



Universidade Federal do Tocantins  
Campus Universitário de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

GASPAR MOREIRA BRAGA JUNIOR

**EFICIÊNCIA DE *Bacillus subtilis* NO BIOCONTROLE DE  
FITOPATÓGENOS E PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL**

GURUPI - TO  
2015



Universidade Federal do Tocantins  
Campus de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

GASPAR MOREIRA BRAGA JUNIOR

**EFICIÊNCIA DE *Bacillus subtilis* NO BIOCONTROLE DE  
FITOPATÓGENOS E PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Aloisio Freitas Chagas Junior

**GURUPI - TO  
2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO TOCANTINS

Universidade Federal do Tocantins  
Campus de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

### Ata nº 13/2015

#### ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GASPAR MOREIRA BRAGA JUNIOR, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Aos 31 dias do mês de julho do ano de 2015, às 09:00 horas, na Sala de número 15 do Bloco BALA II, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Aloisio Freitas Chagas Junior do Câmpus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins (UFT), Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lillian França Borges Chagas, do Campus Universitário de Gurupi/ UFT, e Dr. Magno Rodrigues de Carvalho Filho, da JCO Fertilizantes, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **GASPAR MOREIRA BRAGA JUNIOR**, intitulada "**EFICIÊNCIA DE *Bacillus subtilis* NO BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS E PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL**". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer aprovado, habilitando-o(a) ao título de Mestre em Produção Vegetal. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dr<sup>a</sup>. Lillian França Borges Chagas  
Universidade Federal do Tocantins

Dr. Magno Rodrigues de Carvalho Filho  
JCO - Fertilizantes

Dr. Aloisio Freitas Chagas Junior  
Universidade Federal do Tocantins  
Orientador e presidente da banca examinadora

Gurupi, 31 de julho de 2015.

Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis  
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

Aos meus amados pais, Gaspar e Francisca  
que apesar da humildade e do pouco estudo,  
sempre acreditaram na educação como o caminho para  
o crescimento do ser humano.

**Dedico**

## AGRADECIMENTO

À Deus, pelas oportunidades, por sempre guiar meus caminhos e minhas escolhas.

Aos meus pais, Gaspar Moreira Braga e Francisca Candida da Cunha por ter me dado uma ótima criação e o maior amor do mundo, sempre me incentivando e me ajudando ir em busca dos meus sonhos.

A minha irmã Nanda Cristina da Cunha Braga por sempre estar do meu lado me incentivando, sendo minha outra metade, sendo não só uma irmã, mas sim uma amiga.

Aos meus pequenos, meu sobrinho Lucas e meu irmão Luiz Gustavo, por serem a alegria e o amor da minha vida.

A toda minha família pelo apoio e torcida e por estarem ao meu lado sempre que possível.

Aos antigos e novos amigos que tenho em minha vida, por sempre me proporcionar momentos maravilhosos, sempre me dando força, me aguentando nos momentos de estresse, em especial Luciana Godoi, Cleiriany, Max, Nayara, Marcela, Nadine, Nayane, Mayara, Sara, Leticia, Lukennes, Kelliane, Any, Carlos Antonio, Charles.

Aos colegas de Mestrado pelos dois anos de convivência, amizade e aprendizado.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Lillian França Borges Chagas, pela amizade e conhecimento repassado na docência.

A todos os alunos que fizeram e fazem parte do grupo de pesquisa Micro-bio do Laboratório de Microbiologia da incubadora de empresas da UFT, Aquiles, Layssah, Antonio Carlos, Alanna, Frota, Simone, Renan, Ceara, Anderson, Alexandre e weslayne. Pelo apoio que foi fundamental para a realização desse trabalho e pela grande amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aloisio Freitas Chagas Junior, pela confiança depositada no trabalho, compreensão, ensinamento, conselhos e principalmente pela amizade.

Aos professores da pós-graduação da UFT por todo conhecimento transmitido.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em contribuir com o nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal- UFT, por possibilitar a concretização desse trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio da bolsa de estudo.

A Empresa JCO fertilizantes pelo apoio a pesquisa que foi imprescindível para a realização do projeto.

A todos que torceram e acreditaram.

Meu muito obrigado!

## RESUMO

As rizobacterias promotoras do crescimento de plantas (RBCP) colonizam as raízes de plantas e induzem um aumento no crescimento vegetal por diversos mecanismos. A rizobacteria *Bacillus subtilis* é capaz de atuar como agente de controle de doenças de várias plantas cultivadas, como também promotor de crescimento vegetal. Diante disso, este trabalho teve como objetivos, nos quatro capítulos apresentados, de avaliar o crescimento micelial de patógenos, com a capacidade dos isolados de *B. subtilis* em inibir esses patógenos; avaliar a capacidade dos isolados de *B. subtilis*, inoculados em solo adubado com fosfato natural e sem adubação, em disponibilizar P e no crescimento da soja e feijão caupi em condições de casa de vegetação; avaliar a eficiência da inoculação de *B. subtilis* como promotor de crescimento vegetal na cultura do milho, em casa de vegetação; e avaliar a eficiência da inoculação de *B. subtilis* no desempenho agrônômico da soja em condições de campo em duas localidades. Foram testados sete isolados de *B. subtilis* contra os patógenos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp., avaliando a capacidade de controle biológico *in vitro*. Na avaliação da capacidade de inibição do crescimento dos patógenos utilizando quatro métodos os isolados de *B. subtilis* UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 foram eficazes. Os isolados UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram capazes de inibir o crescimento micelial dos patógenos testados por metabólitos termoestáveis, sendo a antibiose seu principal mecanismo de ação. Quanto à eficiência da inoculação de *B. subtilis* em soja e feijão caupi com adubação de fosfato natural e sem adubação, em casa de vegetação, utilizando sete isolados e um MIX, observou-se que a maioria dos tratamentos onde recebeu a inoculação de *B. subtilis* proporcionou o crescimento da cultura da soja e do feijão caupi, também a maioria dos isolados testados proporcionaram um maior teor de P disponível no solo e na parte aérea das plantas, tanto em solo suplementado com fosfato natural como também em solo sem adubação, em ambas as culturas. Em casa de vegetação testando inoculante de *B. subtilis*, composto por três cepas (UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03), em milho, mostrou que sementes de milho inoculadas com *B. subtilis* resultaram em plantas com maior acúmulo de biomassa, em estágio inicial de crescimento. No experimento de campo, onde foi testado inoculante de *B. subtilis*,

composto por três cepas (UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03), na cultura da soja em duas localidades na safra 2013/1014, a inoculação com *B. subtilis* proporcionou aumento da biomassa e produtividade da soja nas duas regiões onde foram avaliadas. Os resultados do presente trabalho comprovam a eficiência de *B. subtilis* nativos, isolados de solos do Tocantins, no controle biológico de fitopatogênos, bem como a capacidade como promotores de crescimento de feijão caupi, milho e soja, e aumento de produtividade da cultura da soja.

**Palavras-chave:** Biocontrole; promotor de crescimento vegetal; rizobactéria, produtividade.

## ABSTRACT

The rhizobacteria promote plant growth (RBCP) colonize roots of plants and induce an increase in plant crecimiento by different mechanisms. The rizobacteria *Bacillus subtilis* is able to act as a control agent of several cultivated plant diseases, as well as plant growth promoter. Thus, this study aimed to the four chapters presented, to evaluate the mycelial growth of pathogens such as the ability of isolates of *B. subtilis* to inhibit these pathogens; evaluate the effect of isolates of *B. subtilis* inoculated in soil fertilized with rock phosphate and without fertilization, as its ability to provide P, the growth of soybean and cowpea at home conditions of vegetation; evaluate the efficiency of *B. subtilis* inoculation as plant growth promoter in corn in a greenhouse; and evaluate the efficiency of inoculation of *B. subtilis* the agronomic performance of soybeans under field conditions in two locations. They tested seven isolates of *B. subtilis* pathogens *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* and *Bipolaris* spp., assessing the biological control capacity *in vitro*. In the evaluation of growth inhibition ability of the pathogens using four methods isolates of *B. subtilis* UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 were effective. Isolated UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 and 07 UFTBs were able to inhibit the mycelial growth of the pathogens tested by thermostable metabolites, antibiose being its main mechanism of action. As the efficiency of inoculation of *B. subtilis* in soybean and cowpea with natural phosphate fertilizer and no fertilization in a greenhouse, using seven isolates and MIX, it was observed that most of the treatments which received inoculation of *B. subtilis* provided the growth of soybean and cowpea, also most of the isolates tested provided a higher P content available in soil and shoots of plants, both in soil supplemented with rock phosphate as well as in soil fertilization in both cultures. In greenhouse testing inoculant *B. subtilis*, composed of three strains (UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03) in corn, showed that maize seed inoculated with *B. subtilis* resulted in plants with higher biomass accumulation in stadium initial growth. In the field trial, where he was tested inoculant *B. subtilis*, composed of three strains (UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03) in soybean at two sites in the harvest 2013/1014, inoculation with *B. subtilis* gave rise biomass and soybean yield in the two regions where they were evaluated. The results of this study demonstrated the efficacy of *B. subtilis* native isolated from the Tocantins soil, the biological control of plant

pathogens, as well as the capacity and bean growth promoters cowpea, corn and soybeans, and increased the soybean yield.

**Keywords:** biocontrol; promoter growth plant; rizobacteria, productivity.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I: CONTROLE BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i> DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> CONTRA <i>FUSARIUM SUBGLUTINANS</i>, <i>CURVULARIA LUNATA</i> E <i>BIPOLARIS</i> SPP. ....</b>	<b>16</b>
2.1	RESUMO .....	16
2.2	ABSTRACT .....	17
2.3	INTRODUÇÃO .....	18
2.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	20
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
2.6	CONCLUSÕES.....	34
2.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II: PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NA CULTURA DA SOJA E FEIJÃO CAUPI EM CASA DE VEGETAÇÃO.. ....</b>	<b>38</b>
3.1	RESUMO .....	38
3.2	ABSTRACT .....	39
3.3	INTRODUÇÃO .....	40
3.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	42
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.6	CONCLUSÕES.....	56
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO III <i>Bacillus subtilis</i> COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO DE MILHO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....</b>	<b>60</b>
4.1	RESUMO .....	60
4.2	ABSTRACT .....	61
4.3	INTRODUÇÃO .....	62
4.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	63
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
4.6	CONCLUSÕES.....	67
4.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO IV: EFEITO DE <i>Bacillus subtilis</i> NA BIOMASSA E PRODUTIVIDADE NA CULTURA DA SOJA EM CAMPO .....</b>	<b>69</b>
5.1	RESUMO .....	69
5.2	ABSTRACT .....	70
5.3	INTRODUÇÃO .....	71
5.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	72
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
5.6	CONCLUSÕES.....	80
5.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1:</b> Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium subglutinans</i> por isolados de <i>Bacillus subtilis</i> .....	23
<b>Tabela 2:</b> Inibição do crescimento micelial de <i>Bipolaris</i> spp., por isolados de <i>Bacillus subtilis</i> .....	26
<b>Tabela 3:</b> Inibição do crescimento micelial de <i>Curvularia lunata</i> , por isolados de <i>Bacillus subtilis</i> .....	38
<b>Tabela 4:</b> Efeito de metabólitos voláteis de <i>Bacillus subtilis</i> no crescimento micelial de <i>Fusarium subglutinans</i> , <i>Curvularia lunata</i> e <i>Bipolaris</i> spp.....	30
<b>Tabela 5:</b> Efeito de metabólitos termoestáveis de isolados de <i>Bacillus subtilis</i> no crescimento micelial de <i>Fusarium subglutinans</i> , <i>Curvularia lunata</i> e <i>Bipolaris</i> spp.....	32

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1:</b> Biomassa e nodulação de soja ( <i>Glycine max</i> L.) inoculada com <i>Bacillus subtilis</i> com e sem adubação com fosfato natural.....	45
<b>Tabela 2:</b> Biomassa e nodulação de feijão caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) inoculada com <i>Bacillus subtilis</i> com e sem adubação com fosfato natural.....	46
<b>Tabela 3:</b> Valores médios de fósforo no solo cultivado com soja inoculados com <i>B. subtilis</i> com e sem adubação com fosfato natural.....	49
<b>Tabela 4:</b> Valores médios de fósforo no solo cultivado com feijão caupi inoculados com <i>B. subtilis</i> com e sem adubação com fosfato natural.....	50
<b>Tabela 5:</b> Valores médios de teor de fósforo na parte aérea (P) e eficiência de utilização de fósforo (EFU-P) em soja inoculados com <i>B. subtilis</i> com e sem adubação com fosfato natural.....	51
<b>Tabela 6:</b> Valores médios de teor de fósforo na parte aérea (P) e eficiência de utilização de fósforo (EFU-P) em feijão caupi inoculados com <i>B. subtilis</i> com e sem adubação com fosfato natural.....	52

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1:</b> Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), em milho inoculado com <i>Bacillus subtilis</i> . Experimento.....	64
<b>Tabela 2:</b> Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), em milho inoculado com <i>Bacillus subtilis</i> . Experimento 2.....	65

## CAPÍTULO IV

<b>Tabela 1:</b> Análise química do solo do experimento na Estação Experimental da UFT, Campus de Gurupi, TO.....	73
<b>Tabela 2:</b> Análise química do solo do experimento na Fazenda Nova Fronteira em Araguaçu, TO.....	73
<b>Tabela 3:</b> Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), em soja inoculado com <i>Bacillus subtilis</i> , cultivada na estação experimental da UFT Campus de Gurupi.....	76
<b>Tabela 4:</b> Estande inicial (EI), estande final (EF), sobrevivência, eficácia e produtividade de soja Monsoy-M 9144 RR, inoculada com <i>B. subtilis</i> , Estação Experimental da UFT, Campus de Gurupi, TO. Safra 2013/2014.....	77
<b>Tabela 5:</b> Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), em soja inoculado com <i>Bacillus subtilis</i> , cultivada na estação experimental na Fazenda Nova Fronteira, Araguaçu.....	78
<b>Tabela 6:</b> Estande inicial (EI), estande final (EF), sobrevivência, eficácia e produtividade de soja Monsoy-M 9144 RR, inoculada com <i>B. subtilis</i> , na Fazenda Nova Fronteira, Araguaçu. TO. Safra 2013/2014.....	78

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Atividade antagonista <i>in vitro</i> com isolados de <i>B. subtilis</i> contra os fungos patogênicos <i>Fusarium subglutinans</i> , <i>Bipolaris</i> spp. e <i>Curvularia lunata</i> , pela produção de metabólitos termoestáveis.....	33
--	----

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Eficiência relativa da soja e feijão caupi, inoculados com isolados de <i>Bacillus subtilis</i> com e sem adubação de fosfato natural em relação à testemunha sem inoculação.....	48
--	----

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1.</b> Eficiência relativa de milho aos 20 DAE, inoculado com <i>Bacillus subtilis</i> em relação à testemunha sem inoculação. Experimento 1.....	65
<b>Figura 2.</b> Eficiência relativa de milho aos 35 DAE, inoculado com <i>Bacillus subtilis</i> em relação à testemunha sem inoculação. Experimento 2.....	66



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado tocantinense tem sido utilizado para o cultivo de culturas agrícolas de grande importância para o país, tal como a soja, milho e arroz. Apresenta solos aptos para o cultivo, se destacando no setor agropecuário. Apesar da produção de soja no estado do Tocantins ter alto potencial de crescimento a cada ano, alguns fatores limitam a obtenção de altos rendimentos, com destaque para as fitopatologias causadas por fungos. O ataque de doenças em plantas tem grande importância econômica, podendo ocasionar perdas parciais ou totais em diferentes regiões produtoras do país devido a práticas de manejo, condições biológicas e edafoclimáticas.

As doenças causadas por patógenos que habitam o solo estão entre os principais fatores de baixa produtividade de culturas agrícolas, e que podem provocar prejuízos severos com perdas significativas na produtividade.

Para o tratamento de sementes são usados diferentes produtos, bem como aplicações via foliar, tornando-se práticas agrícolas rotineiras, principalmente o uso de fungicidas e inseticidas. O controle através de produtos químicos não tem atingido resultados esperados e tem se tornado inviável, considerando aspectos ecológicos e possíveis efeitos em inoculantes utilizados visando à fixação biológica do nitrogênio em espécies leguminosas. Também devem ser considerados os efeitos negativos para o meio ambiente, para o agro-ecossistema, incluindo a inibição de polinizadores, predadores úteis / parasitóides e comunidades microbianas benéficas, bem como para o produtor e consumidor final (BERNARDES et al., 2010; WOO et al., 2014).

O uso de microrganismos benéficos pode ser uma opção ambientalmente saudável para aumentar a produtividade das culturas e a redução da incidência de doenças. Os microrganismos são responsáveis por diversas transformações químicas envolvidas no processo de ciclagem de nutrientes para as plantas. As Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) colonizam as raízes de plantas e induzem um aumento no crescimento vegetal. Entre os mecanismos pelo qual RPCP podem exercer efeitos benéficos nas plantas estão a absorção de nutrientes, principalmente o fósforo, através da solubilização de fosfatos, síntese de fitohormônios tal como o ácido indol acético (AIA) (VESSEY, 2003), assim como o controle dos efeitos

deletérios de patógenos pela produção de substâncias inibitórias produzidas, excluindo-os das raízes pela concorrência ou por indução de resistência sistêmica (COMPANT et al., 2005).

Estirpes do gênero *Bacillus* estão entre mais comumente estudadas como RPCP. Espécies deste gênero tem apresentado a capacidade para a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e antifúngica contra microrganismos fitopatogênicos (ASAKA & SHODA, 1996; COMPANT et al., 2005). A espécie *Bacillus subtilis* tem um grande potencial como biocontrole devido a múltiplos mecanismos entre eles a antibiose (LANNA FILHO et al., 2010).

Produtos para o biocontrole de doenças de plantas contendo *B. subtilis* têm sido utilizado nos últimos anos no tratamento de sementes e via foliar de várias culturas. Porém, espécies de *B. subtilis* que compõem inoculantes comerciais podem não sobreviver em solos locais devido as diferentes condições edáficas e climáticas, ou ser superado através de uma melhor adaptação bacteriana nativa durante a colonização vegetal, podendo resultar em mau desempenho de RPCP (BASHAN, 1998; JOHNSON et al., 1998). Assim, o isolamento e seleção de estirpes de *B. subtilis* nativos é justificado.

Desta forma, a discussão do isolamento e seleção de estirpes nativas de *B. subtilis* é importante, considerando o impacto econômico da adoção da tecnologia de uso de inoculantes para o controle biológico e, principalmente, como promotores do crescimento vegetal. Assim, é de extrema importância a geração de novos inoculantes isolados de regiões de interesse, para a disseminação do uso de inoculantes produzidos com isolados de *B. subtilis* como promotores de crescimento para culturas estratégicas para o Cerrado.

Dessa forma, o projeto buscou a seleção de *B. subtilis* isolados de solos de cerrado para o desenvolvimento de inoculantes utilizando *B. subtilis* com potencial não só para o controle biológico de fitopatógenos, mas como promotor do crescimento vegetal, visando o direcionamento para uso de inoculantes para a região do cerrado em culturas estratégicas, em função dos resultados desta pesquisa, atingindo novas áreas em potencial para o uso dos produtos gerados (inoculantes).

Com isso, o trabalho é apresentado em quatro capítulos com os respectivos objetivos:

Capítulo I: Avaliar o controle biológico *in vitro* de isolados de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp;

Capítulo II: Avaliar a promoção de crescimento e solubilização de fosfato por *Bacillus subtilis* na cultura da soja e feijão caupi em casa de vegetação;

Capítulo III: Avaliar o *Bacillus subtilis* como promotor do crescimento de milho em casa de vegetação;

Capítulo IV: Efeito de *Bacillus subtilis* na biomassa e produtividade na cultura da soja em campo.

## 2. CAPÍTULO I

### CONTROLE BIOLÓGICO *in vitro* DE ISOLADOS DE *Bacillus subtilis* CONTRA *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp.

#### RESUMO

Considerando as perdas causadas por doenças em diversas culturas, as rizobactérias se apresentam como uma alternativa para manejar esses patógenos. O trabalho teve por finalidade avaliar a potencialidade antagonista de isolados de *Bacillus subtilis* aos fungos fitopatogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp. Foram estudados sete isolados de *B. subtilis* e seus efeitos antagonísticos nos fungos fitopatogênicos utilizando quatro métodos (técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista, pareamento direto, pareamento com risco no centro da placa e técnica de círculo). Também foram avaliados os efeitos de metabólitos voláteis e termoestáveis desses isolados. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições. As avaliações foram feitas aos três, seis, nove e doze dias para os quatro métodos e aos seis e doze dias para avaliação de metabólitos voláteis e termoestáveis, onde foram medidos o diâmetro da colônia e calculado o PCI (porcentagem de inibição de crescimento) do patógeno. Os isolados de *B. subtilis* UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram eficazes na inibição de crescimento micelial dos fungos patogênicos *F. subglutinans*, *C. lunata* e *Bipolaris* spp. pelos quatro métodos. Os isolados UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 inibiram por metabólitos voláteis o crescimento micelial de *F. subglutinans*. Os isolados UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram capazes de inibir o crescimento micelial de *F. subglutinans*, *C. lunata* e *Bipolaris* spp. por metabólitos termoestáveis, considerando assim a antibiose um mecanismo de ação.

**Palavras-chaves:** Biocontrole, Rizobactérias, Antagonismo.

**BIOLOGICAL CONTROL *in vitro* OF *Bacillus subtilis* ISOLATED on *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* and *Bipolaris* spp.**

**ABSTRACT**

Considering the losses caused by diseases in many cultures, rhizobacteria present themselves as an alternative for managing these pathogens. The work aimed to evaluate the potential antagonist of *Bacillus subtilis* isolates to pathogenic fungi *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* and *Bipolaris* spp. Seven were studied isolates of *B. subtilis* and its antagonistic effect on pathogenic fungi using four methods (fungal culture technique on culture antagonist, direct pairing, pairing with risk in the center of the plate and circle technique). Was also evaluated effect of volatile metabolites and thermostable these isolates. The experimental design was completely randomized with three repetitions. The assessments took the tree, six, nine and twelve day for the four methods and the six and twelve day to evaluate volatile metabolites and thermostable, which were measured the diameter of the colony and calculated the PGI (percentage growth inhibition) of the pathogen. *B. subtilis* isolates UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 and UFTBs 07 were effective in inhibiting mycelial growth of pathogenic fungi *F. subglutinans*, *C. lunata* and *Bipolaris* spp. by four methods. Isolated UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 and UFTBs 07 inhibited by volatile metabolites mycelial crecimiento of *F. subglutinans*. Isolated UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 and UFTBs 07 they were able to inhibit the mycelial growth of *F. subglutinans*, *C. lunata* and *Bipolaris* spp. by thermostable metabolites, so considering the antibiose the mechanism of action.

**Keywords:** Biocontrol, Rhizobacteria, Antagonism.

## INTRODUÇÃO

As principais culturas agrícolas cultivadas no Brasil são constantemente afetadas por diversas doenças de importância econômica, que podem ser de origem bacteriana, fúngica, virótica ou causada por nematoides. Essas doenças levam a diminuição na produção podendo chegar até a perda total da lavoura, causando assim grandes danos econômicos aos produtores. Dentre as doenças mais preocupantes estão àquelas causadas por fungos que atacam desde o início da cultura até o final do ciclo afetando todas as partes da planta. Entre os fungos causadores de doenças se encontra o *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp.

O gênero *Fusarium* compreende um grande grupo heterogêneo de fungos que provoca doenças em diversas plantas, como por exemplo o abacaxizeiro, danificando tanto a qualidade como a quantidade dos seus produtos, sendo portanto economicamente prejudicial (MATARESE et al., 2012). O fungo *Fusarium subglutinans* é o agente causador da fusariose no abacaxi, e tem como principal característica a capacidade de infectar frutos e mudas do abacaxizeiro (MATOS et al., 2010).

A *Curvularia lunata* é considerado um patógeno importante em algumas culturas causando danos severos, entre as doenças causadas pelo fungo *C. lunata* se encontra a manchas-das-glumas no arroz. Os sintomas característicos da doença são o apodrecimento dos bulbos e as manchas nas hastes e flores (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005).

Fungos do gênero *Bipolaris* atacam uma grande quantidade de espécies vegetais, e são importantes patógenos de sementes. Entre as espécies causadoras de doenças se encontra *Bipolaris oryzae* fungo causador da mancha parda no arroz. A mancha parda ataca o coleóptilo, folhas, bainha, ramificações das panículas, glumelas e grãos (LOBO et al., 2006).

O método frequente utilizado para o controle desses fitopatógenos é o químico. Entretanto o intensivo uso de produtos químicos nas últimas décadas vem criando inúmeros problemas, tais como: resistência microbiana adquirida, contaminação ambiental (água, solo, produtor e consumidor) e elevação dos custos de produção. Assim torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas de controle desses fitopatógenos. Dentre as alternativas estudadas, atualmente,

destaca-se o controle biológico por meio de microrganismos antagonistas (MOREIRA et al., 2008; SANTOS & SILVIA, 2014). A grande diversidade de microrganismos, bem como suas relações antagônicas, é uma grande ferramenta para o controle biológico aplicado. Particularmente para bactérias, muitas pesquisas vêm sendo realizados para elucidar as interações entre antagonista-patógeno-hospedeiro (HALFELD-VIEIRA et al., 2006; RYAN et al., 2008).

Entre esses microrganismos se encontra as rizobactérias promotoras de crescimento de planta (RPCPs), são bactérias que vivem e colonizam a rizosfera, e que promovem crescimento das plantas associadas numa relação não simbiótica (SOTERRO, 2013). Um dos gêneros de rizobactérias com poder antagonista de maior relevância é o *Bacillus*, que se destaca por formar endósporo resistentes a condições adversas e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos, possibilitando dessa forma, a sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação para driblar e inibir as defesas dos fitopatógenos. A espécie *B. subtilis* tem um grande potencial como biocontrole devido a múltiplos mecanismos entre eles a antibiose (LANNA FILHO et al., 2010).

Dorighello (2013) em seu trabalho observou o controle biológico da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) com isolados de *B. subtilis*, constatando que os isolados de *B. subtilis* (QST 713 e AP-3) reduziram significativamente a germinação dos uredósporos, e em casa de vegetação os isolados de *B. subtilis* (QST 713, AP-3 e AP-51) reduziram a severidade da doença no teste de folhas destacadas.

Tendo em vista as propriedades antipatogênicas do *Bacillus subtilis* o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antagonista *in vitro* de isolados de *B. subtilis* contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp., visando seu emprego e seleção para controle de doenças fúngicas em plantas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Tocantins – UFT, câmpus de Gurupi, durante o período de janeiro a Maio de 2015. Após a repicagem, os isolados foram submetidos a três

ensaios distintos *in vitro* que avaliaram a ação antagônica dos isolados de *Bacillus subtilis*.

### **Obtenção e procedência dos isolados fitopatogênicos**

Os fungos fitopatogênicos utilizados foram da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFT, Câmpus de Gurupi. Os fungos *Fusarium subglutinans* e *Curvularia lunata* foram isolados do fruto do abacaxizeiro e do tomateiro, respectivamente, cultivadas no estado do Tocantins e com sintomas característicos das respectivas doenças. O fungo *Bipolaris* spp. Foi isolado de grãos armazenados de feijão. Todos os fungos fitopatogênicos foram identificados morfologicamente conforme BARNETT (1960).

Para o início dos experimentos *in vitro* os patógenos foram mantidos em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por sete dias de incubação, em câmara de crescimento (B.O.D) sob fotoperíodo de 12 h à temperatura de  $25 \pm 2$  °C (SALGADO et al., 2003).

### **Isolados de *Bacillus subtilis***

Foram utilizados nos testes sete isolados de *Bacillus subtilis* da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFT, Campu de Gurupi. Esses isolados foram obtidos de solos de cerrado em áreas de cultivos no Estado do Tocantins, e identificados conforme metodologia pela análise do perfil dos ácidos graxos (SASSER, 2001). Os isolados foram mantidos em meio estoque LB (Luria-Bertani) e repicados em meio LB e BDA.

### **Antagonismo de *Bacillus subtilis* por diferentes métodos**

No presente estudo, a atividade antagonista dos sete isolados de *Bacillus subtilis* foi testada contra os fungos patogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp., utilizando-se quatro métodos. Os sete isolados de *B. subtilis* foram colocados em crescimento em meio líquido LB sobre agitador mecânico tipo shaker em agitação com velocidade de 140 rpm à 27 °C durante três dias. Os fungos fitopatogênicos foram colocados em crescimento em meio BDA modificado, conforme FIGUEIREDO et al. (2010).

No método 1 foi utilizado a técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista. Após três dias de crescimento dos isolados de *B. subtilis*, os inóculos

foram plaqueados em meio BDA com o auxílio de uma alça de platina. Em seguida, discos de 7 mm contendo meio de cultura com colônias de cada fungo fitopatogênico com sete dias de crescimento, medindo aproximadamente 7 cm de diâmetro, foram colocados no centro das placas.

No método 2 foi utilizada a técnica de cultura pareada, os fungos fitopatogênicos foram colocados em crescimento em meio BDA e com sete dias de crescimento dos fungos fitopatogênicos foi levado um disco de 7 mm contendo a cultura e colocado à 1,5 cm da borda da placa contendo meio BDA e na outra extremidade foi colocado 3 µL do isolado de *B. subtilis* (MELO & VALARINI, 1995).

No Método 3 se utilizou a técnica de pareamento com risco no centro da placa conforme descrito por Dennis e Webster (1971) com algumas modificações. Para isso, o isolado fúngico foi transferido com sete dias de crescimento com estilete flambado para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. Discos do meio colonizado com o fungo de aproximadamente 7,0 mm foram colocados nos dois centros de cada metade das placas. Os isolados de *Bacillus* foram inoculados com o auxílio de uma alça de platina, fazendo um risco no centro da placa, com exceção das placas controle (testemunha).

No método 4 foi utilizada a técnica de círculo, transferiu-se assepticamente para placas de petri um disco de 7,0 mm de diâmetro com micélio do fitopatógeno, colocando-se no centro da placa. Com auxílio de uma alça de platina, inoculou-se a bactéria, na mesma placa formando um círculo com diâmetro de aproximadamente de 4 cm, em torno do disco do patógeno. Para o tratamento controle ou testemunha foi utilizado somente fitopatógeno cultivado em meio BDA (MARIANO, 1993).

Todos os experimentos foram feitos em triplicatas. Após os procedimentos os experimentos foram incubados em câmara de crescimento (B.O.D) sob fotoperíodo de 12 h à temperatura de  $25 \pm 2$  °C (SALGADO et al., 2003). As avaliações foram feitas no terceiro, sexto, nono e décimo segundo dia após a repicagem. Para a avaliação foram efetuadas medições do diâmetro das colônias, em três sentidos diametralmente opostos, com auxílio de um paquímetro, definindo-se uma média para cada colônia.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela fórmula de Menten et al. (1976), onde:  $PIC = [(Crescimento da testemunha - Crescimento tratamento) / Crescimento da testemunha] \times 100$ . Os tratamentos onde não obtiveram inibição de crescimento receberam nota zero

### **Avaliação da produção de metabólitos termoestáveis mediados por *B. subtilis***

No método para detecção qualitativa de antibióticos (MDA), conforme Lima et al. (2014) adaptado de KUPPER et al. (2003), foram preparadas alíquotas de 200 ml de meio BD (Batata-Dextrose) em frascos de Erlenmeyer e colocados discos de meio BDA contendo a cultura dos isolados de *B. subtilis*, com sete dias de crescimento. Os frascos permaneceram durante 15 dias, sem agitação. Após esse período, foram adicionadas 4 g de Ágar em cada frasco, e estes autoclavados por 20 minutos a 120 °C, e o caldo agarizado foi vertido em placas de Petri de 8 cm de diâmetro. No centro das placas foram colocados discos de 7 mm da cultura de *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp., em seguida incubados em câmara de crescimento B.O.D sob fotoperíodo de 12 h à temperatura de  $25 \pm 2$  °C. As avaliações se deram ao sexto e ao décimo segundo dia, medindo-se em três sentidos diametralmente opostos com auxílio de um paquímetro, definindo-se uma média para cada colônia. Os diâmetros das colônias do patógeno foram comparados com a testemunha, cujo patógeno se desenvolveu em meio BDA, sem a presença do caldo agarizado autoclavado.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada, também, pela fórmula de Menten et al. (1976), os tratamentos onde não obtiveram inibição de crescimento receberam nota zero.

### **Avaliação de metabólitos voláteis**

Utilizou-se metodologia modificada semelhante à apresentada por Bharat et al. (1980). Foram utilizadas placas de Petri divididas ao meio onde foi vertido meio BDA. Em um lado da placa foi colocado disco de micélio de 7 mm do fungo patogênico, e no outro lado disco de aproximadamente 7 mm com a cultura antagonista dos isolados de *B. subtilis*. Em seguida as placas foram vedadas com plástico filme e incubados em câmara de crescimento B.O.D sob fotoperíodo de 12 h à temperatura de  $25 \pm 2$  °C. As avaliações se deram ao sexto e décimo segundo dia, medindo-se em três sentidos diametralmente opostos com auxílio de um paquímetro, definindo-se uma média para cada colônia.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada, também, pela fórmula de Menten et al. (1976), os tratamentos onde não obtiveram inibição de crescimento receberam valor zero.

Para todos os experimentos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 repetições e os dados analisados pelo teste de Tukey a 5% probabilidade (SILVIA, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *B. subtilis* x *F. subglutinans*

No experimento onde se avaliou o efeito antagonista dos sete isolados de *Bacillus subtilis* pelos quatro métodos contra fungo fitopatogênico *Fusarium subglutinans*, alguns isolados mostraram efeito inibidor no crescimento micelial do fungo (Tabela 1). O primeiro método utilizou a técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista, e dos isolados testados quatro deles (UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07) foram superiores ( $p < 0,05$ ) a testemunha a partir do nono dia de incubação (Tabela 1) com percentagem de inibição do crescimento micelial (PCI) superior a 50%.

No segundo método, onde foi o método de pareamento, o isolado UFTBs 03 se mostrou estatisticamente superior à testemunha ao inibir o crescimento micelial do fungo ao decimo segundo dia de crescimento, com um PCI de 45,2%. No terceiro método (técnica de pareamento com risco no centro da placa) ao décimo segundo dia os isolados UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 se mostraram superiores ao inibir o crescimento micelial do patógeno em relação à testemunha (Tabela 1), com PCI variando de 35,4 a 55 %.

**Tabela 1:** Inibição do crescimento micelial de *Fusarium subglutinans* por isolados de *Bacillus subtilis*.<sup>1</sup>

Tratamento	3 dias de incubação		6 dias de incubação		9 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)
<b>Método 1</b>								
UFTBs 01	37,1 a	0,0	65,0 a	0,0	70,0 a	0,0	70,0 a	0,0
UFTBs 02	35,5 a	0,0	65,0 a	0,0	70,0 a	0,0	70,0 a	0,0
UFTBs 03	13,9 bc	46,9	17,4 c	54,9	20,7 d	57,8	34,3 d	37,7
UFTBs 04	22,3 bc	15,3	29,8 bc	29,3	44,6 bc	9,2	47,1 bc	14,4
UFTBs 05	11,6 c	55,8	25,8 bc	33,0	20,7 d	57,8	22,6 e	58,9
UFTBs 06	14,9 bc	43,1	14,0 c	63,6	19,0 d	61,2	20,5 e	62,7
UFTBs 07	16,2 bc	38,4	24,0 bc	37,7	36,2 c	26,4	42,1 cd	23,5
Testemunha	26,3 ab		38,6 b		49,2 b		55,1 b	

CV (%)	30,5	30,5	15,5	14,5				
<b>Método 2</b>								
UFTBs 01	19,8 ab	24,5	65,0 a	0,0	65,0 a	0,0	65,0 a	0,0
UFTBs 02	36,4 a	0,0	65,0 a	0,0	63,0 a	0,0	65,0 a	0,0
UFTBs 03	17,6 b	33,0	18,0 c	53,4	26,9 b	45,2	34,2 b	37,9
UFTBs 04	23,9 ab	9,0	29,8 bc	22,7	53,3 a	0,0	55,0 a	0,1
UFTBs 05	29,0 ab	0,0	29,8 bc	22,7	52,9 a	0,0	50,2 a	8,7
UFTBs 06	32,9 ab	39,3	16,0 c	58,5	55,8 a	0,0	55,6 a	0,0
UFTBs 07	35,4 ab	3,4	25,0 bc	35,1	53,0 a	0,0	53,3 a	3,2
Testemunha	26,3 ab		38,6 b		49,2 a		55,1 a	
CV (%)	33,1	30,5	17,8	15,0				
<b>Método 3</b>								
UFTBs 01	27,4 ab	0,0	39,1 ab	0,0	46,8 ab	4,8	48,6 ab	11,6
UFTBs 02	35,4 a	0,0	48,8 a	0,0	51,1 a	0,0	52,2 a	5,2
UFTBs 03	21,7 b	17,4	25,2 b	34,5	31,6 c	35,7	33,3 de	39,5
UFTBs 04	32,6 ab	0,0	38,4 ab	0,5	39,6 ab	19,4	42,8 bc	22,2
UFTBs 05	22,9 ab	12,9	25,5 b	33,8	28,4 c	42,2	24,7 e	55,0
UFTBs 06	27,2 ab	0,0	31,4 ab	18,6	33,7 c	31,4	33,9 cd	38,3
UFTBs 07	25,8 ab	1,7	38,0 ab	1,6	36,0 bc	26,7	35,5 cd	35,4
Testemunha	26,3 ab		38,6 ab		49,2 a		55,1 a	
CV (%)	25,5	27,0	16,4	12,5				
<b>Método 4</b>								
UFTBs 01	25,3 ab	3,9	59,6 a	0,0	65,6 a	0,0	64,1 a	0,0
UFTBs 02	31,6 a	0,0	58,3 a	0,0	63,6 a	0,0	63,0 ab	0,0
UFTBs 03	19,7 ab	24,9	29,8 b	22,7	37,5 bc	23,7	41,9 cd	23,8
UFTBs 04	28,9 ab	0,0	59,9 a	0,0	63,2 a	0,0	62,5 ab	0,0
UFTBs 05	18,5 ab	29,7	30,5 b	21,0	37,8 bc	23,0	46,7 bc	15,1
UFTBs 06	12,1 b	53,8	19,5 b	49,5	21,0 c	57,3	28,8 d	47,6
UFTBs 07	15,5 ab	41,0	21,6 b	43,9	34,0 bc	29,6	40,6 cd	26,2
Testemunha	26,3 ab		38,6 ab		49,2 ab		53,1 ab	
CV (%)	43,9	35,3	24,0	17,9				

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

<sup>2</sup> PCI = Percentagem de inibição do crescimento micelial.

Método 1: técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonística; Método 2: técnica de pareamento direto; Método 3: técnica de pareamento com risco no centro da placa; Método 4: técnica de círculo.

Na técnica de círculo (Método 4), o isolado UFTBs 03, UFTBs 06 e UFTBs 07 mostram superiores estatisticamente a testemunha a partir ao decimo segundo dia de incubação (Tabela 1), com PCI variando de 23,8 a 47,6%.

Os isolados de *B. subtilis* podem ter atuado de diferentes formas e mecanismos para inibir o patógeno *Fusarium subglutinans*, como pela produção de

compostos voláteis, antibiose (produção de antibióticos e antifúngicos) e competição, podendo agir de forma isolada ou com todos esses mecanismos. Lima et al. (2014) em seu trabalho avaliou 10 isolados de *Bacillus* spp. e seu efeito antagonista em *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* agente causador da fusariose no tomateiro, utilizando a técnica de círculo, onde todos isolados mostraram efeito inibidor ao patógeno avaliado. Melo e Valarini (1995) ao avaliarem o antagonismo de dois isolados de *B. subtilis* (Isolado OG e 5G) pelo método de pareamento verificou que todos os dois isolados inibiram significativamente o crescimento micelial de *Fusarium solani* causador da podridão radicular do pepino, tendo uma percentagem de inibição do crescimento micelial de 71,7 e 53,3% em relação à testemunha, reforçando assim o potencial biocontrolador dessas bactérias ao gênero patogênico *Fusarium*.

### ***B. subtilis* x *Bipolaris* spp.**

No experimento para avaliação do efeito antagonista dos isolados de *B. subtilis* sobre o fungo patogênico *Bipolaris* spp., no primeiro método até o terceiro dia de incubação todos os isolados inibiram o crescimento do patógeno superior ( $p < 0,05$ ) a testemunha, após o sexto dia os isolados que inibiram o crescimento do *Bipolaris* spp. até os doze dias foram UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 (Tabela 2), chegando a um PCI de 78,6%.

No (método 2) até o terceiro dia de incubação todos os tratamentos se diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da testemunha (Tabela 2). Aos doze dias apenas os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram superiores ( $p < 0,05$ ) a testemunha (Tabela 2), com PCI variando de 17,7 a 25,1%.

No aos doze dias de incubação todos os isolados inibiram o crescimento do patógeno (Tabela 2), com PCI variando de 17,9 a 55,1%. Pelo método 4 os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 foram capaz de inibir o crescimento micelial do patógeno superior a testemunha aos doze dia (Tabela 2), chegando a um PCI de ate 81,8%.

**Tabela 2:** Inibição do crescimento micelial de *Bipolaris* spp., por isolados de *Bacillus subtilis*.<sup>1</sup>

Tratamento	3 dias de incubação		6 dias de incubação		9 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI <sup>2</sup> (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)
<b>Método 1</b>								
UFTBs 01	29,1 b	24,4	50,7 a	4,7	56,6 a	14,1	62,9 a	3,8
UFTBs 02	30,8 b	19,9	55,1 a	0,0	62,9 a	4,5	63,9 a	5,2
UFTBs 03	12,8 d	66,6	12,9 b	75,6	14,8 b	77,5	14,9 b	77,8
UFTBs 04	29,1 b	24,4	52,0 a	2,2	57,2 a	13,2	66,4 a	1,6
UFTBs 05	12,7 d	66,8	13,06 b	75,4	15,4 b	76,6	14,4 b	78,6
UFTBs 06	17,3 c	55,0	16,5 b	68,9	18,4 b	72,0	18,9 b	71,9
UFTBs 07	12,3 d	68,0	12,7 b	76,0	15,8 b	75,9	15,5 b	77,0
Testemunha	38,5 a		53,2 a		65,9 a		67,5 a	
CV (%)	6,9		18,0		17,9		9,3	
<b>Método 2</b>								
UFTBs 01	31,6 bc	17,9	49,1 ab	7,8	57,2 ab	13,0	66,6 a	1,4
UFTBs 02	30,3 bc	21,3	43,9 b	17,5	50,5 b	23,2	59,3 ab	12,3
UFTBs 03	28,9 c	24,8	43,1 b	18,9	49,7 b	24,4	55,6 b	17,7
UFTBs 04	30,6 bc	19,9	45,6 b	14,3	57,8 ab	12,1	67,2 a	0,6
UFTBs 05	33,1 b	13,9	43,9 b	17,4	48,2 b	26,7	50,6 b	25,1
UFTBs 06	31,6 bc	17,8	46,1 b	13,3	51,8 b	21,2	54,7 b	19,0
UFTBs 07	28,3 c	26,5	42,5 b	20,1	48,4 b	26,4	50,6 b	25,1
Testemunha	38,5 a		53,2 a		65,8 a		67,6 a	
CV (%)	5,9		7,4		10,5		9,0	
<b>Método 3</b>								
UFTBs 01	34,3 ab	10,9	40,2 b	24,4	49,8 b	24,2	54,9 b	18,7
UFTBs 02	30,9 bc	19,7	41,3 b	22,4	49,8 b	24,2	55,5 b	17,9
UFTBs 03	18,5 e	51,9	26,9 c	49,3	29,2 cd	55,5	30,3 d	55,1
UFTBs 04	36,2 a	5,9	39,4 b	25,8	45,7 b	30,5	55,4 b	17,9
UFTBs 05	22,6 de	41,2	27,6 c	48,1	26,3 d	60,0	31,2 d	53,7
UFTBs 06	23,5 de	38,9	31,1 c	41,5	32,4 cd	50,7	38,2 cd	43,4
UFTBs 07	27,4 cd	28,6	31,1 c	41,4	35,1 c	46,6	39,4 c	41,7
Testemunha	38,5 a		53,2 a		65,8 a		67,6 a	
CV (%)	9,4		12,2		9,8		9,4	
<b>Método 4</b>								
UFTBs 01	44,9 b	0,0	60,6 a	0,0	66,0 a	0,0	66,8 a	1,1
UFTBs 02	40,4 c	0,0	59,5 a	0,0	66,0 a	0,0	67,3 a	0,4
UFTBs 03	9,9 e	74,1	10,7 d	79,7	12,1 c	81,5	12,3 c	81,8
UFTBs 04	48,4 a	0,0	58,4 ab	0,0	65,6 a	0,30	66,9 a	0,9
UFTBs 05	12,1 de	68,5	14,8 cd	72,0	12,9 b	80,3	15,5 b	77,0
UFTBs 06	13,9 d	63,7	16,4 c	69,1	16,9 b	74,2	16,9 b	75,4
UFTBs 07	9,7 e	74,6	11,2 cd	78,9	12,4 b	81,1	13,0 c	80,7
Testemunha	38,5 c		53,2 b		65,8 a		67,6 a	
CV (%)	5,9		8,4		4,7		2,3	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

<sup>2</sup> PCI = Percentagem de inibição do crescimento micelial.

Método 1: técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonística; Método 2: técnica de pareamento direto; Método 3: técnica de pareamento com risco no centro da placa; Método 4: técnica de círculo.

Os mecanismos pelos quais esses isolados podem ter inibido o crescimento micelial do *Bipolaris* spp., são os mesmos que foram citados anteriormente para o *F. subglutinans*, entre eles o mais frequente é pela ação de antibiose. Segundo Kupper et al. (2003) os microrganismos que agem por antibiose possuem um grande espectro de ação, de forma que ao inibir fungos patogênicos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação. Isolados de *B. subtilis* tem capacidade de produzir uma grande gama de metabólitos antifúngicos, entre os quais se encontram lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina (LANNA FILHO et al., 2010). Quando o isolado bacteriano entra em contato com o patógeno permite que o antagonismo se manifeste, mesmo pela produção de antibióticos ou pela competição por espaço e nutrientes.

Pascoal e Aguiar (2014) em seu trabalho isolaram e identificaram 54 bactérias endofíticas do arroz como sendo a maioria do gênero *Bacillus* spp., onde foram testadas utilizando a técnica de pareamento direto contra o fungo fitopatogênico *Bipolares* spp., no qual seis isolados tiveram ação antagônica contra a espécie patogênica.

### ***B. subtilis* x *C. lunata***

Na avaliação da capacidade antagônica dos isolados de *B. subtilis* em relação ao fungo *Curvularia lunata* utilizando os quatro métodos. No método 1, ao terceiro dia de crescimento todos os isolados inibiram o crescimento do patógeno. Aos doze dias de incubação os isolados que foram capazes de inibir o crescimento do patógeno foram os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 (Tabela 3), com um PCI variando de 15,2 a 85,5%.

Utilizando o método 2 aos doze dias os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram superiores ( $p < 0,05$ ) a testemunha e aos outros

isolados ao inibir o crescimento micelial do patógeno (Tabela 3), chegando a um PCI de 43,3%.

**Tabela 3:** Inibição do crescimento micelial de *Curvularia lunata*, por isolados de *Bacillus subtilis*.<sup>1</sup>

Tratamento	3 dias de incubação		6 dias de incubação		9 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI <sup>2</sup> (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)
<b>Método 1</b>								
UFTBs 01	26,5 b	31,1	64,9 b	13,9	71,5 ab	8,2	77,0 a	2,1
UFTBs 02	23,1 b	40,0	58,8 bc	22,1	69,4 b	10,9	75,7 a	3,8
UFTBs 03	12,1 c	68,4	10,8 d	85,6	13,8 d	82,2	14,3 c	81,8
UFTBs 04	27,9 b	27,4	73,8 a	2,6	75,6 ab	2,9	76,6 a	2,6
UFTBs 05	8,7 c	77,2	9,7 d	87,1	10,2 d	86,9	11,40 c	85,5
UFTBs 06	25,6 b	33,4	52,4 c	30,5	59,0 c	24,2	66,7 b	15,2
UFTBs 07	11,9 c	69,0	13,2 d	82,5	16,8 d	78,3	13,4 c	82,9
Testemunha	38,5 a		75,5 a		77,9 a		78,7 a	
CV (%)	13,8		11,1		8,9		7,1	
<b>Método 2</b>								
UFTBs 01	31,6 b	17,9	58,8 bc	22,0	61,4 abc	21,2	73,8 a	6,1
UFTBs 02	31,9 b	17,0	68,7 ab	8,9	71,3 a	8,5	75,8 a	3,6
UFTBs 03	26,4 c	31,4	47,1 cd	37,6	44,5 c	42,9	54,7 bc	30,4
UFTBs 04	31,4 b	18,4	56,0 c	25,7	65,5 ab	15,9	72,4 a	8,0
UFTBs 05	31,5 b	18,2	55,3 c	26,7	51,4 bc	34,0	60,3 b	23,3
UFTBs 06	25,3 c	34,3	49,5 cd	34,4	51,8 bc	33,4	50,8 bc	35,4
UFTBs 07	27,3 c	29,1	40,3 d	46,6	42,7 c	45,3	44,6 c	43,3
Testemunha	38,5 a		75,5 a		77,9 a		78,7 a	
CV (%)	6,9		11,3		11,7		9,6	
<b>Método 3</b>								
UFTBs 01	51,5 a	0,0	51,6 b	31,6	53,7 b	31,1	59,9 b	23,8
UFTBs 02	48,2 ab	0,0	48,2 bc	35,7	51,5 b	33,9	61,7 b	21,5
UFTBs 03	36,0 d	6,4	34,4 d	48,9	34,6 c	55,5	39,8 c	49,4
UFTBs 04	47,7 ab	0,0	47,7 bc	36,7	51,6 b	33,8	65,3 b	16,9
UFTBs 05	39,7 bc	0,0	39,4 cd	47,7	36,9 c	52,6	41,8 c	46,8
UFTBs 06	38,6 cd	0,0	38,6 cd	48,8	39,2 c	49,6	44,8 c	43,0
UFTBs 07	37,9 d	1,4	37,9 cd	49,7	38,7 c	50,9	40,4 c	48,6
Testemunha	38,5 cd		75,5 a		77,9 a		78,7 a	
CV (%)	12,0		11,9		12,0		11,9	
<b>Método 4</b>								
UFTBs 01	42,3 ab	0,0	62,8 b	16,8	72,8 a	6,5	75,5 ab	4,0
UFTBs 02	44,3 a	0,0	60,3 b	20,1	75,6 a	2,9	74,4 ab	5,4
UFTBs 03	8,0 c	79,2	9,3 c	87,6	12,7 b	83,6	12,5 c	84,0
UFTBs 04	44,8 a	0,0	63,6 b	15,7	72,3 a	7,2	73,0 b	7,2
UFTBs 05	7,5 c	80,4	7,3 c	90,2	8,1 b	89,6	8,3 c	89,4

UFTBs 06	9,7 c	74,6	10,9 c	85,4	12,0 b	84,5	11,6 c	85,1
UFTBs 07	7,8 c	79,6	8,5 c	88,7	11,8 b	84,7	10,0 c	87,2
Testemunha	38,5 b		75,5 a		77,9 a		78,7 a	
CV (%)	11,5		13,4		7,3		6,2	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

<sup>2</sup> PCI = Percentagem de inibição do crescimento micelial.

Método 1: técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonística; Método 2: técnica de pareamento direto; Método 3: técnica de pareamento com risco no centro da placa; Método 4: técnica de círculo

No método 3 todos isolados inibiram o crescimento do patógeno e se diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da testemunha (Tabela 3), com um PCI chegando a 49,4% ao décimo segundo dia. Pelo método 4 os isolados que foram antagonísticos ao patógeno evitando o seu crescimento até o doze dias de incubação foram UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07, apresentando uma porcentagem de inibição de crescimento do patógeno de 7,2 a 89,4% (Tabela 3).

As bactérias do gênero *Bacillus* possuem a característica de produzir enzimas hidrolíticas, que degradam os componentes da parede celular de outros microrganismos, dando-lhes a característica de micoparasitismo (ZAGO et al., 2000). Basha e Ulaganathan (2002) em seu trabalho utilizaram a cepa de *Bacillus* sp. BC121 que foi isolada da rizosfera do sorgo, onde esse isolado apresentou alta atividade antagônica contra *Curvularia lunata*, sendo observado por microscopia eletrônica de varredura a degradação da parede da célula fúngica do patógeno, inibindo o crescimento da *Curvularia lunata* até 60%, ainda constatou em teste a capacidade do isolado em secretar quitinase.

A maioria dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua por antibiose, onde um metabolito produzido por um deles tem efeito prejudicial sobre o outro. Podendo ter contato físico ou não entre esses microrganismos a produção desses metabólitos pode resultar na lise e dissolução da estrutura celular. Diversas espécies de *Bacillus* incluindo a *subtilis* são citadas como produtoras de antibióticos, podendo secretar metabolitos como enzimas aminolíticas e proteolíticas (BETTIOL & GHINI, 1995).

### **Produção de metabólitos voláteis**

Ao avaliar a capacidade dos isolados em produzir metabólitos voláteis (Tabela 4) aos doze dias de incubação contra o fungo fitopatogênico *F. subglutinans* os isolados UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 inibiram o crescimento do patógeno diferindo estatisticamente da testemunha. Destaque para os isolados UFTBs 06 e UFTBs 07 que inibiram o crescimento do *F. subglutinans* em 55,8% e 52,8% respectivamente (Tabela 4). Para o fungo fitopatogênico *C. lunata* o isolado UFTBs 07 foi capaz de inibir o seu crescimento e diferenciar estatisticamente da testemunha por metabólitos voláteis, inibindo o crescimento do patógeno em 47,7% (Tabela 4). Para *Bipolaris* spp. apenas o isolado UFTBs 05 foi capaz de inibir o crescimento do fungo e diferir estatisticamente da testemunha por metabólitos voláteis, inibindo o seu crescimento em 60,1% (Tabela 4).

Chen et al. (2008) identificaram 14 compostos voláteis antifúngicos a partir de *Bacillus subtilis* que inibiram o desenvolvimento de *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento em frutas e vegetais. Dados recentes revelam que *B. subtilis* é capaz de produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica. No entanto, muitas dessas substâncias voláteis produzidas por este microrganismo são ainda desconhecidas (KAI et al., 2007).

**Tabela 4:** Efeito de metabólitos voláteis de *Bacillus subtilis* no crescimento micelial de *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp.<sup>1</sup>

Tratamentos	6 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%) <sup>2</sup>	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PCI (%)
<b><i>Fusarium subglutinans</i></b>				
UFTBs 01	46,5 ab	8,8	56,9 a	0,0
UFTBs 02	25,6 c	41,6	43,9 cd	21,5
UFTBs 03	36,7 b	27,9	41,3 d	26,3
UFTBs 04	43,2 ab	15,2	50,8 ab	9,2
UFTBs 05	44,5 ab	12,6	47,9 bc	14,4
UFTBs 06	11,1 d	78,2	24,7 e	55,8
UFTBs 07	11,7 d	76,9	26,4 e	52,8
Testemunha	51,0 a		56,0 ab	
CV (%)	16,5		11,0	
<b><i>Curvularia lunata</i></b>				
UFTBs 01	53,9 a	0,0	57,4 a	7,5
UFTBs 02	46,1 ab	7,9	53,5 a	13,8
UFTBs 03	49,9 a	0,1	59,0 a	5,1
UFTBs 04	52,6 a	5,1	60,4 a	2,7
UFTBs 05	48,5 ab	3,0	60,2 a	3,5

UFTBs 06	45,4 ab	9,3	48,8 ab	21,3
UFTBs 07	34,3 b	31,4	32,4 b	47,7
Testemunha	50,0 a		62,1 a	
CV (%)	16,2		19,3	
<b><i>Bipolaris</i> spp.</b>				
UFTBs 01	54,0 a	0,0	59,4 a	3,0
UFTBs 02	53,2 a	0,0	61,7 a	0,0
UFTBs 03	46,0 ab	0,3	53,9 a	12,0
UFTBs 04	51,1 ab	0,0	61,6 a	0,0
UFTBs 05	27,5 c	40,4	24,4 b	60,1
UFTBs 06	41,8 b	9,5	45,8 a	25,1
UFTBs 07	47,0 ab	0,0	41,6 ab	32,0
Testemunha	46,2 ab		61,3 a	
CV (%)	12,4		21,3	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

<sup>2</sup> PCI = Percentagem de inibição do crescimento micelia

### **Produção de metabólitos termoestáveis**

No estudo da inibição do crescimento micelial de *F. subglutinans*, *C. lunata* e *Bipolaris* spp., pelos antibióticos secretados em caldo agarizado pelos sete isolados de *Bacillus subtilis*, os isolados UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da testemunha ao decimo segundo dia de incubação (Tabela 5 e Figura 13). O isolado UFTBs 06 mostrou que seus produtos antibióticos foram capazes de inibir o crescimento micelial de *F. subglutinans*, *C. lunata* e *Bipolaris* spp. em 53,4, 78,5 e 82,7%, respectivamente, sendo o isolado que proporcionou maior inibição em todos patógenos (Tabela 5).

Esses resultados mostram que os antibióticos presentes no caldo agarizado autoclavado são termoestáveis, ou seja, resistem a altas temperaturas sem perder as características antifúngicas, e que seu modo de antagonismo a outros microrganismos é principalmente a antibiose. Fuga (2013) em seu trabalho verificou que todos os isolados de *Bacillus* spp. testados inibiram o crescimento de *Sclerotium cepivorum*, o que revela que os metabólitos produzidos mostraram-se termoestáveis e mantiveram suas atividades mesmo após a autoclavagem. Kupper et al. (2003) avaliando 69 isolados de *Bacillus* spp., quanto à produção de metabólitos, verificaram com exceção de dois isolados, que todos os outros tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha revelando que os metabólitos produzidos mostraram-se termoestáveis

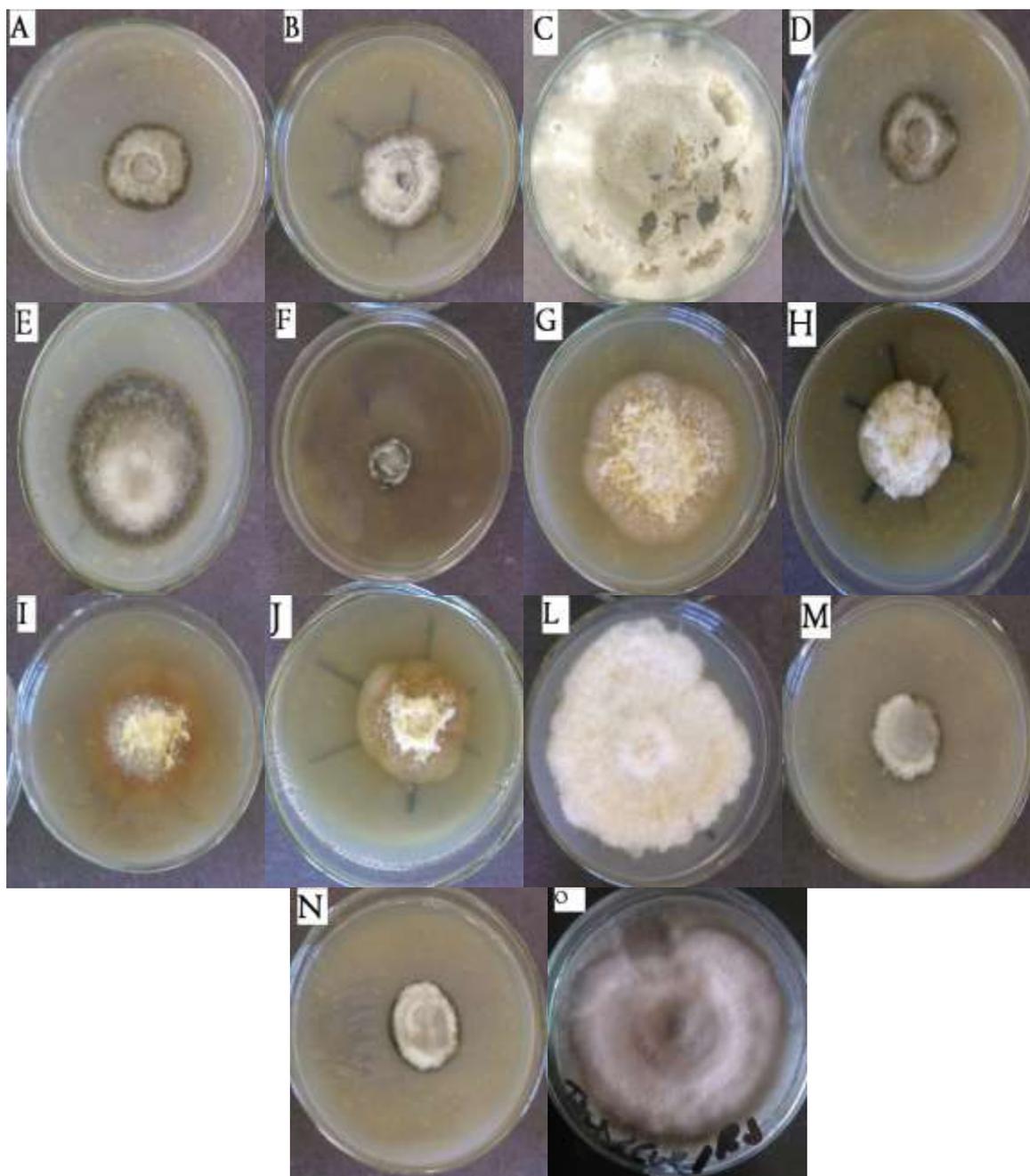
Os resultados obtidos demonstram o potencial de alguns isolados de *B. subtilis* testados no controle biológico de fungos patogênicos de plantas, como o *Fusarium subglutinans*, *Bipolaris* spp. e *Curvularia lunata*. Testes em vivo devem ser feitos para verificar esse potencial de biocontrole em condições de campo.

**Tabela 5:** Efeito de metabólitos termoestáveis de isolados de *Bacillus subtilis* no crescimento micelial de *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp.<sup>1</sup>

Tratamentos	6 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Diâmetro da colônia (mm)	PCI (%) <sup>2</sup>	Diâmetro da colônia (mm)	PCI (%)
<b><i>Fusarium subglutinans</i></b>				
UFTBs 01	16,9 cd	47,8	47,6 b	22,6
UFTBs 02	44,2 a	0,0	61,1 a	0,6
UFTBs 03	26,6 bc	18,1	52,5 b	14,6
UFTBs 04	11,3 d	65,2	28,8 d	53,1
UFTBs 05	14,6 cd	55,0	42,4 c	31,0
UFTBs 06	11,1 d	65,8	28,6 d	53,4
UFTBs 07	16,7 cd	48,5	41,7 c	32,1
Testemunha	32,5 ab		61,5 a	
CV (%)	30,9		6,4	
<b><i>Curvularia lunata</i></b>				
UFTBs 01	23,2 bc	57,7	27,5 c	58,9
UFTBs 02	61,6 a	0,0	66,2 a	1,2
UFTBs 03	29,8 b	45,5	46,9 b	29,9
UFTBs 04	13,7 c	74,9	19,8 cd	70,3
UFTBs 05	12,3 c	77,5	23,4 c	65,0
UFTBs 06	9,5 c	82,6	14,4 d	78,5
UFTBs 07	13,8 c	74,7	22,8 c	65,9
Testemunha	54,8 a		67,0 a	
CV (%)	31,1		12,0	
<b><i>Bipolaris</i> spp.</b>				
UFTBs 01	13,5 bc	76,5	27,9 c	58,5
UFTBs 02	62,1 a	0,0	67,0 a	0,6
UFTBs 03	17,7 b	69,2	50,2 b	25,5
UFTBs 04	12,0 c	79,1	18,1 e	73,0
UFTBs 05	12,5 c	78,3	21,9 de	67,4
UFTBs 06	10,2 c	82,2	11,6 f	82,7
UFTBs 07	12,7 c	77,8	24,9 cd	63,0
Testemunha	57,7 a		67,5 a	
CV (%)	10,5		7,7	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

<sup>2</sup> PCI = Percentagem de inibição do crescimento micelial.



**Figura 1:** Atividade antagonista *in vitro* com isolados de *B. subtilis* contra os fungos patogênicos *Fusarium subglutinans*, *Bipolaris* spp. e *Curvularia lunata*, pela produção de metabólitos termoestáveis. (A) *Bipolaris* spp. e UFTBs 07; (B) *Bipolaris* spp. e UFTBs 01; (C) *Bipolaris* spp. e testemunha; (D) *Bipolaris* spp. e UFTBs 05; (E) *Bipolaris* spp. e UFTBs 03; (F) *Bipolaris* spp. e UFTBs 06; (G) *F. subglutinans* e UFTBs 07; (H) *F. subglutinans* e UFTBs 06; (I) *F. subglutinans* e UFTBs 05; (J) *F. subglutinans* e UFTBs 03; (L) *F. subglutinans* e testemunha; (M) *C. lunata* e UFTBs 07; (N) *C. lunata* e UFTBs 05; (O) *C. lunata* e testemunha.

## CONCLUSÕES

Os isolados de *Bacillus subtilis* UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 foram eficazes na inibição de crescimento micelial dos fungos patogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp. pelos quatro métodos de antagonismo testado, sendo o métodos de círculo (método 4) e o de cultura fúngica sobre cultura antagonista (método 1) os que tiveram maior porcentagem de inibição de crescimento micelial em relação aos outros dois.

Ao avaliar a capacidade dos isolados em inibir o crescimento micelial dos patógenos pela produção de metabólitos voláteis, contra o fungo fitopatogênico *Fusarium subglutinans* os isolados UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 inibiram o crescimento do patógeno. Para *C. Lunata* o isolado UFTBs 07 foi capaz de inibir, e *Bipolaris* spp. apenas o isolado UFTBs 05 foi capaz de inibir o crescimento do fungo. Os isolados UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram capazes de inibir o crescimento micelial do *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp. por metabólitos termoestáveis, sendo a antibiose seu principal mecanismo de ação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, H. L. Illustrated genera of imperfect fungi. 2. ed. **Burgess Publishing Company**, 1960. 225p.

BASHA, S.; ULAGANATHAN, K. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. **Current science**, v. 82, n. 12, p. 1457-1463, 2002.

BETTIOL, W.; GHINI, **Controle Biológico**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ceres, P.717-728. 1995.

BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v.57, p.131-135, 1980.

CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.919–923, 2008.

DORIGHELLO, D. V. **Controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora packyrhizi*) com óleo de café e *Bacillus* spp.** 2013. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p.359-363, 1971.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Cultivo do arroz irrigado no Brasil. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap12.htm>>. Acesso em: 13 jul 2015.

FIGUEIREDO, J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W.; PINTO, N. F. J. ; CASELA, C. R. Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. Potencialidades, desafios e sustentabilidade: **resumos expandidos...** Goiânia: ABMS, 2010.

FUGA, C. A. G. **Prospecção de microrganismos e substâncias de origem vegetal para o controle de *Sclerotium cepivorum***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2013.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; VIEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; SILVA, H. S. A.; BARACATPEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1247-1252, 2006.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v.187, p.351–360, 2007.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

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.

LIMA, O. D. D. R.; DOS SANTOS, M. S. B.; RODRIGUES, A. A. C. Ação antifúngica in vitro de isolados de *Bacillus* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, 27(4), p.57-64, 2014.

LOBO, V. L. S.; FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Cultivo do arroz de terras altas no estado de Mato Grosso. **Embrapa arroz e feijão**, 2006. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/doencas\\_metodo\\_controle.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/doencas_metodo_controle.htm)>. Acesso em: 13 jul 2015.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógeno de plan-tas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.

MATARESE F, SARROCCO S, GRUBER S, SEIDL-SEIBOTH V, VANNACCI G. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. **Microbiology**,v.158, n. 1,p.98–106,2012.

MATOS, A. P., SANCHES, N. F., TEIXEIRA, F. A., SIMÃO, A. H., VASCONCELOS, J. A. R.; COELHO, D. Monitoramento da fusariose em plantios de abacaxi conduzidos em sistema de produção integrada no Tocantins. In Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (*ALICE*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: **anais**. Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010.

MELO, I. S. de; VALARINI, P. J. Potential of rhizobacteria in the control of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. in cucumber (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.

MENTEN, J. O. M; MACHADO, C. C; MINUSSI, E; CASTRO, C; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "*in vitro*". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MOREIRA, C. G. Á.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. DA S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.332-7, 2008.

PASCOAL, P. V; AGUIAR, R. W. S. Seleção de bactérias endofíticas de plantas de arroz irrigado no estado do Tocantins. **10º seminário de iniciação científica da UFT**, Palmas – TO, 2014.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v.278, p.1-9, 2008.

SALGADO, A. P. S. P., CARDOSO, M. D. G., SOUZA, P. E. D., SOUZA, J. A. D., ABREU, C. M. P.; PINTO, J. E. . Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de Eucalyptus sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciênc. agrotec.** vol.27 n<sup>o</sup>.2, 2003.

SANTOS, M. S. B.; SILVA, A. A. C. R. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014.

SASSER, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids: **revised**. Newark: MIDI, 2001. 6p. (MIDI Technical Note, 101).

SILVA, F. de A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. **Anais...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

SOTTERO, A. N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. 2013. Dissertação de Mestrado. Instituto Agrônômico.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudonomas* spp. Fluorescentes- Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas e Biocontroladoras de Fitopatógenos em Sistemas de Produção Agrícola. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, dez. 2000.

### 3. CAPITULO II

## PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *Bacillus subtilis* NA CULTURA DA SOJA E FEIJÃO CAUPI EM CASA DE VEGETAÇÃO

### RESUMO

O trabalho teve como objetivo verificar a resposta da soja e do feijão caupi a inoculação de *Bacillus subtilis*, inoculados em solo adubado com fosfato natural e em solo sem adubação, em condições de casa de vegetação. Sete isolados de *B. subtilis* foram utilizados e um Mix de uma mistura de 3 cepas, oriundos de isolamento de solos do Cerrado tocantinense. Os isolados de *B. subtilis* foram inoculados aplicado diretamente na cova sobre as sementes no momento do plantio em uma quantidade de 1 mL vaso<sup>-1</sup> de uma suspensão bacteriana apresentando concentração mínima de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os parâmetros avaliados foram massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR), total (MST), número de nódulos (NN) e massa seca dos nódulos (MSN) teor de fósforo na parte aérea e fósforo disponível no solo. Observou-se que na cultura da soja onde recebeu adubação de fosfato natural os isolados UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX promoveram aumento significativo na biomassa. Nos tratamentos sem adubação com fosfato natural os isolados UFTBs 07 e o MIX foram capazes de promover o maior incremento de biomassa. Os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX mostrou maior eficiência na produção de biomassa do feijão caupi com adubação de fosfato natural, onde não houve adubação os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX foram eficazes na produção de biomassa. Na soja e no feijão caupi a maioria do isolados testados proporcionaram um maior teor de P disponível no solo e na parte aérea das plantas. A maioria dos isolados mostrou estar envolvidos diretamente na promoção do crescimento destas culturas quando comparado à testemunha não inoculada.

**Palavras chaves:** Rizobactéria, teor de fósforo, biomassa.

## GROWTH PROMOTION AND PHOSPHATE SOLUBILIZATION *Bacillus subtilis* IN THE SOYBEAN CROP AND FEJÃO COWPEA IN THE GREENHOUSE<sup>1</sup>

### ABSTRACT

The study aimed to verify the response of soybean and cowpea inoculation of *Bacillus subtilis* inoculated in soil fertilized with phosphate rock and soil fertilization, under greenhouse conditions. Seven isolates of *B. subtilis*. Mix were used and a mixture of three strains, coming isolation tocantinense cerrado soils. The isolates of *B. subtilis* were applied directly inoculated into the pit on the seed at planting in an amount of 1 mL vaso-1 bacterial suspension having a minimum concentration of  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. The parameters evaluated were dry mass of the aerial part (MSPA), the root (MSR), total (MST), number of nodes (NN) and dry weight of nodules (MSN) phosphorus content in shoots and available phosphorus in the soil. It was observed that in soybeans where he received natural phosphate fertilizer isolated UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 and the MIX promoted significant increase in biomass. In treatments without fertilization with rock phosphate isolated UFTBs 07 and MIX were able to promote greater biomass increment. Isolated UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06, UFTBs 07 and the MIX showed greater efficiency in biomass production of cowpea with natural phosphate fertilizer where no fertilizer isolated UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 06, UFTBs 07 and MIX were effective in producing biomass. In soybean and cowpea most of the isolates tested provided a higher P content available in soil and shoots of plants. Most isolates shown to be directly involved in promoting the growth of these crops compared to the non inoculated.

**Key words:** Rizobacteria, phosphorus, biomass.

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos encontrados nos solos podem ser divididos de acordo com a influência que causam nas plantas, podendo ser: prejudiciais, benéficos e neutros. Dentre esses microrganismos benéficos existe um grupo chamado rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), que são bactérias que habitam o solo e possuem capacidade de promover o crescimento das plantas e controlar microrganismos fitopatogênicos. O modo de ação dessas bactérias nas plantas estão ligadas a produção de antibióticos, produção de sideróforos, indução de resistência sistêmica, produção de hormônios, fixação assimbiótica de nitrogênio e solubilização de fosfato (MELO,1998). As RPCPs incluem diferentes espécies pertencentes a diversos gêneros como: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Hydroganophaga*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Azospillum* (BENIZRI et al., 2001).

O fósforo (P) é um nutriente de grande importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pelo seu papel importante em biomoléculas (ácidos nucleicos, fosfolipídios e nucleotídios) (BARROSO & NAHAS, 2008). O fósforo também é o macronutriente mais limitante para o crescimento de plantas na produção agrícola em condições brasileiras (RAIJ, 1991). Porém os solos podem ter grandes reservas de P total, mas as quantidades disponíveis para as plantas geralmente são pequenas (STEVENSON & COLE, 1999). Os solos altamente intemperizados como são os solos tropicais, são caracterizados por ter baixa disponibilidade de fósforo (NAHAS, 1999). A reduzida disponibilidade de fósforo nos solos tropicais decorre da reatividade das formas solúveis de P com cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) e alumínio (Al), formando compostos de baixa solubilidade (BARROSO & NAHAS, 2005). As plantas somente conseguem absorver P como ânions ortofosfato, predominantemente nas formas solúveis monobásicos ( $H_2PO_4$ ) e dibásicos ( $HPO_4^-$ ) (GLASS, 1989). Existem processos naturais que são capazes de tornar o fósforo indisponível em forma disponível, entre os quais se encontra a solubilização microbiana de fosfatos inorgânicos insolúveis já existentes ou adicionados no solo como os fosfatos de rocha (BARROSO, 2006).

Essa solubilização é decorrente da produção de ácidos orgânicos como glucômico, cítrico, glutâmico, oxático láctico, fumárico, tartárico e succínico, e também de mecanismo que envolve o crescimento microbiano que favorece a secreção de

prótons ( $H^+$ ). Segundo Rodrigues e Fraga (1999), estirpes do gênero *Bacillus* esta entre as bactérias mais eficientes na solubilização de P.

O Tocantins tem despontado no cenário nacional como um grande produtor de grãos. Fazendo parte da região MATOPIBA (região de interface entre os estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia). A soja (*Glycine max* L.) é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos (COSTA NETO & ROSSI, 2000). O Tocantins produz 3,5 milhões de toneladas de grãos, sendo a soja a principal cultura com 2,22 milhões de toneladas produzidas em 2013/2014 (CONAB, 2014).

O feijão-caupi tem grande importância, tanto como alimento quanto como gerador de emprego e renda. A produção de feijão caupi, no Brasil, concentra-se nas regiões Nordeste, em torno de 1,5 milhões de hectares, seguida do Norte com 56,8 mil hectares (FREIRE FILHO et al., 2011). No Brasil, historicamente, a produção de feijão-caupi concentra-se nas regiões Nordeste e Norte, onde é produzido em sua maioria pela agricultura familiar. No entanto, a cultura vem conquistando espaço na região Centro-Oeste, em razão do desenvolvimento de novas tecnologias de produção (EMBRAPA MEIO NORTE, 2009).

Com o propósito de obter aumento do crescimento e rendimento das plantas, e um maior entendimento da capacidade de microrganismo em solubilizar fosfatos, diversos trabalhos vêm sendo realizado com a bactéria *Bacillus subtilis*. RAASCH et al. (2013) avaliaram a inoculação de *Bacillus subtilis* em miniestacas de eucalipto, onde se observou o aumento no crescimento das mudas, variando entre 20,3 a 37,2%. Araújo e Carvalho (2009), em seu estudo com tomateiro verificou-se que o tratamento com inoculação de *Bacillus subtilis* aumentou a massa fresca da parte aérea e produção de frutos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de isolados de *Bacillus subtilis* em relação a promoção de crescimento e solubilização de fosfato nas culturas da soja (*Glycine max* L.) e feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.), em casa de vegetação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia da UFT – Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi. Localizado a 11°43'45" S e 49°04'07" W a 278 m de altura, entre os meses de fevereiro à maio de 2015.

### Isolados

Foram utilizados sete cepas de *Bacillus subtilis* da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFT – Universidade Federal do Tocantins, provenientes do isolamento de solos de cerrado em áreas de cultivos no Estado do Tocantins. Foram testados os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 separadamente, e um mix dos isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03. Os isolados foram mantidos em crescimento e repicados em meio LB (Luria-Bertani).

### Culturas

As culturas utilizadas no experimento foram a soja (*Glycine max* L.) cultivar M – 9144 RR e feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) tipo fradinho.

### Inoculação de *Bacillus subtilis* em solo em casa de vegetação

O experimento se deu pela inoculação dos setes isolados separadamente, sendo cada isolado um tratamento e um MIX (3 isolados: UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03), em solos com adubação de fosfato natura e sem fosfato natural, o experimento foi empregado em vasos plásticos preto com volume de 1,7 L, preenchidos com solo coletado em área de cultivo com as seguintes características: Análise de solo: Ca+Mg 2,55 cmol/dm<sup>3</sup>; Ca 1,80 cmol/dm<sup>3</sup>; Mg 0,75 cmol/dm<sup>3</sup>; Al 0,00 cmol/dm<sup>3</sup>; H+Al 5,54 cmol/dm<sup>3</sup>; K 0,21 cmol/dm<sup>3</sup>; CTC (T) 8,31 cmol/dm<sup>3</sup>; SB 2,76 cmol/dm<sup>3</sup>; K 83,54 mg/dm<sup>3</sup> (ppm); P (Mel) 5,85 mg/dm<sup>3</sup> (PP); V 33,27%; M 0,00%; Mat. Org. 2,56 % 25,59 g/dm<sup>3</sup>; pH CaCl<sub>2</sub> 4,80, H<sub>2</sub>O 5,38.

No experimento onde recebeu adubação de P foi suplementado com 0,3 g/vaso de fosfato natural insolúvel (ligado) na concentração de 100 mg kg<sup>-1</sup> de solo (65 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>). O concentrado fosfático utilizado foi o Angico, obtido na

Galvani (Industria de Fertilizantes de Luiz Eduardo Magalhães - BA, com teor de  $P_2O_5$  total de 32%.

Foram semeados seis sementes por vaso para ambas culturas. Para o feijão caupi foi feita a inoculação com o inoculante Nodubeans espécie *Bradyrhizobium sp.* estirpe SEMIA 6442, inoculante tipo líquido com recomendação de 100 mL de calda para 50 kg de semente. Para a soja inoculação foi feita utilizando o produto Nodusoja10T, inoculante sólido turfoso para soja, contendo a espécie *Bradyrhizobio japonico*. A inoculação das sementes foi feita uma hora antes do plantio na concentração de 100 mL 50 kg<sup>-1</sup> de sementes.

Os isolados de *Bacillus subtilis* foram inoculados aplicando diretamente na cova sobre as sementes no momento do plantio em uma quantidade de 1 mL/vaso, de uma suspensão bacteriana de água destilada e 0,5 de NaCl obtida da raspagem de células apresentando concentração mínima de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> multiplicadas previamente em placas de petri com meio de cultura sólido LB. A irrigação foi feita manualmente, fornecendo água para as plantas até a capacidade de campo do solo. Sete dias após o plantio foi feito desbaste deixando apenas uma planta por vaso

As avaliações foram aos 45 dias após o plantio. O solo dos vasos e aderidos a raízes foi retirado com cuidado e colocados para secagem para ser feito a análise de fósforo disponível, em seguida, separou-se o sistema radicular da parte aérea das plantas e as raízes foram lavadas em água corrente para remoção do solo aderido. Os nódulos foram retirados das raízes e contados. Em seguida, o material foi colocado para secagem em estufa com aeração forçada a 75°C até obtenção de massa constante, o material foi pesado para obter a massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST) e massa seca dos nódulos (MSN).

A MSPA foi moído em moinho de facas onde foi retirada amostra para avaliação do teor de fósforo na parte aérea (EMBRAPA, 1997). Com as amostras secas do solo foi determinado o fósforo disponível no solo pelo método de Mehlich-1. Com os dados de biomassa determinou-se a eficiência relativa de cada tratamento para cada cultura, calculada segundo a fórmula:  $ER = (MSPA \text{ inoculada com os isolados} / MSPA \text{ sem inoculante}) \times 100$ . Com o teor de fósforo na parte aérea foi determinada a eficiência de utilização de P nas plantas de soja e feijão caupi que de acordo com Rodrigues et al. (2003), pode ser calculada pela seguinte fórmula:  $EFU-P = [(matéria \text{ seca})^2 / (\text{Teor do nutriente})]$ .

### **Análise Estatística**

Os dados dos parâmetros MSPA, MSR, MST, NN, MSN e teor de P na parte aérea foram submetidos à análise de variância com teste F, e as médias dos tratamentos agrupados pelo teste de Scott-Knott a 1 ou 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Assistat (SILVA, 1996).

Os valores de P disponível no solo foram submetidos à análise de variância com teste F, e as médias dos tratamentos agrupados pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Assistat (SILVA, 1996).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No experimento em casa de vegetação, onde foi avaliada a promoção de crescimento das culturas da soja e do feijão caupi em vasos com adubação de fosfato natural e sem fosfato natural em casa de vegetação, alguns isolados se mostraram promissores na promoção de crescimento e incremento da matéria seca das culturas (Tabelas 1 e 2). Na cultura da soja (Tabela 1), com adubação de fosfato natural para as características avaliadas de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) os isolados UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX foram superiores aos demais isolados e a testemunha. Para o número de nódulos e massa seca de nódulos (MSN) nenhum tratamento conseguiu diferir estatisticamente da testemunha, lembrando que todos os tratamentos da cultura da soja incluindo a testemunha foram inoculados antes do plantio com inoculante a base de *Bradyrhizobium japonicum*.

Nos vasos onde o solo não recebeu adubação de fosfato natural, na cultura da soja para MSPA apenas o isolado UFTBs 07 e o MIX foram superiores ( $p < 0,05$ ) aos outros tratamentos e a testemunha (Tabela 1). Para o parâmetro MSR os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 07 e o MIX tiveram um maior incremento na raiz, com destaque para o isolado UFTBs 07 e MIX. Na MST os isolados UFTBs 07 e o MIX foram os melhores ( $p < 0,01$ ) em relação aos outros tratamentos e a testemunha. Para o Número de nódulos e a MSN nenhuma tratamento se diferiu estatisticamente da testemunha, mas podemos destacar o tratamento MIX que teve os melhores valores de NN e MSN, tanto em solo sem fosfato como em solo com adubação de fosfato natural.

**Tabela 1:** Biomassa e nodulação de soja (*Glycine max* L.) inoculada com *Bacillus subtilis* com e sem adubação com fosfato natural.<sup>1</sup>

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	NN	MSN (mg)
Com FN					
UFTBs 01	0,51 b	0,40 b	0,91 b	5,0 a	5,3 a
UFTBs 02	0,52 b	0,36 b	0,88 b	4,0 a	4,0 a
UFTBs 03	0,68 b	0,44 b	1,12 b	4,0 a	5,7 a
UFTBs 04	0,89 a	0,65 a	1,54 a	6,7 a	9,3 a
UFTBs 05	0,96 a	0,62 a	1,58 a	6,3 a	11,0 a
UFTBs 06	1,14 a	0,67 a	1,81 a	8,0 a	12,7 a
UFTBs 07	0,91 a	0,58 a	1,49 a	4,7 a	10,3 a
MIX	1,04 a	0,69 a	1,73 a	6,7 a	14,3 a
Testemunha	0,54 b	0,42 b	0,96 b	3,0 a	5,3 a
CV (%)	31,9 *	15,5 **	23,5 **	34,1 <sup>ns</sup>	61,5 <sup>ns</sup>
Sem FN					
UFTBs 01	0,60 b	0,43 b	1,03 b	4,3 a	3,7 a
UFTBs 02	0,55 b	0,44 b	0,99 b	3,3 a	3,7 a
UFTBs 03	0,53 b	0,41 b	0,94 b	3,3 a	3,0 a
UFTBs 04	0,57 b	0,36 c	0,93 b	3,7 a	3,0 a
UFTBs 05	0,62 b	0,34 c	0,96 b	5,3 a	4,7 a
UFTBs 06	0,57 b	0,26 c	0,83 b	4,0 a	3,0 a
UFTBs 07	0,76 a	0,52 a	1,28 a	6,3 a	5,7 a
MIX	0,80 a	0,58 a	1,38 a	6,7 a	6,7 a
Testemunha	0,41 b	0,25 c	0,66 b	4,0 a	4,0 a
CV (%)	18,7 *	15,2 *	14,9 **	35,3 <sup>ns</sup>	43,0 <sup>ns</sup>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Na cultura do feijão caupi (Tabela 2), com adubação de fosfato natural para o parâmetro MSPA os melhores resultados ( $p < 0,01$ ) foram obtidos pelos isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06, UFTBs 07, com destaque para o isolado UFTBs 01. Para MSR apenas os isolados UFTBs 01, UFTBs 02 e UFTBs 03 foram superiores ( $p < 0,01$ ) aos outros tratamentos e a testemunha. O melhor valor para MST foi obtido pelo isolado UFTBs 01, os isolados UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX foram superiores ( $p < 0,01$ ) aos outros tratamentos e a testemunha. Os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03 e UFTBs 04 foram

capazes de produzir uma maior quantidade de nódulos ( $p < 0,01$ ). Para a variável MSN não houve diferença estatística, mas pode-se notar que os maiores valores de MSN foram obtidos pelos tratamentos onde recebeu a inoculação com os isolados UFTBs 04, UFTBs 03, UFTBs 01 e UFTBs 02.

**Tabela 2:** Biomassa e nodulação de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) inoculada com *Bacillus subtilis* com e sem adubação com fosfato natural.<sup>1</sup>

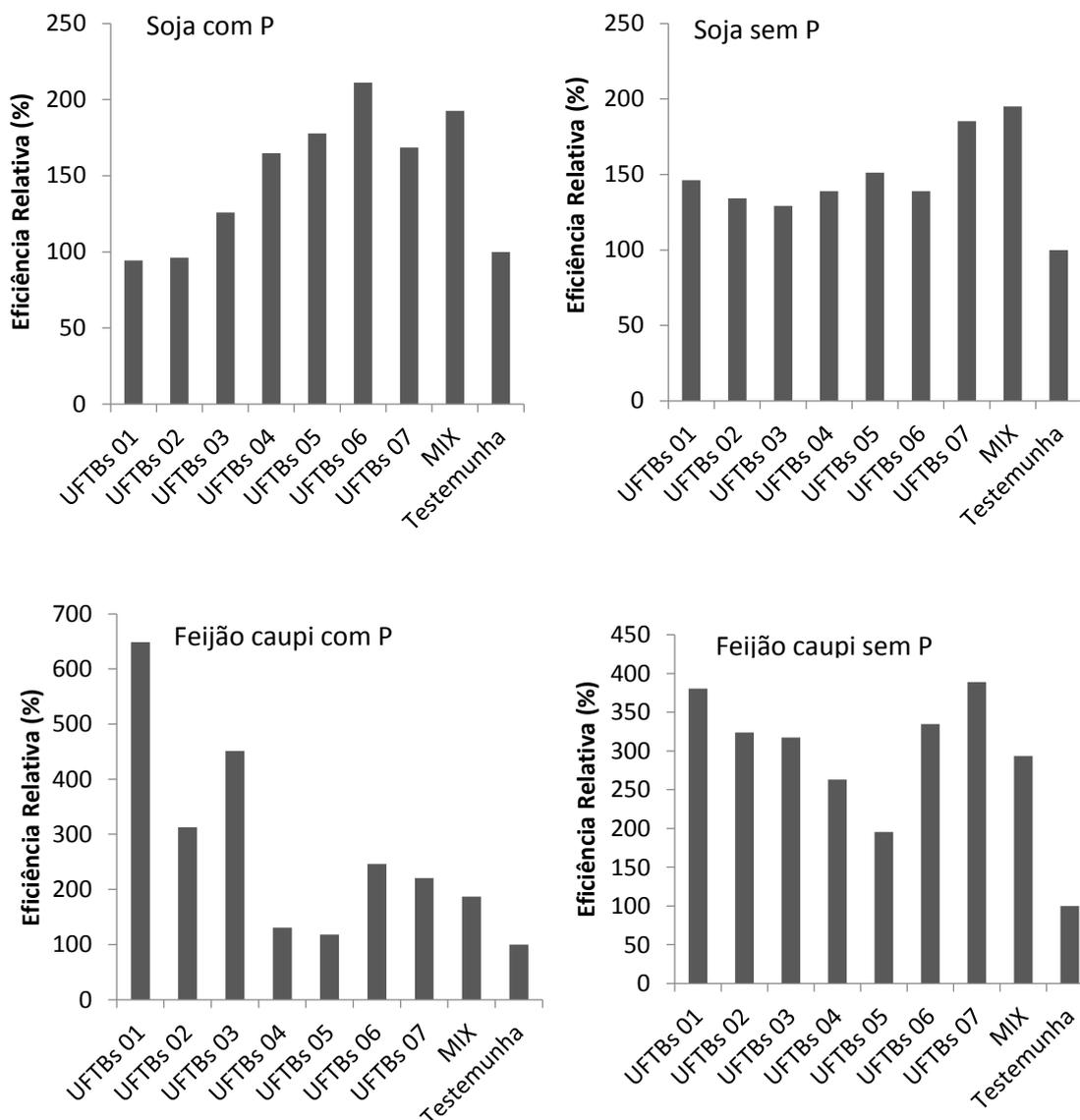
Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	NN	MSN (mg)
<b>Com FN</b>					
UFTBs 01	2,53 a	0,91 a	3,44 a	53,0 a	38,3 a
UFTBs 02	1,22 c	0,68 b	1,90 b	39,3 a	31,3 a
UFTBs 03	1,76 b	0,65 b	2,42 b	33,3 a	41,7 a
UFTBs 04	0,51 d	0,33 c	0,84 d	55,6 a	50,7 a
UFTBs 05	0,46 d	0,18 c	0,64 d	13,6 b	16,0 a
UFTBs 06	0,96 c	0,29 c	1,24 c	25,0 b	25,3 a
UFTBs 07	0,86 c	0,37 c	1,22 c	18,7 b	14,0 a
MIX	0,73 d	0,29 c	1,02 c	16,7 b	15,0 a
Testemunha	0,39 d	0,14 c	0,53 d	9,0 b	14,0 a
CV (%)	29,9 **	29,5 **	21,1 **	41,7 **	51,9 <sup>ns</sup>
<b>Sem FN</b>					
UFTBs 01	1,75 a	0,85 a	2,60 a	27,0 a	36,3 a
UFTBs 02	1,49 a	0,62 a	2,11 a	37,7 a	38,0 a
UFTBs 03	1,46 a	0,81 a	2,27 a	38,0 a	37,3 a
UFTBs 04	1,21 a	0,62 a	1,83 a	16,7 b	10,3 b
UFTBs 05	0,90 b	0,51 b	1,41 b	20,0 a	13,0 b
UFTBs 06	1,54 a	0,66 a	2,20 a	39,0 a	17,0 b
UFTBs 07	1,79 a	0,48 b	2,27 a	41,0 a	37,7 a
MIX	1,35 a	0,71 a	2,06 a	28,0 a	24,0 b
Testemunha	0,46 b	0,45 b	0,91 b	11,0 b	8,0 b
CV (%)	28,8 *	11,5 *	24,5 *	34,6 *	45,1 *

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Nos vasos onde o solo não recebeu adubação com fosfato natural o único tratamento que não foi superior ( $p < 0,05$ ) à testemunha no incremento da MSPA foi o tratamento onde foi inoculado com o isolado UFTBs 05. Apenas os isolados UFTBs 05 e UFTBs 07 não tiveram um maior incremento na MSR estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação à testemunha. Para MST os tratamentos onde recebeu a inoculação dos isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX foram superiores ( $p < 0,05$ ) a testemunha. Em relação ao número de nódulos os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX proporcionaram uma maior nodulação ( $p < 0,05$ ). Para a variável MSN os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03 e UFTBs 07 foram significativamente melhores ( $p < 0,05$ ).

Quanto à eficiência relativa (ER) (Figura 1), que relaciona a biomassa da parte aérea dos tratamentos inoculados com isolados de *B. subtilis* ao tratamento testemunha sem inoculação, para a cultura da soja com adubação de fosfato natural as melhores médias foram encontradas com a inoculação dos isolados UFTBs 06 e UFTBs MIX com aumento da ER de 111% (UFTBs 06) e 93 % (UFTBs) em relação à testemunha. Na soja sem adubação de fosfato natural todos os tratamentos tiveram uma ER superior que a testemunha, com destaque para os tratamentos com o isolado UFTBs 07 com aumento de 85% e o Mix com aumento de 95% em relação à testemunha.

Para o feijão caupi adubado com fosfato natural todos os tratamentos tiveram médias superiores à testemunha, sendo as maiores médias obtidas pelos tratamentos com o isolado UFTBs 01 onde chegou a 549% a mais que a testemunha e o isolado UFTBs 03 com 351% de aumento em relação a testemunha. Sem adubação de fosfato natural no feijão caupi também todos os tratamentos tiveram maiores médias do que a testemunha sendo os UFTBs 01 e UFTBs 07 com maior ER, com 280% e 289% a mais em relação à testemunha, respectivamente.



**Figura 1:** Eficiência relativa da soja e feijão caupi, inoculados com isolados de *Bacillus subtilis* com e sem adubação de fósforo natural em relação à testemunha sem inoculação.

Para o teor de fósforo disponível no solo com a cultura da soja (Tabela 3), em solo sem adubação de fósforo natural os isolados UFTBs 06 e UFTBs 07 foram superiores aos demais ( $p < 0,05$ ), seguido do isolado UFTBs 05 que foi superior à testemunha e aos outros tratamentos. Os isolados UFTBs 06, UFTBs 07 e UFTBs 05 aumentaram o teor de fósforo no solo em relação a testemunha em 43, 38 e 30%, respectivamente. Em solo onde recebeu adubação de fósforo natural na cultura da soja os isolados UFTBs 04, UFTBs 06 e MIX proporcionaram um maior teor de fósforo disponível no solo ( $p < 0,05$ ), seguido dos isolados UFTBs 05, UFTBs 03,

UFTBs 02, UFTBs 07 e UFTBs 01 superiores a testemunha sem inoculação de *B. subtilis*. A inoculação com os isolados de *B. subtilis* em solo com adubação de fosfato natural aumentou o teor de fósforo disponível no solo em 57 a 155% em relação a testemunha com adubação de fosfato natural e sem inoculação de *B. subtilis*.

**Tabela 3.** Valores médios de fósforo no solo cultivado com soja inoculados com *B. subtilis* com e sem adubação com fosfato natural.<sup>1</sup>

Tratamentos	--Sem fosfato natural--		--Com fosfato natural--	
	P (g kg <sup>-1</sup> )	% <sup>2</sup>	P (g kg <sup>-1</sup> )	% <sup>3</sup>
UFTBs 01	4,9 c	104	11,9 b	157
UFTBs 02	4,6 c	98	14,3 b	188
UFTBs 03	4,7 c	100	14,3 b	188
UFTBs 04	5,1 bc	109	17,0 a	224
UFTBs 05	6,1 ab	130	15,1 ab	199
UFTBs 06	6,7 a	143	19,4 a	255
UFTBs 07	6,5 a	138	14,1 b	186
MIX	4,9 c	104	16,5 a	217
Testemunha	4,7 c	100	7,6 c	100
CV (%) <sup>4</sup>	12,2	-	15,3	-

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Aumento do teor de P nos tratamentos sem adubação com fosfato natural, determinado em relação a testemunha e expresso em percentagem. <sup>3</sup> Aumento do teor de P nos tratamentos com adubação com fosfato natural, determinado em relação a testemunha e expresso em percentagem. <sup>4</sup> Coeficiente de variação.

Para o teor de fósforo (P) no solo na cultura do feijão caupi (Tabela 4), onde não recebeu adubação com fosfato natural o isolado UFTBs 05 foi superior aos demais ( $p < 0,05$ ), e junto com os isolados UFTBs 03, UFTBs 06, UFTBs 07 e MIX superiores a testemunha sem inoculação de *B. subtilis*. O aumento no teor de P no solo que os isolados de *B. subtilis* proporcionaram em relação à testemunha variou de 9 a 93%. Em solo onde recebeu adubação de fosfato natural, os tratamentos onde recebeu a inoculação dos isolados UFTBs 05 e MIX obtiveram maiores valores de fósforo disponível no solo em relação aos demais ( $p < 0,05$ ), e junto com os isolados UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 04 e UFTBs 06 superiores a testemunha. O teor de fósforo disponível no solo aumentou 21 a 287% inoculando isolados de *B. subtilis*, em relação a testemunha onde não recebeu inoculação.

**Tabela 4.** Valores médios de fósforo no solo cultivado com feijão caupi inoculados com *B. subtilis* com e sem adubação com fosfato natural.<sup>1</sup>

Tratamentos	--Sem fosfato natural--		--Com fosfato natural--	
	P (g kg <sup>-1</sup> )	% <sup>2</sup>	P (g kg <sup>-1</sup> )	% <sup>3</sup>
UFTBs 01	5,9 bc	111	27,2 c	165
UFTBs 02	5,3 c	100	15,0 d	92
UFTBs 03	6,4 b	121	43,5 b	265
UFTBs 04	5,8 bc	109	37,3 b	227
UFTBs 05	10,2 a	193	63,5 a	387
UFTBs 06	7,4 b	140	37,9 b	231
UFTBs 07	6,7 b	126	19,9 d	121
MIX	6,3 b	119	51,0 a	311
Testemunha	5,3 c	100	16,4 d	100
CV (%) <sup>4</sup>	11,1	-	14,3	-

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Aumento do teor de P nos tratamentos sem adubação com fosfato natural, determinado em relação a testemunha e expresso em percentagem. <sup>3</sup> Aumento do teor de P nos tratamentos com adubação com fosfato natural, determinado em relação a testemunha e expresso em percentagem. <sup>4</sup> Coeficiente de variação.

Para a variável teor de fósforo na parte aérea na cultura da soja (tabela 5), sem adubação de fosfato natural o isolado UFTBs 07 proporcionou o maior teor do P ( $p < 0,05$ ) em relação aos outros isolados e a testemunha, aumentando 58 % o teor de fósforo em relação a testemunha. Quanto à eficiência de utilização de fósforo (EFU-P), os maiores valores ( $p < 0,05$ ) foram encontrados pelos tratamentos onde foi inoculado *B.subtilis*, destaque para o Mix. O aumento na percentagem de EFU-P que os isolados testados proporcionou em relação à testemunha variou de 67 a 256 %. O teor de fósforo na parte aérea para soja, onde o solo foi adubado com fosfato natural, foi maior nos isolados UFTBs 04 e UFTBs 06, seguido do UFTBs 05 e MIX superiores aos outros tratamentos e a testemunha com adubação de fosfato natural e sem inoculação de *B.subtilis*. Os maiores valores de EFU-P encontrado foram pelos UFTBs 07 e MIX. O aumento na percentagem de EFU-P entre os isolados de *B. subtilis* em relação a testemunha variou de 8 a 150%.

**Tabela 5.** Valores médios de teor de fósforo na parte aérea (P) e eficiência de utilização de fósforo (EFU-P) em soja inoculados com *B. subtilis* com e sem adubação com fosfato natural.<sup>1</sup>

Tratamentos	P (g kg <sup>-1</sup> )	% <sup>2</sup>	EFU-P	% <sup>3</sup>
<b>Sem fosfato natural</b>				
UFTBs 01	2,0 b	105	0,18	200
UFTBs 02	1,9 b	100	0,16	178
UFTBs 03	1,9 b	100	0,15	167
UFTBs 04	1,7 b	90	0,19	211
UFTBs 05	2,0 b	105	0,19	211
UFTBs 06	1,9 b	100	0,17	189
UFTBs 07	3,0 a	158	0,19	211
MIX Bs	2,0 b	105	0,32	356
Testemunha	1,9 b	100	0,09	100
CV (%) <sup>4</sup>	8,9	-	-	-
<b>Com fosfato natural</b>				
UFTBs 01	1,6 cd	64	0,16	133
UFTBs 02	2,9 c	116	0,09	75
UFTBs 03	3,7 b	148	0,13	108
UFTBs 04	5,0 a	200	0,16	133
UFTBs 05	4,3 b	172	0,21	175
UFTBs 06	5,6 a	224	0,23	192
UFTBs 07	2,8 c	112	0,30	250
MIX	3,9 b	156	0,28	233
Testemunha	2,5 c	100	0,12	100
CV (%) <sup>4</sup>	9,8	-	-	-

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Aumento do teor de P, determinado em relação a testemunha, calculado como acréscimo no teor de P na parte aérea da soja e expresso em percentagem. <sup>3</sup> Aumento na eficiência de utilização de P (EFU-P), determinado em relação a testemunha, calculado como acréscimo na EFU-P pela soja e expresso em percentagem.

<sup>4</sup> Coeficiente de variação.

Para a variável o teor de P na parte aérea do feijão caupi (Tabela 6), em solo sem adubação de fosfato natural, os isolado UFTBs 01 foi superior aos demais ( $p < 0,05$ ), e junto com os isolados UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 07 e MIX superiores a testemunha sem inoculação de *B. subtilis*. O aumento no teor de P entre os isolados de *B. subtilis* em relação a testemunha variou de 8 a 75%. Quanto a eficiência de utilização de fósforo (EFU-P), os maiores valores ( $p < 0,05$ ) foram encontrados para os isolados UFTBs 07 e UFTBs 06, seguidos pelos isolados UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 02, MIX, UFTBs 04 e UFTBs 05, superiores a

testemunha. O aumento na percentagem de EFU-P entre os isolados de *B. subtilis* em relação à testemunha sem inoculação variou de 280 a 1240%. O teor de fósforo na parte aérea para feijão caupi, onde o solo foi adubado com fosfato natural, foi maior no isolado UFTBs 07, e junto com UFTBs 02, UFTBs 06 e MIX superiores a testemunha com adubação de fosfato natural e sem inoculação de *B. subtilis*. O aumento no teor de P entre os isolados de *B. subtilis* em relação a testemunha variou de 6 a 92%. Os maiores valores de EFU-P encontrado foram pelos UFTBs 01 e UFTBs 03. O aumento na percentagem de EFU-P entre os isolados de *B. subtilis* em relação à testemunha variou de 67 a 2833%.

**Tabela 6.** Valores médios de teor de fósforo na parte aérea (P) e eficiência de utilização de fósforo (EFU-P) em feijão caupi inoculados com *B. subtilis* com e sem adubação com fosfato natural.<sup>1</sup>

Tratamentos	P (g kg <sup>-1</sup> )	% <sup>2</sup>	EFU-P	% <sup>3</sup>
<b>Sem fosfato natural</b>				
UFTBs 01	7,0 a	175	0,44	880
UFTBs 02	5,3 b	133	0,42	840
UFTBs 03	4,9 b	123	0,44	880
UFTBs 04	5,4 b	135	0,27	540
UFTBs 05	4,3 bc	108	0,19	380
UFTBs 06	4,3 bc	108	0,55	1100
UFTBs 07	4,8 b	120	0,67	1340
MIX Bs	4,8 b	120	0,38	760
Testemunha	4,0 c	100	0,05	100
CV (%) <sup>4</sup>	11,6	-	-	-
<b>Com fosfato natural</b>				
UFTBs 01	7,3 b	155	0,88	2933
UFTBs 02	5,8 c	123	0,26	867
UFTBs 03	5,0 cd	106	0,62	2067
UFTBs 04	5,3 cd	113	0,05	167
UFTBs 05	4,3 d	92	0,05	167
UFTBs 06	6,1 c	130	0,15	500
UFTBs 07	9,0 a	192	0,08	267
MIX Bs	5,8 c	123	0,09	300
Testemunha	4,7 d	100	0,03	100
CV (%) <sup>4</sup>	12,1	-	-	-

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Aumento do teor de P, determinado em relação a testemunha, calculado como acréscimo no teor de P na parte aérea do feijão caupi e expresso em percentagem. <sup>3</sup> Aumento na eficiência de utilização de P (EFU-P), determinado

em relação a testemunha, calculado como acréscimo na EFU-P pelo feijão caupi e expresso em porcentagem. <sup>4</sup> Coeficiente de variação.

Pelos resultados pode-se ver um maior incremento de MSPA, MSR e MST que alguns dos isolados de *B. subtilis* testados proporcionaram tanto para a soja como para o feijão caupi. Esse aumento pode estar ligado aos vários mecanismos pelos qual essa bactéria atua, como a produção de ácido cianídrico, fitohormônios, enzimas, na disponibilização de nutrientes (P e N), atuando no controle biológico de fitopatógenos, entre outros. O incremento proporcionado pode ter relação pela capacidade das rizobactérias em produzir reguladores de crescimento de plantas (RCPs), que são substâncias orgânicas que influenciam os processos fisiológicos de plantas em baixas concentrações (MELO, 1998). As rizobactérias do gênero *Bacillus* são capazes de produzir gibberelina (KATZNELSON & COLE, 1965) e auxina (KAMPERT et al., 1975). Cerqueira et al. (2015) em seu trabalho utilizando quatro isolados de *Bacillus* spp. realizou testes *in vitro* onde confirmou a produção de AIA, ARA e ACC-deaminase por esses isolados. Saharan (2011) em seu trabalho observou que espécies de *Bacillus* contribuiu para melhoria de diferentes parâmetros de raiz, tal como o enraizamento, comprimento de raízes e teor de matéria seca, e que a inoculação com isolados produtores de AIA, aumentou a absorção de alguns nutrientes, promovendo o crescimento da bata doce e maior enraizamento de mudas de eucalipto.

Araújo et al. (2005), utilizando isolados de *B. subtilis* constatou que o isolado AP-3 aumentou a produção de pêlos radiculares, enquanto que o isolado PRBS-1 aumentou as raízes laterais na soja.

Um fator pelo qual os isolados testados podem ter atuado para aumento no incremento da biomassa é na disponibilidade e solubilização de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio. Além disso, outros mecanismos que estimulam o crescimento das plantas estão também relacionados com o metabolismo microbiano no solo, tais como a produção de enzimas nitrogenase, quitinases e glucanases (CATTELAN et al., 1999).

Araújo et al. (2012) reportaram em seu trabalho utilizando o feijão caupi cultivar BRS Guariba, que a simples inoculação de *B. subtilis* (PRBS-1) proporcionou o maior aumento no crescimento da planta, maior fixação de N e não afetou a nodulação, aos 40 e 55 dias após a semeadura.

Araújo (2008), em seu trabalho utilizando *B.subtilis* (estirpe PRBS-1) formulado com farinha de ostras em casa de vegetação, verificou um aumento na emergência da cultura do algodão e soja, também constatou um maior incremento na matéria seca do milho aos 40 dias após a emergência, maior concentração de fósforo nas folhas de algodão e milho, e maior teor de nitrogênio nas folhas de milho. Lazzareti e Melo (2005) verificaram que a utilizaram *B. subtilis* via semente promoveu um aumento na nodulação, e aumento significativo no peso da matéria seca das raízes (89%) e parte aérea (83%) na cultura do feijoeiro.

Em relação ao NN e MSN para a cultura da soja nenhum tratamento se diferiu estatisticamente tanto em solo com adubação de fosfato natural como sem, porém os melhores valores foram encontrado com a co-inoculação dos isolados de *B. subtilis*. Araújo e Hungria (1999) ao co-inocular *B. subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* em experimento em campo com a soja, foi constatado no estágio V3, que a co-inoculação de *B. japonicum* com metabólitos formulados de *B. subtilis* aumentou significativamente o número de nódulos, em 59% em relação ao tratamento não inoculado e em 27% em relação à inoculação exclusivamente de *Bradyrhizobium*, resultando ainda em uma maior MSN.

Para o NN e MSN na cultura do feijão caupi em solo com e sem adubação de fosfato natural todos os tratamentos que receberam a co-inoculação com isolados de *B. subtilis* obtiveram maior produção. Araújo et al. (2010) em experimento com feijão caupi avaliando a co-inoculação de *B. subtilis* e *Bradyrhizobium* mostrou que nos tratamentos inoculados, houve um aumento na nodulação do feijão-caupi com a co-inoculação, sugerindo uma influência do *Bacillus subtilis* na promoção de nodulação pela *Bradyrhizobium* inoculado.

Segundo Araújo e Hungria (1999), desde que os metabólitos do *Bacillus* não sejam tóxicos ao rizóbio, a coinoculação de ambos pode influenciar o aumento da nodulação. Ele relata que essa influência pode se dar pela contribuição no aumento de competitividade da bactéria inoculada, pelo aumento dos sítios de infecção e pela ação inibitória do crescimento de fungos patogênicos nas raízes.

A maioria dos isolados de *B.subtilis* testado nesse estudo influenciou no teor de fósforo na parte aérea e na disponibilidade desse nutriente no solo, tanto quando adubado com fosfato natural como também sem adubação. Isso demonstra que nesses tratamentos pode ter ocorrido algum evento no solo como aumento de atividade enzimática (fosfatases) ou maior disponibilização do fosfato natural que

proporcionou aumento na disponibilidade do nutriente no solo. Segundo Rodriguez e Fraga (1999) as estirpes do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior potencial em solubilização de fósforo. Essas bactérias solubilizadoras de fósforo atua sobre o fosfato insolúvel por meio de fosfatases, principalmente fosfatases ácidas, com a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou redução do pH, obtendo-se assim o fosfato disponível para a planta (VASSILEV & VASSILEVA, 2003).

Mesmo sendo o fosfato natural Angico (32% de  $P_2O_5$ ), utilizado no presente estudo, uma fonte pouco solúvel, resultou em uma maior disponibilidade de fosforo no solo comparado ao experiemnto onde não houve adubação de fosfato natural. Alguns isolados de *B. Subtilis* quando comparado os experimentos com fosfato natural e sem fosfato natural procorcionou um maior teor de P na parte area onde foi adubado.

As leguminosas têm uma maior facilidade em absorver P, proveniente de fosfato natural do que outras famílias de plantas, por serem plantas acidófilas, isto é, acidificam a rizosfera, devido a troca de íons em seu sistema radicular, deixando grande concentração de  $H^+$  na área das proximidades da raiz.

Araújo (2008) ao observar a concentração de fósforo, nas folhas de algodão e milho, verificou que quando as sementes foram inoculadas com *B. subtilis* (BSFO) foi significativamente maior quando comparada ao tratamento testemunha sem inoculação. Andrade (2012) em seu trabalho verificou que diferentes espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, entre elas *B. subtilis*, apresentaram *in vitro* capacidade de solubilização de fosfato de cálcio insolúvel. Gaing e Gaur (1991) em seu experimento verificou que um isolado de *B. subtilis* foi capaz de promover o aumento de biomassa, produção de grãos e absorção de P e N na cultura do feijão desenvolvido em solo de campo deficiente em P, adubado com fosfato de rocha.

Com isso, pode-se justificar o ganho de biomassa e maior teor de fósforo na cultura da soja e do feijão caupi, quando inoculado com os isolados de *B. subtilis*, pela provável síntese ou estímulo da produção de fitormônios, como também pela solubilização de fosfato, atuando tanto no P indisponível existente no solo como também no suplementado por fosfato natral, como visto no estudo. Proporcionando uma maior quantidade de fósforo disponível no solo para a planta. Assim, a maioria dos isolados de *B. subtilis* testados nesse trabalho demonstrou potencialidade para promoção de crescimento de plantas como também na solubilização de fosfato.

Estudos futuros devem ser feitos para verificar a real eficácia desses isolados em campo como também em testes *in vitro*.

## CONCLUSÕES

Na cultura da soja onde recebeu adubação de fosfato natural os isolados UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX promoveram o crescimento da cultura, no experimento onde não foi adubado com fosfato natural os isolados UFTBs 07 e o MIX foram capazes de promover o maior incremento no crescimento da planta.

Os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX mostrou maior eficiência na produção de biomassa do feijão caupi com adubação de fosfato natural, onde não houve adubação os isolados UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 06, UFTBs 07 e o MIX foram eficazes na produção de biomassa.

Na soja e no feijão caupi a maioria do isolados testados proporcionaram um maior teor de P disponível no solo e na parte aérea das plantas, tanto em solo suplementado com fosfato natural como também em solo sem adubação.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. F. **Bactérias endofíticas em bananeira Prata Anã: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido indol-3-acético**. 2012. 79 p. 2012.. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido)-Universidade Estadual de Montes Claros.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639-1645, 2005.

ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 456-462, 2008.

ARAÚJO, F. F.; CARVALHO, M. H. M. Crescimento de tomateiro após tratamento de mudas com *Bacillus subtilis* e Carbofuran/Growth of tomato after treatment of plants with *Bacillus subtilis* and carbofuran. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 4, 2009.

ARAÚJO, A. S. F. D.; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C; ARAÚJO, F. F. D. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N<sub>2</sub> e o crescimento das plantas. **Ciênc. rural**, v. 40, n. 1, p. 182-185, 2010.

ARAÚJO, F. F.; DE ARAÚJO, A. S. F.; DE SOUZA, M. R. Inoculação do feijão-caupi com rizobactérias promotoras de crescimento e desempenho na produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 17, n. 1, p. 53-58, 2012.

BARROSO, C. B. **Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus Níger***. 2006. xvi, 94 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 11, p. 557-574, 2001.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 63, p. 1670-1680, 1999.

CERQUEIRA, W. F.; MORAIS, J. S.; MIRANDA, J. S.; MELO, I. K. S.; SANTOS, A. F. J. influência de bactérias do gênero *Bacillus* sobre o crescimento de feijão comum (*phaseolus vulgaris l.*). **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11, n.20, 2015

CONAB. **Série histórica da soja**. 2014, Disponível em: <[WWW.conab.gov.br/conabweb/download/safra/SojaSerieHist.xts](http://WWW.conab.gov.br/conabweb/download/safra/SojaSerieHist.xts)> . Acesso em: 19 Jul. 2015.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, v.23, p. 4, 2000.

EMBRAPA MEIO-NORTE. **Estatística da produção de feijão-caupi**. 2009. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=34241>>. Acesso em: 20 jul. 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA - CNPS, 1997. 212 p.

FREIRE FILHO, F. R., RIBEIRO, V. Q., ROCHA, M. D. M., SILVA, K., NOGUEIRA, M.; RODRIGUES, E. Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. **IV Reunião de**, 2011.

GAING, S.; GAUR, A. C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. **Plant and Soil**, 133: 141-149, 1991.

GLASS, A. D. M. Plant Nutrition: an introduction to current concepts. Boston MA: **Jones and Bartlett Publishers**, 1989.

KAMPERT, M.; STRZELCZYK, E.; POKOJSKA, A. Production of auxins by bacteria isolated from roots of pine seedlings (*Pinus silvestris* L.). **Acta Microbiol. Pol.**, V. 7, 1975.

KATZNELSON, H.; COLE, S. E. Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes. **Canadian Journal Microbiol.** v.11, 1965.

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**, 2005.

MEHLICH, A. Determination of P, Ca, Mg, K, Na and NH<sub>4</sub> by North Carolina Soil Testing Laboratory. Raleigh: **University of North Carolina**, 1953

MELO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. **Ecologia Microbiana. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariuna**, p. 86-116, 1998.

NAHAS, E. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J. O. et al. Inter-Relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas. Lavras, **SBCS**. 818p. 1999.

RAASCH, L. D.; BONALDO, S. M.; DE OLIVEIRA, A. A. F. *Bacillus subtilis*: enraizamento e crescimento de miniestacas de eucalipto em Sinop, norte de Mato Grosso = *Bacillus subtilis*: rooting and growth of eucalyptus mini-cuttings in Sinop, northern Mato Grosso. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, 2013.

RAIJ, B. V. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba, **Ceres**, p. 343, 1991.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

RODRIGUES, L. A.; MARTINS, M. A.; SALOMÃO, M. S. M. B. Uso de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalipto e sesbânia. II- Absorção e eficiência de utilização de fósforo e frações fosfatadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 4, p. 593-599, 2003.

SAHARAN, B. S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, 2011.

SILVA, F. de A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. **Anais...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. 2. Ed. **New York: Wiley & Sons**, 1999.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Newcastle University, v. 61, p. 435-440, 2003.

#### 4. CAPITULO III

### ***Bacillus subtilis* COMO PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE MILHO EM CASA DE VEGETAÇÃO**

#### **RESUMO**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de *Bacillus subtilis* como promotor de crescimento vegetal em milho em casa de vegetação. Os tratamentos foram inoculações simples de *B. subtilis* nas sementes no momento do plantio e tratamento testemunha sem inoculação. Foi utilizado o inoculante líquido composto de *B. subtilis* isolados de solos de cerrado no Tocantins, com dose de 1 ml por cova no momento do plantio, com concentração mínima de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Foram feitos dois experimentos e em cada experimento duas avaliações, aos 10 e 20 dias após a emergência (DAE) no primeiro experimento e ao 10 e 35 DAE no segundo experimento. Foram determinados nos dois experimentos a massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST). Com os dados de biomassa determinou-se a eficiência relativa de cada tratamento. No primeiro experimento, houve diferença significativa aos 10 DAE, sendo superior ( $p < 0,01$ ) para o tratamento com inoculação de *B. subtilis* para a MSPA e MST. Aos 20 DAE todas as características de biomassa avaliadas foram superiores ( $p < 0,01$ ) para os tratamentos com inoculação de *B. subtilis*. Para o segundo experimento, nas duas avaliações as características de biomassa foram superiores ( $p < 0,01$ ) para o tratamento com inoculação de *B. subtilis*. Quanto à eficiência relativa, foram observados, também, valores superiores ( $p < 0,01$ ) para o tratamento com inoculação de *B. subtilis*, nos dois experimentos. O uso de *B. subtilis* apresentou resultados significativos no acúmulo de biomassa na cultura do milho, em estágio inicial de crescimento vegetal.

**Palavras-Chaves:** Inoculação, Crescimento vegetal, *Zea mays*.

## ***Bacillus subtilis* AS A PROMOTER OF CORN GROWING IN A GREENHOUSE**

### **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the effect of *Bacillus subtilis* as plant growth promoter in corn in a greenhouse. Treatments were single inoculations of *B. subtilis* in the seeds at planting and control treatment without inoculation. It was used liquid inoculant composed of *B. subtilis* isolated from Cerrado soils in Tocantins, with a dosage of 1 ml per hole at planting, with minimum concentration of  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Two experiments were made and in each experiment two assessments, at 10 and 20 days after emergence (DAE) in the first experiment and 10 and 35 DAE in the second experiment. They were determined in both experiments the shoot dry mass (SDM), root (RDM) and total (TDM). With the data biomass was determined the relative effectiveness of each treatment. In the first experiment, there was a significant difference at 10 DAE, being higher ( $p < 0.01$ ) for the treatment inoculated with *B. subtilis* to the MSPA and MST. At 20 DAE all biomass characteristics evaluated were higher ( $p < 0.01$ ) for the treatments inoculated with *B. subtilis*. For the second experiment, the biomass in both evaluations of characteristics were greater ( $p < 0.01$ ) for the treatment inoculated with *B. subtilis*. As regards the relative efficiency were observed also greater ( $p < 0.01$ ) for the treatment inoculated with *B. subtilis*, in both experiments. The use of *B. subtilis* showed significant results in biomass accumulation in the corn crop in early stages of plant growth.

**Keywords:** Inoculation, Growth vegetable, *Zea mays*.

## INTRODUÇÃO

*Bacillus subtilis* é uma das principais rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCP's). A promoção de crescimento das plantas mediada por *B. subtilis* é realizada por meio de vários mecanismos, como a produção de fitohormônios estimuladores do crescimento, produção de sideróforos e antibióticos e indução de resistência das plantas contra fitopatógenos (RAMAMOORTHY et al., 2001).

Os resultados encontrados com *Bacillus* sp. no controle de doenças das plantas e as perspectivas de seu uso como promotor de crescimento vegetal levaram a estudos utilizando procedimentos de inoculação de sementes, como reportados por Resende et al. (2004), Kavitha et al. (2005) e Araújo (2008). A interação destas bactérias com raízes de plantas no solo e da produção de metabólitos microbianos como reguladores de crescimento têm sido abordada por vários autores (ARAÚJO et al., 2005; RESENDE et al., 2004; ARAÚJO et al. 2012).

Segundo Manjula e Podile (2005), a promoção de crescimento ocasionada por *B. subtilis* é consequência do aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Além dos benefícios indiretos pela supressão deste ambiente contra microrganismos maléficos. Adicionalmente, a associação benéfica proporciona o aumento fisiológico de metabólitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular as condições externas, proporcionando a facilitação da percepção e absorção de nutrientes. Isolados de *B. subtilis* também tem a capacidade de conduzir a regulação hormonal de plantas, como relatado por Tsavkelova et al. (2006) e Persello-Cartieaux et al. (2003), governando assim, o controle do crescimento radicular pela síntese de auxina, giberelina e citocinina.

O milho (*Zea mays* L.) é um vegetal importante para a humanidade, devido ao seu elevado valor nutritivo e pelas diversas formas de utilização na alimentação humana e animal. Entretanto, baixos níveis de produtividade têm sido observados em diversas áreas de produção e uma das principais causas é a pouca disponibilidade de nutrientes no solo (OLIVEIRA et al., 2009).

Em virtude da capacidade das RPCPs de liberar substâncias promotoras de crescimento e auxiliar as plantas pelo fornecimento de nutrientes, pode ocorrer efeitos positivos no desenvolvimento do milho e uma economia na adubação. Neste

sentido, a inoculação das sementes com produto à base de *B. subtilis* pode favorecer o desenvolvimento e a produtividade do milho. Trabalhos de inoculação de RPCPs em culturas como o milho em condições de cerrado no Tocantins ainda são escasso. Considerando a seleção de isolados de *B. subtilis* oriundos de solos de cerrado e seu potencial como RPCPs objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da inoculação com *B. subtilis*, isolados de cerrado, no desenvolvimento inicial do milho em solo natural em casa de vegetação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em casa de vegetação na estação experimental da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi, localizado na região sul do Estado do Tocantins (11°48'29" S, 48°56'39" W, 280 m altitude), onde o clima predominante é do tipo Aw, definido como equatorial e inverno seco.

Foram realizados dois experimentos com a inoculação de *B. subtilis* em milho. O primeiro de dezembro de 2013 a janeiro de 2014, e o segundo de fevereiro a março de 2014. Para a instalação dos experimentos foram utilizados vasos com capacidade de 1,7 L, preenchidos com solo peneirado, coletado em área de cultivo. Foi feita a adubação de base conforme recomendação para cultura e análise do solo.

Nos dois experimentos foram semeadas quatro sementes por vaso. Após a germinação foi feito o desbaste deixando uma planta por vaso.

Foi utilizado o inoculante líquido a base de *Bacillus subtilis*. O produto foi formulado na JCO Fertilizantes (Barreiras, BA) com três estirpes de *Bacillus subtilis*, isolados de solos de cerrado no Tocantins, apresentava concentração mínima de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, e foi aplicado direto na cova sobre as sementes (1 mL por cova), no momento do plantio.+

Foram feitas duas avaliações em cada experimento, sendo no primeiro experimento aos 10 e 20 dias após a emergência (DAE) e no segundo experimento aos 10 e 35 DAE. O material coletado foi lavado em água corrente e levado para secar em estufa a 60 °C para determinação da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST). Com os dados de biomassa determinou-se a eficiência relativa de cada tratamento, calculada segundo a fórmula: ER = (MSPA inoculada com os isolados / MSPA sem inoculante) x 100.

Os resultados foram submetidos à análise estatística e as médias comparadas pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados referentes à matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) para a cultura do milho referentes ao primeiro experimento. Foi possível verificar que na primeira avaliação, aos 10 DAE, que o tratamento com *B. subtilis* foi superior ( $p < 0,01$ ) para a MSPA. Aos 20 DAE o tratamento com *B. subtilis* foi significativamente superior ( $p < 0,01$ ) para todas as características avaliadas.

**Tabela 1:** Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), em milho inoculado com *Bacillus subtilis*. Experimento 1.<sup>1</sup>

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
<b>10 DAE<sup>(2)</sup></b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	0,65 a	1,39 a	2,04 a
Testemunha	0,49 b	1,21 a	1,70 a
CV (%) <sup>3</sup>	10,9	24,4	18,1
<b>20 DAE</b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	1,67 a	2,36 a	3,93 a
Testemunha	1,33 b	1,81 b	3,14 b
CV (%)	10,4	10,1	8,5

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. <sup>(2)</sup> DAE = Dias após a emergência. <sup>(3)</sup> CV: Coef. de Variação.

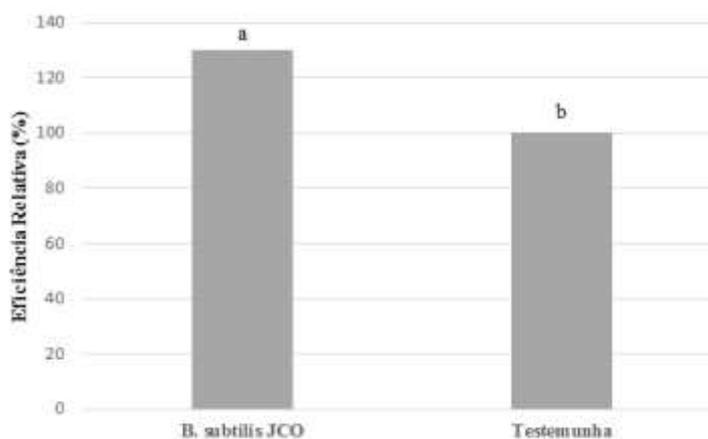
Para o segundo experimento, nas duas avaliações as características de biomassa foram superiores ( $p < 0,01$ ) para o tratamento com inoculação de *B. subtilis* (Tabela 2).

**Tabela 2:** Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), em milho inoculado com *Bacillus subtilis*. Experimento 2.<sup>1</sup>

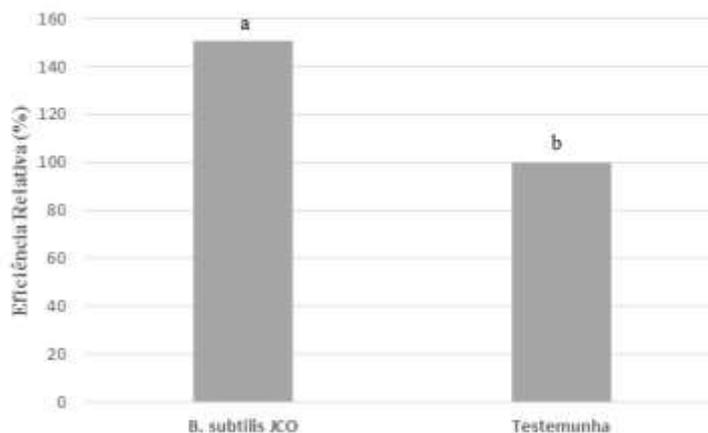
Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
<b>10 DAE<sup>(2)</sup></b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	0,63 a	1,99 a	2,62 a
Testemunha	0,41 b	1,20 b	1,61 b
CV (%) <sup>3</sup>	11,5	14,4	12,8
<b>35 DAE</b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	7,43 a	3,73 a	11,16 a
Testemunha	4,93 b	2,92 b	7,85 b
CV (%)	11,2	13,3	9,8

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. <sup>(2)</sup> DAE = Dias após a emergência. <sup>(3)</sup> CV: Coef. de Variação.

Quanto à eficiência relativa (ER), que relaciona a biomassa da parte aérea do tratamento inoculado com *B. subtilis* com o tratamento testemunha sem inoculação, foi observado valores superiores ( $p < 0,01$ ) para o tratamento com inoculação de *B. subtilis*. O aumento na segunda avaliação aos 20 DAP, no primeiro experimento, foi de 30%. No segundo experimento, na segunda avaliação aos 35 DAE, o aumento na ER foi de 51% em relação à testemunha.



**Figura 1:** Eficiência relativa de milho aos 20 DAE, inoculado com *Bacillus subtilis* em relação a testemunha sem inoculação. Experimento 1.



**Figura 2:** Eficiência relativa de milho aos 35 DAE, inoculado com *Bacillus subtilis* em relação a testemunha sem inoculação. Experimento 2.

De acordo com os resultados, observou-se a capacidade dos isolados de *B. subtilis*, em promover o crescimento inicial de plantas, como observado para a cultura do milho.

O aumento na biomassa vegetal, proporcionada por *B. subtilis*, pode levar a semente à rápida germinação. Manjula e Podile (2005), tratando sementes de feijão guandu com *B. subtilis* AF1, constataram um aumento de 29 e 33% na emergência e peso seco de mudas, respectivamente. Araújo (2008), em experimento com sementes de algodão, milho e soja inoculadas com bioformulados a base de *B. subtilis* PRBS1, também, observou aumento na emergência das plântulas. Segundo Filho et al. (2010), o rápido desenvolvimento da plântula condiciona a mesma a alcançar mais rapidamente o estágio adulto, permanecendo menos tempo no campo, o que favorece o escape contra patógenos presentes no solo e no ambiente externo, podendo promover, também, maior resistência a condições abióticas adversas por apresentar-se nutricionalmente balanceada.

Segundo Filho et al. (2010), o sucesso de *B. subtilis* na promoção de crescimento de plantas está intrinsecamente relacionada com as características biológicas deste microrganismo, que apresenta facilidades para a manutenção de sua viabilidade em bioformulados. Assim, a potencialidade para o incremento da produtividade, bem como a redução de doenças, tem se tornado evidente para essa espécie de *Bacillus*, haja vista, os inúmeros trabalhos para se chegar à luz dos mecanismos benéficos como promoção de crescimento e biocontrole.

Outros trabalhos evidenciam a potencialidade de *B. subtilis* na promoção do

crescimento de plantas, tais como Luz (2001), Lima et al. (2011) e Araújo et al. (2012) em milho e Araújo e Santos Jr. (2009) em feijão caupi e leucena.

Com base nos resultados de diversas pesquisas com milho e outras culturas e no presente trabalho, há a necessidade de usar produtos biológicos que sirvam como alternativa e apresentem controle dos principais patógenos e aumento na biomassa e produtividade de culturas. Assim, a utilização de *B. subtilis* apresenta-se como uma alternativa para o tratamento de sementes de culturas como o milho. Estes inoculantes, como o mix composto por três isolados de *B. subtilis* oriundos de solos de cerrado no Tocantins, poderão ter um importante impacto na redução do uso excessivo de fungicidas e de adubos, no alcance de agricultura sustentável e na proteção do ambiente.

## CONCLUSÃO

Sementes de milho inoculadas com *Bacillus subtilis* nativas de solos de cerrado resultaram em plantas com maior acúmulo de biomassa, em estágio inicial de crescimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybeans root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 1639-1645, 2005.

ARAUJO, F. F. inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 456-462, 2008.

ARAUJO, F. F.; SANTOS JR., J. D. Desenvolvimento e nutrição de milho em solo degradado biofertilizado com fosfato natural, enxofre e acidithiobacillus. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 98-103, 2009.

ARAUJO, F. F.; SOUZA, E. C.; GUERREIRO, R. T.; GUABERTO, L. M.; ARAÚJO, A. S. F. Diversity and growth-promoting activities of *Bacillus* sp. In maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 2012.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

KAVITHA, K.; MATHIYAZHAGAN, S.; SENTHILVEL, V.; NAKKEERAN, S.; CHANDRASEKAR, G. Development of bioformulation of antagonista bacteria for the management of damping off of chilli (*Capsicum annuum*). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 38, n. 1, p. 19-30, 2005.

LIMA, F. F.; NUNES, L. A. P. L.; FIGUEIREDO, M. V. B.; ARAÚJO, F. F.; LIMA, L. M.; ARAÚJO, A. S. F. *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 3, p. 544-550, 2011.

LUZ, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 16-20, 2001.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1057-1062, 2005.

OLIVEIRA, F. A.; CAVALCANTE, L. F.; SILVA, I. F.; PEREIRA, W. E.; OLIVEIRA, J. C.; FILHO, J. F. C. Crescimento do milho adubado com nitrogênio e fósforo em um latossolo amarelo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, p. 238-244, 2009.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, v. 26, p. 186-199, 2003.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAN, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.

RESENDE, M. D. L.; OLIVEIRA, J. A. D.; GUIMARÃES, R. M.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ci. Agrotecnol.**, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 117-126, 2006.

## 5. CAPÍTULO IV

### EFEITO DE *Bacillus subtilis* NA BIOMASSA E PRODUTIVIDADE NA CULTURA DA SOJA EM CAMPO

#### RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência da inoculação de *Bacillus subtilis* no desempenho agrônômico da cultura da soja em condições de campo. Foram desenvolvidos dois experimentos de campo com a inoculação de *B. subtilis* em soja. Um na estação experimental da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi e o outro na área experimental na Fazenda Nova Fronteira, no município de Araguaçu, na região sudoeste do Estado do Tocantins. Os experimentos foram instalados na safra 2013/2014 no período de dezembro a abril. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições e os tratamentos com e sem inoculação de *Bacillus subtilis*. Os parâmetros avaliados foram MSPA, MSR, MST, NN, MSN, estande inicial, estande final e produtividade. A inoculação com *B. subtilis* proporcionou aumento da biomassa de soja nas duas regiões onde foram avaliadas. O *B. subtilis* proporcionou manutenção de estande e aumento da produtividade da soja cultivada nas condições edafoclimáticas das regiões de Gurupi e Araguaçu em Tocantins. O uso de *B. Subtilis* não interferiu na nodulação da soja, contribuindo para o aumento do número e peso de nódulos.

**Palavras Chave:** *Glycine Max* , Biomassa e Produtividade.

## EFFECT ON *Bacillus subtilis* IN BIOMASS AND PRODUCTIVITY IN SOYBEAN

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of *Bacillus subtilis* inoculation in the agronomic performance of the soybean crop under field conditions. Two field experiments were developed with inoculation of *B. subtilis* in soybeans. One in the experimental station of the Federal University of Tocantins, Campus Gurupi and the other in the experimental area in the New Frontier Farm in the municipality of Araguaçu, in the southwestern state of Tocantins region. The experiments were conducted in the 2013/2014 season from December to April. The design was a randomized block with four replications and the treatments with and without inoculation of *B. subtilis*. Evaluated MSPA, MSR, MST, NN, MSN, initial stand, final stand and productivity. Inoculation with *B. subtilis* provided increased soybean biomass in the two regions where they were evaluated. The *B. subtilis* provided booth maintenance and increased productivity of soybeans grown in soil and climatic conditions of the regions of Gurupi and Araguaçu in Tocantins. The use of *B. subtilis* interfereriu not on soybean nodulation, contributing to increasing the number and weight of nodules.

**Key words:** *Glycine Max*, Biomass and Productivity.

## INTRODUÇÃO

O Tocantins tem se destacado no cultivo de soja, possuindo condições favoráveis ao desenvolvimento da cultura. Na safra de 2013/14 a área plantada no Estado foi de 221,4 mil hectares com crescimento de 45,3% na safra 2014/15, com um total de 321,7 mil hectares. Quanto à produção foi colhido em 2014/15 970,9 mil toneladas com produtividade médias de 3.018 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2015).

A cultura da soja se destaca como um dos elementos mais fortes da economia brasileira dentro do meio rural. A soja tem um potencial de produtividade (mais de 4000 kg ha<sup>-1</sup>) utilizando um alto nível de tecnologia, porém a vários fatores que delimitam esse alto índice de produtividade entre eles as doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus.

A utilização de produtos químicos como fungicidas para o controle de doenças de solo tem um custo muito alto, portanto a integração entre técnicas de controle biológico e práticas culturais que inibam o patógeno são as melhores alternativas (VISCARDI, 2013).

Além da capacidade de uso de microrganismos com potencial para o biocontrole de doenças, o uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal vem sendo muito discutido no meio científico, uma vez que esses organismos contribuem tanto no aumento de produtividade como no controle biológico. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) são bactérias encontradas na rizosfera, podendo estar na superfície ou em associação com as raízes, sendo capazes de potencializar o crescimento da planta de maneira direta ou indireta (GALDIANO JUNIOR, 2011). Os gêneros mais estudados destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium*.

Bactérias do gênero *Bacillus*, além de componentes da população microbiana do solo, rizoplano e filoplano, apresentam características atrativas para os estudos de controle biológico de doenças e promotoras de crescimento de plantas (NORONHA et al., 1995). É uma das principais rizobactérias de importância para o aumento do crescimento vegetal e influência positivamente a germinação, desenvolvimento e rendimento da cultura devido, também, à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas (LIMA, 2010).

O gênero *Bacillus* é composto de microrganismos ambientais cujo habitat principal é o solo onde possuem um papel importante no ciclo do carbono e do nitrogênio. A resistência dos esporos e a diversidade fisiológica das formas vegetativas fazem com que sejam considerados ubíquos, podendo ser isolados do solo, água do mar e água doce e gêneros alimentícios (GOMES, 2013).

A espécie *Bacillus subtilis* apresenta um efeito benéfico sobre a nodulação, atuam indiretamente pela supressão de doenças e diretamente pela produção ou alteração da concentração de fitohormônios, fixação de N, pela solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo; oxidação do S; aumento de permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (MARIANO & KLOEPPER, 2000) promovendo o aumento da produtividade das culturas principalmente quando associado a outras práticas de manejo, tais como a adubação (LIMA, 2010). Adicionalmente, a associação benéfica proporciona o aumento fisiológico de metabólitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular as condições externas, proporcionando a facilitação da percepção e absorção de nutrientes, e pode levar a semente à rápida germinação (MANJULA & PODILE, 2005).

O sucesso do *B. subtilis* na promoção de crescimento de plantas está essencialmente relacionada com as características biológicas deste microrganismo, que apresenta facilidade para a manutenção de sua viabilidade em bioformulados. Assim, a potencialidade para o incremento da produtividade, bem como a redução de doenças, tem se tornado evidente para essa espécie de *Bacillus*.

Portanto o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de *Bacillus subtilis* no desenvolvimento da biomassa, na nodulação e na produtividade da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em condições de campo em duas localidades na safra 20013/2014.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram desenvolvidos dois experimentos de campo com a inoculação de *B. subtilis* em soja. Um na estação experimental da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, localizada a 11° 43' de latitude Sul e 49° 04' de longitude Oeste e altitude de 280 m, apresentando clima predominante Aw, segundo classificação de Koppen-Geiger, predominantemente tropical com estação seca. O outro na área experimental na Fazenda Nova Fronteira, no município de Araguaçu, na região

sudoeste do Estado do Tocantins localizado a 12° 55'50" de latitude Sul e 49°49'35" de longitude Oeste e altitude de 278 m, apresentando clima predominante Aw, segundo classificação de Koppen-Geiger, predominantemente tropical com estação seca.

As características de química e física dos solos foram determinadas conforme Embrapa (1997) e análise da matéria orgânica pelo processo de Walkley-Black (Jackson, 1958), conforme as Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Análise química do solo do experimento na Estação Experimental da UFT, Campus de Gurupi, TO.

Profundidade	pH	P	K	Al <sup>3+</sup>	H + Al	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	SB	T	V	MO
Cm	CaCl	--mg dm <sup>-3</sup> --		-----cmolc dm <sup>-3</sup> -----						%	g.dm <sup>-3</sup>
0-20	4,7	6,23	55,5	0,0	4,13	2,14	0,86	3,1	7,27	43,2	26,7

**Tabela 2:** Análise química do solo do experimento na Fazenda Nova Fronteira em Araguaçu, TO.

Profundidade	pH	P	K	Al <sup>3+</sup>	H + Al	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	SB	T	V	MO
Cm	CaCl	--mg dm <sup>-3</sup> --		-----cmolc dm <sup>-3</sup> -----						%	g.dm <sup>-3</sup>
0-20	5,1	1,8	59	0,0	1,7	1,6	1,2	2,9	4,65	63,4	12

Os experimentos foram instalados na safra 2013/2014 no período de dezembro a abril.

No experimento na estação experimental da UFT o preparo do solo foi realizado pelo método convencional, onde a grade aradora foi utilizada para fazer uma gradagem, e para o nivelamento do solo foi utilizada a grade niveladora em uma operação e sulcagem com uso de sulcador de linhas, adotando profundidade de sulco de 10 cm e espaçados 50 cm entre linhas.

Cada parcela experimental foi constituída por (9) linhas de (6) metros de comprimento, com o espaçamento entre linhas de 0,5 m, 1 m entre parcelas e 1 m entre blocos, totalizando uma parcela de 24 m<sup>2</sup>.

Conforme a análise de solo foi feita a recomendação de adubação, no qual foi recomendado 80 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 60 kg de KCl por ha. A adubação foi feita em linha, utilizando como fonte fósforo o superfosfato simples amoniado, que apresenta em

sua composição 3% de N e 17% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e como fonte de potássio o KCl com 58% de K<sub>2</sub>O.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições e os tratamentos com e sem inoculação de *Bacillus subtilis*.

As sementes de soja utilizadas foram da variedade MONSOY- M 9144 RR, e inoculadas com rizóbio com inoculante comercial recomendado para soja que utiliza como veículo a turfa. A aplicação do inoculante foi realizada na proporção de 10 g do inoculante por kg de semente.

Para o tratamento com a utilização de *Bacillus subtilis*, foi realizada a aplicação da solução na semeadura, diretamente na linha de plantio com dosagem de 2 L ha<sup>-1</sup>. Foi utilizado o inoculante líquido composto por *B. subtilis* na concentração de 1 x 10<sup>9</sup> células viáveis por ml/g.

O plantio foi realizado utilizando 15 sementes por metro linear, visando um estande de 12 plantas por metro linear estimando um total de 240.000 mil plantas por hectare.

Para o controle de plantas daninhas, foi realizada apenas uma aplicação do herbicida pós emergente na dose de 50 ml por bomba e utilizando duas bombas costais de 20 litros totalizando 100 ml do produto. Para o controle de pragas foi aplicado o inseticida Intrepred 240 SC para o controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) e lagarta falsa medideira (*Pseudoplusia includens*) foi utilizado dose de 15 ml por bomba e feita duas aplicações no total de 30 ml do produto e para o controle da vaquinha (*Diabrotica speciosa*) e de percevejo verde (*Nezara viridula*) utilizou-se o produto Lancer 750 SP na dose de 250 gramas por bomba costal 2 aplicações totalizando 500 gramas.

Foram realizadas duas coletas de plantas durante o experimento, sendo a primeira aos 25 dias e a segunda aos 56 dias após o plantio, visando quantificar a biomassa da raiz, da parte aérea e total, assim como o número de nódulos e massa seca dos nódulos. As coletas partiram da amostragem de três plantas situadas na bordadura para não comprometer as plantas da área útil de cada parcela, sendo as partes aérea e radicular separadas, identificadas e armazenadas em sacos de papel. As raízes foram lavadas em água corrente, posteriormente foi feita a contagem de cada amostra. De posse das raízes, nódulos e parte aérea, os materiais foram secos em estufa a fim de se obter peso seco para posteriormente serem pesadas em

balança eletrônica para obter a massa seca da parte aérea (MASPA), radicular (MSR), total (MST) e massa seca dos nódulos (MSN).

A colheita foi realizada nas duas linhas centrais de cada tratamento onde foi colhido 4 metros de cada linha no total 8 m<sup>2</sup> da parcela, depois foi debulhada e pesada para estimar a produtividade por hectare e realizado a contagem do estande final.

A eficácia (E%) ou eficiência na utilização do inoculante *B. subtilis* na manutenção do estande, foi calculada utilizando-se a equação:  $E\% = \{1 - [Ti / Tc]\} \times 100$ , na qual E% = eficácia do tratamento; Ti = % media do estande final no tratamento i; Tc = % media do estande final no tratamento testemunha.

No experimento na Estação Experimental da Fazenda Nova Fronteira, em Araguaçu, a área do experimento foi adubada antes do plantio com base no resultado da análise de solo, com 150 kg de K<sub>2</sub>O, feita a lanço. No plantio foi aplicado 221 kg ha<sup>-1</sup> de NPK com a formulação 05-37-00.

O plantio foi feito com plantadeira modelo PP solo, da marca Baldan, de 11 linhas com espaçamento de 50 cm entre linhas.

O experimento também foi em blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo os mesmos tratamentos com e sem inoculação de *B. subtilis*. Para o tratamento com *B. subtilis*, também foi utilizado o inoculante líquido composto por *B. subtilis* na concentração de 1 x 10<sup>9</sup> células viáveis por ml/g. inoculado direto na linha de plantio como uso do pulverizador miron combat acoplado à plantadeira, na dose de 2 L ha<sup>-1</sup>.

No plantio objetivou-se um estande final de 13 plantas por metro linear, utilizado, também a cultivar MONSOY- M 9144 RR.

Para os tratamentos necessário à cultura foi feita a aplicação dos seguintes produtos: Aplitec 30 mL ha<sup>-1</sup>; Carbendazim 1 L ha<sup>-1</sup>; Glifosato 1,8 L ha<sup>-1</sup>; intrepid 150 mL ha<sup>-1</sup>; Manganês 200 mL ha<sup>-1</sup>.

Aos 20 e 60 dias após o plantio, procedeu-se a coleta de plantas visando quantificar a biomassa, estande inicial e final, bem como a produtividade, semelhante ao experimento na Estação Experimental da UFT, em parcelas experimentais, também, de 24 m<sup>2</sup>.

Em ambos experimentos foram feitas as análise de variância e ao teste de Duncan a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento na Estação Experimental da UFT, a primeira coleta aos 25 dias após o plantio (DAP) a soja se encontrava no estágio V3 nas avaliações de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) não havendo diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). Na segunda avaliação aos 56 DAP verifica-se que o tratamento com *B. subtilis* teve resultado superior ( $p < 0,05$ ) para a produção de MSPA, MSR e MST em comparação a testemunha. Quanto ao número de nódulos (NN) e massa seca dos nódulos (MSN), aos 25 DAP não houve diferença significativa entre os tratamentos. Na avaliação aos 56 DAP o tratamento com *B. subtilis* foi superior ( $p < 0,05$ ) a testemunha quanto NN e MSN (Tabela 3).

**Tabela 3:** Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), em soja inoculado com *Bacillus subtilis*, cultivada na estação experimental da UFT Campus de Gurupi.

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	NN	MSN (mg)
<b>25 DAP (Estádio V3)</b>					
<i>Bacillus subtilis</i>	0,80 a	0,23 a	1,03 a	14,8 a	64,3 a
Testemunha	0,77 a	0,23 a	1,00 a	8,7 a	40,5 a
CV (%)	18,5	16,5	17,8	35,7	35,2
<b>56 DAP (Estádio R3)</b>					
<i>Bacillus</i>	14,1 a	2,23 a	16,33 a	18,3 a	192,5 a
Testemunha	8,10 b	1,52 b	9,60 b	11,4 b	120,0 b
CV (%)	19,6	11,4	12,3	20,2	18,6

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. <sup>(2)</sup> DAE = Dias após a emergência. CV: Coeficiente de Variação.

Para a variável estande inicial (25 DAP) não houve diferença significativa entre os tratamentos. Porém, aos 50 DAP foi superior para o tratamento com *B. subtilis* (Tabela 4). Quanto à sobrevivência e eficácia do tratamento com inoculação de *B. subtilis*, não houve diferença significativa para a sobrevivência e a eficácia na utilização de *B. subtilis* foi de 4,8%. Quanto a produtividade, houve diferença entre os tratamentos sendo superior ( $p < 0,05$ ) para o tratamento com inoculação de *B.*

*subtilis* (2585,4 kg ha<sup>-1</sup>) em relação a testemunha (2250,1 kg ha<sup>-1</sup>), com produção de 43,1 sacas ha<sup>-1</sup>, sendo 14,9% superior a testemunha com 37,5 sacas ha<sup>-1</sup>, referente a um aumento de 5,6 sacas ha<sup>-1</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4.** Estande inicial (EI), estande final (EF), sobrevivência, eficácia e produtividade de soja Monsoy-M 9144 RR, inoculada com *B. subtilis*, Estação Experimental da UFT, Campus de Gurupi, TO. Safra 2013/2014. <sup>1</sup>

Tratamentos	EI	EF	Sobrev. <sup>(3)</sup> (%)	Eficácia <sup>(4)</sup> (%)	Prod. (Kg ha <sup>-1</sup> )	Sacas
	25 DAP <sup>(2)</sup> (plantas m <sup>-2</sup> )	50 DAP (plantas m <sup>-2</sup> )				
<i>B. subtilis</i>	144,7 a	115,8 a	80,0 a	4,8	2585,4 a	43,1
Testemunha	140,3 a	110,3 b	78,6 a		2250,1 b	37,5
CV (%) <sup>(5)</sup>	8,7 *	7,8 *	12,1 *	-	8,6 *	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 1 e 5% de significância. <sup>(2)</sup> DAP = Dias após o plantio. <sup>(3)</sup> Sobrev. = percentual de sobrevivência de plantas em relação ao estande esperado de 12 plantas por metro linear. <sup>(4)</sup> Eficácia ou eficiência na utilização do *B. subtilis* na manutenção do estande. <sup>(5)</sup> CV = Coeficiente de Variação.

Para o experimento na Estação Experimental da Fazenda Nova Fronteira, na primeira avaliação aos 20 DAP, houve diferença significativa para as variáveis MSPA, MSR e MST, sendo superior ( $p < 0,05$ ) para o tratamento com *B. subtilis*. Na segunda avaliação aos 60 DAP também o tratamento com inoculação de *B. subtilis* foi superior ( $p < 0,05$ ) para as variáveis de biomassa (Tabela 5). Para a massa seca dos nódulos (MSN), a avaliação foi realizada aos 60 DAE, onde o tratamento com inoculação de *B. subtilis* foi superior ( $p < 0,05$ ) em relação a testemunha.

**Tabela 5:** Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), em soja inoculado com *Bacillus subtilis*, cultivada na estação experimental na Fazenda Nova Fronteira, Araguaçu.

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	NN	MSN (mg)
<b>20 DAP (Estádio V3)</b>					
<i>Bacillus subtilis</i>	0,70 a	0,33 a	1,03 a	-	-
Testemunha	0,53 b	0,20 b	0,73 b	-	-
CV (%)	10,4	15,2	10,5		
<b>60 DAP (Estádio R3)</b>					
<i>Bacillus</i>	13,66 a	2,55 a	16,21 a	67,0 a	361 a
Testemunha	11,09 b	2,31 b	13,40 b	53,0 a	224 c
CV (%)	10,6	12,2	11,8	32,0	23,0

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. <sup>(2)</sup> DAE = Dias após a emergência. CV: Coeficiente de Variação.

Para a variável estande inicial, aos 20 DAP, houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo superior ( $p < 0,05$ ) para o tratamento com inoculação de *B. subtilis*, da mesma forma aos 60 DAP (Tabela 6). Quanto à sobrevivência e eficácia do tratamento com inoculação de *B. subtilis*, não houve diferença significativa para a sobrevivência e a eficácia na utilização de *B. subtilis* foi de 6,6%. Quanto a produtividade, houve diferença entre os tratamentos sendo superior ( $p < 0,05$ ) para o tratamento com inoculação de *B. subtilis* ( $3330 \text{ kg ha}^{-1}$ ) em relação a testemunha ( $3060 \text{ kg ha}^{-1}$ ), com produção de  $55,5 \text{ sacas ha}^{-1}$ , sendo 8,8% superior a testemunha com  $51,0 \text{ sacas ha}^{-1}$ , referente a um aumento de  $4,5 \text{ sacas ha}^{-1}$  (Tabela 6).

**Tabela 6.** Estande inicial (EI), estande final (EF), sobrevivência, eficácia e produtividade de soja Monsoy-M 9144 RR, inoculada com *B. subtilis*, na Fazenda Nova Fronteira, Araguaçu. TO. Safra 2013/2014

Tratamentos	EI 20 DAP <sup>(2)</sup> (plantas m <sup>-2</sup> )	EF 60 DAP (plantas m <sup>-2</sup> )	Sobrev. <sup>(3)</sup> (%)	Eficácia <sup>(4)</sup> (%)	Prod. (Kg ha <sup>-1</sup> )	Sacas
<i>B. subtilis</i>	130,5 a	130,0 a	99,6 a	6,6	3330 a	55,5
Testemunha	125,0 b	122,0 b	97,6 a		3060 b	51,0
CV (%) <sup>(5)</sup>	8,5	8,1	7,6		8,8	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 1 e 5% de significância. <sup>(2)</sup> DAP = Dias após o plantio. <sup>(3)</sup> Sobrev. = percentual de sobrevivência de plantas em relação ao estande esperado de 30 plantas m<sup>2</sup>. <sup>(4)</sup> Eficácia ou eficiência na utilização do *B. subtilis* na manutenção do estande. <sup>(5)</sup> CV = Coeficiente de Variação.

Espécies de *B. subtilis* produzem fitohormônios durante seu desenvolvimento, os quais também proporcionam estímulo no desenvolvimento radicular como constatado por Araújo et al. (2005) em soja. A promoção de crescimento ocasionada por microrganismos do solo ocorre devido à ação de vários fatores ainda pouco esclarecidos, podendo envolver produção de hormônios vegetais, produção de vitaminas ou conversão de materiais a uma forma útil para as plantas, absorção e translocação de minerais e controle de patógenos (AGUIAR et al., 2013). Estes efeitos podem ter ocorrido nos dois experimentos o que pode ter proporcionado aumentos na biomassa da soja como observado nas tabelas 3 e 5.

O efeito sobre o aumento da disponibilização de nutrientes proporcionado pela inoculação de *B. subtilis* foi encontrado por Canbolat et al. (2006) em trigo e cevada os quais sugeriram que as estirpes de *Bacillus* utilizadas apresentaram potencial para o aumento do crescimento das plantas. Tsavkelova et al. (2006) relataram que isolados de *B. subtilis* também têm a capacidade de conduzir a regulação hormonal de plantas governando assim, o controle do crescimento radicular pela síntese de auxina, giberelina e citocinina.

Porém, na avaliação aos 25 DAP no experimento na Estação Experimental da UFT não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). Segundo Motta (2013) na fase inicial da cultura quando se inocula um microrganismo, o fungo ou bactéria podem não ter tido tempo para se estabelecer completamente na área, podendo ser explicado que aos 25 DAP o uso de *B. subtilis* não ter se deferido da testemunha.

Além de promotores de crescimento, microrganismos rizosféricos, principalmente do gênero *Bacillus*, possuem um grande potencial de controle biológico de nematóides fitopatogênicos (NEIPP & BECKER, 1999). Segundo Yao et al. (2006) *B. subtilis* tem sido usado comercialmente para o biocontrole de enfermidades de plantas, assim como para aumentar a produtividade de culturas.

Sharma e Gomes (1996) relataram que as endotoxinas produzidas por *B. subtilis* no solo interferem no ciclo reprodutivo dos nematóides, principalmente na oviposição e eclosão de juvenis.

Estes efeitos podem ter se refletido nos estande inicial e final, onde foi possível observar que o tratamento com inoculação de *B. subtilis* apresentou resultado superior à testemunha, nos dois experimentos (Tabelas 4 e 6). Resultado semelhante foi observado por (MERTZ et al., 2009) concluindo que na ausência de tratamento de sementes ocorreu decréscimo na emergência das plântulas, com comprometimento do estande final, o que pode ter ocorrido na manutenção dos estandes nos dois experimentos (Tabelas 4 e 6), mesmo com a aplicação do inoculante *B. subtilis* na linha de plantio.

O êxito do uso de *B. subtilis* no crescimento de plantas está relacionado com as características biológicas deste microrganismo, que expressa facilidades para a manutenção de sua viabilidade em bioformulados e com isso a potencialidade para o aumento da produtividade, bem como a redução de doenças.

## CONCLUSÕES

A inoculação com *B. subtilis* proporcionou aumento da biomassa de soja nas duas regiões onde foram avaliadas.

A inoculação de *B. subtilis* proporciona manutenção de estande e aumento de produtividade da soja cultivada nas condições edafoclimáticas das regiões de Gurupi e Araguaçu em Tocantins.

O uso de *B. Subtilis* não interfere na nodulação de soja, contribuindo para o aumento do número e peso de nódulos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. R.; MACHADO, D. F. M.; PARANHOS, J. T.; DA SILVA, A. C. F. seleção de isolados de *trichoderma* spp. na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. carioca e controle de *sclerotinia sclerotiorum*. **Ciência e Natura**, v. 34, n. 2, p. 47-58, 2013.

ARAUJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. 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.

CANBOLAT, M. Y; BILEN, S; ÇAKMAKÇI, R; ŞAHIN, F; AYDIN, A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and fertility of soils**, V42, 350-357, 2006.

CONAB. Acomp. **safr**a bras. grãos, v. 2 - Safra 2014/15, n. 9 - Nono levantamento, junho 2015. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_06\\_11\\_09\\_00\\_38\\_boletim\\_graos\\_junho\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_11_09_00_38_boletim_graos_junho_2015.pdf)> Acesso em: 19 Jul. 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA - CNPS, 1997. 212 p.

GALDIANO JR., R. F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. Jaboticabal. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/m/3614pd>> Acesso em: 10 de set. de 2011.

GOMES, J. M. Gênero *Bacillus* spp. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária FAVET-UFRGS**. 2013.

JACKSON, M.L. **Soil chemical analysis**. New Jersey, Prentice Hall, 1958. 498p.

LIMA, F. F. **Bacillus subtilis e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho**. Teresina. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). 2010.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MARIANO, R.L.R.; KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 121-137, 2000.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 13-18, 2009.

MOTTA, P. H. C. **Avaliação do efeito de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento da biomassa e produtividade do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Gurupi: UFT, 2013, 24p. Monografia.

NEIPP, P. .W., BECKER, J. O. Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta vulgaris* against *Heterodera schachtii*. **Journal of Nematology**, v.31, n.1, p.54-61, 1999.

NORONHA, M.A., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, n.2, p.174-178, 1995.

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

SILVA, F. de A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. **Anais...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p.117–126, 2006.

VISCARDI, B. S. M. **Influência do esterco bovino no desenvolvimento do feijão caupi (*Vigna unguiculata*) e no controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) na presença ou não de *Trichoderma harzianum***. 2013. xii, 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

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

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo com *Bacillus subtilis* vimos o potencial dos isolados testados dessa rizobactéria para o controle biológico e como promotor do crescimento vegetal, direcionado para uso de inoculantes para a região do Cerrado em culturas estratégicas, em função dos resultados desta pesquisa, e para novas áreas em potencial para o uso dos produtos gerados (inoculantes).

O trabalho apresentou resultados referentes à capacidade antagônica de isolados de *B. subtilis* contra diferentes patógenos, *in vitro*, evidenciando os efeitos de *B. subtilis* para o controle de patógeno. Mostrou a capacidade em promover o crescimento de culturas, como também promover a maior disponibilidade de P, em casa de vegetação. Como também o efeito positivo da aplicação de *B. subtilis* no crescimento vegetal, desenvolvimento e rendimento da soja em campo em duas regiões, mostrando a capacidade de adaptabilidade e resistência dessa bactéria a diferentes condições. Araujo (2008) observou que a inoculação de sementes de milho e algodão com *B. subtilis* apresentou potencial para incrementar o crescimento das duas culturas. Segundo Rodríguez e Fraga (1999) as bactérias do gênero *Bacillus* estão entre as com maior potencial para solubilização de fosfato. *Bacillus subtilis* tem sido usado comercialmente para o biocontrole de enfermidades de plantas, assim como para aumentar a produtividade de culturas (NGUGIA et al., 2005).

A utilização de *B. subtilis* como promotores de crescimento de plantas e biocontrole é uma das estratégias mais importante para o setor agrícola, isso em função das demandas emergentes para a diminuição de dependência de fertilizantes químicos, além da necessidade de desenvolvimento da agricultura sustentável, onde a inoculação desta bactéria promova o maior rendimento e proteção das culturas no campo.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 2, p. 456-462, 2008.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4081-4085, 1996.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.

BERNARDES, T.G.; SILVEIRA, P.M. DA; MESQUITA, M.A.M. Regulador de crescimento e *Trichoderma harzianum* aplicados em sementes de feijoeiro cultivado em sucessão a culturas de cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia-GO, v. 40, n. 4, p. 439-446, 2010.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

JOHNSON, C.; BISHOP, A. H.; TURNER C. L. Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the housefly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Journal Invertebrate Pathology**, v.71, p.138-144, 1998.

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.

NGUGIA, H.K.; DEDEJB, S.; DELAPLANEB, K.S.; SAVELLEA, A.T.; SCHERMA, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v.33, p.32-38, 2005.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, n.4-5, p.319-339, 1999.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8 (Suppl-1, M4), p. 71-126. 2014.