763	-0,028	0,035
PH (Q)	0,027	0,013	2,127	0,167	-0,010	0,065
1L BY 2L	0,013	0,015	0,831	0,494	-0,032	0,057

Tabela 16. Efeitos estimativas da variável resposta PA PS (peso seco da parte aérea) utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura MCM+Micro, $R^2 = 40\%$ e Puro Erro = 0,0002337.

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

Na tabela 17, foi verificado o valor puro erro muito alto devido a variação do ponto central no do teste de penetração do *P. brachyurus*.

Tabela 17. Efeitos estimativas da variável resposta N° *P. brachyurus* por g/raiz utilizando o DCCR no software Statistica para o meio de cultura MCM+Micro, $R^2 = 53\%$ e Puro Erro =88.

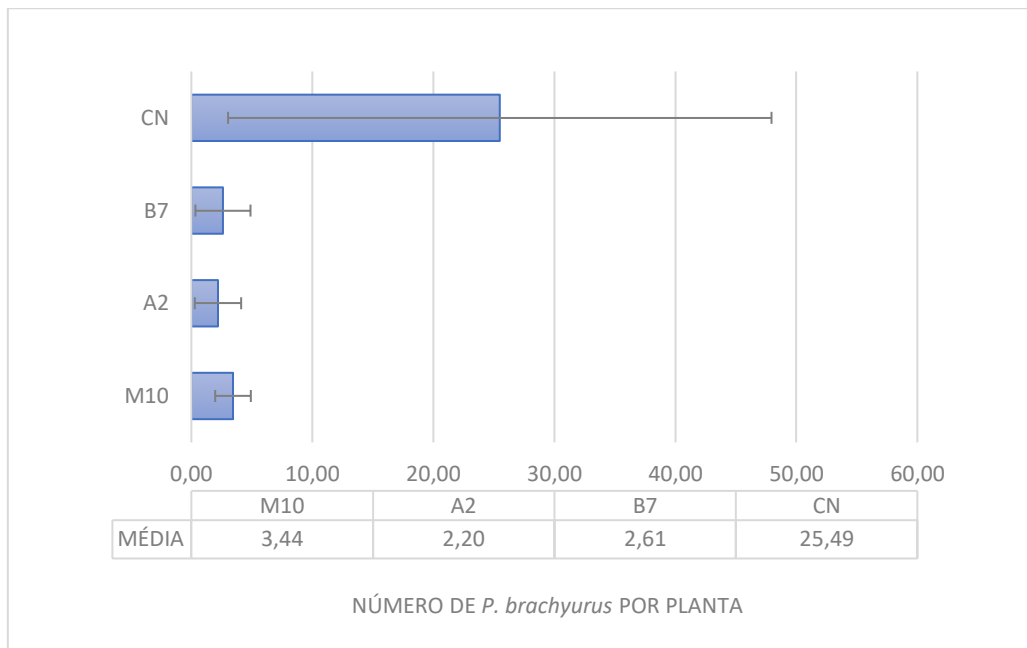
	EFEITO	PURO ERRO	T(3)	P	-95,%	+95,%
MÉDIA	10,332	5,421	1,906	0,197	-5,498	26,163
(1)TEMPERATURA (L)	0,038	6,650	0,006	0,996	-19,380	19,455
TEMPERATURA (Q)	-5,923	7,935	-0,746	0,533	-29,093	17,248
(2) PH (L)	9,964	6,650	1,498	0,273	-9,454	29,381
PH (Q)	10,135	7,935	1,277	0,330	-13,035	33,305
1L BY 2L	13,076	9,390	1,392	0,298	-14,344	40,496

T=teste t de student. P=nível de significância (10%)

3.2 Comparação da eficiência de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 multiplicado nos diferentes meios de cultura comerciais.

Foi selecionado um tratamento de cada meio de cultura (Multibacter, Agropaceli e MCM+Micronutrientes) que demonstrou o menor número de *Pratylenchus brachyurus* penetrado por planta e assim realizou a comparação das médias dos resultados com o controle negativo do teste (somente água esterilizada). De acordo com a figura 1, o tratamento A2 obteve a menor penetração (2,2 *P. brachyurus* penetrado por planta) do fitonematoide em comparação aos demais e redução de 91% da penetração em relação à média do controle negativo. O Controle negativo apresentou 88% de variação da penetração sendo sua média de 25,49 *P. brachyurus* penetrado por planta muito superior à média dos tratamentos que receberam a aplicação de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 em M10 (média 3,44); B7 (média 2,61) e A2 (média 2,20).

Figura 1. Comparação da média dos tratamentos do DCCR e do controle negativo para o teste de penetração de *Pratylenchus brachyurus* em raízes de soja.



*Ensaio: M10 (Multibacter -29°C e pH 6,6); A2 (Agropaceli - 32°C e pH 6); B7 (MCM+Micronutriente - 29°C e pH 5,8) e CN (controle negativo – somente água esterilizada).

4. DISCUSSÃO

A segunda parte deste estudo, no DCCR para o meio de cultura Multibacter (quadro 3), a produção de metabólitos de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 pode estar proporcionando controle e proteção das plantas em M6 onde se têm 3,17 *P. brachyurus* por grama de raiz de soja e somente 3,737 log₁₀ UFC/mL de células endosporogênicas. No ensaio M2, foi verificado peso verde da parte aérea (PA PV) = 0,906 g; peso seco da parte aérea (PA PS) = 0,126 g; peso da raiz (P RAIZ) = 0,857 g e também 11,20 *P. brachyurus* penetrado por g de raiz. Esta característica de plantas com sistema radicular vigoroso oferecendo maior volume de alimento para o nematoide, tem sido observada em pesquisas relacionadas a texturas dos solos, a oferta de água em solos argilosos proporcionou melhor desenvolvimento de plantas, ganhos no sistema radicular e acréscimo de ovos viáveis de fitonematoides (mesmo diminuindo sua mobilidade) (ROCHA et al. 2006). Todavia, neste presente estudo a areia estéril foi utilizada como substrato, porém o fator relacionado ao aumento do crescimento das plantas de soja (M2) pode estar associado a influência de fitoreguladores produzidos por *Bacillus* (ARAÚJO et al., 2005) e por consequência maior área para penetração do *P. brachyurus*. O resultado do dano causado a estas plantas poderia ser medido na produção final do grão, pois plantas maiores e vigorosas suportaram melhor ao ataque de fitonematoides e isto traz incremento em

produtividade. Espécies do gênero *Bacillus* são utilizadas de forma a controlar biologicamente doenças nos vegetais, sendo também, confirmado o efeito positivo desse grupo sobre a produtividade das lavouras (YAO et al., 2006).

Cultivos de *Bacillus* onde valores de bactérias totais e bactérias endosporogênicas são semelhantes, assim como encontrado no DCCR do meio de cultura Agropaceli (quadro 4) são desejáveis por sugerir que o produto final (48 h) das multiplicações contém predominância de células endosporogênicas de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764. Para o meio Agropaceli, verificou-se nos ensaios plantas maiores com acréscimo da parte aérea verde; parte aérea seca e peso de raiz, em relação aos ensaios com os meios Multibacter e MCM +micronutrientes. Em estudo realizado com feijoeiro e solos esterilizados destacou-se a utilização de *B. subtilis* como bastante promissor a aumentar a nodulação de raízes e promover o crescimento das plantas transformado em ganhos de produtividade (LAZZARETTI E MELO, 2005). Pode-se destacar os ensaios A2 e A8 como promissores a novos estudos para este meio de cultura em condições de laboratório.

Em B6 (33,3 °C e pH 6,6) (quadro 5) observou-se peso do sistema radicular 0,855 g e apenas 3,90 *P. brachyurus* por grama de raiz. O pior resultado de N° *P. brachyurus* por grama de raiz (37,4) ocorreu em B8 onde se encontra o menor número de bactérias endosporogênicas 3,108 log₁₀ UFC/mL. Voss (2013) aplicando diferentes concentrações de suspensão de células de *B. subtilis* constatou efeito dos tratamentos, quanto maior a concentração de células aplicada houve diminuição gradativa da população de *Meloidogyne incognita* parasitando tomateiros. *Bacillus subtilis*, também causaram dificuldades para nematoides localizarem raízes por causa da produção de compostos que alteraram os exsudatos do sistema radicular (SANTIAGO, 2015). Esta afirmação justifica as respostas encontradas na média dos tratamentos M10; A2; B7 contendo *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 multiplicado e controle negativo (somente água esterilizada) (figura 1).

As condições de cultivo de *Bacillus* interferem diretamente na resposta de controle a fitoparasitas. Os metabólitos secundários produzidos no final da fase exponencial de crescimento da bactéria conhecidos particularmente como iturina, surfactina e fengicina dependem para sua formação de fatores de cultivo, como fornecimento de ar, temperatura; pH; meio de cultura entre outros (AKPA et al., 2001). Em *Bacillus subtilis* onde se estudou os lipopeptídeos cíclicos, a surfactina foi secretada a temperaturas de 25 a 37 °C, de acordo com Chen & Juang (2008). Os autores Sen e Swaminathan (2005) constataram que 37,4 °C foi a temperatura ótima para a produção de surfactina pelo *B. subtilis* DSM 3256.

Contudo, Todos os três meios de cultura demonstraram eficientes na multiplicação de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 em condições controladas de laboratório. As temperaturas e pH dos ensaios no DCCR podem ser recomendadas na multiplicação realizada pelos produtores na fazenda, pois não houve diferencial significativo dos tratamentos ao nível de significância $\alpha=0,10$ para os meios de cultura comerciais estudados. O uso da temperatura de multiplicação com valores menores a 34 °C é recomendado por diminuir o risco de multiplicação de patógenos humanos. A distribuição e comercialização deve ser considerada no momento da decisão do produtor por qual meio de cultura utilizar, pois nem todos estão disponíveis em todas regiões e em quantidades que consiga atender os produtores do estado.

5. CONCLUSÕES

Os meios de cultura comerciais Multibacter, Agropaceli e MSM+Micronutrientes são eficientes na multiplicação do *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 sob condições controladas em laboratório nas temperaturas (24,7; 26; 29; 32 e 33,3 °C) e pH (5,8; 6; 6,6; 7,2 e 7,4) do estudo.

Ocorre redução da penetração de *P. brachyurus* em plantas de soja com a aplicação do produto da multiplicação de *Bacillus subtilis* UFPEDA 764 nos meios de cultura Multibacter (M10), Agropaceli (A2) e MSM+Micro (B7) em comparação ao controle negativo (somente água).

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, F.F; et al. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1639-1645, 2005.DOI: 10.1007/s11274-005-3621-x
- AKPA, E., JACQUES, P., WATHELET, B. *et al.* Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis* . **Appl Biochem Biotechnol** 91, 551–561, 2001.
- BRASIL (2009). **Regras para análises de sementes**. Disponível em: < https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf >. Acesso em: 03 de novembro de 2021.
- BYRD, DW, Jr., T. Kirkpatrick and KR Barker. An improved technique for cleaning and staining plant tissue for nematode detection. **Journal of Nematology** 14: p.142-143, 1983.
- CHEN, H.; JUANG, R. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. **Biochem Eng. J.** v. 38, p. 39-46, 2008.
- COOLEN, W. A., D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Agriculture Research Center – GHENT**, Belgium. p.77, 1972.
- LAZZARETTI, E.; MELO, I. S. Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro. **Embrapa Meio Ambiente**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28. 2005.
- ROCHA, M. R.; CARVALHO, Y.; CÔRREA, G. C.; CATTINI, G. P.; RAGAGNIN, O. Efeito da textura do solo sobre a população de *Heterodera glycines*. *Nematologia Brasileira*, v. 30, n. 1, p. 11-15, 2006.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: Cárita, 2014.
- ROMEIRO, R.S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. **Bactérias Fitopatogênicas. Roteiro das aulas práticas**. 2007
- SANTIAGO, D. C. “Controle biológico de nematoides”. In: **XXXII Congresso brasileiro de Nematologia**, Londrina – PR, 307p. 2015.
- SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochem**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.
- VOSS, G. B. Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro. **Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, SC, 2013. 115p.
- Yao, A. V.; Bochow, Dr H.; Karimov, S.; Boturov, U.; Sanginboy, S. & Sharipov, A. K. Effect of FZB 24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field

tests, **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 39:4, 323-328, 2006. DOI: [10.1080/03235400600655347](https://doi.org/10.1080/03235400600655347)