

**MULTIPLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* EM VINHAÇA E VIABILIDADE
NO CONTROLE DE MELOIDOGINOSE EM CANA-DE-AÇÚCAR**

RODRIGO BORGES CARDOZO

**MULTIPLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* EM VINHAÇA E VIABILIDADE
NO CONTROLE DE MELOIDOGINOSE EM CANA-DE-AÇÚCAR**

RODRIGO BORGES CARDOZO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Fernando de Araújo

633.61 C268m	Cardozo, Rodrigo Borges. Multiplicação de <i>Bacillus subtilis</i> em Vinhaça e Viabilidade no Controle de Meloidoginose em Cana-de-açúcar / Rodrigo Borges Cardozo. – Presidente Prudente SP, 2009. 31 f Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2009. Bibliografia 1. Cana-de-açúcar -- resíduos orgânicos. 2. <i>Meloidogyne</i> . 3. Fitopatologia. 3. Controle biológico. I. Título.
-----------------	--

RODRIGO BORGES CARDOZO

**MULTIPLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* EM VINHAÇA E VIABILIDADE
NO CONTROLE DE MELOIDOGINOSE EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos obtenção do título de Mestre em.Agronomia.

Presidente Prudente, 02 de Julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Fernando de Araujo
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto
Universidade do Oeste Paulista- UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Alan Pomella
Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM
Patos de Minas - MG

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador, Dr. Fabio Fernando de Araújo, por seu empenho e dedicação prestada no decorrer do trabalho.

Aos demais professores, pelos ensinamentos e trocas de experiências que foi de fundamental importância para mais essa vitória.

A funcionaria Márcia, pelo apoio técnico e companheirismo no decorrer de todo o trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa Marcia Helena Ferreira Cardozo por me inspirar em todos os momentos e ser a mãe de nosso Raul, que chegou para abrilhantar ainda mais esta fase tão especial de nossas vidas.

A minha família, pelo amor e por sempre acreditar e incentivar na luta para as realizações dos nossos sonhos.

“[...] A felicidade não está em viver, mas em saber viver. Não vive mais o que mais vive, mas o que melhor vive. [...]”

Mahatma Gandhi.

RESUMO

Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle de Meloidoginose em cana de açúcar

Este trabalho objetivou avaliar a utilização de vinhaça como meio de cultura para multiplicação de *Bacillus subtilis* e o efeito de sua aplicação no solo visando o controle de nematóides e promoção crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solo infestado com nematóide de galhas (*Meloidogyne* spp.). Foram desenvolvidos ensaios em laboratório para definição da melhor concentração de vinhaça na composição do meio de cultura visando otimização do crescimento de *B. subtilis*. No experimento em casa de vegetação foi utilizado solo coletado em área de cultivo de cana. Foram estabelecidos os seguintes tratamentos: controle; vinhaça pura ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$); *Bacillus subtilis* em suspensão aquosa ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$); *B. subtilis* multiplicado na vinhaça ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$); *B. subtilis* multiplicado na vinhaça ($100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$). A multiplicação de *Bacillus subtilis* em meio de cultura a base de vinhaça foi considerada satisfatória em comparação ao meio de cultura padrão. A aplicação de *B. subtilis* não multiplicado na vinhaça promoveu o crescimento da cana e redução da reprodução dos nematóides na raiz durante o experimento. A utilização de *B. subtilis*, multiplicado na vinhaça, não alcança os benefícios encontrados na aplicação apenas da bactéria, com relação ao estímulo ao crescimento e controle de nematóides na cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar -- resíduos orgânicos; *Meloidogyne*; Fitopatologia; Controle biológico

ABSTRACT

Multiplication of *Bacillus subtilis* in vinasse and viability in the control of *Meloidogyne incognita* in cane sugar

This work aimed to evaluate the use of vinasse as a cultive medium for multiplication of *Bacillus subtilis* and the effect of your inoculation to control nematodes and growth of sugar cane grown in soil infested with the nematode galls (*Meloidogyne* spp.). Were developed in laboratory tests to define the best concentration of vinasse on the composition of culture medium to optimize the growth of *B. subtilis*. For the experiment with plants in the greenhouse soil used was collected in area of cultivation of sugarcane. Were established the following treatments: control, pure vinasse ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$), *Bacillus subtilis* in aqueous suspension ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$); *B. subtilis* multiplied in vinasse ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$), multiplied in *B. subtilis* vinasse ($100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$). The multiplication of *Bacillus subtilis* in the culture-based stillage was considered satisfactory when compared to the culture pattern. The application of *B. subtilis* without multiplication in vinasse promoted the growth of sugarcane and reduced reproduction of the nematodes in the root during the experiment. The use of *B. subtilis*, multiplied in vinasse not achieved the benefits found in the application of bacteria in aqueous suspension, with the stimulus to growth and control of nematodes in sugar cane.

Keywords: Sugar-cane -- organic residues; *Meloidogyne*; Phytopathology; Biological control

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODO	14
2.1 Descrição da vinhaça e estirpe de <i>Bacillus subtilis</i> utilizados	14
2.2 Avaliação do de <i>Bacillus subtilis</i> em meio contendo vinhaça	14
2.3 Efeito do <i>Bacillus subtilis</i> multiplicado em meio com vinhaça sobre o crescimento da cana e controle de nematóides	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	18
4 CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

A produção de cana-de-açúcar no Brasil é a maior do mundo, a produção em 2008 foi de 643.652.312 toneladas, 17,4% superior a de 2007. São Paulo é responsável por 60,2% da produção brasileira (387,5 milhões de toneladas), um crescimento de 18,3% na produção em relação a 2007 (IBGE 2009). Sendo que parcela considerável da cana produzida é destinada para produção de álcool.

A vinhaça é um resíduo gerado em grande abundância, nas destilarias de produção de álcool. O resíduo é caracterizado como líquido de coloração escura sendo produzido na proporção de 10 a 15 litros para cada litro de álcool, a mesma na sua constituição apresenta uma mistura de água e compostos orgânicos e inorgânicos (MENEZES, 1980). A utilização da vinhaça na fertirrigação promove a adição de nutrientes ao solo, elevação da umidade e do pH e melhora a resistência do solo à erosão, resultando no acréscimo da produtividade agrícola (CAMBUIM, 1983).

Segundo Rosenfeld (2003) o setor sucroalcooleiro é o que melhor uso faz dos efluentes gerados, comentando que esse uso não se dá apenas devido a crescente consciência ambiental, mas principalmente porque o efluente produzido tem grande quantidade de nutrientes, não tem metais pesados e tem baixa quantidade de sódio que diminui o risco de saturação. Os nutrientes existentes nestes efluentes são provenientes da própria cana, em alguns casos complementados com nitrogênio, fósforo e enxofre adicionados no processo industrial. A extensa literatura disponível relata efeitos da aplicação da vinhaça sobre as características e propriedades físico químicas e mecânicas do solo; no entanto, são poucas as informações relativas sobre os efeitos biológicos advindos da aplicação deste resíduo ao solo, principalmente sobre a atividade supressiva no controle de fitopatógenos do solo (PEDROSA et al., 2005).

Com o crescente plantio da cana-de-açúcar, principalmente no Estado de São Paulo, novos espaços vêm sendo requisitados estabelecendo-se a necessidade de uso de solos pobres e arenosos. Com isso, aumentam os problemas fitossanitários, entre os quais se destaca a ação dos fitonematóides (MOURA, 2000). Dinardo-Miranda e Menegatti (2003) estimam que na cultura da cana-de-açúcar os

danos causados pelos nematóides sejam superiores a 20% da produção. Estes danificam o sistema radicular das plantas, chegando a comprometer a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, o seu desenvolvimento. Além disso, os prejuízos causados pelos fitonematóides, em áreas cultivadas, podem inviabilizar a utilização dessas áreas para novos cultivos, tornando assim, anti-econômica a exploração de certas culturas em determinadas áreas. Muito se tem feito para o controle de nematóides e vários métodos apresentaram resultados positivos. Entre as alternativas mais empregadas, destaca-se o controle químico, especialmente por este apresentar resultados imediatos. Entretanto, o uso de nematicidas sistêmicos em plantios de cana-de-açúcar tem sido questionado quanto à eficácia e pela inconstância dos resultados (BARROS et al., 2003).

O emprego da matéria orgânica tem sido preconizado com destacada eficiência para controle destes microrganismos, contribuindo para a redução do uso de produtos químicos e os conseqüentes impactos ao meio ambiente. Nematicidas de solo, além de apresentarem elevado custo, são prejudiciais a saúde humana, animal e ao meio ambiente, e são pouco eficientes no controle da meloidoginose em plantas (FILGUEIRA, 2000). Produtos naturais também já foram testados no controle de nematóides, como é o caso da torta de nim, aplicada ao solo no cultivo do tomateiro, obtendo resultados de até 83% de redução no número de galhas e 93% no número de ovos com dosagens crescentes equivalentes ao valor de até 40 t/ha de torta de nim (LOPES, 2008). Dosagens consideradas altas e viáveis apenas para aplicação em pequenas áreas.

Vários subprodutos ou resíduos industriais que são abundantes em diferentes localidades podem ser utilizados como veículos ou substratos para o desenvolvimento de processos biotecnológicos de interesse agrícola e industrial (ALTAF et al., 2005). O uso da própria vinhaça já demonstrou resultados positivos no controle de nematóides em cana-de-açúcar (PEDROSA et al., 2005). É possível que o efeito do resíduo estudado esteja associado àqueles atribuídos a adição de matéria orgânica que, segundo Lordello (1984), está relacionado à liberação de ácidos graxos voláteis nocivos aos nematóides, além de criar condições favoráveis à proliferação de microrganismos que atuam como inimigos naturais desses fitoparasitos (RODRIGUEZ-KÁBANA, 1986; RIEGEL et al., 1996).

Segundo Rodriguez-Kábana (1986), a matéria orgânica exerce efeito

antagonista aos nematóides pela liberação de diferentes formas de nitrogênio no solo, que pode beneficiar muitos microrganismos e favorecer o surgimento de novas espécies. Também, o processo de decomposição de substâncias orgânicas promovido, sobretudo, por bactérias e fungos, resultando na formação de ácidos orgânicos, pode exercer atividade nematicida dependendo do pH. Dijan et al. (1994) concluíram que a alta acidificação do solo, promovida pela alta concentração de matéria orgânica, forma moléculas de ácidos orgânicos não dissociadas que conseguem ultrapassar a cutícula dos nematóides com liberação de H⁺ dentro do pseudoceloma, eliminando aceleradamente o parasito.

Segundo Pedrosa et al. (2005) a dosagem equivalente a 500 m³ ha⁻¹ de vinhaça foi a mais indicada para o controle de *M. incognita* em cana-de-açúcar. Contudo avaliando as dosagens médias de vinhaça aplicadas pelas usinas, de acordo com o levantamento feito por (NUNES et al., 2004), verificou-se que as mesmas são de 250,3 m³/ha⁻¹ para aplicação em soqueira e 273,8 m³/ha⁻¹ para cana planta, o que está abaixo do indicado por Pedrosa et al. (2003), salientando que as dosagens acima do recomendado podem aumentar os impactos ambientais causados pela aplicação do resíduo no solo.

Uma opção viável para o controle de fitonematóides, que não seja o controle químico convencional nem a utilização de dosagens excessivas de resíduos orgânicos é o controle biológico, o qual tem se apresentado eficiente e viável para o manejo de várias culturas por minimizar o dano ambiental e ser mais vantajoso economicamente comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA 2005). Algumas espécies microbianas, como os estreptomicetos e *Bacillus subtilis*, já foram avaliadas como interferentes no ciclo dos fitonematóides apresentando potencial para utilização no controle do parasito do solo (ARAÚJO et al., 2002 e SOUZA et al., 2006). A rizobactéria *Bacillus subtilis* tem sido avaliada como de grande potencial para controle de fitopatógenos, já sendo utilizada na formulação de produtos comerciais para uso agrícola em vários países (LAZZARETTI; BETTIOL, 1997).

O emprego de lodo de estações de tratamento de efluentes (ETE) como veículo para produção de inoculantes tem sido considerado como nova alternativa viável para reciclagem (BEN REBAH et al., 2001). Lodo de ETE de indústria alimentícia já foi avaliado como meio de cultura para *Bacillus subtilis* com

resultados de multiplicação da bactéria considerados satisfatórios (ARAUJO et al., 2006). A utilização da vinhaça para desenvolvimento de microrganismos de interesse agrônômico e industrial já foi descrita na literatura (NAHAS; ASSIS, 1992;). O resíduo sucroalcooleiro apresenta características favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos destacando-se a concentração de matéria orgânica e açúcares totais (SHI; ZHU, 2007).

Alternativa que objetivam incrementar o efeito das rizobactérias contra patógenos de plantas tem sido a mistura dos microrganismos com resíduos orgânicos específicos. Resultados promissores nesta área têm sido encontrados no controle de nematóides parasitas de plantas o que têm estimulado o interesse em combinar agentes de biocontrole com outros componentes químicos (SIDDIQUI et al., 2001). Os resíduos que contêm carbono e traços de minerais proporcionam aumento da atividade de biocontrole de várias estirpes bacterianas (SHAUKAT; SIDDIQUI, 2003). Os resíduos orgânicos, de forma geral, influenciam positivamente com incremento na sanidade das plantas devido a redução dos patógenos. Vários grupos de microrganismos são estimulados para multiplicação após a aplicação de resíduos orgânicos no solo, os quais podem estar envolvido, de algum modo, no controle biológico dos nematóides (ARAUJO; BETTIOL, 2005). Este controle não é restrito apenas às interações entre estes fitopatógenos e seus antagonistas, mas ambos são influenciados pela planta, pelo ambiente físico e pela microflora e microfauna do solo (STIRLING, 1991). Algumas rizobactérias produzem metabólitos tóxicos e afetam o movimento de nematóides, enquanto outras inibem a eclosão de juvenis e o processo pelo qual eles penetram as raízes (STIRLING, 1991; ARAUJO et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivos a avaliação da multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e sua aplicação no controle de nematóides e crescimento de cana cultivada em solo naturalmente infestado com o parasita.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e fitopatologia e Casa de Vegetação da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP no período de 09/2007 a 10/2008.

2.1 Descrição da Vinhaça e Estirpe de *Bacillus subtilis* Utilizados

Neste trabalho foram utilizadas amostras de vinhaça concentrada (40% BRIX e 30% de matéria seca) obtidas na empresa Destilaria Santa Eliza, Penápolis, SP. O resíduo foi analisado em laboratório para determinação de composição química (Tabela 1). A estirpe de *Bacillus subtilis* utilizada nos experimentos foi a AP-3 (ARAUJO et al., 2005) mantida na coleção do laboratório de microbiologia da UNOESTE.

TABELA 1 - Composição química da vinhaça (base seca)

pH	N (g kg ⁻¹)	P (g kg ⁻¹)	K (g kg ⁻¹)	Ca (g kg ⁻¹)	Mg (g kg ⁻¹)	S (g kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn (g kg ⁻¹)
3,9	9,2	0,5	15,1	3,3	3,3	5,8	147	19	7

2.2 Avaliação do Crescimento de *Bacillus subtilis* em Meio Contendo Vinhaça

Foram preparadas formulações de meio de cultura com doses crescentes de vinhaça ajustando-se os seguintes tratamentos: T1 – vinhaça concentrada, T2 – 50% de vinhaça + 50% de água destilada, T3 - 25% de vinhaça + 75% de água destilada e T4 - meio de cultura padrão (caldo nutriente). Os meios

foram preparados com água destilada para volume final de 50 mL acondicionado em erlenmeyer (250 ml). O pH de todos os meios utilizados foram ajustados para 7,0. O meio de cultura padrão (caldo nutritivo) foi preparado a base de peptona (5 g L^{-1}) e extrato de levedura (3 g L^{-1}). Os meios de cultura foram autoclavados ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min.) e após resfriamento transferiu-se 1 mL de suspensão de *Bacillus subtilis* (AP-3) em água destilada contendo aproximadamente 1.10^8 u.f.c mL^{-1} . Os recipientes após inoculação foram colocados em mesa agitadora orbital (120 rpm) e deixados sob agitação a temperatura ambiente, durante cinco dias. Decorrido este período, foi avaliada a concentração de bactérias, no meio de cultura, pelo método de diluição seriada e contagem de unidades formadoras de colônias em placas, em triplicata, com meio agar nutriente.

No meio de cultura que apresentou a maior concentração bacteriana foi determinado também a curva de crescimento de *Bacillus subtilis*. Para isto, após a inoculação do *Bacillus subtilis* neste meio de cultura o mesmo foi colocado em mesa agitadora orbital (120 rpm) durante 7 dias sendo realizada contagem diária da concentração de bactérias no meio pelo método de diluição seriada e contagem em placas, em triplicatas, com meio Agar nutriente.

2.3 Efeito do *Bacillus subtilis* Multiplicado em Meio com Vinhaça Sobre o Crescimento da Cana e Controle de Nematóides

Para execução deste experimento foram coletadas inicialmente amostras de solo em área agrícola, sob cultivo de cana, da Usina Alto Alegre, Presidente Prudente, SP, com histórico de alta infestação por nematóides, conforme análise nematológica previamente realizada. Pela análise de extração de nematóides realizada segundo Jenkies (1964), foi detectada a presença de 200 juvenis de *Meloydogine* spp em 100 cm^3 de solo. A análise de fertilidade do solo foi realizada segundo Rajj e Quagio (1983), a mesma apresentou os seguintes valores: pH (CaCl_2) - 5,0; 14 g dm^{-3} de M.O.; 6 mg dm^{-3} de P; $2,5\text{ mmol}_c\text{ dm}^{-3}$ de K; $14\text{ mmol}_c\text{ dm}^{-3}$ de Ca; $4\text{ mmol}_c\text{ dm}^{-3}$ de Mg; $36\text{ mmol}_c\text{ dm}^{-3}$ de CTC e 58% de saturação de bases.

As amostras de solo foram homogeneizadas, peneiradas e colocadas em vasos com capacidade de 15 kg de solo. A variedade de cana-de-açúcar utilizada foi a RB 72454 a qual foi plantada nos vasos pela transferência de colmo contendo cinco gemas. Para a condução do experimento após o brotamento da cana foram deixados dois perfilhos por vaso.

O experimento foi delineado em blocos inteiramente casualizados com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo dispostos da seguinte forma: 1 - testemunha; 2 - vinhaça ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$); 3 - *Bacillus subtilis* em água ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$); 4 - *Bacillus subtilis* multiplicado em meio vinhaça ($50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$); 5 - *Bacillus subtilis* multiplicado em meio vinhaça ($100 \text{ m}^3 \text{ ha}$). No tratamento apenas com *Bacillus subtilis* em água foram utilizadas células multiplicadas em tubos com meio sólido que posteriormente foram raspados e diluídos em água para concentração final de $5,0 \times 10^8 \text{ u.f.c. mL}^{-1}$. Nos tratamentos onde *Bacillus subtilis* foi multiplicado em meio com vinhaça foi utilizado o meio de cultura com melhor desempenho de crescimento de *B. subtilis* na etapa anterior, obtendo-se a concentração final de $5,0 \times 10^8 \text{ u.f.c. mL}^{-1}$. As aplicações de todos os tratamentos foram distribuídas em três épocas (30, 60 e 90 dias) após o plantio da cana.

Para avaliação do crescimento da cana foi realizado a medição de altura das plantas aos 90 dias. Aos 105 dias as plantas foram retiradas dos vasos e separadas a parte aérea das raízes. A parte aérea foi cortada próxima a raiz e acomodada em sacos de papel sendo levados ao laboratório. Logo após as amostras foram acondicionadas em estufa de ventilação forçada (60° C) até peso constante visando determinação da massa seca de parte aérea e posterior moagem para determinação dos teores de nutrientes na parte aérea segundo Malavolta et al. (1997). As raízes foram lavadas em água corrente para a retirada da terra aderida superficialmente, em seguida foram acomodadas na bancada sob temperatura ambiente durante 12 horas visando a perda do excesso de umidade. Após isto as raízes foram pesadas e submetidas a extração de nematóides seguindo metodologia descrita por Araújo e Bettiol (2005). Para isto as raízes foram adicionadas a 200 mL de solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e trituradas em liquidificador por 30 segundos. O material foi então vertido sobre peneira de 0,150 mm de abertura de malha (100 mesh) acoplado a outra de 0,025 mm (500 mesh). A peneira de 500 mesh foi então lavada com jato de água e os juvenis juntamente com ovos de

Meloidogyne spp. foram coletados em volume final de 40 mL sendo retirado 1 mL para contagem em câmara de Peters (ARAUJO; BETTIOL, 2005). Após a contagem foram efetivados os cálculos de diluição para expressão dos resultados em juvenis e ovos por grama de raiz de cana.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2000). De acordo com os valores de F obtidos nas análises de cada variável foram realizados teste de comparação de média empregando-se o teste t (5%).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A vinhaça apresentou-se como viável para o uso como meio de cultura para a multiplicação de *Bacillus subtilis*, já que no bioensaio de crescimento bacteriano os resultados revelaram desempenho satisfatório do crescimento de *B. subtilis* quando comparado ao caldo nutritivo (Tabela 2). O maior desempenho de crescimento ocorreu no tratamento com meio de cultivo a base de 25% de vinhaça, este tratamento superou todos os outros tratamentos, inclusive a testemunha (meio padrão), podendo então ser recomendado para utilização na multiplicação de *B. subtilis*. Os resultados encontrados confirmam a viabilidade da utilização de efluentes da indústria sucroalcooleira como meio de cultura para a produção de esporos de *B. subtilis*, relatada por Shi e Zhu (2007), os quais concluíram que o resíduo contém concentrações consideráveis de material orgânico e inorgânico solúveis disponíveis ao crescimento bacteriano.

TABELA 2 - Crescimento de *Bacillus subtilis* em unidades formadoras de colônia (u.f.c) por mL⁻¹ utilizando-se diferentes concentrações de vinhaça após 6 dias de cultivo

Tratamentos	ufc ml ⁻¹
Vinhaça pura	1,30 x 10 ⁸ b
Vinhaça 50%	1,91 x 10 ⁸ b
Vinhaça 25%	1,15 x 10 ⁹ a
Caldo nutriente	1,81 x 10 ⁸ b

Medias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste t (LSD).

A curva de crescimento de *B. subtilis* no meio de cultura a base de vinhaça (25%), de melhor desempenho no bioensaio anterior, denominado meio V25, durante sete dias, demonstrou que o pico de crescimento bacteriano aconteceu entre o quinto e sexto dia (Figura 1). Este período pode ser indicado para produção

da bactéria com finalidade de produção de maiores concentrações de células. O modelo polinomial foi o mais adequado para representar a curva de crescimento com coeficiente de regressão (R^2) significativo a 5% de probabilidade.

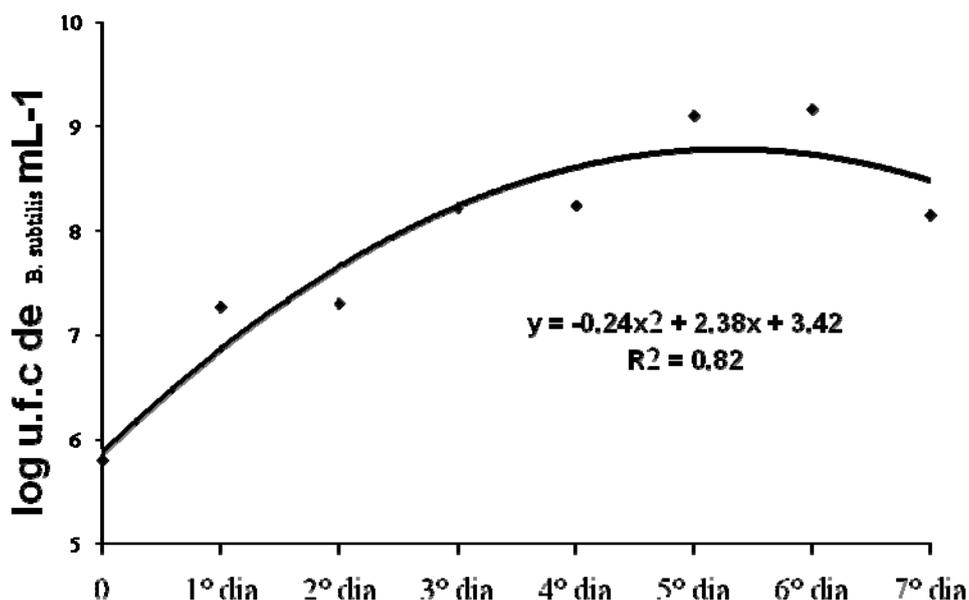


FIGURA 1 - Curva de crescimento de *B. subtilis* em meio de cultura a base de vinhaça (25%)

Com base na definição da melhor concentração de vinhaça e período de crescimento para multiplicação de *B. subtilis* foi conduzido o experimento de casa de vegetação com o cultivo de cana. Na tabela 3 é apresentado o resumo da análise de variância com apresentação dos valores de quadrado médio calculado em cada variável analisada. Foi observado que apenas as variáveis massa seca de raiz e acúmulo de nutrientes não apresentaram valores significativos.

TABELA 3 – Valores de coeficiente de variação (C.V.) e quadrado médio (Q.M.) obtidos pela análise de variância nas variáveis avaliadas no experimento

Variável	C. V.	Q.M.
Altura de plantas (cm planta ⁻¹)	5,80	0,72*
Massa seca de raiz (g planta ⁻¹)	18,7	1,64 n.s.
Massa seca da p aérea (g planta ⁻¹)	9,29	0,52*
Nº de ovos de nematóides por plantas	25,0	15,14*
Nº de juvenis de nematóides por planta	14,4	3,35*
Acúmulo de nitrogênio (mg planta ⁻¹)	19,10	12,9 n.s.
Acúmulo de fósforo (mg planta ⁻¹)	29,95	4,78 n.s.
Acúmulo de potássio (mg planta ⁻¹)	12,08	26,2 n.s.

* Significativo pelo teste F (P<0,05), n.s. – não significativo

O tratamento representado apenas pela presença de *Bacillus subtilis* proporcionou aumento significativo na altura das plantas e massa seca da parte aérea aos 90 e 105 dias após o plantio, respectivamente, em comparação com a testemunha (Tabela 4). Este resultado confirma a ação de promoção de crescimento de plantas proporcionada por *Bacillus subtilis* (AP-3) já comprovada em outros trabalhos de avaliação de crescimento de plantas (ARAUJO; HUNGRIA, 1999; ARAUJO, 2008). Todos os tratamentos associados a vinhaça com e sem *B. subtilis* não alteraram significativamente o crescimento da parte aérea da cana em solo infestado com nematóides. Em trabalho com utilização de vinhaça para controle de nematóides em solo Pedrosa et al. (2005) também não encontraram alteração de crescimento da planta, aos 90 dias após inoculação dos nematóides, com aplicação de doses de 50 a 1000m³ ha⁻¹ de vinhaça.

TABELA 4 - Altura de plantas (90 dias após plantio) e massa seca da parte aérea (105 dias após o plantio) de cana tratada com *Bacillus subtilis*, em suspensão aquosa e multiplicado em meio com 25 % de vinhaça (V25), em cultivo utilizando solo com infestação natural de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) em condições de casa de vegetação

Tratamentos	Altura de plantas (cm)	Massa seca da p. aérea (g)
Testemunha	74,8 ¹ b	20,50 b
Vinhaça (50 m³ ha⁻¹)	82,0 ab	24,00 ab
Bacillus subtilis (50m³ ha⁻¹)	95,5 a	29,25 a
B. subtilis V25 (50 m³ ha⁻¹)	82,3 ab	20,50 b
B. subtilis V25 (100 m³ ha⁻¹)	87,5 ab	24,75 ab

1- Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente pelo teste t (5%)

Com relação aos efeitos dos tratamentos sobre a reprodução do nematóide foi observado que apenas o tratamento *B. subtilis*, não multiplicado na vinhaça, conseguiu proporcionar efeito inibidor na reprodução do nematóide avaliada pela presença de ovos e juvenis nas raízes da cana (Figura 2 e 3). O tratamento apenas com a vinhaça (50 m³ ha⁻¹) não inibiu a reprodução do nematóide, demonstrando que a vinhaça na concentração aplicada não proporciona controle do parasita conforme já verificado por Pedrosa (2005). Os mesmos autores sugerem aplicação de doses de vinhaça acima de 500 m³ ha⁻¹ para efetivo controle do nematóide no cultivo da cana-de-açúcar. A presença de *Bacillus subtilis* proporcionou redução na reprodução do nematóide embora o mecanismo de supressão não tenha sido determinado. Araújo et al. (2002) estudando o efeito de *B. subtilis* sobre o nematóide *Heterodera glycines* concluiu que umas das formas de

ação da bactéria sobre o parasita seria na orientação dos nematóides no solo. Outros estudos tem associados as proteases microbianas produzidas por *Bacillus* como fatores de virulência contra os nematóides (LIAN et al., 2007).

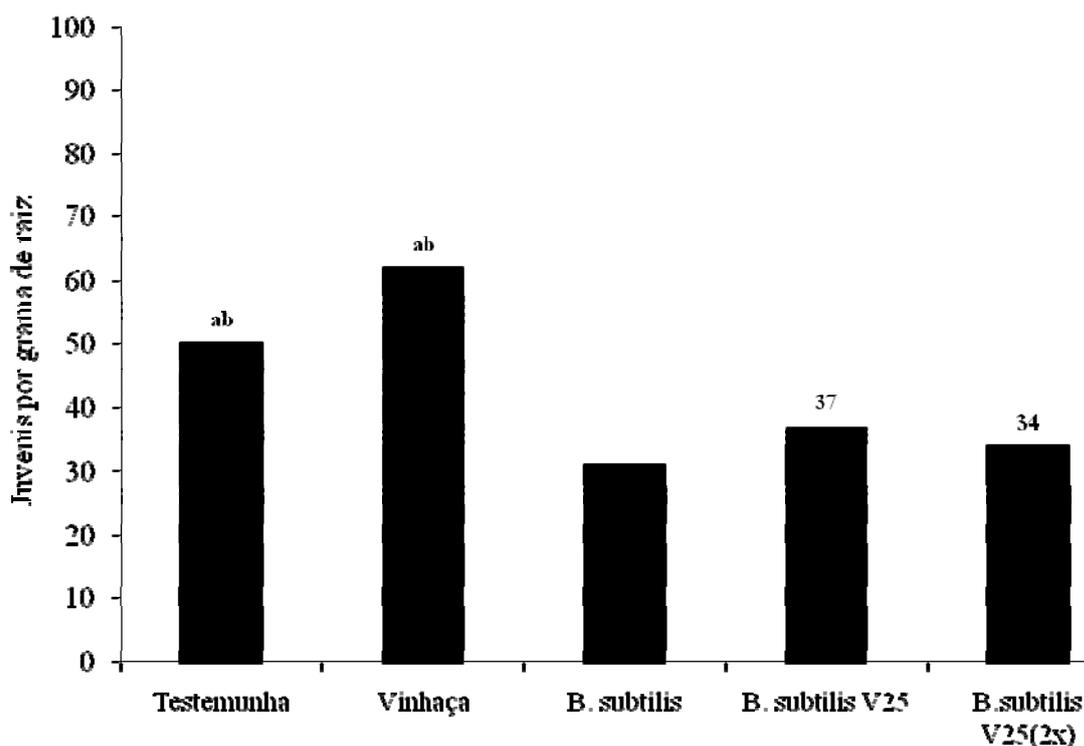


FIGURA 2 - Juvenis de *Meloidogyne* sp em raízes de cana após aplicação de *Bacillus subtilis*, em suspensão aquosa e multiplicado em meio com 25 % de vinhaça (V25). Experimento conduzido em casa de vegetação. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste t (5%)

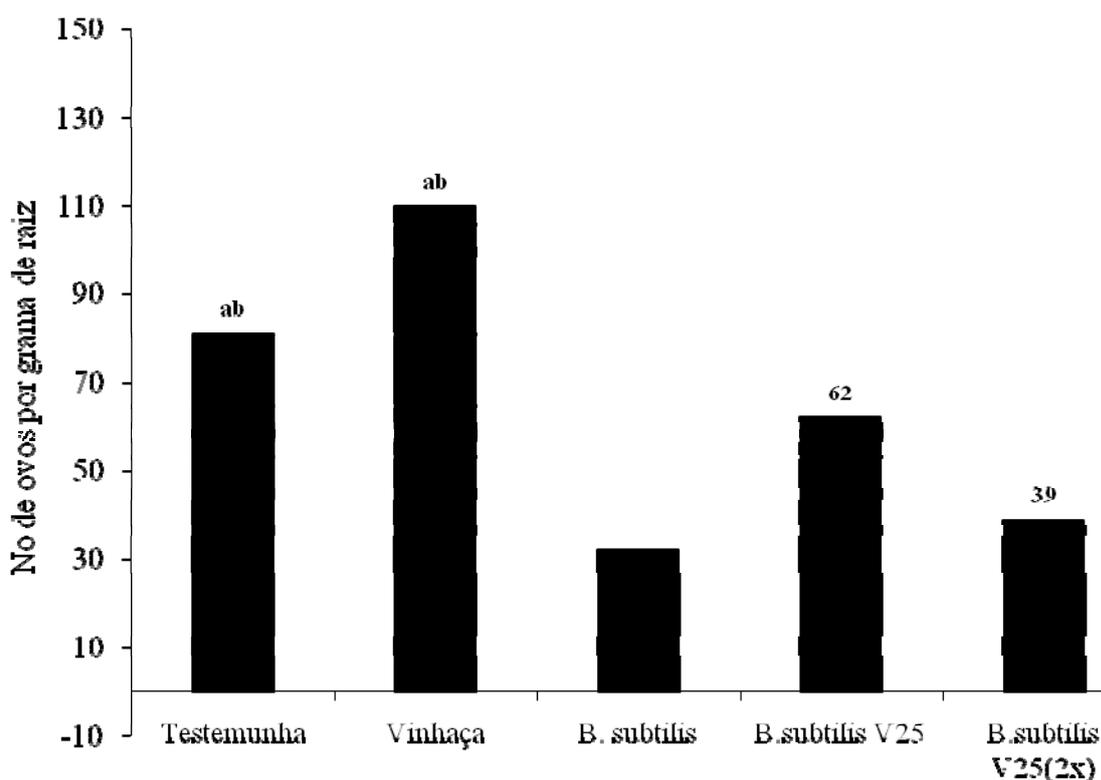


FIGURA 3 - Ovos de *Meloidogyne* sp em raízes de cana após aplicação de *Bacillus subtilis* multiplicado em meio com 25 % de vinhaça (V25), no solo. Experimento de casa de vegetação. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste t (5%)

Com base nos resultados encontrados pode também ser observado que a presença da vinhaça, nas concentrações aplicada ao solo, reduziu o efeito de controle do *Bacillus subtilis* sobre o nematóide, podendo ser afirmado que a vinhaça possa ter estimulado de alguma forma o parasitismo. Sendo então necessário novos estudos com efeito de doses de vinhaça associado a presença da bactéria.

Os resultados de análise nutricional foliar estão apresentados na tabela 5. O maior acúmulo de potássio na parte aérea da cana nos tratamento com aplicação de vinhaça confirma a indicação de que este resíduo pode ser útil no fornecimento deste nutriente para a cultura (CAMBUIM, 1983). Com relação ao menor acúmulo de nitrogênio na parte aérea, encontrado nos tratamentos que recebeu a maior dose de vinhaça, pode-se concluir que a presença de concentrações elevadas de vinhaça promove distúrbios nutricionais na cultura

confirmando as afirmações já relatadas em outros estudos de que a aplicação de doses de vinhaça afeta a absorção de N pelas plantas (GOMES, 2003). Por outro lado, Silveira e Crocomo (1990) concluíram que a vinhaça não afeta negativamente a taxa de acúmulo de nitrogênio.

Foi observado também que a aplicação de 100 m³ de vinhaça alterou consideravelmente a relação N:K que alcançou o valor de 0,20 (Tabela 5) enquanto que a testemunha apresentou a relação de 0,64. Isto reforça o que foi encontrado por Gomes (2003) que em experimento com aplicação de 150 m³ de vinhaça, com a mesma variedade de cana, também encontrou redução da relação N:K. Estes resultados indicam que aplicação de doses elevada de vinhaça no solo pode sim causar desequilíbrio na absorção nutricional pela cultura.

TABELA 5 - Acúmulo de nitrogênio e potássio (mg planta⁻¹) na parte aérea de cana (105 dias após o plantio) tratada com *Bacillus subtilis* multiplicado em meio com 25 % de vinhaça (V25) vinhaça, em condições de casa de vegetação

Tratamento	Nitrogênio	Potássio	Relação N:K
Testemunha	275,17 a ¹	426,8 b	0,64
Vinhaça (50 m³ ha⁻¹)	176,15 ab	562,2 ab	0,31
Bacillus subtilis	213,25 ab	552,1ab	0,38
B. subtilis V25 (50 m³ ha⁻¹)	153,15 ab	473,4ab	0,32
B. subtilis+V25 (100 m³ ha⁻¹)	129,62 b	634,3 a	0,20

1- Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente pelo teste t (5%)

Mesmo se considerando os relatos da redução na reprodução de nematóides parasitos de plantas quando da aplicação de *B. subtilis* (ARAUJO; MARCHESI, 2009), em experimento de casa de vegetação, existem poucos estudos acerca da ação direta dessa rizobactéria sobre os nematóides. Contudo os benefícios indiretos ao crescimento das plantas como a produção de reguladores de crescimento (ARAUJO et al., 2005) e controle biológico de doenças de plantas (CUBETA et al., 1985) proporcionado pela presença de *B. subtilis* na rizosfera pode subsidiar novos trabalhos de campo com o cultivo de cana para comprovação destes benefícios no desenvolvimento da cultura.

4 CONCLUSÕES

- A multiplicação de *Bacillus subtilis* em meio de cultura a base de vinhaça foi considerada satisfatória em comparação ao meio de cultura padrão.
- A aplicação de *B. subtilis* sem multiplicação na vinhaça promoveu o crescimento da cana e redução da reprodução dos nematóides na raiz durante o experimento.
- A utilização de *B. subtilis*, multiplicado na vinhaça, não alcançou os benefícios encontrados na aplicação da bactéria sozinha no cultivo e controle de nematóides na cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

ALTAF, M. D. et al. Single step fermentation of starch to acid lactic by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpressive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract-optimization by RSM. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 465-472, 2005.

ARAÚJO, F. F. **Efeito de *Bacillus* spp e seus metabólitos na competitividade e na nodulação da soja (*Glycine max* Merrill) por *Bradyrhizobium* ssp.** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1995.

ARAÚJO, F. F.; SILVA, J. F. V.; ARAÚJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, 2002.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *B. elkanii*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 34, 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.; BETTIOL, W. Supressividade dos nematóides *Meloygogine javanica* e *Heterodera glycines* em soja por adição de lodo de esgoto ao solo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 806-812, 2005.

ARAÚJO, F. F., AIRES, A. C. A., FARINA, F. R. Lodo industrial como alternativa de meio de cultura para *Bacillus subtilis*. **Colloquium Agrariae**, v.2, p.1 - 5, 2006.

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

ARAÚJO, F. F. & MARCHESI, G.P.M.. Aplicação de *Bacillus subtilis* no controle da meloidinose em tomateiro. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1558-1561, 2009

BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Influência da aplicação conjunta de nematicida com calcário, cupinicida ou torta de filtro na eficiência do nematicida em cana-de-açúcar. 236 p. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLÓGIA, 25., Petrolina, **Anais...** Petrolina: Embrapa, 2003. p. 277.

BEN REBAH. F.; TYAGI, R. D.; PREVOST, D. Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. **Can. J. Microbiol.**, v. 47, p. 467-474, 2001.

CAMBUIM, F. A. **A ação da vinhaça sobre a retenção de umidade, pH, acidez total, acumulação e lixiviação de nutrientes, em solo arenoso.** 1983. 133 p. Dissertação (Mestrado) – UFRPE, Recife.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 232-238, 2005.

CUBETA, M. A.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. **Plant Disease**, v. 69, p. 506-509, 1985.

DIJAN, C.; PONCHET, M.; CAYROL, J. C. Nematological properties of carboxylic acids and derivatives. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 50, p. 229-239, 1994.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; MENEGATTI, C. C. Danos causados por nematóides a variedades de cana-de-açúcar em cana planta. **Nematologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 69-73, 2003a.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de oleicultura: cultura e comercialização de hortaliças.** São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2000. v. 2. 357 p.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 203 p.

GOMES, J. F. F. **Produção de colmo e exportação de macro nutrientes primários por cultivares de cana de açúcar.** 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Escola superior de agronomia Luiz de Queiroz. Piracicaba.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2009. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Disponível em: <<http://www.ibge.com.br/pages/>>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2009.

JENKINS, W.R. **A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil.** Plant Disease Reportes v.48, p.692.

LAZZARETI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, p. 89-96, 1997.

LIAN L.H. et al. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 262-269, 2007.

LOPES, E. A. et al. Controle de *Meloidogyne javanica* com diferentes quantidades de torta de nim. Universidade Federal de Viçosa, **Revista trópica**, 2008.

LORDELLO, L. G. E. Métodos Gerais de Controle. In: LORDELLO, L. G. E (ed.) **Nematóides das Plantas Cultivadas.** São Paulo: Nobel, 1984. p. 81-123.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas.** Piracicaba: Associação Brasileira para pesquisa de potassa e do fosfato, 1997. 201 p.

MENEZES, T. J. B. **Etanol:** o combustível do Brasil. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MOURA, R. M.. Controle integrado de nematóides da cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 22., 2000. Uberlândia - Minas Gerais. **Anais...** Uberlândia, 2000. p. 88-94.

NAHAS, E.; ASSIS, L. C. Solubilização de fosfatos de rocha por *Aspergillus niger* em diferentes tipos de vinhaça. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 27, p. 325-331, 1992.

NUNES Jr., D. et al. **Indicadores Agrícolas do setor Sucrialcooleiro Safra 2003/2004**. Ribeirão Preto: Grupo IDEA, 2004. 111 p.

PEDROSA, E. M. R. et al. Alterações biodinâmicas associadas à aplicação de vinhaça e torta de filtro e considerações para manejo de solos agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 2003. Salvador. **Anais...** Jaboticabal: SBEA, 2003.

PEDROSA, E. M. R. et al. Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, Campina Grande, v. 9, (Supl.), p. 197-201, 2005.

RAIJ, B. V.; QUAGGIO, J. A. **Método de análise de solo para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto agrônômico, 1983. (Boletim técnico, 81).

RIEGEL, C.; FERNANDEZ, F. A.; NOE, J. P. Meloidogyne incognita infested soil amended with chicken litter. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 369-378, 1996.

RODRIGUEZ-KABANA, R. Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. **Journal of Nematology**, Gainesville, v. 18, p. 129-135, 1986.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; Morgan-Jones, G.; Chet, I. Biological control of nematodes soil amendments and microbial antagonists. **Plant and Soil**, v. 100, p. 237-247, 1987

ROSENFELD, V. Irrigação e Fertirrigação nas regiões de SP e CO. In: I SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR, 1., 2003. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: GAPE/ESALQ/USP, 2003.

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

SIDDIQUI, Z. A.; IQBAL, A.; MAHMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 16, p. 179-185, 2001.

SHAUKAT, S. S.; SIDIQI, I. A. The influence of mineral and carbon sources on biological control of charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina* by fluorescent pseudomonads in tomato. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 392-398, 2003.

SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; ALMEIDA, G.M.C.O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesq. Agropec. Bras.** v.41, p.1759-1766, 2006.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International, 1991. 282p.