

Glenise Bierhalz Voss

**Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores *airlift* e sua aplicação  
no controle de nematoide de galhas do tomateiro**

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos da Universidade Federal  
de Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de Mestre em Engenharia de  
Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz  
Ninow

Coorientador: Prof. Dr. Márcio José  
Rossi

Florianópolis  
2013

VOSS, Glenise Bierhalz

Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores *airlift* e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro/ Glenise Bierhalz VOSS; orientador, Jorge Luiz NINOW; coorientador, Márcio José ROSSI. Florianópolis, SC, 2013. 115p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. *Bacillus subtilis*.
  3. Biorreator airlift. 4. Controle biológico. 5. Nematoides.
- I. NINOW, Jorge Luiz. II. ROSSI, Márcio José.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos..

Glenise Bierhalz Voss

**Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores *airlift* e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia de Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, Abril de 2013.

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
**Orientador**

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi  
**Coorientador**

---

Prof. Dr. João Borges Laurindo  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi

---

Pesq. Dr. José Angelo Rebelo

---

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell  
Netto

---

Dr.<sup>a</sup> Silvana Licodiedoff

**Florianópolis, 10 de abril de 2013.**



Dedico este trabalho a minha família  
por todo amor e compreensão.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças e iluminar meus caminhos.

A toda minha família, especialmente aos meus pais Ivo e Darlene, irmão Gleizer e cunhada Cristiane, que foram muito importantes para que eu vencesse mais esta etapa de minha vida, agradeço a eles por todo amor e que mesmo distantes, me deram o apoio e a força que eu precisava, nos momentos difíceis, para seguir em frente. Obrigada também por todos momentos de descontração proporcionados. Amo muito vocês!

Ao professor Márcio José Rossi, por ter aceitado me coorientar. Agradeço ainda, pelos valiosos ensinamentos passados ao longo deste trabalho, pelas palavras de apoio, ajuda e orientação em todos os momentos do trabalho. Sem sua ajuda, esse trabalho não seria possível.

Ao professor Jorge Luiz Ninow pela orientação e ajuda para desenvolvimento do trabalho.

As amizades feitas durante o mestrado, especialmente ao Jean, Dani, Stéphanie, Rossana, Fernanda e Pedro, pela amizade, companheirismo e incentivo, durante esta etapa que vivemos juntos.

A Epagri de Itajaí, especialmente ao Dr. José Angelo Rebelo, que nos forneceu o solo e as mudas, para realização do experimento. Também agradeço por todos os ensinamentos passados e pela ajuda concedida, que foi fundamental.

Ao professor Aparecido, que nos incentivou a começar este trabalho.

Ao Willian e demais colegas do laboratório de microbiologia do solo e laboratório de bioprocessos do MIP, que fizeram com que o desenvolvimento deste trabalho fosse possível. Em especial gostaria de agradecer aos professores Cláudio e Ademir, e ao Dr. Rafael, pelos conhecimentos passados e contribuições, que foram muito importantes. Agradeço ainda, ao Douglas, pela ajuda no laboratório, amizade e pela alegria contagiante, que deixa nosso trabalho mais leve.

Aos colegas do laboratório ENGBIO Denise, Daniela, Jean, Andréia, Mélodi, Kellen, Kelin, Ana Paula, Jonathan, Rosana, Silvana, Morgana, Mara, Raquel, Américo, Silvana, Carol, Willian, Francielli, Bruno, Neto e demais colegas, que de alguma maneira ajudaram na realização deste trabalho, através de conselhos ou empréstimo de materiais. Também agradeço aos professores do laboratório Glaucia, José Miguel, Agenor, Jorge, Willibaldo e Débora.

Ao seu Zé, que mantém o laboratório sempre limpo e nos recebe todas as manhãs com um sorriso.

Ao Bruno, estagiário de iniciação científica, pela ajuda durante a realização dos experimentos.

Ao Ricardo, do laboratório de fitopatologia da UFSC, pela ajuda nas análises iniciais do solo e pelo empréstimo de reagente.

À Silvana, pela amizade, ajuda, por todas as conversas e conselhos.

Ao Lindomar pela ajuda e amizade.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de desenvolver o mestrado. Em especial agradeço todos os professores, que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do departamento, em especial a Raquel, secretária do Programa de Pós-graduação, pela disponibilidade e ajuda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro concedido, que fez com que este trabalho fosse realizado.

Enfim agradeço a todos amigos e familiares, que não foram mencionados, mas que são igualmente especiais e que sempre me acompanham, agradeço de coração por todo carinho e apoio.

“Não importa se a estação do ano muda...  
Se o século vira, se o milênio é outro.  
Se a idade aumenta...  
Conserva a vontade de viver,  
Não se chega a parte alguma sem ela.”  
(Fernando Pessoa)



## RESUMO

A utilização de alguns produtos químicos na agricultura foi proibida em diversos países, no entanto, o Brasil ainda é o maior consumidor mundial destes produtos. Sendo que, uma das grandes problemáticas na agricultura são os nematoides de galhas, que causam grandes perdas econômicas, principalmente em culturas de tomate, por serem uma das principais plantas hospedeiras destes fitoparasitas. Além disso, estes nematoides são de difícil controle, pois apresentam um curto tempo de multiplicação e difícil identificação, por estarem presentes no solo. Outro problema é que, o controle realizado com nematicidas, nem sempre se mostra eficiente, apresentando alta toxidez e contaminação do solo. Assim, o controle biológico se apresenta como uma importante alternativa para controle de diversas doenças em plantas. Dentre os microrganismos estudados para biocontrole destacam-se os *Bacillus subtilis*, devido à produção de metabólitos secundários e endósporos, que apresentam alta resistência a fatores ambientais, características importantes para a viabilidade desses produtos no mercado. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar o processo de produção de *B. subtilis* em biorreator *airlift*, além de testar diferentes doses dessa bactéria para o controle de nematoides em cultura de tomate. Através deste estudo foi examinada a eficiência do biorreator *airlift* para a produção de biomassa do *B. subtilis*. Quanto à aplicação do *B. subtilis* em cultura de tomate, não foi observada diferença significativa para o crescimento das plantas, porém foi possível observar a diminuição da concentração de nematoides no solo com o aumento das concentrações do inóculo aplicado no solo.

**Palavras-chave:** Nematoides. *Bacillus subtilis*. Controle biológico. Biorreator *airlift*. Tomateiro.



## ABSTRACT

The use of some chemicals in agriculture was prohibited in many countries, however Brazil is still the world's largest consumer of these products. Since one of the major problems in agriculture are the nematode galls, causing huge economic losses especially in tomato crops, being a major host plants of these parasites. Moreover these nematodes are difficult to control, since they have a short multiplication time and difficult to identify, because they are present in the soil. Another problem is that the control performed with nematicides, doesn't always prove effective, with high toxicity and soil contamination. The biological control is presented as an important alternative for the control of several plant diseases. Among the microorganisms studied to highlight the biocontrol *Bacillus subtilis* due to the production of secondary metabolites and endospores which have high resistance to environmental factors, characteristics important to the viability of these products on the market. In this context the aim of this work was to study the production process *B. subtilis* in an airlift bioreactor as well as test different doses of bacteria for the control of nematodes in tomato crops. Through this study we examined the efficiency of the airlift bioreactor for the production of biomass *B. subtilis*. Concerning the application of *B. subtilis* in tomato crops no significant difference was observed for plant growth. Also was observed a decrease in the concentration of nematodes in the soil with increasing concentrations of the inoculum to the soil.

**Keywords:** Nematodes. *Bacillus subtilis*. Biological control. Airlift bioreactor. Tomato.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Principais gêneros de antagonistas presentes em produtos biológicos comercializados no mundo .....	35
Figura 2- Estrutura química bidimensional de lipopetídeos produzidos por espécies de <i>Bacillus</i> : (a) Fengicina, (b) Iturina A e (c) surfactina. Átomos de nitrogênio e oxigênio são retratados em azul e vermelho, respectivamente	38
Figura 3- Ciclo da célula vegetativa e esporulação do <i>Bacillus subtilis</i> ....	40
Figura 4- Juvenis de segundo estágio de nematoide fitoparasita.....	42
Figura 5- Frutos de tomate do grupo Santa Cruz .....	45
Figura 6- Esquema do biorreator <i>airlift</i> construído em aço inox com equipamentos acessórios (cinza). Detalhe do separador de gás (a) .....	46
Figura 7- Reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico .....	54
Figura 8- Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar $k_{La}$ e $Q_{O_2}$ .....	58
Figura 9- Ilustração para explicar a determinação do $C_{crit}$ com a utilização de um sensor de oxigênio dissolvido.....	59
Figura 10- Placa utilizada na contagem de nematoides.....	63
Figura 11- Gráfico de Pareto para análise de efeito de variáveis em relação ao crescimento celular (densidade óptica a 600nm) em função da variação de componentes do meio de cultura .....	65
Figura 12- Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> em frascos com aeração e temperatura de 30 °C mantida com banho Maria.....	66
Figura 13- Imagem da parte superior do biorreator <i>airlift</i> , na área de separação de gases, onde se observa a intensa formação de espuma durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> .....	67
Figura 14- Curva de crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> ao longo do tempo de cultivo, em frascos aerados (a), determinação da conversão de glicose em biomassa (b) e determinação da velocidade específica máxima de crescimento (c), com pH inicial do meio de cultura, antes da inoculação, em 6,0 .....	68
Figura 15- Curva de crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> ao longo do tempo cultivo, em frascos aerados (a), determinação da conversão de glicose em biomassa (b) e determinação da velocidade específica máxima de crescimento (c), com pH inicial do meio de cultura, antes da inoculação, em 7,0 .....	69

Figura 16- Ensaio dinâmico para determinação da concentração crítica de oxigênio, realizado na 6ª hora do cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> em biorreator <i>airlift</i> .....	73
Figura 17- Variação da concentração de oxigênio dissolvido, realizado na 6ª hora do cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> em biorreator <i>airlift</i> . O ponto 1 indica a interrupção da aeração e o ponto 2 indica a retomada .....	73
Figura 18- Consumo de glicose e crescimento de <i>B subtilis</i> em biorreator <i>airlift</i> com meio de cultura mantido em pH 7,0 e temperatura de 30 °C (cultivo A) .....	74
Figura 19- Determinação da conversão de glicose em biomassa. O coeficiente angular da reta representa o valor de $Y_{X/S}$ .....	75
Figura 20- Determinação da velocidade específica máxima de crescimento. O coeficiente angular representa o valor de $\mu_{max}$ . A velocidade foi determinada através da densidade óptica (a) e massa seca das células (b) .....	75
Figura 21-Variação do oxigênio dissolvido (pontos em azul) e vazão específica de ar (pontos em vermelho com ruídos), durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> em biorreator <i>airlift</i> com meio de cultura mantido em pH 7,0 e temperatura de 30 °C (cultivo A) .....	77
Figura 22- Consumo de glicose e crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> em biorreator <i>airlift</i> com meio de cultura mantido em pH 7,0 e temperatura de 30 °C (cultivo B).....	77
Figura 23- Determinação da conversão de glicose em biomassa. O coeficiente angular da reta representa o valor de $Y_{X/S}$ .....	78
Figura 24- Determinação da velocidade específica máxima de crescimento. O coeficiente angular representa o valor de $\mu_{max}$ .....	78
Figura 25-Variação do oxigênio dissolvido (pontos em azul) e vazão específica de ar (pontos em vermelho) durante o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> em biorreator <i>airlift</i> com meio de cultura mantido em pH 7,0 e temperatura de 30 °C (cultivo B).....	79
Figura 26-Variação da concentração de oxigênio dissolvido durante um ensaio dinâmico para determinação da velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ) e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ), realizado na 5ª hora de cultivo de <i>B. subtilis</i> em biorreator <i>airlift</i> . A vazão de ar foi de 0,2 vvm no momento do ensaio (cultivo B).....	80
Figura 27- Determinação do consumo global de oxigênio ( $Q_{O_2} X$ ) na 3,5ª (a) e 5ª (b) hora de cultivo, para uma vazão de 0,2 vvm .....	81

Figura 28- Determinação do coeficiente volumétrico de oxigênio ( $k_L a$ ) na 5ª hora de cultivo, para uma vazão de 0,2 vvm .....	82
Figura 29- Mudas de tomateiros na sementeira após 40 dias da semeadura .....	83
Figura 30- Mudas de tomateiros nos vasos após transplante e inoculação de <i>Bacillus subtilis</i> .....	83
Figura 31- Tomateiros com 60 dias após transplante das mudas .....	86
Figura 32- Raiz de tomateiro inoculado com 0,5 mL de inoculante de <i>Bacillus subtilis</i> apresentando galhas (A) e raiz do tratamento testemunha corado com floxina B com pontos vermelhos indicando massa de ovos nas galhas (B) .....	92



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produtos de biocontrole com base em <i>Bacillus subtilis</i> .....	36
Tabela 2- Composição do meio de cultura ágar nutriente .....	49
Tabela 3- Variáveis e níveis (-1 e +1) utilizados no planejamento experimental para adequação do meio de cultura para o cultivo submerso de <i>Bacillus subtilis</i> .....	50
Tabela 4- Composição do meio de cultura para cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> .....	50
Tabela 5- Composição do meio utilizado para cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> após o estudo de adequação para diminuição de custo.....	51
Tabela 6- Características químicas e físicas do solo utilizado no cultivo do tomateiro .....	60
Tabela 7- Solução nutritiva aplicada nas plantas de tomate .....	62
Tabela 8- Altura, massa fresca da parte aérea e diâmetro do caule das plantas de tomateiros. SE (solo esterilizado), Testemunha (solo não inoculado), T1 (0,50 mL do inóculo), T2 (1,5 mL do inóculo), T3 (3,0 mL do inóculo).....	86
Tabela 9- Comprimento e massa fresca das raízes de tomateiro. SE (solo esterilizado), Testemunha (solo não inoculado), T1 (0,50 mL do inóculo), T2 (1,5 mL do inóculo), T3 (3,0 mL do inóculo).....	88
Tabela 10- Número de nematoides no solo após o cultivo de tomateiro. SE (solo esterilizado), Testemunha (solo não inoculado), T1 (0,50 mL do inóculo), T2 (1,5 mL do inóculo), T3 (3,0 mL do inóculo) .....	89
Tabela 11- Índice de massa de ovos (IMO) e índice de galhas (IG) nas raízes das plantas de tomateiro. SE (solo esterilizado), Testemunha (solo não inoculado), T1 (0,50 mL do inóculo), T2 (1,5 mL do inóculo), T3 (3,0 mL do inóculo).....	92



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Açúcar redutor total
DNS	Ácido 3,5- Dinitrosalicílico
DO	Densidade óptica
OD	Oxigênio dissolvido
PGPR	Rizobactérias promotoras de crescimento
pH	Potencial hidrogeniônico
$r^2$	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minute
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto



## LISTA DE SÍMBOLOS

$C$	Concentração de oxigênio no seio do líquido ( $\text{mg}_{\text{O}_2} \text{L}^{-1}$ )
$C_s$	Concentração $\text{O}_2$ dissolvido no líquido na saturação ( $\text{mg}_{\text{O}_2} \text{L}^{-1}$ )
$C_{\text{crít}}$	Concentração crítica de $\text{O}_2$ dissolvido no líquido ( $\text{mg}_{\text{O}_2} \text{L}^{-1}$ )
$k_{\text{L}a}$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $\text{h}^{-1}$ )
$Q_{\text{O}_2}$	Velocidade específica de respiração ( $\text{mg}_{\text{O}_2} \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
$Q_{\text{O}_2}X$	Consumo global de oxigênio ( $\text{mg}_{\text{O}_2} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
$Y_{\text{X/S}}$	Fator de conversão da fonte de carbono em célula ( $\text{g}_\text{x} \text{g}_\text{s}^{-1}$ )
$\mu_{\text{max}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )
$X$	Biomassa ( $\text{g} \text{L}^{-1}$ )



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>1.1.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>31</b>
<b>1.1.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>31</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>33</b>
2.1 A PROBLEMÁTICA DOS AGROTÓXICOS .....	33
2.2 CONTROLE BIOLÓGICO .....	34
<b>2.2.1 Uso de <i>Bacillus subtilis</i> para controle biológico</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2.2 Mecanismo de ação das bactérias no controle biológico</b> .....	<b>37</b>
2.3 <i>Bacillus subtilis</i> .....	39
2.4 ENDÓSPOROS BACTERIANOS.....	40
2.5 FITOPARASITAS .....	41
<b>2.5.1 Nematoides</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5.2 O gênero <i>Meloidogyne</i> e problemas radiculares</b> .....	<b>43</b>
2.6 O TOMATEIRO .....	43
2.7 BIORREADORES .....	45
<b>2.7.1 Biorreatores <i>airlift</i></b> .....	<b>46</b>
<b>2.7.2 Vantagens do biorreator <i>Airlift</i></b> .....	<b>47</b>
2.8 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO .....	47
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 MICRORGANISMO UTILIZADO E MANUTENÇÃO .....	49
3.2 PREPARO DO INÓCULO .....	49
3.3 ADEQUAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA CULTIVO .....	49
<b>3.3.1 Meios de cultura</b> .....	<b>50</b>
3.4 CULTIVO SUBMERSO.....	51
<b>3.4.1 Cultivo em frascos com aeração</b> .....	<b>51</b>
<b>3.4.2 Cultivo em biorreator <i>airlift</i></b> .....	<b>51</b>
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	52
<b>3.5.1 Quantificação do crescimento celular</b> .....	<b>52</b>

3.5.2 Contagem de células viáveis .....	53
3.5.3 Contagem de esporos .....	53
3.5.4 Determinação de açúcares redutores .....	54
3.5.5 Coloração de Gram.....	55
3.6 DETERMINAÇÃO DAS GRANDEZAS DE TRANSFORMAÇÃO... 55	
3.6.1 Conversão de substrato em biomassa .....	55
3.6.2 Produtividade em biomassa .....	56
3.6.3 Velocidade específica de crescimento celular .....	56
3.7 TRANSFERÊNCIA E CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O CULTIVO: DETERMINAÇÃO DO $k_{La}$ E $Q_{O_2}$ .....	57
3.8 PRODUÇÃO DE PLANTAS DE TOMATEIRO .....	60
3.8.1 Preparo das mudas .....	60
3.8.2 Características do solo.....	60
2.8.2.1 Condutividade elétrica do solo.....	61
3.8.3 Preparação dos vasos e transplante dos tomateiros.....	61
3.8.4 Inoculação dos tomateiros e manutenção dos vasos.....	61
3.8.5 Identificação dos nematoides no solo e raízes dos tomateiros .....	62
3.8.6 Quantificação de nematoides no solo .....	62
3.8.7 Análise das plantas de tomateiros .....	63
3.8.8 Quantificação de galhas e massa de ovos de nematoides nas raízes de tomateiro.....	64
3.8.9 Análise estatística.....	64
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
4.1 ADEQUAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA CULTIVO SUBMERSO.....	65
4.2 CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS AERADOS E EM BIORREATOR <i>AIRLIFT</i> .....	66
4.3 CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR <i>AIRLIFT</i> .....	72

4.4 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO PARA CULTIVOS DE <i>Bacillus subtilis</i> EM BIORREATOR AIRLIFT .....	79
4.5 CULTIVO DO TOMATEIRO .....	83
4.6 AVALIAÇÃO DOS TOMATEIROS .....	85
<b>4.6.1 Quantidade de frutos e flores nas plantas .....</b>	<b>89</b>
4.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NEMATOIDES.....	89
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE GALHAS E MASSA DE OVOS DE NEMATOIDES NAS RAÍZES DE TOMATEIRO .....	91
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>6 SUGESTÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>115</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Desde 2008, o Brasil é considerado o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, e grande parte desses produtos químicos já foram proibidos em diversos países (SINDAG, 2013).

Estudos têm relacionado o uso de agrotóxicos com a incidência de casos de cânceres e ainda a um aumento do número de suicídios entre os agricultores, devido a sua ação no sistema nervoso central. Além disso, o uso de insumos químicos são os grandes responsáveis pelo desequilíbrio do solo, sendo de suma importância encontrar alternativas imediatas para substituir, ou pelo menos diminuir, seu uso na agricultura (STOPPELLI e CRESTANA, 2005; LONDRES, 2011).

Entre os nematoides, os mais importantes para a agricultura são os nematoides de galhas (*Meloidogyne*) e cisto (*Heterodera* e *Globodera*). Os nematoides de galhas são responsáveis por grandes perdas econômicas na agricultura e, devido ao seu nicho ecológico ser o solo, muitas vezes esses fitoparasitas têm sua identificação dificultada (OKA et al., 2000).

Além disso, o controle efetivo desses fitoparasitas é dificultado pelo curto tempo de geração e alta velocidade de reprodução dos mesmos, levando assim ao extenso uso de produtos químicos, como os nematicidas. Porém, esses produtos podem ter sua eficiência reduzida frente a altas densidades populacionais de nematoides no solo, e ainda apresentarem alta toxidez e permanecerem longos períodos no solo (ABAWI e WIDMER, 2000; AKHTAR e MALIK, 2000; AFFOKPONA et al., 2011).

Além dos problemas já mencionados, devido ao avanço na proibição de muitos produtos químicos na agricultura mundial, é provável que seu uso também seja reduzido no Brasil, em face do aumento das exigências para a exportação de nossos produtos. Portanto, é fundamental o desenvolvimento ou aperfeiçoamento de métodos de controle para estes fitoparasitas. Uma alternativa que tem se mostrado importante nos últimos anos é o controle biológico, visto que muitos microrganismos têm sido estudados e apontados como promissores para serem usados em biocontrole, entre os quais pode-se destacar as bactérias, que representam um grupo importante dentro de microrganismos antagonistas de patógenos radiculares (MARIANO, SILVEIRA e GOMES, 2006).

Entre as bactérias mais estudadas no biocontrole estão algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*, sendo que entre os

*Bacillus*, pode-se destacar a espécie *Bacillus subtilis*, que já é utilizada há muitos anos para o biocontrole de diversas doenças em plantas, devido a produção de metabólitos secundários e também pela sua capacidade de produzir endósporos, que são altamente resistentes a fatores ambientais, como temperatura, quando comparado com as células vegetativas, sendo este um fator importante para o desenvolvimento de produtos comerciais (ONGENA e JACQUES, 2008; YAN et al., 2011, YU et al., 2011). Outro fato que merece destaque é o grande interesse por parte das pequenas empresas pelos biocontroladores, que tem buscado ajuda para desenvolvimento desses produtos.

Neste contexto, o trabalho visou estudar a produção de inoculante de *B. subtilis* em biorreator *airlift*, um biorreator de menor investimento inicial e menor custo de operação, que poderá permitir a produção, principalmente por pequenas empresas, além de avaliar a efetividade do inoculante no biocontrole de nematoides na cultura do tomateiro.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Produção de biomassa de *Bacillus subtilis* em biorreator *airlift* visando sua aplicação em cultura de tomate.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

1. Diminuir o custo do meio de cultura utilizando a técnica de planejamento fatorial;
2. Realizar estudos cinéticos preliminares de cultivo submerso em frascos aerados pela injeção de ar comprimido;
3. Realizar cultivos em biorreator *airlift* para obtenção de biomassa e determinação das grandezas de transformação;
4. Avaliar o efeito de diferentes doses de *Bacillus subtilis* na promoção do crescimento e supressão de nematoides no cultivo do tomateiro.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A PROBLEMÁTICA DOS AGROTÓXICOS

O uso de agrotóxicos para controle de doenças e pragas nas lavouras existe há pouco mais de meio século, tendo origem após as grandes guerras mundiais, onde as indústrias químicas, fabricante de armas químicas, encontraram na agricultura um novo mercado (LONDRES, 2011).

No Brasil, a venda de produtos químicos utilizados na agricultura, entre os 2001 a 2008 passou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões dando ao país a posição de maior consumidor mundial desses produtos e, em 2010, as vendas foram ainda maiores, chegando a US\$ 8,5 bilhões. Em 2009, com a ampliação do consumo, foram consumidos mais de 1 milhão de toneladas de agrotóxicos, além disso, muitos destes produtos que ainda são usados no Brasil, já estão proibidos em muitos países desenvolvidos, devido aos riscos que podem causar para a saúde da população (LONDRES, 2011; SINDAG, 2013). Além disso, existem muitos estudos relacionando o uso de agrotóxicos a suicídio entre agricultores, além de outras doenças como câncer, também tem sido relacionado com a exposição a diversos agrotóxicos (STOPPELLI e CRESTANA, 2005; LONDRES, 2011).

No controle de fitoparasitas, como os nematoides, os nematicidas, classificados em sistêmicos ou fumigantes, são os produtos mais usados. Além do alto custo, quando se trata de alta densidade populacional de nematoides a sua eficiência é muito pequena, não proporcionando o controle efetivo. Além disso, esses produtos ainda apresentam uma alta toxidez, podendo prejudicar a saúde por serem cancerígenos e trazer graves danos para o meio ambiente, pois permanecem longo tempo no solo para conferir um controle eficiente de nematoides e, por isso, podem se infiltrar em águas subterrâneas. A partir disso, alguns nematicidas, como os fumigantes, já tiveram a proibição total ou restrição do seu uso pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA há muitos anos e já estão sendo avaliados em outros países (ABAWI e WIDMER, 2000; AKHTAR e MALIK, 2000).

Sendo assim, é provável que em países em desenvolvimento, também seja reduzido o uso desses produtos químicos, devido a preocupações locais, além das muitas exigências para a importação de seus produtos. Portanto, estudos de novos métodos para o controle destes fitoparasitas e estratégias alternativas para substituir nematicidas

químicos no controle de nematoides são de extrema importância neste momento. Os produtos biológicos já estão sendo estudados e já existem relatos na literatura quanto às vantagens e à segurança desses produtos em relação aos agrotóxicos, além de diversos países já estarem utilizando métodos de controle biológico (AKHTAR e MALIK, 2000; BETTIOL et al., 2012).

## 2.2 CONTROLE BIOLÓGICO

A utilização de microrganismos na produção de substâncias e processos tem encontrado um grande destaque na agricultura. Para a produção industrial de microrganismos podem ser usadas duas formas de multiplicação: *in vivo*, utilizando-se o hospedeiro alvo ou alternativo, ou *in vitro*, onde é possível utilizar meios artificiais para condições de cultivo (PRADELLA, OLIVEIRA e URENHA, 2001; LOPES, 2009).

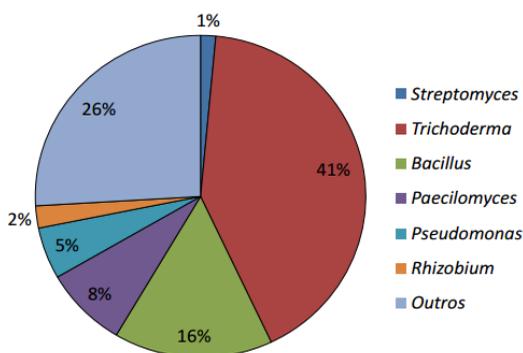
O uso de biocontroladores ainda não se encontra bem difundido na América Latina, pois ainda existem poucos produtos de biocontrole disponíveis no mercado, além disso, também existem os aspectos socioculturais da população que dificultam a difusão de biocontroladores de pragas e doenças. Porém, os benefícios esperados vão além da ação direta do produto no alvo, podendo agir ainda sobre outros organismos, além disso, não causam desequilíbrios ambientais quando comparados com os agrotóxicos. Por outro lado, os produtos para controle biológico encontram dificuldades no mercado devido ao alto custo requerido para seu registro. Esse fator pode ser um agravante ainda maior, quando se considera que grande parte das empresas produtoras desse tipo de produto é de pequeno porte (LOPES, 2009).

Para o controle biológico, as bactérias representam um grupo importante dentro de microrganismos antagonistas de patógenos radiculares. As bactérias que podem incitar um aumento no desenvolvimento e na produção do seu hospedeiro são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento das plantas (PGPR) (MARIANO, SILVEIRA e GOMES, 2006). A *Pasteuria penetrans* é uma bactéria formadora de endósporos, amplamente distribuída nos solos e que ganhou destaque como antagonista de nematoides (SAYRE, 1988). Além dessa, outras bactérias produtoras de endósporos, pertencentes a família *Bacillaceae*, como aquelas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, também têm sido estudadas. Um exemplo é *Bacillus subtilis*, que são referidas como potencial para aplicação em controle biológico, pelas suas características de resistência às condições adversas

ambientais e de processamento industrial. Além disso, essas bactérias são capazes de produzir metabólitos e endósporos que são altamente resistentes ao calor, que se tornam características importantes para o desenvolvimento de produtos comerciais para o controle biológico (SHODA, 2000; MORAES et al., 2001; ONGENA e JACQUES, 2008; KINSELLA et al., 2009).

Atualmente existem muitos microrganismos de vários gêneros, não restritos somente a bactérias, sendo aplicados em biocontrole no mundo, como demonstrado na Figura 1.

**Figura 1-** Principais gêneros de antagonistas presentes em produtos biológicos comercializados no mundo



**Fonte:** Bettiol et al., 2012.

Depois dos fungos, principalmente os do gênero *Trichoderma*, entre as bactérias, os gêneros mais usados para controle biológico são *Pseudomonas* e *Bacillus*, sendo que esses estão envolvidos na supressividade do solo e de patógenos. Eles podem ter ação direta no solo por antibiose e competição, além de exercer ação direta, como as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) (BETTIOL et al., 2009).

### 2.2.1 Uso de *Bacillus subtilis* para controle biológico

O gênero *Bacillus* está entre os mais usados em biocontrole, devido à ausência de patogenicidade, além de outros fatores como a capacidade de formação de esporos, que por sua vez apresentam um

maior tolerância a temperatura, assim como condições extremas de pH e tempo de estocagem. Em face desses fatores é o gênero com maior destaque, sendo que em produtos à base de *Bacillus*, a espécie *Bacillus subtilis* representa cerca 62 % dos produtos comercializados (LIMA, 1975; MASSAGUER, 2005; BETTIOL et al., 2012).

Essa bactéria é também considerada uma das espécies mais eficazes para biocontrole, devido a sua atividade biológica em diversos microrganismos responsáveis por doenças em plantas. A atividade pode estar relacionada à produção de lipopeptídeos ativos e também à facilidade de colonizar plantas (ASAKA e SHODA, 1996). Pela produção desses metabólitos secundários, a espécie *Bacillus subtilis* já é usada há mais de 50 anos para biocontrole de diversas doenças em plantas (YAN et al., 2011; YU et al., 2011).

Na Tabela 1 estão listados alguns produtos que já se encontram no mercado de biocontroladores, onde tem como base as bactérias da espécie *Bacillus subtilis*.

**Tabela 1-** Produtos de biocontrole com base em *Bacillus subtilis*

<b>Produto</b>	<b>Países de comercialização e registro</b>
Avogreen®	África do Sul
Biosubtilin	Índia
Cease®	EUA e México
Companion® e Kodiak®	EUA
Ecoshot	EUA
FZB24®	Alemanha
HiStick N/T® e Subtilex®	EUA e Canadá
Rhapsody® e Pro-Mix®	EUA e Canadá
Rhizo Plus®	Alemanha
Serenade®*	Chile, EUA, México, Nova Zelândia, Porto Rico, Costa Rica, Japão, Israel, Filipinas, Guatemala, Honduras, Suíça, Turquia, Argentina, França, Itália, Coreia, Equador, Peru, Brasil

\*Além desses países, o produto ainda está sendo aprovado para uso na Colômbia, Canadá, Espanha, Grécia, Alemanha, África e Reino Unido. Também é aprovado para uso em agricultura orgânica nos EUA, Suíça e Alemanha (BETTIOL et al., 2012).

## 2.2.2 Mecanismo de ação das bactérias no controle biológico

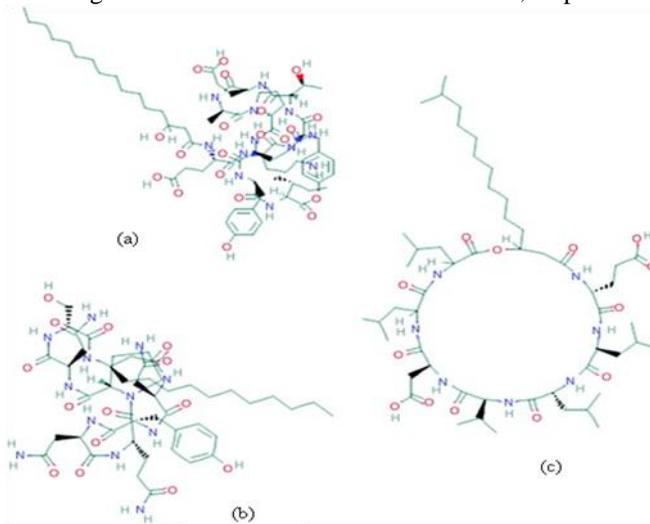
Os mecanismos de ação dos microrganismos para controle de doenças em plantas são diversos, podendo ajudar no aumento de absorção de nutrientes, a indução de resistência, a antibiose (através da produção de iturina, um heptapeptídeo ligado a um ácido graxo, que pode romper em alguns casos a parede celular de patógenos), a competição e a promoção de crescimento (BETTIOL et al., 2012).

O principal mecanismo do *Bacillus subtilis* para o controle biológico é o antagonismo aos agentes patogênicos. Além disso, muitas enzimas, antibióticos peptídicos e outras moléculas menores, como os compostos voláteis, são secretadas por muitas espécies de *Bacillus*. No caso do *Bacillus subtilis* uma média de 4 a 5 % do seu genoma é direcionado para síntese de antibióticos, sendo capaz de produzir mais de 20 compostos antimicrobianos (SHODA, 2000; STEIN, 2005; PÉRES-GARCÍA, ROMERO e VICENTE, 2011).

Entre os compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus subtilis*, estão os lipopeptídeos cíclicos, que podem ser classificados de acordo com as seguintes famílias químicas: surfactinas, iturinas e fengincinas. Suas estruturas químicas podem ser visualizadas na Figura 2 (ONGENA e JACQUES, 2008; PÉRES-GARCÍA, ROMERO e VICENTE, 2011).

Considerado um poderoso biossurfactante, a surfactina apresenta uma alta atividade antibacteriana, porém baixa atividade fungicida, ao contrário das iturinas, que apresentam uma forte ação antifúngica, contra uma ampla variedade de leveduras e fungos, pela sua capacidade de permear membranas, através da perturbação osmótica. Assim como iturinas, as fengincinas também apresentam uma forte atividade antifúngica, em especial para com os fungos filamentosos (ONGENA e JACQUES, 2008; PÉRES-GARCÍA, ROMERO e VICENTE, 2011).

**Figura 2-** Estrutura química bidimensional de lipopetídeos produzidos por espécies de *Bacillus*: (a) Fengicina, (b) Iturina A e (c) sufactina. Átomos de nitrogênio e oxigênio são retratados em azul e vermelho, respectivamente



**Fonte:** Péres-García, Romero e Vicente, 2011.

As bactérias podem ter diferentes modos de ação para controle de fitoparasitas. No caso do uso de bactérias para o controle de nematoides do solo, as interações de bactérias e nematoides podem ocorrer de diferentes maneiras, sendo que muitas bactérias durante a decomposição de matéria orgânica, são capazes de produzir subprodutos, metabólicos e toxinas, além de enzimas, que podem apresentar ação antagonista em relação aos nematoides presentes (AKHTAR e MALIK, 2000).

De acordo com Sayre (1988) e Cho, Na e Yiem (2000) os nematoides podem ser controlados usando a bactéria *Pasteuria penetrans*, que apresenta uma grande eficiência para nematoides de galhas. Essa bactéria se adere aos nematoides e após um tempo seus endósporos penetram os fitoparasitas, sendo que esses podem até chegar à fase adulta, porém com sua fertilidade reduzida ou até mesmo eliminada. Entretanto, um dos grandes problemas dessa bactéria é que sua produção *in vitro* não se encontra bem estabelecida. Por outro lado, grande parte das bactérias, como dos gêneros *Bacillus*, *Azobacter*, *Pseudomonas*, entre outros, podem controlar os nematoides através de toxinas, cuja produção é mais bem conduzida (AKHTAR e MALIK, 2000).

### 2.3 *Bacillus subtilis*

A bactéria *Vibrio subtilis* descrita por Ehrenberg em 1835 foi, em 1872, renomeada para *Bacillus subtilis* por Cohn (GORDON, 1981 *apud* SLEPECKY e HEMPHILL, 2006). Este microrganismo é membro fundador da família *Bacillaceae*, que se diferencia pela formação de endósporos. Dentro desta família ainda são encontrados seis outros gêneros: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* e *Thermoactinomyces* (FRITZE, 2004; MASSAGUER, 2005; SLEPECKY e HEMPHILL, 2006),

Os *Bacillus subtilis* são bactérias que possuem formato de bastonete Gram positivos, são formadoras de endósporos, podendo ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Essas bactérias tendem a apresentar falso Gram (Gram<sup>-</sup>) quando as células envelhecem. Além disso, são considerados quimio-heterotróficas, ou seja, conseguem aproveitar substratos orgânicos, sendo algumas consideradas proteolíticas, lipolíticas e amilolíticas (MASSAGUER, 2005; CARBALLIDO-LÓPEZ e FORMSTONE, 2007).

Esta bactéria é amplamente encontrada no solo, pelo fato de crescer em uma vasta gama de temperaturas e alta velocidade de crescimento, ainda apresenta capacidade de se mover. Além disso, também pode produzir endósporos, enzimas hidrolíticas e antibiótico (SLEPECKY E HEMPHILL, 2006).

A diversidade metabólica destes microrganismos tem levado os *Bacillus subtilis* a ser utilizado em uma ampla variedade de processos industriais, desde produção de enzimas hidrolíticas, antibióticos, inseticidas e também produtos alimentícios, como a fermentação de grão de soja, um produto muito consumido pelos japoneses (HARWOOD, 1992).

A utilização de *B. subtilis* também tem sido relatada para controle biológico e promoção de crescimento em plantas (ARAÚJO, HENNING e HUNGRIA, 2005; LAZARETTI e MELO, 2005; MENA-VIOLANTE e OLALDE-PORTUGA, 2007; ARAÚJO, 2008; LIMA, 2010; LÓPEZ-VALDEZ et al., 2011), e outros estudos têm relacionado esta bactéria como probiótico para animais (FRANÇA et al., 2008; GARCIA, 2008). Porém, mesmo com vários estudos realizados, a aplicação efetiva do *B. subtilis* para o controle de nematoides ainda não se encontra bem difundida.

## 2.4 ENDÓSPOROS BACTERIANOS

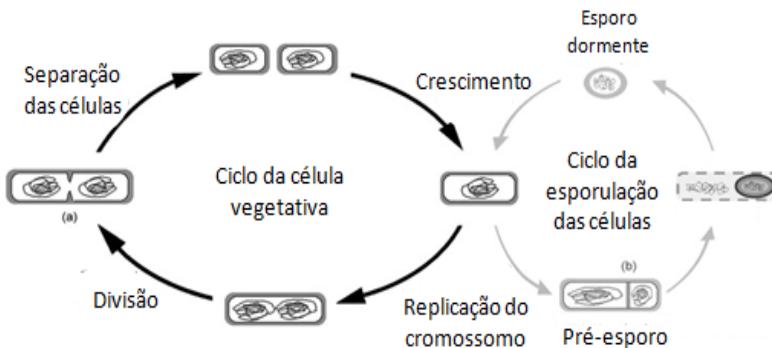
Na *Bacillaceae* a produção de endósporos é considerada uma característica distinta dessa família. Os esporos podem ser redondos, ovais ou cilíndricos e são formados dentro das células bacterianas. Os esporos foram descritos pela primeira vez por Cohn em *Bacillus subtilis*, mas, um tempo mais tarde, foi identificado por Koch no patógeno *B. anthracis*, considerado único patógeno de vertebrados nesse gênero (SLEPECKY e HEMPHILL, 2006).

A transformação da célula vegetativa em esporo ocorre por meio de uma série de mudanças estruturais e metabólicas. Esta transformação pode ocorrer no momento em que o microrganismo esporulante se encontra em condições adversas, como esgotamento de nutrientes ou ainda no final da fase exponencial (MASSAGUER, 2005; CARBALLIDO-LÓPEZ e FORMSTONE, 2007).

O esporo representa uma fase da vida de algumas bactérias, sendo uma estrutura diferente da célula vegetativa, que contém material nuclear e citoplasma condensado, além de ter uma menor quantidade de água, um maior teor de cálcio e um ácido, que não está presente na forma vegetativa, o ácido dipicolínico. Além disso, o esporo apresenta características morfológicas que ajudam a classificá-lo, pois esses não permitem a entrada de corante, sendo que quando a coloração de Gram é realizada o esporo aparece incolor (LIMA, 1975; MASSAGUER, 2005).

A sequência de eventos morfológicos que culminam na formação de um esporo-livre, passa por diversas fases, conforme pode ser visualizado na Figura 3.

**Figura 3-** Ciclo da célula vegetativa e esporulação do *Bacillus subtilis*



**Fonte:** Carballido-López e Formstone, 2007.

Na Figura 3 o círculo preto representa a divisão celular (a) que é sempre perpendicular ao eixo longitudinal da célula e ocorre no meio da célula vegetativa, gerando duas células filhas idênticas. O ciclo celular alternativo de esporulação, que ocorre sob condições de privação de nutrientes é mostrado em cinza, partindo da célula vegetal, a assimetria gerada na célula esporulada, dando origem a uma célula mãe e ao pré-esporo (b), chegando ao final a um endósporo maduro, dormente e altamente resistente. Sendo que após a germinação, os esporos dormentes, em condições favoráveis, podem vir a germinar e transformar-se novamente em célula vegetativa (CARBALLIDO-LÓPEZ e FORMSTONE, 2007).

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

## 2.5 FITOPARASITAS

### 2.5.1 Nematoides

Derivada do grego, a palavra nematoide é formada pelo prefixo *nema* e pelo sufixo *idos*, que significa vermes em forma de fio, por apresentarem, em parte de sua vida, o corpo alongado e cilíndrico (CARES e HUANG, 2010).

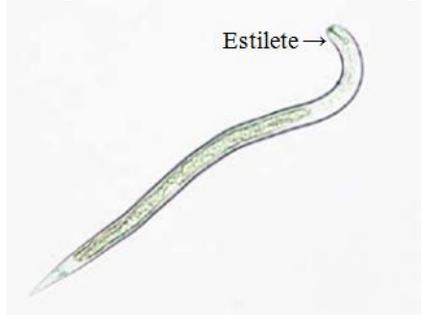
Os nematoides são invertebrados, pequenos e constituem o grupo com maior abundância e diversidade entre os animais, pela sua alta capacidade de adaptação, sendo que de cada cinco animais do planeta, quatro pertencem a esse grupo. Grande parte dos nematoides presentes no solo é benéfica, pois degradam e mineralizam a matéria orgânica presente no solo. Em contrapartida, algumas espécies são importantes patógenos de plantas, que causam grandes perdas na agricultura (FREITAS, NEVES e OLIVEIRA, 2007; CARES e HUANG, 2010).

Os nematoides presentes no solo não considerados patogênicos as plantas são chamados de vida livre e ingerem organismos como bactérias, fungos, algas e microinvertebrados (incluindo outros nematoides). Já os nematoides fitopatogênicos são parasitas que se

alimentam de raízes e, algumas espécies são capazes de migrar para a parte aérea da planta, podendo causar galhas e lesões até mesmo nas folhas (MICHEREFF et al., 2006; CARES e HUANG, 2010).

Os nematoides fitopatogênicos possuem um estilete que facilita sua penetração e extração de nutrientes, conforme pode ser visualizado na Figura 4, causando uma série de sintomas nas plantas, como necrose radicular, galhas radiculares, ramificações anormais das raízes, murcha e clorose. Além disso, mesmo os nematoides sendo patógenos primários, também podem causar outras doenças de maneira indireta, devido aos ferimentos causados nas plantas, o que propicia o acesso de bactérias e fungos a tecidos radiculares intercelulares (MICHEREFF et al., 2006).

**Figura 4-** Juvenis de segundo estágio de nematoide fitoparasita



**Fonte:** Dias et al., 2010.

Esses organismos têm extremidades finas, variando de 0,2 a 3 milímetros, seu ciclo de vida é cerca de quatro semanas quando a temperatura do solo encontra-se a 28°C, sendo que a baixas temperaturas, apresentam um ciclo maior. Vários gêneros são capazes de infectar as raízes de tomateiros, podendo ser agrupados em quatro diferentes tipos de parasitismo: ectoparasitas (não penetram nas raízes), semi-endoparasitas (penetram parcialmente nas raízes), endoparasitas migratórios (penetram e migram internamente nas raízes) e endoparasitas (penetram as raízes, mas após início da alimentação de células da raiz, não migram internamente). No último grupo, as fêmeas adquirem uma forma globosa e tornam-se sedentárias, diferentemente de machos e juvenis encontrados nesse grupo (CHARCHAR e LOPES, 2005).

### 2.5.2 O gênero *Meloidogyne* e problemas radiculares

Os danos causados nas plantas pelos nematoides fitoparasitas, que se desenvolvem e se reproduzem em plantas, podem levar a perdas anuais de US\$ 100 milhões na agricultura mundial. Além disso, muitas vezes os danos causados as plantas por esses parasitas não é identificado, devido ao nicho ecológico principal se encontrar no solo. Os nematoides mais importantes em todo o mundo são os de galhas (*Meloidogyne*) e cisto (*Heterodera* e *Globodera*) (OKA et al., 2000).

Espécies de *Meloidogyne* (nematoides de galhas) normalmente são as mais prejudiciais, apresentando difícil controle pelo tempo curto de geração e altas velocidades de reprodução. Além disso, tem uma ampla gama de hospedeiros e natureza endoparasita. Esses aspectos acabam levando ao uso extensivo de pesticidas para seu controle (AFFOKPONA et al., 2011).

Dentro dos nematoides no gênero *Meloidogyne*, as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* são as mais encontradas no Brasil e podem ser encontradas em qualquer tipo de solo, predominando em regiões com solo arenoso. Já a espécie *M. hapla*, ocorre com menor intensidade em regiões com menores temperaturas (CHARCHAR e LOPES, 2005).

De acordo com Abawi e Widmer (2000) as doenças radiculares são mais graves nas plantas e podem causar perdas ainda maiores quando o solo apresenta condições desfavoráveis, como alta compactação, ocorrendo uma drenagem inadequada ou baixo teor de matéria orgânica, e também pela sequência da cultura de plantas suscetíveis a esse fitopatógeno favorece as altas densidades no solo. As principais medidas que podem ser empregadas para seu controle são o uso de culturas resistentes, rotação de cultura ou nematicidas químicos e plantas armadilhas.

## 2.6 O TOMATEIRO

A origem do tomateiro encontra-se na região andina, desde o Equador até o norte do Chile. Sendo que nessa área diversas espécies do gênero *Solanum* crescem espontaneamente, já a domesticação dessa hortaliça, ocorreu no México. A difusão do tomate pelo mundo foi feita pelos espanhóis e portugueses. A introdução do tomate no Brasil, também se deve aos imigrantes europeus no final do século XIX, porém

sua difusão e consumo começaram por volta de 1930, depois da Primeira Guerra Mundial (ALVARENGA, 2004a).

O tomateiro é uma planta perene de cultivo anual, podendo se desenvolver de forma rasteira, ereta ou semiereta. Essa apresenta folhas alternadas, com um folíolo terminal e cerca de seis a oito folíolos laterais, mas o interesse comercial está no fruto produzido. Esses se desenvolvem por inflorescência, que pode ser do tipo racimo (cachos), com flores pequenas e amarelas, sendo que o início da floração, para algumas cultivares, pode ocorrer em 45 dias após a sementeira (ALVARENGA, 2004a).

O tomateiro é produzido em todas as regiões do Brasil, e de acordo com IBGE (2012) a área de tomate plantada em 2012 foi de 64.880 ha, sendo esta 2 % inferior quando comparada a 2011. A produção de 2012 chegou a 4 milhões de toneladas, tendo um rendimento médio de 63 toneladas por ha. Os estados com maior produção de tomate no Brasil são Goiás, São Paulo e Minas Gerais, respectivamente.

De acordo com Alvarenga (2004a) o tomateiro se desenvolve bem em diversos tipos de solo, escala de latitudes, temperaturas e modo de cultivo. Porém, desenvolve-se melhor em ambientes quentes, com temperaturas de 20 a 25 °C, com boa iluminação e drenagem, sendo que temperaturas inferiores a 10 °C são prejudiciais à planta.

Nutricionalmente, além de ser fonte substancial de carboidratos e proteínas, também é fonte de diversas vitaminas, sais minerais e grandes quantidade de licopeno, um composto antioxidante, muito estudado. Entre os atributos mais importantes em termos de preferência de consumo estão o sabor, aroma, aparência, textura e facilidade de preparo (ALVARENGA, 2004 b).

De acordo com Alvarenga (2004 b) as cultivares de tomate para consumo *in natura*, didaticamente podem ser divididas em cinco grupos: Santa Cruz, Salada ou Caqui, Cereja, Saladinha e Saladete ou Italiano. O grupo Santa Cruz (Figura 5) surgiu de um cruzamento realizado pelos agricultores de duas variedades de tomate, Rei Umberto e Redondo Japonês, em 1930. Esse grupo apresenta frutos oblongos, com menor diâmetro transversal em comparação com longitudinal e peso médio de 80 a 220 gramas. Estes são os que apresentam uma maior demanda pelo mercado, geralmente apresentam preços mais baixos e apresentam uma maior acidez.

**Figura 5-** Frutos de tomate do grupo Santa Cruz



**Fonte:** Toca do verde, 2013.

Considerada uma das hortaliças mais importantes economicamente, o tomate pode ser consumido tanto *in natura* como processado e ainda é considerado uma das hortaliças mais exigentes e suscetíveis a pragas e doenças, sendo que já foram relatados mais de duzentas doenças e distúrbios fisiológicos em cultura de tomate em todo mundo. Sendo que os nematoides causadores de galhas são os responsáveis pelas maiores perdas a essa cultura no Brasil (CHARCHAR e LOPES, 2005).

## 2.7 BIORREATORES

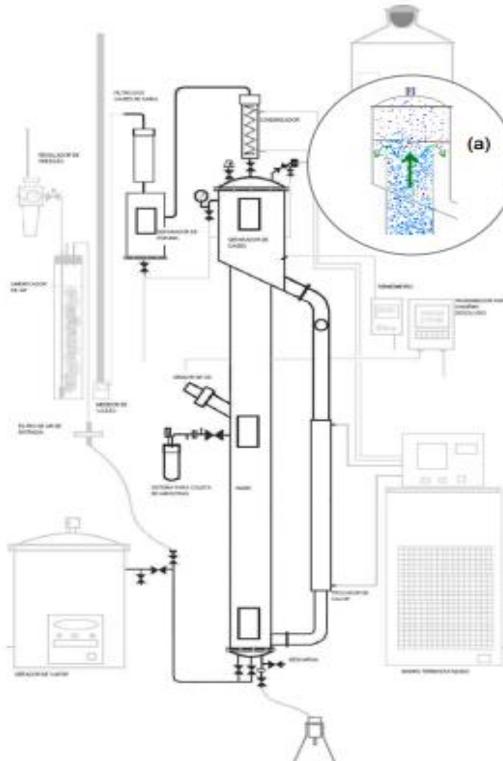
Os biorreatores são reatores onde pode ocorrer uma série de reações químicas realizadas por biocatalisadores, que podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais). Além disso, os biorreatores ainda podem ser classificados de acordo com o tipo de biocatalizador (células ou enzimas), configuração do biocatalizador (livres ou imobilizadas) e quanto à forma de agitação do líquido no reator (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

A forma de agitação dos reatores pode ser realizada com agitador mecânico ou ainda serem agitados pneumaticamente, onde a agitação do líquido ocorre pelo borbulhamento de um gás no reator. Esses últimos reatores apresentam uma menor tensão de cisalhamento e nesse grupo podem ser destacados os reatores *airlift* (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

### 2.7.1 Biorreatores *airlift*

Os biorreatores *airlift* são reatores pneumáticos, que apresentam diferenças em relação a outros reatores pneumáticos usados, como o biorreator de coluna de bolhas, devido ao tipo de fluxo. O funcionamento desse último reator ocorre pela injeção de gás na parte inferior e através das bolhas ascendentes, ocorre a mistura do meio. Já no caso do primeiro biorreator, a circulação do líquido é determinada pelo *design* do reator (SIEGEL e ROBINSON, 1992; VIAL et al., 2002). Na Figura 6 está ilustrado o esquema de um biorreator *airlift* com circulação externa, desenvolvido por Rossi (2006).

**Figura 6-** Esquema do biorreator *airlift* construído em aço inox com equipamentos acessórios (cinza). Detalhe do separador de gás (a)



**Fonte:** Rossi, 2006.

O *airlift* apresenta quatro zonas diferentes, sendo que cada uma delas tem um fluxo diferente, que dividem o reator em duas zonas de escoamento, sendo um para cima e outra no sentido oposto, com duas fases (gasosa e líquida). Essas zonas ou canais permitem a circulação do líquido no reator, que é induzida pela diferença de densidade entre o tubo de subida e tubo de descida, criando uma diferença de pressão hidrostática no fundo do tubo ascendente e na parte inferior do outro tubo, onde o líquido desce e propicia a força motriz para a movimentação do líquido (SIEGEL e ROBINSON, 1992; VIAL et al., 2002).

### **2.7.2 Vantagens do biorreator *Airlift***

Os biorreatores *airlift* são classificados junto com os biorreatores de coluna de bolhas e apresentam as mesmas vantagens destes, pois apresentam uma construção simples, sem partes internas ou móveis, excelente capacidade de transferência de calor e massa, com baixo consumo de energia, pois a fase gasosa apresenta duas funções: aeração e agitação do meio. Estes se destacam em relação aos demais reatores pneumáticos, por terem uma maior velocidade do líquido no meio, o que aumenta transferência de calor e massa. Além disso, esse biorreator ainda apresenta uma menor e melhor tensão de cisalhamento, quando comparado com reatores de agitação mecânica e até mesmo de coluna de bolhas. Isso é uma grande vantagem para processos biológicos, pois a falta de uniformidade no cisalhamento, que ocorre em outros reatores como os mecanicamente agitados e coluna de bolhas, expõe o microrganismo a diferentes ambientes e tensões, o que pode prejudicá-lo (SIEGEL e ROBINSON, 1992; VIAL et al., 2002).

De acordo com Siegel e Robinson (1992) esses biorreatores têm um perigo de contaminação menor, devido a ausência de partes mecânicas móveis para agitação. Outra vantagem é a ausência de partes internas e a orientação vertical do equipamento, que facilita a sua limpeza e esterilização.

## **2.8 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO**

De acordo com Schmidell (2001) os processos biotecnológicos para cultivo de células em aerobiose são de grande interesse industrial, sendo que muitos produtos como vitaminas, antibióticos, inoculantes,

enzimas, entre outros, são produzidos dessa forma. Porém, para o desenvolvimento de um processo envolvendo células aeróbias é necessário um adequado dimensionamento da transferência de oxigênio, que consiste em dissolver o oxigênio da fase gasosa na fase líquida. Sendo assim, o oxigênio contido na fase líquida poderá ser consumido pelo microrganismo na sua respiração.

Bioquimicamente, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons e é reduzido a água no final da cadeia respiratória, permitindo assim, que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação, ao longo da glicólise ou do ciclo de Krebs, além de permitir, o armazenamento de energia através da transformação das moléculas de ADP em ATP. Estes compostos participarão das reações que necessitam energia, como a síntese de moléculas importantes para a sobrevivência das células e surgimento de novas células (SCHMIDELL, 2001).

Durante todo o processo fermentativo, tem-se a necessidade de aerar e agitar o meio de cultivo, pois diferente dos demais nutrientes usados no meio de cultivo, o oxigênio é um fator limitante no cultivo, pois este é pouco solúvel em água, sendo que a concentração de oxigênio dissolvido na saturação ao se borbulhar ar atmosférico a pressão de 1 atm e 35 °C é de apenas 7 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (7 ppm) (SCHMIDELL, 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMO UTILIZADO E MANUTENÇÃO

O microrganismo utilizado foi um isolado de *Bacillus subtilis* (CCT 3131) adquirido da Coleção de Culturas Tropicais André Tosello. O isolado foi mantido em placas com ágar nutriente, com a composição apresentada na Tabela 2. Após repiques por estriamento as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24 horas e depois conservadas em geladeira entre 8-10 °C.

**Tabela 2-** Composição do meio de cultura ágar nutriente

Componente	Quantidade
Ágar	20 g
Peptona	15 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada	1000 mL

#### 3.2 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo para os cultivos submersos foi preparado em meio caldo nutriente (Tabela 2 sem adição de ágar). Em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do meio de cultura, onde foram inoculadas três alçadas contendo colônias isoladas crescidas em ágar nutriente. Os frascos foram incubados durante 24 horas em agitador orbital a 180 rpm em temperatura de 30 °C. Desses frascos foram retirados volumes que representaram 10 % do volume do cultivo a ser realizado.

#### 3.3 ADEQUAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA CULTIVO

Com o objetivo de racionalizar os nutrientes com maior impacto no custo do meio de cultura, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> considerando como variáveis a peptona, o extrato de levedura e o sulfato de amônio. O planejamento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Foi adicionado 1 % de inóculo, para todos os frascos. Os frascos foram colocados sob agitação orbital de 180 rpm a 30 °C por 24 horas, em duplicata. Como resposta foi

avaliada a concentração final de biomassa, a densidade óptica. Na Tabela 3 pode ser visualizada a matriz do planejamento.

**Tabela 3-** Variáveis e níveis (-1 e +1) utilizados no planejamento experimental para adequação do meio de cultura para o cultivo submerso de *Bacillus subtilis*

Peptona (g L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g L <sup>-1</sup> )	Sulfato de amônio (g L <sup>-1</sup> )
(-1) 3	(-1) 1	(-1) 0
(-1) 3	(+1) 5	(-1) 0
(+1) 10	(-1) 1	(-1) 0
(+1) 10	(+1) 5	(-1) 0
(-1) 3	(-1) 1	(+1) 1,5
(-1) 3	(+1) 5	(+1) 1,5
(+1) 10	(-1) 1	(+1) 1,5
(+1) 10	(+1) 5	(+1) 1,5

### 3.3.1 Meios de cultura

Cultivos preliminares foram realizados em meio contendo os componentes listados na Tabela 4, conforme estudado por Lazzaretti e Mello (2005). Após o estudo de adequação do meio, levando em consideração os resultados obtidos no planejamento experimental, passou-se a utilizar a composição apresentada na Tabela 5.

**Tabela 4-** Composição do meio de cultura para cultivo de *Bacillus subtilis*

Componente	Quantidade (g L <sup>-1</sup> )
Glicose	10,0
Peptona	10,0
Extrato de levedura	5,0
NaCl	3,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5

**Fonte:** Lazzaretti e Mello, 2005.

**Tabela 5-** Composição do meio utilizado para cultivo de *Bacillus subtilis* após o estudo de adequação para diminuição de custo

<b>Componente</b>	<b>Quantidade (g L<sup>-1</sup>)</b>
Glicose	10,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	1,0
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	1,5
NaCl	3,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5

Material e meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Volumes de 5 L de meios utilizados no biorreator, foram esterilizado por 20 minutos. A glicose foi esterilizada separadamente dos demais componentes e adicionada ao meio de cultura no momento da inoculação.

### 3.4 CULTIVO SUBMERSO

#### 3.4.1 Cultivo em frascos com aeração

Cultivos preliminares foram realizados em frascos Erlenmeyer de 1000 mL com uma abertura lateral onde eram retiradas periodicamente amostras com uma seringa de 10 mL. Foram utilizados 600 mL de meio de cultivo, temperatura de 30°C e aeração fornecida pelo sistema de ar comprimido com o auxílio de mangueira de silicone com uma pedra porosa como distribuidor de ar. O ar foi esterilizado utilizando membranas de PTFE com poros de 0,20 µm de diâmetro, da Millipore Billerica, USA. O cultivo durou cerca de 25 horas, até alcançar a fase estacionária.

#### 3.4.2 Cultivo em biorreator airlift

Foi utilizado um biorreator airlift com circulação externa e 5 L de capacidade útil. Sua esterilização foi realizada através de injeção de

vapor direto produzido por uma autoclave de 50 L. O biorreator tinha um sistema de controle de vazão de ar, temperatura e pH. O controle da vazão de ar permitia a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido (OD) dentro de valores estabelecidos. O eletrodo para OD era do tipo polarográfico da Mettler-Toledo International e foi calibrado no meio de cultura após a esterilização do biorreator.

O pH foi medido com um eletrodo da série InPro, também da Mettler-Toledo. Esse foi calibrado previamente a esterilização utilizando padrões de pH 4,01 e 7,0. O controle durante o cultivo foi mantido através da injeção de soluções de NaOH e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M. Após a transferência do meio de cultura, procedeu-se a inoculação dando início ao cultivo que foi mantido até atingir a fase estacionária de crescimento. Periodicamente foram retiradas amostras para o estudo do processo.

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.5.1 Quantificação do crescimento celular

O crescimento celular determinado nas amostras retiradas ao longo do tempo de cultivo foi quantificado pela massa seca e por densidade óptica. Nas amostras iniciais do cultivo, quando a concentração celular ainda era baixa, volumes entre 4 e 10 mL de amostra, foram filtradas em membranas de celulose da Millipore com diâmetro de 47 mm e poros de 0,22 µm, previamente secas e pesadas, utilizando um sistema de filtração a vácuo da marca Sartorius Stedium. A seguir, as membranas contendo a biomassa foram lavadas com 5 mL de água e secas em micro-ondas por 10 minutos e 800 Watts de potência e colocadas em dessecador por cerca de 20 minutos e, então, pesadas em balança analítica (REIS et al., 2004).

Quando as amostras continham uma quantidade maior de biomassa, apresentando dificuldade para filtrar com membranas, estas passaram por um procedimento diferente. As amostras foram colocadas em tubos de 2 mL e centrifugadas a 9.660 *xg* durante 20 minutos, em centrífuga da marca Eppendorf MiniSpin plus. Em seguida o sobrenadante foi separado para análise de açúcares redutores e o precipitado foi lavado com água sob agitação em vortex, e centrifugado novamente a 9.660 *xg* por 20 minutos. Finalmente, o precipitado de células foi colocado em estufa a 90 °C por 24 horas. Após esse período os tubos foram colocados em dessecador por 30 minutos e pesados em

balança analítica. Os tubos limpos e secos foram previamente pesados. O cálculo da biomassa seca foi realizado conforme Equação 1.

$$X = \frac{m_f - m_i}{V} \quad (1)$$

Onde: X = concentração de biomassa (g.L<sup>-1</sup>); m<sub>f</sub> = massa da amostra seca + massa da membrana ou microtubo(g); m<sub>i</sub>= massa da membrana ou microtubo(g); V= volume da amostra (L)

A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro (modelo SF325NM, da marca TECNAL) a 600 nm e zerada com o próprio meio de cultivo. Para manter a precisão adequada (região linear), foi utilizada uma faixa de absorbância entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram realizadas diluições, utilizando água destilada.

### 3.5.2 Contagem de células viáveis

A quantificação das células viáveis nas amostras de cultivo foi realizada pela contagem em placas pelo método *pour plate*. Para isso, para cada amostra foi submetida a diluição seriada decimal em solução salina (0,85% de NaCl). Após a transferência de 1 mL de cada diluição para placas vazias, adicionou-se o meio ágar nutriente (Tabela 2) ainda fundido. Após a homogeneização através de movimentos circulares as placas foram deixadas descansando para meio solidificar. Em seguida as placas foram colocadas invertidas em incubadora, na temperatura de 30 °C durante 18 horas a 24 horas. A determinação foi realizada em triplicatas e para a contagem foi escolhida as placas com diluições que fornecerem entre 30 e 300 colônias e, o resultado foi considerado a média das três contagens de colônias e expresso em UFC mL<sup>-1</sup>.

### 3.5.3 Contagem de esporos

Na fase mais adiantada dos cultivos pode ocorrer a esporulação. A contagem de esporos foi realizada também pela técnica *pour plate*. Inicialmente, as amostra de cultivo foram colocadas em banho Maria a 80 °C por 10 minutos, para inativação das células vegetativas. Após diluição, 1 mL das amostras foram colocadas em placa e adicionou-se meio ágar triptona de soja ainda fundido. Após homogeneização as placas foram incubadas invertidas a 35 °C durante 18 horas a 24 horas.

O resultado foi considerado como a média das três contagens das colônias e expresso em UFC mL<sup>-1</sup>.

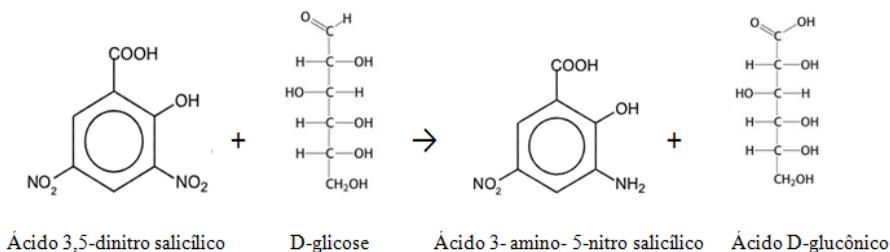
### 3.5.4 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores totais (ART) foi realizada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS), em microescala, adaptado de Miller (1959) e Gonçalves et al. (2010). Para a preparação do reagente DNS, dissolveu-se 75 g de tartarato de sódio e potássio e 4 g de NaOH em água destilada. Em seguida adicionou-se lentamente 2,5 g de ácido 3-5 dinitrosalicílico sob constante agitação e ajustou-se o volume final para 250 mL.

As amostras foram diluídas, de forma que a concentração de substrato se encontrasse dentro do intervalo de concentração da curva padrão de 0,3 a 2,0 g L<sup>-1</sup> de glicose (Figura 1 do Apêndice). Então um volume de 25 µL de amostra, juntamente com 25 µL de reagente DNS foram adicionadas em placa Nunclon<sup>TM</sup> de 96 poços e submetidos a tratamento térmico em banho de água a 100 °C por 5 minutos. Em seguida foram resfriados em banho de gelo e acrescentou-se 250 µL de água destilada. A absorbância foi lida a 540 nm em leitor de placas. Para calcular a concentração final, descontou-se o valor do branco, obtido conforme descrito acima e utilizando água no lugar da amostra (Infinite M200 da TECAN).

O fundamento do método esta baseado na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (coloração amarela) em meio alcalino e oxidação do aldeído do açúcar redutor presente no meio, neste caso glicose (Figura 7). Após a reação, é obtida uma coloração avermelhada, que é devido ao composto ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, formado na reação.

**Figura 7-** Reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico



Conforme o aumento da concentração de glicose contido em cada amostra, a coloração avermelhada se intensifica (Figura 2 Apêndice). Assim através da medição da absorbância das amostras, foi possível a determinação de glicose em cada amostra.

### 3.5.5 Coloração de Gram

Durante os cultivos, foram preparadas colorações de Gram, para conseguir acompanhar o cultivo quanto a possíveis contaminações e observar se havia ocorrido a esporulação. Após o esfregão das amostras em lâmina e fixação em chama, o corante púrpura cristal violeta foi aplicado, por 1 minuto e lavado com água, após aplicou-se lugol (solução de iodo) por 1 minuto e lavou-se com água. Logo a seguir foi aplicado álcool-cetona por 20 segundos e novamente lavou-se com água. O corante fucsina foi então aplicado por 30 segundos e lavado com água. Após secagem, analisou-se em microscópio com óleo de imersão na lente de aumento de 100x.

## 3.6 DETERMINAÇÃO DAS GRANDEZAS DE TRANSFORMAÇÃO

### 3.6.1 Conversão de substrato em biomassa

Em cultivo batelada a volume constante, a conversão de substrato em biomassa pode ser calculada através da equação abaixo.

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{(-dS)} \quad (2)$$

Onde:  $Y_{X/S}$  = fator de conversão de substrato (glicose) em biomassa ( $\frac{g_{cel}}{g_{sub}^{-1}}$ );  $X$  = concentração de biomassa ( $g L^{-1}$ );  $S$  = concentração de glicose ( $g L^{-1}$ )

A partir da integração da Equação 2 pode-se plotar um gráfico  $X=f(S)$  e o coeficiente angular da tangente à curva em qualquer instante é o fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ).

### 3.6.2 Produtividade em biomassa

A produtividade em biomassa, definida pela Equação 3, é uma definição especial de velocidade, capaz de avaliar o desempenho de um cultivo.

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (3)$$

Onde:  $P_x$ = produtividade média em biomassa ( $g.L^{-1}h^{-1}$ );  $X_m$ = concentração máxima de biomassa ( $g.L^{-1}$ );  $X_0$ = concentração inicial de biomassa ( $g.L^{-1}$ );  $t_f$ = tempo total do cultivo (h)

### 3.6.3 Velocidade específica de crescimento celular

A partir dos dados de concentração celular foi possível determinar a velocidade instantânea de crescimento microbiano ( $dX/dt$ ). Dividindo-se a velocidade instantânea pela concentração celular no tempo  $t$ , a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ) foi obtida, conforme Equação 4.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \left( \frac{dX}{dt} \right) \quad (4)$$

Onde:  $\mu_x$ =velocidade específica de crescimento de células ( $h^{-1}$ );  $X$ = biomassa ( $g.L^{-1}$ );  $t$ =tempo (h)

Considerando que durante a fase exponencial a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ) é constante e apresenta seu valor máximo, a integração da Equação 4 fornece a Equação 5.

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \cdot t \quad (5)$$

Então, através da representação gráfica de  $\ln(X)=f(t)$  na fase exponencial, obtém-se uma reta, cujo coeficiente angular é  $\mu_{\max}$ . Conhecendo-se  $\mu_{\max}$ , pôde-se calcular o tempo de duplicação da biomassa para o microrganismo através da Equação 6.

$$t_{\text{dup}} = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (6)$$

Onde:  $t_{\text{dup}}$ = tempo de duplicação (geração) das células (h)

### 3.7 TRANSFERÊNCIA E CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O CULTIVO: DETERMINAÇÃO DO $k_{L,a}$ E $Q_{O_2}$

Durante o cultivo, o oxigênio é injetado no biorreator e parte dele se dissolve na fase líquida, mas parte deste oxigênio é consumida pelo microrganismo simultaneamente, para crescimento celular e manutenção. Portanto, o balanço de oxigênio no meio líquido pode ser equacionado da seguinte maneira:

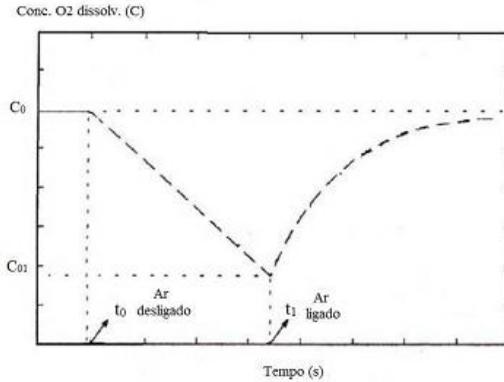
$$\frac{dC}{dt} = k_{L,a}(C_s - C) - Q_{O_2}X \quad (7)$$

Onde:  $Q_{O_2}$ : velocidade específica de respiração ( $g_{O_2} g_{cel}^{-1} h^{-1}$ );  $k_{L,a}$ : coeficiente volumétrico de transferência de  $O_2$  ( $h^{-1}$ );  $C_s$ : concentração de saturação de  $O_2$  dissolvido no líquido ( $g_{O_2} L^{-1}$ );  $C$ : concentração de oxigênio no meio líquido ( $g_{O_2} L^{-1}$ );  $X$ : concentração de biomassa ( $g_{cel} L^{-1}$ )

De acordo com a Equação 7, a variação da concentração de oxigênio dissolvido (OD) no meio líquido ( $dC/dt$ ) é o resultado obtido através da diferença de quantidade de oxigênio, que se consegue dissolver no meio ( $k_{L,a}(C_s - C)$ ) e a quantidade de oxigênio consumido pelo microrganismo ( $Q_{O_2}X$ ). Vale ressaltar que nesta equação, a cinética do cultivo esta sendo considerada, pois  $X$  varia com o tempo e  $Q_{O_2}$  varia com  $\mu_x$ , atingindo o valor máximo quando  $\mu_x = \mu_{max}$  (SCHMIDELL, 2001).

O  $k_{L,a}$  e  $Q_{O_2}$  foram determinados de acordo com Schmidell (2001), através do método dinâmico. Esse método é baseado na interrupção da aeração no processo fermentativo, em um determinado instante, interrompendo assim a transferência de  $O_2$  para o meio. Conforme ilustrado na Figura 8 a concentração de OD ( $C_0$ ) começa a diminuir, sendo registrada pelo sensor continuamente, após atingir um determinado valor de OD ( $C_{01}$ ), a aeração é retomada, conforme condições anteriores do cultivo, então registra-se o OD, até o mesmo atingir novamente o valor anterior  $C_0$ . A execução deste procedimento demanda um tempo relativamente curto, poucos minutos dependendo do estágio do processo. É importante ressaltar que para execução desse método as concentrações de  $O_2$  não devem atingir os valores críticos, para que não ocorra prejuízo ao metabolismo do microrganismo.

**Figura 8-** Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar  $k_L a$  e  $Q_{O_2}$ :



**Fonte:** Adaptado de SCHMIDELL, 2001.

A Equação 8 é resultante do trecho sem aeração.

$$\frac{dC}{dt} = -Q_{O_2} X \quad (8)$$

Pode-se supor, que neste curto período de tempo, não ocorre aumento de X, sendo assim  $Q_{O_2}$  se mantém constante, pode-se integrar a equação anterior, resultando na Equação 9.

$$C = C_0 - Q_{O_2} X \cdot (t - t_0) \quad (9)$$

A equação anterior prevê uma variação linear de C com o tempo, no trecho sem aeração, obtendo-se assim o valor de  $Q_{O_2}$ , através do coeficiente angular ( $Q_{O_2} X$ ) e de X neste instante, obtido através de análise gravimétrica, obtida da amostra retirada no momento da realização do ensaio.

O valor de  $k_L a$  foi determinado a partir dos dados obtidos durante o aumento da concentração OD (retomada da aeração), ilustrado no segundo trecho da Figura 8, onde a Equação 8 foi ajustada e aplicada na íntegra, obtendo-se a Equação 10.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \left( C_s - \frac{Q_{O_2} X}{k_L a} \right) - k_L a C \quad (10)$$

Admitindo-se o estado estacionário no momento que antecede a interrupção da aeração ( $C = C_0$ ), é possível verificar que:

$$C_0 = C_s - \frac{Q \cdot X}{k_L a} \quad (11)$$

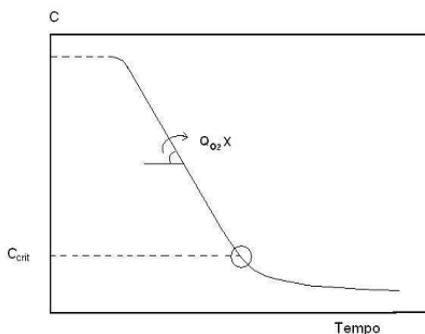
Através da substituição da Equação 11 na Equação 9 e posterior integração, chega-se a Equação 12, mas deve-se lembrar que no instante inicial de retomada da aeração do meio, ou seja, para  $t = t_1$ , tem-se  $C = C_{01}$ .

$$\ln \frac{C_0 - C}{C_0 - C_{01}} = -k_L a(t - t_1) \quad (12)$$

Então, plotando-se  $C=f(t)$ , conforme a Equação 12, obteve-se uma reta, para a qual o coeficiente angular forneceu o valor de  $k_L a$ .

A concentração crítica de oxigênio ( $C_{crit}$ ), é a denominação de uma determinada concentração de oxigênio dissolvido, onde a velocidade específica de respiração e conseqüentemente o crescimento celular passa a ser limitado. O  $C_{crit}$  foi determinado da mesma maneira do método dinâmico, interrompendo-se a aeração em determinado momento do cultivo e anotando-se a queda do oxigênio lido pelo sensor, conforme Figura 9. Então a partir de certo ponto a concentração de OD torna-se insuficiente, sendo que esse momento que inicia a diminuição da velocidade de respiração revela o ponto crítico de oxigênio naquele processo fermentativo.

**Figura 9-** Ilustração para explicar a determinação do  $C_{crit}$  com a utilização de um sensor de oxigênio dissolvido



**Fonte:** ROSSI, 2006.

## 3.8 PRODUÇÃO DE PLANTAS DE TOMATEIRO

### 3.8.1 Preparo das mudas

As mudas de tomate da variedade Miguel Pereira, pertencente ao grupo Santa Cruz, foram feitas na Estação Experimental da Epagri de Itajaí/SC em bandejas de 128 células, com 34,6 cm<sup>3</sup>, preenchidas com substrato marca Carolina, composto à base de turfa. A irrigação foi realizada com água coletada da chuva. As bandejas foram transferidas da unidade da Epagri após 20 dias de semeadura, a partir deste período foram mantidas na casa de vegetação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do CCB da UFSC, durante mais 20 dias, onde foram irrigadas com água deionizada, todos os dias na parte da manhã.

### 3.8.2 Características do solo

Um solo proveniente da Epagri de Itajaí/SC, com histórico de nematoides (456 nematoides por 100 g de solo) e utilizado em cultivo de tomateiro, foi levado para o experimento de controle biológico. A análise do solo utilizado no cultivo do tomateiro foi realizada na CIDASC de Florianópolis Anexo A e também está apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6-** Características químicas e físicas do solo utilizado no cultivo do tomateiro

Componente	Quantidade
Textura	26 % de argila
pH	5,50
Fósforo	50 ppm
Potássio	470 ppm
Matéria orgânica	2,3 % (m/V)
Alumínio	< 0,3 cmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup>
Cálcio	8,9 cmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup>
Magnésio	5,1 cmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup>
Sódio	109 ppm
Saturação de Bases-V	81,89 %

\*A unidade cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup> equivale a mg L<sup>-1</sup>

### **2.8.2.1 Condutividade elétrica do solo**

A condutividade elétrica foi realizada de acordo com Raij, Gheyi e Bataglia (2001). Para realização da análise preparou-se um extrato de solo (1:5), 10 cm<sup>3</sup> de solo juntamente com 50 mL de água deionizada, foram transferidos para um béquer. Deixou-se por 30 minutos em repouso, a seguir foram agitados durante 15 minutos em agitador magnético. Após o extrato foi filtrado em papel filtro e sua mediação foi realizada em condutivímetro (modelo Tec- 4MP da marca Tecnal).

### **3.8.3 Preparação dos vasos e transplante dos tomates**

O solo foi colocado em vasos de polietileno de baixa densidade (PEBD) com capacidade de 8 L. Os vasos foram previamente desinfestados com hipoclorito de sódio, em seguida foi colocado uma camada de pedra brita no fundo, esterilizadas 121°C por 40 minutos. A seguir foram colocados 5 kg de solo em cada vaso. Para os vasos controle, sem contaminação de nematoides, o solo foi esterilizado a 121°C por 100 minutos, em vasos de 1,5 kg. Para os demais experimentos, o solo com histórico de nematoides foi utilizado da forma como foi coletado na Epagri de Itajaí/ SC.

As mudas de tomates foram transplantadas para os vasos após 40 dias de semeadura, sendo que para cada vaso foram transplantadas duas mudas. Devido ao solo ser argiloso, foi adicionada uma camada de areia grossa, previamente esterilizada a 121°C por 90 minutos, para manter a umidade do solo.

### **3.8.4 Inoculação dos tomates e manutenção dos vasos**

Para os vasos com tratamento de *B. subtilis* foram usados três doses: 0,5 mL, 1,5 mL e 3,0 mL por vaso, aplicadas com pipeta ao redor das plantas, visando a colonização da rizosfera. A concentração de células viáveis de *B. subtilis* no inóculo foi de cerca  $1,5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Para os vasos testemunha e solo previamente esterilizado, não se aplicou nenhum tratamento.

Os vasos foram mantidos na casa de vegetação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do CCB da UFSC e foram irrigados com água deionizada, diariamente pela parte da manhã. Já o estaqueamento dos tomates foi realizado após 14 dias de transplante.

Além disso, cada um dos vasos recebeu três aplicações de 100 mL de solução nutritiva, correspondente à metade do tratamento completo de Hoogland e Arnon (1950), conforme Tabela 7, para suprir os nutrientes necessários.

**Tabela 7-** Solução nutritiva aplicada nas plantas de tomate

Reagente	Quantidade (mL L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub> (1M)	2,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1M)	1
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (1M)	2,5
Fe-EDTA *	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M)	0,5
Micronutrientes**	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O, ZnCl <sub>2</sub> , CuCl <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> Mo.H <sub>2</sub> O	0,5

\*Solução contendo (g L<sup>-1</sup>): FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (24,9) e EDTA (26,1) em 286 mL de NaOH 1N.

\*\*Solução contendo (g L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(2,86), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,81), ZnCl<sub>2</sub> (0,22), CuCl<sub>2</sub> (0,08), H<sub>2</sub>Mo.H<sub>2</sub>O (0,02)

Os vasos foram mantidos durante 60 dias na casa de vegetação, após esse período foram feitas as análises nas plantas e solo. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com sete repetições para cada tratamento.

### 3.8.5 Identificação dos nematoides no solo e raízes dos tomateiros

A identificação dos nematoides de galhas nos tomateiros foi realizada na Embrapa-Clima temperado de Pelotas/RS, a partir de amostras de solo e raízes dos tomateiros cultivados.

### 3.8.6 Quantificação de nematoides no solo

O solo de cada vaso foi armazenado em sacos plásticos em geladeira com temperatura de 4 a 7 °C e após os nematoides foram quantificados segundo a metodologia de flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964). Amostras de 300 mL de solo foram homogeneizadas com 2 L de água, para liberação dos nematoides para a suspensão. Após esperou-se cerca de 2 minutos para que os resíduos mais grossos decantassem e filtrou-se a suspensão em peneira de 60

*mesh* acoplada a uma de 400 *mesh* (0,037 mm de abertura). Então, o material retido na peneira de 400 *mesh* foi recolhido com auxílio de um frasco de água destilada, para tubos de centrifuga de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 1591 *xg* por cinco minutos, em centrífuga da marca Novatecnica. Após, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se nos tubos uma solução de 45 % de sacarose, com uso de pipeta para ressuspensão dos nematoides.

Os tubos foram centrifugados novamente por dois minutos a 129 *xg*. O tempo nessa etapa é de extrema importância para que os nematoides não se deformem devido à solução de sacarose ser mais densa que o fluido pseudocelomático dos nematoides. A seguir recolheu-se o sobrenadante contendo os nematoides, que são menos densos que a sacarose, e filtrou-se em peneira de 400 *mesh*, removendo-se toda a sacarose, através de lavagem com água destilada. Então, com auxílio de um frasco de água destilada, os nematoides foram recolhidos em um volume de 20 mL. A seguir foram feitas as contagens em microscópio estereoscópico com ampliação de 32 vezes. Amostras de 2 mL foram colocadas em placas redondas dispostas em círculos, conforme ilustrado na Figura 10.

**Figura 10-** Placa utilizada na contagem de nematoides



### 3.8.7 Análise das plantas de tomateiros

A altura dos tomateiros foram medidas com uma trena e o diâmetro do caule a uma distância de 15 cm do colo da planta, foi medido com auxílio de um paquímetro. Para as demais determinações, as plantas foram cortadas na altura do colo e foram pesadas em balança analítica, sem os frutos, para determinação da massa fresca da planta. Já as raízes foram bem lavadas para remoção do solo, tomando cuidado

para não danificar as mesmas e foram então colocadas em papel toalha para retirar a umidade, só então foram pesadas e medidas com auxílio de uma régua.

### **3.8.8 Quantificação de galhas e massa de ovos de nematoides nas raízes de tomateiro**

Após pesagem e medição das raízes, foram feitas análises de índice de galhas (IG) e índice de massa de ovos (IMO). Para melhor visualização e contagem de massa de ovos, as raízes foram coradas com Floxina B, na concentração de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de água, durante 20 minutos. Após, foram lavadas em água corrente e contadas, de acordo com a metodologia de Taylor e Sasser (1978). Já o IG foi realizado a partir da contagem das galhas nas raízes não coradas. O IG e o IMO foram avaliados de acordo com a escala de notas de Taylor e Sasser (1978), onde a nota 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massa de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massa de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massa de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massa de ovos e 5 = mais de 100 galhas ou massa de ovos.

### **3.8.9 Análise estatística**

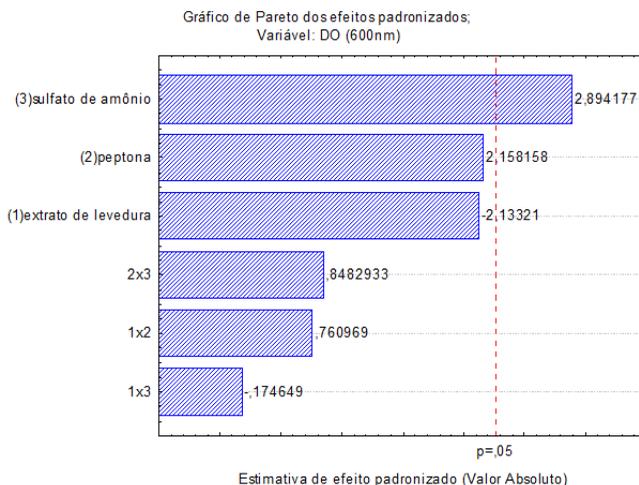
A análise de variância (ANOVA) e comparação de médias foi obtida pelo teste de Tukey a 5 %, utilizando o programa Statistica para Windows, versão 7.0 da Statsoft.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ADEQUAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA CULTIVO SUBMERSO

Na Figura 11 são apresentados os resultados do planejamento fatorial que objetivou racionalizar a utilização dos três componentes com maior impacto no custo do meio de cultura. Como pode ser observado no gráfico de Pareto, apenas o sulfato de amônio apresentou efeito positivo e significativo (ao nível de 5 % de probabilidade) na produção de biomassa. Embora não tenha sido significativo o efeito de quantidades maiores de peptona foi positivo para o crescimento, enquanto que o do extrato de levedura apresentou efeito negativo no crescimento, embora não significativo. Um efeito negativo do aumento da concentração de extrato de levedura no crescimento de fungos ectomicorrízicos também foi observado por Rossi e Oliveira (2011).

**Figura 11-** Gráfico de Pareto para análise de efeito de variáveis em relação ao crescimento celular (densidade óptica a 600nm) em função da variação de componentes do meio de cultura



O extrato de levedura, além de conter nutrientes importantes para o crescimento microbiano, também contém metabólitos produzidos

pelas leveduras, e podem a partir de certas concentrações exercerem um efeito deletério ao crescimento, principalmente se considerar que outra fonte de nitrogênio esteja disponível no meio de cultura, como é o caso do meio utilizado neste trabalho.

Assim, fica evidente que a peptona ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) e o extrato de levedura ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) podem ser utilizados nos níveis de concentração menores, podendo-se reduzir significativamente o custo do meio. Portanto, para a formulação do meio de cultura utilizado em biorreator foi possível diminuir pela metade a quantidade de peptona e ainda diminuir cerca de cinco vezes a quantidade de extrato de levedura. Esses dois componentes representam a maior parcela de custo de meio, sendo interessante já que os meios de cultura representam grande parte dos custos para o desenvolvimento de produtos a base de microrganismos.

#### 4.2 CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS AERADOS E EM BIORREATOR AIRLIFT

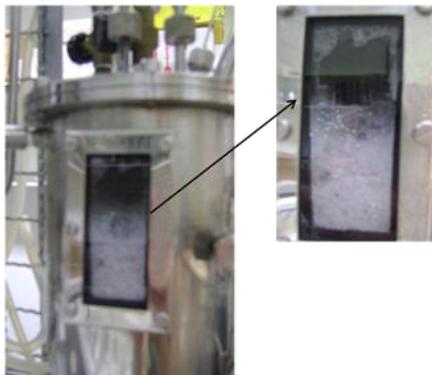
Frascos aerados, embora não sejam sistemas adequados para atenderem as necessidades de oxigênio em cultivos aeróbios, permitem a realização de estudos preliminares de cultivo, ajudando na interpretação quando sua cinética é comparada com a cinética de crescimento obtida em biorreatores projetados para alcançar maiores coeficientes de transferência de massa. A Figura 12 mostra um cultivo de *B. subtilis* nesse sistema e com temperatura mantida a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 12-** Cultivo de *Bacillus subtilis* em frascos com aeração e temperatura de  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  mantida com banho Maria



O primeiro resultado esteve relacionado com uma das primeiras dificuldades que podem ser encontradas em cultivos bacterianos aerados, que é a excessiva formação de espuma. A tensão superficial nas bolhas atraem as células e se não houver controle da formação da espuma, as células podem ser levadas junto com a espuma para a saída de gases. Além dos problemas de contaminação e entupimento dos filtros de saída, a perda de biomassa é o mais importante. Observou-se uma dificuldade no controle da espuma mesmo com a utilização de grande quantidade de antiespumante. Assim, também se esperou problemas com a espuma, e até mais grave, para o cultivo realizado em biorreator. De fato isso ocorreu, como pode ser observado numa imagem obtida através de um visor localizado no topo do biorreator *airlift* (Figura 13).

**Figura 13-** Imagem da parte superior do biorreator *airlift*, na área de separação de gases, onde se observa a intensa formação de espuma durante o cultivo de *Bacillus subtilis*



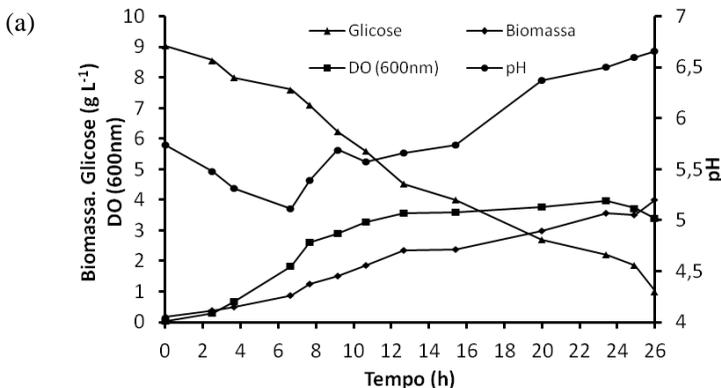
A formação de espuma em processos biotecnológicos envolvendo bactérias são muito relatados e, às vezes, podem ser convenientes ao processo. Yeh, Wei e Chang (2006) estudaram a produção de surfactina em um biorreator mecanicamente agitado, no qual foi acoplado um recipiente coletor de espuma e um recirculador de células, nesse caso a espuma formada foi utilizada para a separação de surfactina. Com esse sistema conseguiram manter mais de 90 % do meio de cultura no biorreator no final do processo, obtendo assim, bons rendimentos e um elevado consumo da fonte de carbono. Esse estudo apresenta grande importância, pois para o controle de espuma em cultivos aerados

normalmente utiliza-se antiespumantes, que além do elevado custo, ainda podem ser prejudiciais para o crescimento celular (KIERAN, MACLOUGHLIN e MALNE, 1997).

No caso deste trabalho, a produção excessiva de espuma torna-se um problema que necessita de atenção, pois a biomassa é o material desejado e é importante que permaneça no sistema durante o cultivo, sendo assim, foi utilizado de 30 a 40 mL do antiespumante polipropileno glicol.

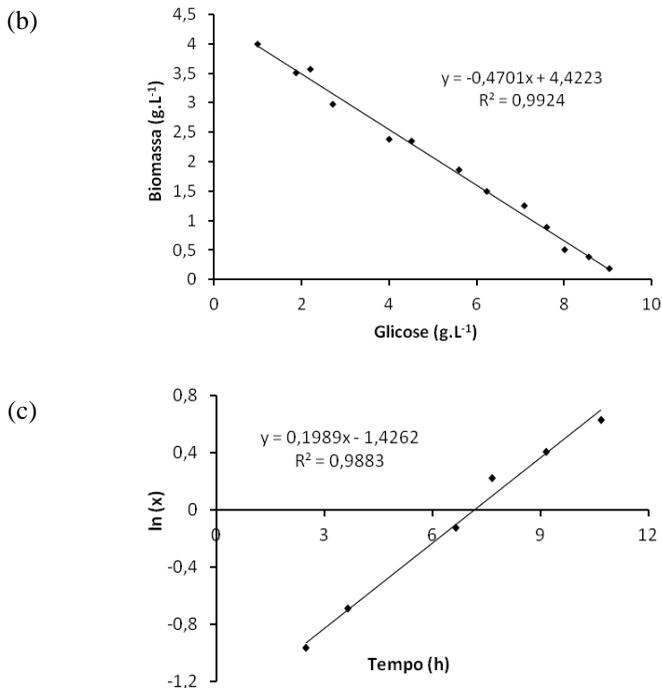
As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados do crescimento celular em função do tempo para cultivo realizado em frascos aerados. O crescimento celular está apresentado através da densidade óptica (que pode ser relacionada com a concentração de biomassa utilizando uma correlação como daquela apresentada na Figura 3 do Apêndice) e também pela massa seca de células. A diferença entre esses dois cultivos está relacionado basicamente pelo valor inicial do pH do meio de cultura.

**Figura 14-** Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* ao longo do tempo de cultivo, em frascos aerados (a), determinação da conversão de glicose em biomassa (b) e determinação da velocidade específica máxima de crescimento (c), com pH inicial do meio de cultura, antes da inoculação, em 6,0

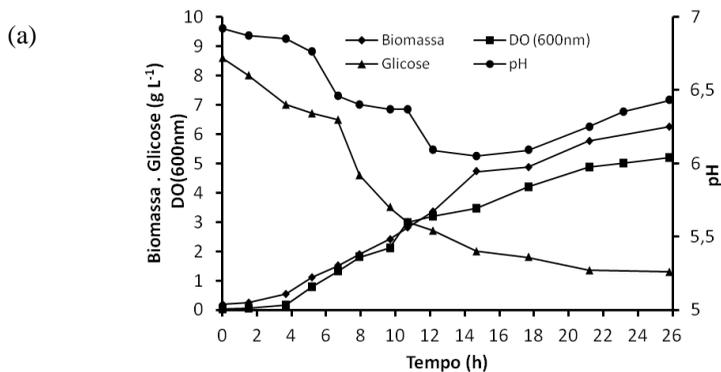


continua...

... continuação da Figura 14



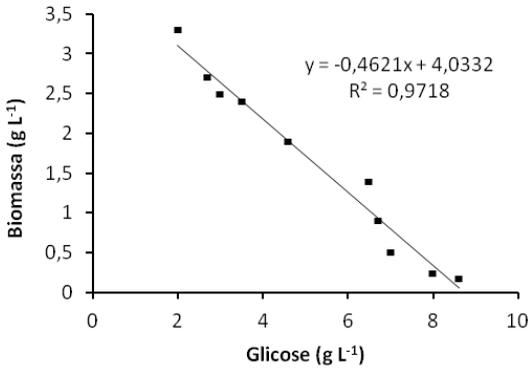
**Figura 15-** Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* ao longo do tempo cultivo, em frascos aerados (a), determinação da conversão de glicose em biomassa (b) e determinação da velocidade específica máxima de crescimento (c), com pH inicial do meio de cultura, antes da inoculação, em 7,0



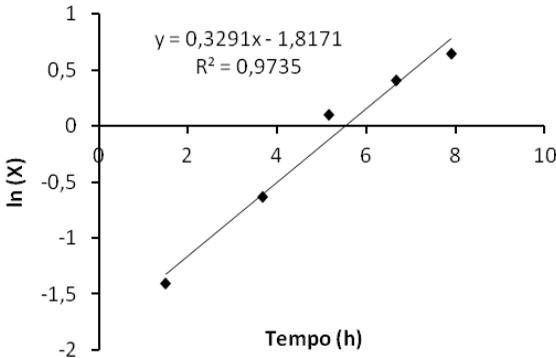
continua...

... continuação da Figura 15

(b)



(c)



Pode-se observar nas Figuras 14 e 15 que os dois cultivos foram de modo geral parecidos. O substrato foi consumido em pouco mais de 24 horas, convertendo-se ( $Y_{X/S}$ ) cerca de 46 % em células. Esse valor é muito bom e característico de cultivos bacterianos. A conversão de substrato em biomassa, principalmetne por se tratar de um fator estequiométrico, foi semelhante aos resultados de Matar et al. (2009) e Lima Júnior (2012) que estudaram diferentes meios para produção de surfactina e biomassa de *B. subtilis* e encontraram conversão de 45 % e 46%, respectivamente.

Observa-se que a partir de 11 h (Figura 14) e 8 h (Figura 15) o crescimento esteve nitidamente limitado, apresentando velocidades de crescimento decrescentes. Embora o pH possa estar relacionado com essa limitação, já que para o cultivo com pH inicial de 7,0, se obteve uma velocidade específica de crescimento 1/3 superior que a do cultivo

realizado em pH 6,0. Pode-se esperar também que a limitação esteja relacionada com o oxigênio, já que, coincidentemente, a limitação é pronunciada a partir da concentração celular de  $2 \text{ g L}^{-1}$  para ambos os cultivos, sinalizando para a incapacidade do sistema em atender a necessidade de oxigênio para concentrações maiores de células. Carvalho et al. (2010) estudaram um isolado de *B. subtilis* em cultivo aerado e em cultivo com limitação de oxigênio. Para as condições limitantes de oxigênio no meio, obteve-se um tempo muito maior para o crescimento, cerca de 50 horas, sendo que em cultivo aerado o crescimento ocorreu em cerca de 14 horas.

O comportamento do pH de diminuir e depois passar a subir é típico de meios de cultura contendo açúcares e proteínas. Enquanto o açúcar está em maior proporção, prevalece a produção de metabólitos ácidos. Quando o açúcar diminui as células passam a utilizar maior quantidade de proteínas e o pH pode aumentar de valor em função da liberação de compostos básicos (MARZZOCO e TORRES, 1999; WEI et al., 2003).

Yeh, Wei e Chang (2006) também observaram que com o crescimento celular e produção de surfactina, o pH tendeu a diminuir acentuadamente no início do cultivo, em compensação no final do cultivo, o pH aumentou gradualmente, essa queda pode ser devido a formação de metabólitos ácidos durante a fermentação (neste estudo foi utilizado meio mineral, com adição de glicose). O mesmo comportamento também foi observado por Noah et al. (2002), em fermentação utilizando *Bacillus subtilis* com efluente de batata em biorreator *airlift*, sem controle de pH.

Em estudo realizado por Esmeraldo (2010) foi obtido uma  $\mu_{\max}$  de  $0,19 \text{ h}^{-1}$  (3,6 h para duplicar) em cultivo com a mesma bactéria utilizando agitador orbital. Neste estudo, com melhor fornecimento de ar, na fase de maior velocidade de crescimento, as bactérias conseguiram duplicar-se a cada duas horas. As diferenças entre as curvas de crescimento obtidas pela densidade óptica e massa de células também pode estar indicando a condição de limitação. Em condição de limitação pode ocorrer a esporulação e, embora a biomassa possa estar aumentando, sua medida através da densidade óptica pode sofrer interferências, já que o endósporo pode apresentar outro índice de absorvância devido a sua particular composição. Além de terem sido cultivos com desempenho bem razoáveis, pôde-se prever algumas situações que poderiam acontecer em cultivos em biorreator, além de

uma indicação de que valores de pH mais elevados poderiam permitir maiores rendimentos.

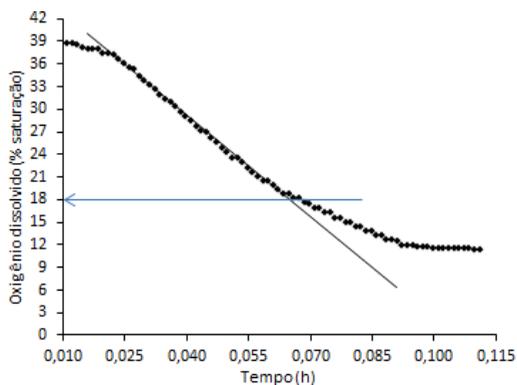
Junto com a esporulação que ocorre em condições de limitação, a exemplo da aproximação da fase estacionária de crescimento, pode ocorrer a liberação de lipopeptídeos formados por *B. subtilis* para o meio, representando um componente importante apontado em alguns estudos por apresentar função de biocontrole em plantas (KILIAN et al., 2000; ALMAGHARI, MASSOUD e ABDELMONEIM, 2013). Em estudo Oh, Kim e Park (2002), observaram que a produção da enzima subtilisina, só começou no final da fase exponencial de crescimento celular.

#### 4.3 CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR *AIRLIFT*

A preferência de utilizar um biorreator *airlift* para o estudo de produção de biomassa de *Bacillus subtilis* para utilização como agente de biocontrole é justificado, pelo fato que deverá ser um produto de valor agregado baixo, pois sua utilização em culturas agrícolas deverá precisar de volumes relativamente grandes e a um baixo custo para ser viável. Nesse sentido, os biorreatores *airlift* apresentam grandes vantagens em relação aos tradicionais tanques agitados, pois podem ser fabricados a um custo inferior e com tecnologias mais simples. Além disso, biorreatores desse tipo também podem operar em modo contínuo para atender a necessidade de altas produtividades.

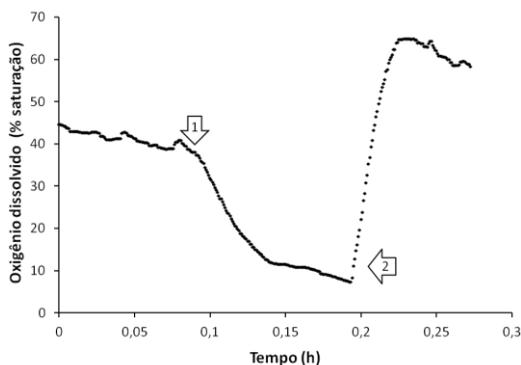
Logo no primeiro cultivo em biorreator procurou-se determinar a concentração crítica de oxigênio para o cultivo de *B. subtilis*. Como a biomassa é considerada constante durante o curto tempo de realização do ensaio, a velocidade de respiração também permanece constante, enquanto houver oxigênio suficiente. Através de um ensaio dinâmico obteve-se os dados apresentados na Figura 16 onde foi possível determinar o valor de 18 % da saturação como o valor crítico para o oxigênio. Esse valor é relativamente alto se considerarmos que os microrganismos são bactérias, aonde em muitos casos esse valor chega a ser da ordem de 10 % (SCHMIDELL, 2001). Uma razão pode estar relacionada à quantidade elevada de antiespumante que foi necessária para o controle da formação de espuma. O antiespumante (no caso polipropileno glicol) deve agir como uma barreira adicional ao transporte do oxigênio através da membrana plasmática das células, necessitando de uma concentração maior dissolvida no meio para aumentar o gradiente e atender a demanda da cadeia respiratória.

**Figura 16-** Ensaio dinâmico para determinação da concentração crítica de oxigênio, realizado na 6ª hora do cultivo de *Bacillus subtilis* em biorreator airlift



O efeito da limitação do oxigênio dissolvido, representado pela Figura 17 que representa um momento onde o fornecimento de ar foi reduzido de maneira a deixar que a concentração de oxigênio dissolvido ficasse abaixo da concentração crítica. Observa-se nesta figura, que quando o fornecimento de oxigênio é reestabelecido, a concentração fica acima do valor antes da interrupção da aeração (era em torno de 40 % da saturação e chegou a 60 %), indicando claramente um efeito negativo no metabolismo relacionado ao crescimento, onde as velocidades são afetadas.

**Figura 17-** Variação da concentração de oxigênio dissolvido, realizado na 6ª hora do cultivo de *Bacillus subtilis* em biorreator airlift. O ponto 1 indica a interrupção da aeração e o ponto 2 indica a retomada

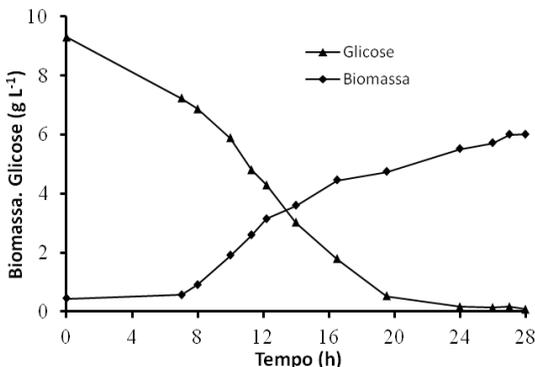


Depois de algum tempo, os microrganismos retomam a condição normal e as concentrações de oxigênio voltam a cair indicando o crescimento celular. Dependendo do tempo que as células permanecerem sem oxigênio, pode ocorrer um efeito drástico, como a morte celular, ou no caso dessas bactérias, a esporulação.

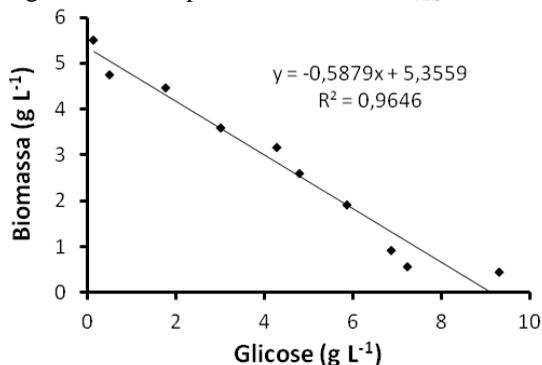
Com essa informação ( $C_{crit}$ ), o sistema de controle eletrônico (BRF.vi) do biorreator foi programado para aumentar a vazão de ar (até o limite de 1,2 vvm), necessária para manter a concentração de oxigênio dissolvido acima de 18 % da saturação, equivalendo a cerca de  $1,35 \text{ mg}_{\text{O}_2} \text{ L}^{-1}$ , se considerar que a solubilidade do meio seja igual a determinada por Vendruscolo et al. (2012).

Na Figura 18 está apresentada uma cinética de crescimento de *B. subtilis* em biorreator *airlift* com circulação de líquido externa (cultivo A). Em 28 horas a fonte de carbono foi totalmente consumida, indicando que o meio de cultura estava balanceado adequadamente. Diferentemente do cultivo em frascos, no biorreator foi possível manter o pH em 7,0, além de se ter um melhor controle da temperatura. Esta pode ser a razão da maior conversão de glicose em biomassa em relação aos cultivos em frascos (Figura 19), visto que a velocidade específica máxima de crescimento (Figura 20) foi igual àquela alcançada em cultivo em frascos (Figura 15-c). Além disso, nesse cultivo foi possível obter uma produtividade de  $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

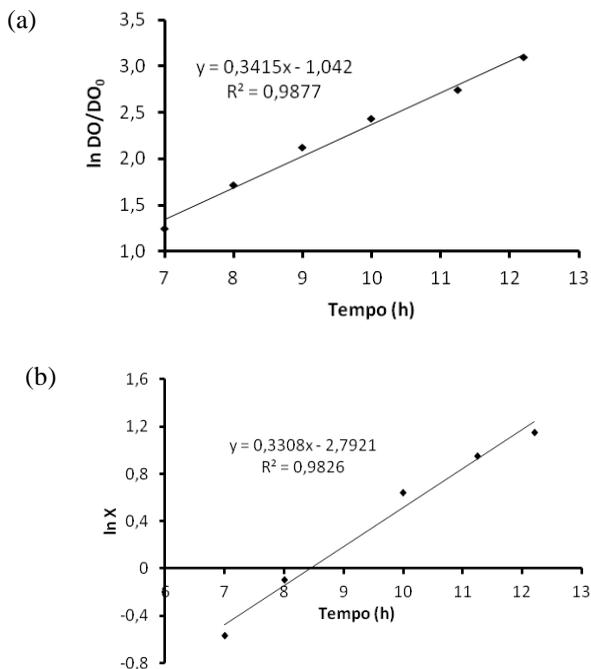
**Figura 18-** Consumo de glicose e crescimento de *B. subtilis* em biorreator *airlift* com meio de cultura mantido em pH 7,0 e temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (cultivo A)



**Figura 19-** Determinação da conversão de glicose em biomassa. O coeficiente angular da reta representa o valor de  $Y_{X/S}$



**Figura 20-** Determinação da velocidade específica máxima de crescimento. O coeficiente angular representa o valor de  $\mu_{max}$ . A velocidade foi determinada através da densidade óptica (a) e massa seca das células (b)



A velocidade específica máxima ( $0,33 \text{ h}^{-1}$ ) que permite um tempo de duplicação em torno de duas horas só foi possível de ser mantida até aproximadamente nove horas do cultivo, após esse tempo passou a desacelerar, conforme mostra a curva de crescimento da Figura 18. A razão está bem clara na Figura 21, onde está representada a variação da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Após cerca de nove horas de cultivo, o sistema de controle já havia imposto toda sua capacidade de vazão de ar ( $1,2 \text{ vvm}$ ) e, mesmo assim, já não conseguia atender a demanda pelas bactérias, permanecendo nessa situação limitante por até a 20ª hora, quando também já ocorria limitação pela glicose. Entre a 20ª e 22ª hora os registros apontam para uma diminuição na demanda pelo oxigênio que é difícil de explicar, a não ser que represente um evento isolado de esporulação.

Entretanto, o fato mais importante nessa análise, aponta que em um período de apenas 2 horas (entre 6,5 e 8,5 horas) o sistema de transferência de oxigênio acionou sua capacidade máxima (aumentou seis vezes) e a partir de então, não foi possível mais manter o OD acima da concentração crítica. Embora a correlação entre o  $k_{La}$  e a velocidade do ar aumente numa razão decrescente (ROSSI, 2006), ainda assim, percebe-se um colapso na transferência do oxigênio. A adição de antiespumante e uma provável alteração na viscosidade do meio, fez com que ocorresse uma maior coalescência das bolhas de ar, e uma conseqüente maior velocidade de subida das bolhas e, principalmente, menor área para transferência de massa gás-líquido.

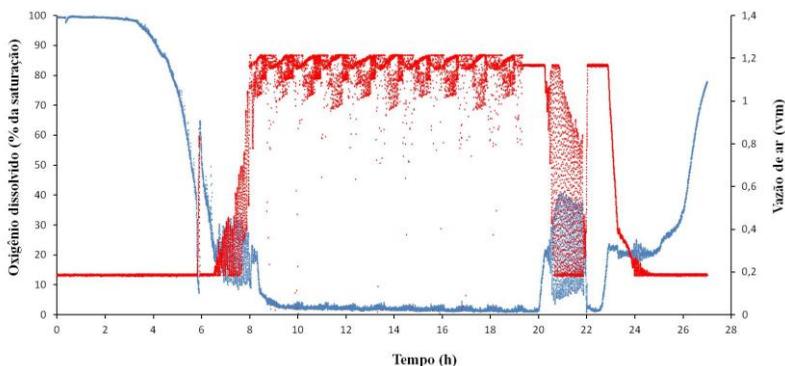
Finalmente, aponta-se ainda na Figura 21 o momento em que foi realizado o ensaio dinâmico para determinação da concentração crítica de oxigênio, próximo a 6ª hora do cultivo. Também é importante esclarecer que o ruído que pode ser observado na vazão de ar (pontos vermelhos) é devido a falha no aterramento do sensor de oxigênio devido a entrada de umidade no circuito elétrico.

Para ilustrar o desempenho de *B. subtilis*, Matar et al. (2009) trabalhando em biorreator com agitação mecânica obtiveram velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) igual a  $0,30 \text{ h}^{-1}$ .

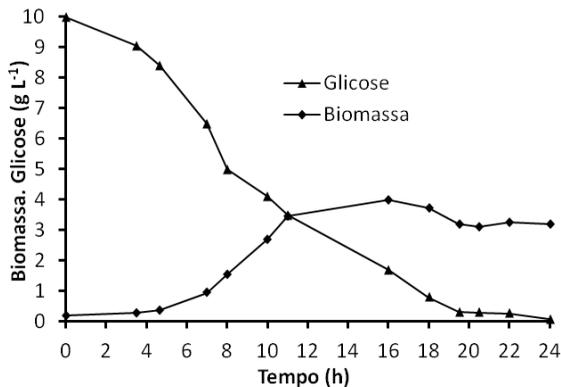
Tanto para confirmar, quanto para observar, um possível desempenho diferente do cultivo A, foi realizado o cultivo B, utilizando biorreator *airlift*. Na Figura 22 é possível observar a variação de biomassa e de glicose em função do tempo de cultivo, representando um comportamento semelhante ao cultivo A, tanto em conversão de substrato em biomassa (Figura 23) quanto na velocidade específica máxima de crescimento (Figura 24).

Entretanto, observa-se na Figura 22, que a produção de biomassa foi de cerca de  $4 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto que no cultivo A (Figura 18) obteve-se  $6 \text{ g L}^{-1}$ . Nesse cultivo, não houve um controle efetivo da espuma e 1/3 da biomassa foi arrastada para fora do biorreator. Isso justifica a baixa correlação para o  $Y_{X/S}$  (Figura 23) e o menor tempo em que o cultivo permaneceu abaixo da concentração crítica de oxigênio (Figura 25), já que a concentração de biomassa chegou até a diminuir a partir da 16ª hora de cultivo, conforme pode ser visualizado na Figura 22.

**Figura 21-**Variação do oxigênio dissolvido (pontos em azul) e vazão específica de ar (pontos em vermelho com ruídos), durante o cultivo de *Bacillus subtilis* em biorreator *airlift* com meio de cultura mantido em pH 7,0 e temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (cultivo A)

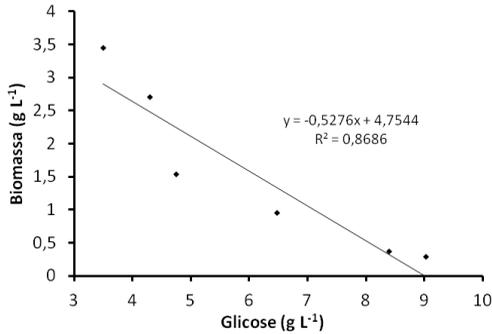


**Figura 22-** Consumo de glicose e crescimento de *Bacillus subtilis* em biorreator *airlift* com meio de cultura mantido em pH 7,0 e temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (cultivo B)

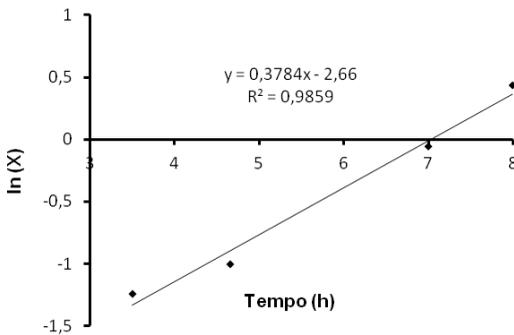


A formação excessiva de espuma em cultivos aerados tem sido um dos problemas bastante relatados (DAVIS, LYNCH e VARLEY, 2001; YEH, WEI e CHANG, 2006; SILVA, 2010). Nesse cultivo também havia sido feita manutenção criteriosa do eletrodo e não se verificou o ruído observado na Figura 21.

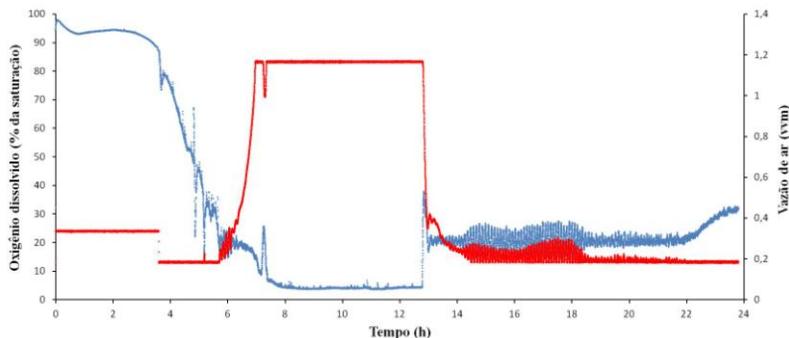
**Figura 23-** Determinação da conversão de glicose em biomassa. O coeficiente angular da reta representa o valor de  $Y_{X/S}$



**Figura 24-** Determinação da velocidade específica máxima de crescimento. O coeficiente angular representa o valor de  $\mu_{\max}$



**Figura 25**-Variação do oxigênio dissolvido (pontos em azul) e vazão específica de ar (pontos em vermelho) durante o cultivo de *Bacillus subtilis* em biorreator *airlift* com meio de cultura mantido em pH 7,0 e temperatura de 30 °C (cultivo B)

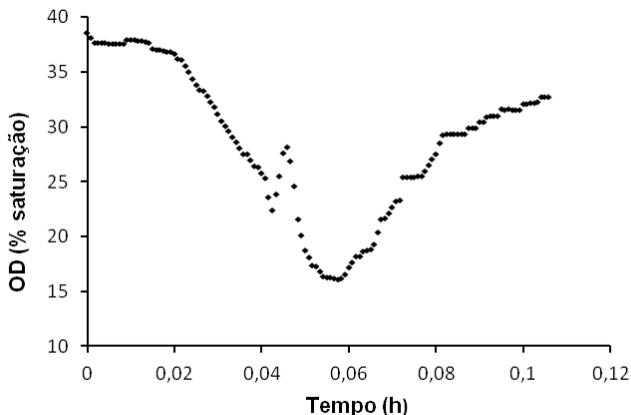


#### 4.4 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO PARA CULTIVOS DE *Bacillus subtilis* EM BIORREATOR AIRLIFT

A transferência de oxigênio foi estudada durante os cultivos de *B. subtilis* para estimar os parâmetros respiratórios dessa bactéria nas condições de cultivo impostas neste trabalho. Nos cultivos apresentados pôde-se observar que o oxigênio dissolvido decai rapidamente nas primeiras 8 horas de cultivo, o que indica a elevada demanda de oxigênio pelas bactérias, superando a capacidade de transferência de oxigênio ao meio pelo biorreator.

Informações sobre velocidade de respiração das células ( $Q_{O_2}$ ) e da capacidade do sistema em transferir oxigênio para o meio de cultura ( $K_La$ ) são essenciais para o dimensionamento do sistema visando a máxima produtividade. Através do método proposto por Humphrey e Taguchi (1966) e o balanço de massa para o oxigênio no líquido, pôde-se determinar essas grandezas. Na Figura 26, visualiza-se uma curva gerada durante método dinâmico, realizado na 5ª hora do cultivo B.

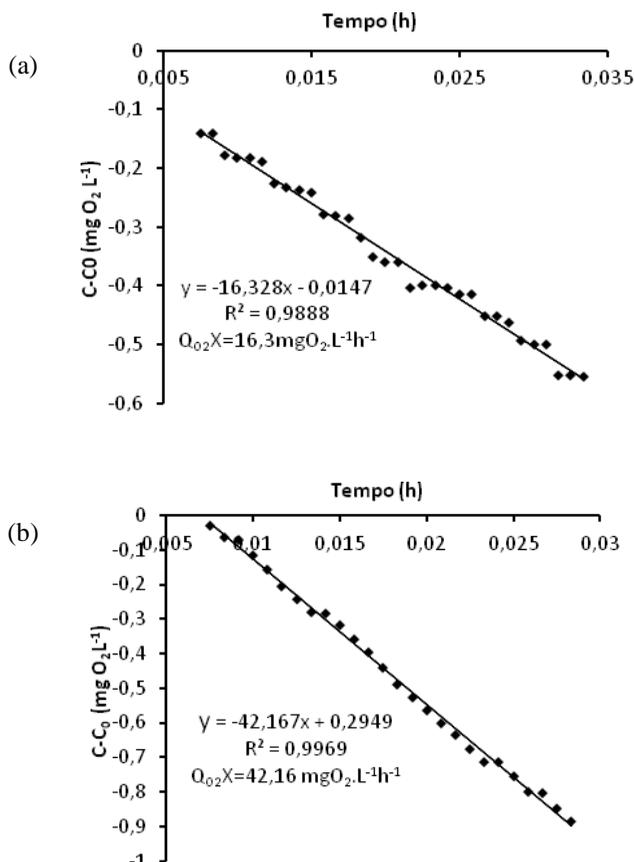
**Figura 26**-Variação da concentração de oxigênio dissolvido durante um ensaio dinâmico para determinação da velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ) e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ), realizado na 5<sup>a</sup> hora de cultivo de *B. subtilis* em biorreator *airlift*. A vazão de ar foi de 0,2 vvm no momento do ensaio (cultivo B)



A velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ) foi calculada através da interrupção da aeração em determinado instante do cultivo, conforme pode ser visualizado pelo declínio da concentração do oxigênio no meio, sendo que essa queda durou poucos minutos. A partir desses dados plotou-se o gráfico de  $(C-C_0)=f(t)$  (Figura 27), onde o coeficiente angular representa o consumo global de oxigênio ( $-Q_{O_2} \cdot X$ ). É importante ressaltar que a concentração de oxigênio dissolvido no meio não deve alcançar valores inferiores à concentração crítica, no período onde ocorre o decaimento da curva, para que a respiração microbiana não seja afetada.

No tempo de 3,5 h obteve-se um velocidade específica de respiração de cerca de  $50 \text{ mg}_{O_2} \text{ g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $X=0,29 \text{ g L}^{-1}$ ), já para o tempo de 5 h a velocidade específica de respiração foi o dobro, cerca de  $100 \text{ mg}_{O_2} \text{ g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (nesse momento  $X=0,42 \text{ g L}^{-1}$ ). A velocidade menor indica que naquele momento a fase exponencial ainda não estava estabelecida, provavelmente em função de endósporos do inóculo estarem ainda em fase de germinação e, como indica a progressiva queda na concentração de oxigênio no meio revelada pela Figura 25, logo em seguida inicia a fase exponencial de crescimento.

**Figura 27-** Determinação do consumo global de oxigênio ( $Q_{O_2}X$ ) na 3,5ª (a) e 5ª (b) hora de cultivo, para uma vazão de 0,2 vvm



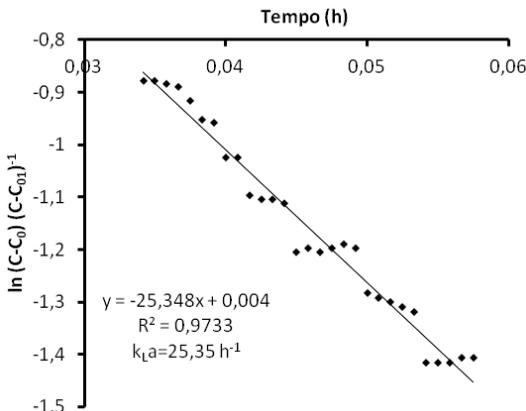
A partir dessa informação, pode-se prever, por exemplo, que com uma concentração de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de células, o meio saturado com oxigênio dissolvido teria todo o oxigênio consumido em menos de 60 segundos. Pequenas paradas na aeração podem causar perdas consideráveis de produtividade e, em muitos casos, provocar a morte de células. Isso demonstra a importância de se dimensionar adequadamente os sistemas de transferência de oxigênio para os cultivos aeróbios. Entretanto, essa situação de anoxia é diferente daquela apresentada nos dois cultivos anteriores, pois, embora durante a maior parte do tempo a concentração

de oxigênio estivesse perto de zero, o oxigênio foi continuamente fornecido, porém em quantidades insuficientes para o máximo desempenho.

Silva (2010) utilizou diferentes velocidades de agitação em reator mecanicamente agitado e também observou a maior demanda de oxigênio nas primeiras horas de cultivo, encontrando valores semelhantes ao deste estudo, em determinadas velocidades de agitação. Como quando o autor utilizou 1000 rpm e no tempo de cultivo de 6 horas, encontrou uma velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ) de  $3,4 \text{ mmol g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , semelhante ao encontrado neste estudo para as 5 horas de cultivo ( $3,6 \text{ mmol g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

A Figura 28 apresenta a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). O valor de  $25 \text{ h}^{-1}$  está coerente com os valores obtidos por Rossi (2006), durante a caracterização hidrodinâmica do biorreator. Já os valores para vazões maiores não foram possíveis de determinar, em função das condições críticas estabelecidas. Embora, os valores possam atingir  $80 \text{ h}^{-1}$  em condições de fluido Newtoniano (ROSSI, 2006), pelas características observadas de coalescência das bolhas de ar, as condições de transferência podem ter sido extremamente prejudicadas. Vale lembrar que em sistemas pneumáticos, como é o caso de *airlifts*, toda a capacidade de transferência está relacionada diretamente ao *holdup* do gás (volume de gás na dispersão gás-fluido), enquanto em sistemas agitados, também está relacionado com a potência aplicada nas pás do agitador.

**Figura 28-** Determinação do coeficiente volumétrico de oxigênio ( $k_L a$ ) na 5ª hora de cultivo, para uma vazão de 0,2 vvm



Alguns exemplos valores de  $k_L a$  para *Bacillus subtilis* são obtidos por Yeh, Wei e Chang (2006), os quais variaram de 12,96 a 50,04  $h^{-1}$ , em biorreator mecanicamente agitado, utilizando agitação de 200 a 350 rpm e vvm de 0,5 a 1,5. Sendo que a 300 rpm e 1,5 vvm, os autores obtiveram a maior concentração de surfactina e um dos maiores  $k_L a$  47,5  $h^{-1}$ . Já o  $k_L a$  50,0  $h^{-1}$  foi a 350 rpm e 1,5 vvm, porém com este  $k_L a$ , foi obtida uma concentração muito menor de produto, que pode ter sido decorrente de prejuízos causados ao microrganismo em função da alta agitação do meio.

#### 4.5 CULTIVO DO TOMATEIRO

Após 40 dias da sementeira, duas mudas de tomateiro (Figura 29), foram transplantadas para cada vaso contendo 5 kg de solo (Figura 30).

**Figura 29-** Mudanças de tomateiros na sementeira após 40 dias da sementeira



**Figura 30-** Mudanças de tomateiros nos vasos após transplante e inoculação de *Bacillus subtilis*



Nos cultivos para preparo do inoculante foram obtidas concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os produtos disponíveis no mercado internacional, para uso em controle biológico, formulados a base de *Bacillus subtilis*, apresentam concentrações de células que variavam de  $10^7$  a  $10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>, podendo ser encontrados na forma líquida ou ainda de pó molhável. Quando em forma líquida, pode ser aplicado através de pulverização direta na planta, por gotejamento no solo ou diretamente nas sementes. Já para os pós, podem ser aplicados nos solos ou em sementes (BETTIOL et al., 2012).

O volume de inoculante aplicado nos tratamentos foram definidos pela comparação de volumes utilizados para o controle biológico utilizando a mesma espécie deste trabalho e também outras bactérias, as quais encontram-se disponíveis em alguns países, como descrito por Bettiol et al. (2012). Depois de algumas semanas, devido a inadequação do ambiente e da sensibilidade do tomateiro, as plantas começaram a apresentar sintomas de doenças fúngicas, mais especificamente Oídio. Para que essa doença não prejudicasse o experimento aplicou-se uma solução de enxofre dissolvido em água, com uma concentração de (2,5 g L<sup>-1</sup>). A solução foi aplicada nas folhas dos tomateiros com auxílio de um borrifador, tomando o cuidado para não cair no solo e interferir nos tratamentos.

O Oídio é um dos problemas mais importantes em cultivos realizados em estufa, sendo que pode ocorrer até mesmo em algumas culturas de tomate a céu aberto. Essa doença pode ser causada por duas espécies de fungos amplamente distribuídas no Brasil: o *Oidium lycopersici* e o *Oidiopsis sicula*. O primeiro apresenta como característica a presença de estruturas fúngicas na superfície das folhas, com aparência de um pó branco e fino na parte superior. Já o segundo fungo é restrito a parte inferior das folhas, portanto, é menos observado nas plantações quando comparado com o anterior (LOPES, REIS e BOITEUX, 2005).

Além disso, as folhas das plantas, após certo tempo, começaram a apresentar manchas e colorações diferenciadas, que pode ser pela falta de certos nutrientes. Como no caso de algumas folhas, que apresentaram uma coloração roxa, que é observada normalmente em plantas com deficiência de fósforo. A falta desse nutriente, ainda pode ocasionar uma diminuição da floração, assim como queda dos frutos. Também surgiram algumas folhas amarelas, que de acordo com a literatura pode estar relacionada à deficiência de potássio, causando um amarelecimento e secamento das folhas mais velhas, em estágios mais avançados de deficiência. A clorose e necrose acabam atacando as

folhas novas também (CARVALHO, BASTOS e ALVARENGA, 2004).

Devido a esses sintomas quando necessário foram aplicadas as soluções nutritivas, porém mesmo assim, as plantas continuaram apresentando sintomas de deficiência. De acordo com a Tabela 6 (item 3.8.2), ainda pode-se perceber que solo utilizado apresenta altas concentrações fósforo, potássio, cálcio e magnésio, podendo ser considerado fértil. Porém, o solo também apresentava alta quantidade de sódio e conseqüentemente alta condutividade elétrica ( $74,5 \text{ mS m}^{-1}$ ) para o extrato do solo. Esse valor está próximo ao encontrado em solos salinos, como em estudo de Li et al. (2008), cujos valores citados foram de  $86 \text{ mS m}^{-1}$ , em solos localizados próximos a costeiras salinas, na China. Entretanto, o valor encontrado para este solo, foi superior ao encontrado por Valente et al. (2012), que obteve valores são em torno 1,8 a  $1,22 \text{ mS m}^{-1}$ , em solos não salinos, coletados no estado de Minas Gerais.

De acordo Medeiros et al. (2010), quando o solo apresenta altas concentrações salinas, pode ocorrer prejuízos às plantas devido a competição entre os sais e os componentes disponíveis para absorção. Além disso, as plantas de tomates são consideradas moderadamente tolerantes a salinidade no solo. Esse mesmo autor, obteve o valor de  $127,8 \text{ mS m}^{-1}$ , para a salinidade limiar em tomates. Essas concentrações já demonstraram prejuízos às plantas, quanto à produtividade e número de frutos. Também foi observado que com o aumento de uma unidade na salinidade do solo, a partir deste limiar, a produtividade diminuiu em torno de 15 %.

Portanto, mesmo que o solo utilizado nesse estudo não tenha alcançado o limiar de salinidade mencionada acima, a concentração de sais foi superior a solos considerados não salinos, podendo ter prejudicado as plantas, dificultando assim a absorção dos nutrientes e ocasionando mudanças na coloração das folhas. A alta concentração salina, também pode ter afetado a bactéria.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DOS TOMATEIROS

Após 100 dias na casa de vegetação as plantas foram removidas dos vasos e analisadas. A Figura 31 mostra os tomateiros aos 60 dias do experimento onde se observa que foi necessária a colocação de estacas

para sustentação das plantas. Na Tabela 8 estão apresentados os dados de altura, peso fresco e diâmetro do caule.

**Figura 31-** Tomateiros com 60 dias após transplante das mudas



**Tabela 8-** Altura, massa fresca da parte aérea e diâmetro do caule das plantas de tomateiros. SE (solo esterilizado), Testemunha (solo não inoculado), T1 (0,50 mL do inóculo), T2 (1,5 mL do inóculo), T3 (3,0 mL do inóculo)

<b>Tratamento</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>Massa fresca por vaso (g)</b>	<b>Diâmetro do caule (mm)</b>
SE	110,64±11,05 <sup>A</sup>	355,32± 29,38 <sup>A</sup>	6,18±0,45 <sup>A</sup>
Testemunha	105,96±7,22 <sup>A</sup>	262,87±29,25 <sup>B</sup>	6,39±0,52 <sup>A</sup>
T1	117,93±10,12 <sup>A</sup>	283,19±22,11 <sup>B</sup>	6,53±0,56 <sup>A</sup>
T2	110,71±3,51 <sup>A</sup>	285,55±43,10 <sup>B</sup>	6,28±0,67 <sup>A</sup>
T3	109,21±10,95 <sup>A</sup>	285,26±34,07 <sup>B</sup>	6,43±0,37 <sup>A</sup>

Médias e desvios padrão de sete repetições para cada tratamento. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

Conforme pode ser visualizado na Tabela 8, não houve diferença significativa para a altura das plantas e diâmetro do caule, porém quanto à massa fresca das plantas por vaso, no solo esterilizado, observa-se um aumento na massa das plantas. Esse aumento pode ter sido devido ao solo não ser contaminado com nematoides, pois quando esses estão presentes em grandes quantidades no solo e aderidos às plantas, impedem a absorção de nutrientes pelas plantas. Já as plantas cultivadas

em solo contaminado, mesmo sendo tratadas com o *B. subtilis* não apresentaram efeito significativo para o crescimento dos tomateiros.

Em estudo realizado por Vaz et al. (2001), também não houve diferenças significativas na massa das plantas aplicando o inoculante dessa bactéria. Já Araújo e Carvalho (2009) verificaram que em tratamentos de plantas de tomate com *Carbofuran* e *Bacillus subtilis*, houve um aumento na massa fresca da parte aérea das plantas, porém não encontraram diferença quanto a altura das mesmas.

Almaghari, Massoud e Abdelmoneim (2013) também não encontraram diferenças significativas no crescimento de tomateiros, sendo que juntamente com o *B. subtilis* também foram estudadas outras bactérias promotoras de crescimento. De acordo com Cardozo e Araújo (2011) que utilizaram somente a bactéria *B. subtilis* para avaliar crescimento de cana-de-açúcar, a inoculação influenciou o crescimento destas plantas, porém quando utilizou a mesma bactéria cultivada em meio contendo vinhaça, as plantas não apresentaram diferenças significativas no seu crescimento.

A promoção de crescimento das plantas pode ser induzida pelos fitormônios e outros metabólitos produzidos pelo *B. subtilis*, que é capaz de colonizar a raiz das plantas, podendo ser usada em diferentes culturas. Porém, é aconselhável um tratamento precoce, ou seja, aplicá-lo no início da cultura (KILIAN et al., 2000). Além disso, os mecanismos pelo qual ocorre a promoção de crescimento nas plantas pelas bactérias promotoras de crescimento, como o caso do *B. subtilis*, não estão bem definidos. Entretanto, alguns estudos levam a acreditar que pode ser consequência de uma maior fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, além dos fitormônios e de alguns lipopeptídeos produzidos por essas bactérias, que podem levar a supressão de microrganismos nocivos às plantas (LANNA FILHO, FERRO e PINHO, 2010; ALMAGHARI, MASSOUD e ABDELMONEIM, 2013).

As raízes das plantas também foram analisadas quanto a massa fresca e comprimento. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos.

**Tabela 9-** Comprimento e massa fresca das raízes de tomateiro. SE (solo esterilizado), Testemunha (solo não inoculado), T1 (0,50 mL do inóculo), T2 (1,5 mL do inóculo), T3 (3,0 mL do inóculo)

<b>Tratamento</b>	<b>Comprimento médio por vaso (cm)</b>	<b>Massa fresca por vaso (g)</b>
SE	9,00±2,07 <sup>A</sup>	16,66±3,53 <sup>A</sup>
Testemunha	10,25±1,54 <sup>A</sup>	19,54±4,64 <sup>A</sup>
T1	9,00±1,34 <sup>A</sup>	17,83±2,11 <sup>A</sup>
T2	8,92±3,13 <sup>A</sup>	22,38±7,91 <sup>A</sup>
T3	8,37±1,07 <sup>A</sup>	20,49±6,20 <sup>A</sup>

Médias e desvios padrão de seis repetições pra cada tratamento. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey

Concordando com a análise da parte aérea dos tomateiros, também para a análise das raízes não houve diferença significativa entre os tratamentos, isto pode ser devido a presença de bactérias originais, que anularam o efeito do *Bacillus subtilis* inoculado no solo.

Para realizar a medição das raízes, considerou-se o comprimento médio, porém algumas raízes apresentavam discrepâncias, com algumas partes mais longas que o restante da raiz. Pôde-se observar que em todos os tratamentos com *B. subtilis* a discrepância nos comprimentos das raízes foi mais acentuada, apresentando algumas raízes muito alongadas, quando comparada com as demais. Em estudo realizado por Swain e Ray (2009) pode-se observar o alongamento de 70 a 74 % em raízes de grão de bico inoculadas com *B. subtilis*, em relação as sementes não tratadas.

Mena-Violante e Olalde-Portugal (2007) também obtiveram uma melhora do sistema radicular de plantas de tomate com a inoculação de *B. subtilis*, sendo que o comprimento da raiz chegou a um aumento de 15 % e a massa das raízes aumentaram até 26 %. De acordo com Kilian et al. (2000) essa bactéria é capaz de colonizar as raízes das plantas, formando um filme bacteriano ao redor da raiz, podendo produzir metabólitos fitormonais, capazes de estimular o crescimento das raízes e ajudar no desenvolvimento das plantas.

#### 4.6.1 Quantidade de frutos e flores nas plantas

Quanto aos frutos nas plantas, observou-se que os tratamentos com *B. subtilis* apresentaram frutos maiores, porém em menor quantidade, em comparação com os vasos testemunhas e solo esterilizado. Além disso, os vasos inoculados, principalmente o T3, apresentaram um florescimento mais rápido, resultando em uma formação de frutos mais precoce que os demais e tamanhos maiores também.

Em estudo realizado por Mena-Violante e Olalde-Portugal (2007), observou-se um maior número de frutos de tomates grandes em plantas inoculadas com *B. subtilis* e a qualidade dos frutos também foi melhor em plantas inoculadas, obtendo assim frutos mais resistentes. Isso ainda deve ser melhor estudado, pois pode resultar em aumento da vida de prateleira dos frutos.

#### 4.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NEMATOIDES

A partir da análise de identificação dos nematoides de galhas nos tomateiros, realizada no laboratório da Embrapa-Clima Temperado de Pelotas, foi possível identificar duas espécies de nematoides de galhas: *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*.

A quantificação dos nematoides no solo foi realizada através da extração e contagem dos mesmos. Na Tabela 10 são apresentados os resultados obtidos em cada tratamento.

**Tabela 10-** Número de nematoides no solo após o cultivo de tomateiro. SE (solo esterilizado), Testemunha (solo não inoculado), T1 (0,50 mL do inóculo), T2 (1,5 mL do inóculo), T3 (3,0 mL do inóculo)

Tratamento	Número de nematoides por 100 g de solo
SE	173,33±37,38 <sup>C</sup>
Testemunha	776,48±197,97 <sup>A</sup>
T1	562,95±72,25 <sup>AB</sup>
T2	487,03±139,30 <sup>ABC</sup>
T3	255,18±67,20 <sup>BC</sup>

Médias e desvios padrão de quatro repetições. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey

Como pode ser observado, em relação ao número de nematoides no solo, ocorreu uma diferença significativa entre os tratamentos realizados, sendo que o T3, apresentou a menor contagem de nematoides, cerca de 255 nematoides juvenis por 100 g de solo. Esse valor não diferiu estatisticamente do solo autoclavado, comprovando o efeito de supressão do *Bacillus subtilis* sobre os nematoides de galhas *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*. Além disso, o T1 e T2 não diferiram estatisticamente do experimento testemunha, ou seja, dos vasos sem tratamento biológico e com solo contaminado. Ainda é possível observar que os três tratamentos com inoculação não apresentaram diferenças significativas entre si, ao nível de 5 %, porém o T2 e T3 ficaram mais próximos ao solo estéril e T1, apresentou valores mais próximos do tratamento testemunha.

Como a contagem inicial de nematoides no solo era 456 nematoides por 100 g de solo, somente o T3 conseguiu realmente diminuir a concentração inicial desses fitoparasitas. Os demais tratamentos também ajudaram no controle da multiplicação, pois foi possível observar uma diminuição destes fitoparasitas com o aumento da concentração de *B. subtilis*, porém, mesmo assim, o T1 e T2 apresentaram concentrações maiores que a inicial do solo.

Os resultados obtidos mostraram que o *B. subtilis* reduziu a população de nematoides, inibindo a multiplicação ou até mesmo eliminando estes fitoparasitas. Embora seu modo de ação ainda não esteja bem definido, biologicamente o mecanismo de ação pode se dar por diferentes maneiras dependendo de como os microrganismos benéficos atuam sobre os patogênicos. Estes microrganismos podem agir através da predação direta, parasitismo, competição (nutrientes, espaço e água), aumento na absorção de nutrientes, promoção de crescimento ou ainda antibiose, como no caso da produção de iturina, um dos lipopeptídeos que também podem ser produzidos pelos *B. subtilis*, e podem romper a parede de alguns patógenos (ABAWI e WIDMER, 2000; BETTIOL et al., 2012).

Além desses mecanismos citados, outro fator importante para o controle biológico de nematoides envolve o estímulo de eclosão dos ovos desses fitoparasitas, que pode ter relação com os metabólitos produzidos pelas bactérias no meio de cultivo. Araújo, Silva e Araújo (2002) estudaram a utilização de *Bacillus subtilis* na eclosão de *Heterodera Glycines* (nematoides de cistos), para isso utilizaram o caldo bacteriano e células previamente precipitadas. Através desse estudo observaram que o uso do caldo bacteriano apresentou uma maior influência na eclosão de *Heterodera Glycines* quando comparado com o

uso das células precipitadas. De acordo com Huang et al. (2010) algumas bactérias são capazes de produzir enzimas, como as proteases, que conseguem agir nas paredes dos ovos ou atrasar a eclosão de juvenis de nematoides.

Compostos voláteis também tem poder nematicida. De acordo com Huang et al. (2010) o *Bacillus megaterium* proporcionou inibição em nematoides *Meloidogyne incognita*, sendo que alguns dos compostos analisados separadamente tiveram um efeito superior na atividade nematicida em ovos e juvenis, como foi o caso do hexadecano, propilbenzeno, propanona, 2-pentilfurano, benzeno etanol e 2,6,10-trimetil-dodecano.

Alves et al. (2011) utilizou isolados de rizobactérias para controle de eclosão de ovos e mortalidade de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* *in vitro*. Os melhores resultados foram obtidos com isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Estas bactérias proporcionaram maior inibição na eclosão de ovos e maior mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Sendo que o *B. subtilis* apresentou mortalidade cerca de 280 % maior quando comparado o tratamento testemunha, mostrando-se como um bom controlador biológico. Porém, também demonstrou que as diferentes bactérias tiveram efeitos diferentes entre as espécies de nematoides, onde o *B. subtilis* teve maior efeito nocivo em nematoides da espécie *Meloidogyne incognita*, quando comparado com a *Meloidogyne javanica*.

El-hadad et al. (2011) também conseguiram suprimir a população de nematoides em raízes de tomateiros infestados e no solo, através da aplicação de biofertilizantes bacterianos de *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*. Em estudo de Cardozo e Araújo (2011), a aplicação de *B. subtilis* também inibiu a reprodução de nematoides em cana-de-açúcar.

#### 4.8 QUANTIFICAÇÃO DE GALHAS E MASSA DE OVOS DE NEMATOIDES NAS RAÍZES DE TOMATEIRO

As galhas foram quantificadas nas raízes das plantas (Figura 32-A). Para melhor visualização e contagem da massa de ovos, corou-se as raízes com o reagente Floxina B (Figura 32-B).

**Figura 32-** Raiz de tomateiro inoculado com 0,5 mL de inoculante de *Bacillus subtilis* apresentando galhas (A) e raiz do tratamento testemunha corado com floxina B com pontos vermelhos indicando massa de ovos nas galhas (B)



Na Tabela 11 pode-se observar os resultados da avaliação do índice de galhas e índice de massa de ovos obtidos nas raízes dos tomateiros.

**Tabela 11-** Índice de massa de ovos (IMO) e índice de galhas (IG) nas raízes das plantas de tomateiro. SE (solo esterilizado), Testemunha (solo não inoculado), T1 (0,50 mL do inóculo), T2 (1,5 mL do inóculo), T3 (3,0 mL do inóculo)

Tratamento	Índice de massa de ovos (IMO)	Índice de galhas (IG)
SE	0±0 <sup>B</sup>	0±0 <sup>C</sup>
Testemunha	14,50±8,37 <sup>AB</sup>	24,41±6,89 <sup>AB</sup>
T1	17,42±4,52 <sup>A</sup>	24,42±5,00 <sup>AB</sup>
T2	15,00±17,24 <sup>AB</sup>	31,25±17,18 <sup>A</sup>
T3	5,17±2,23 <sup>AB</sup>	14,25±7,61 <sup>BC</sup>

Médias e desvios padrão de quatro repetições. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey

As plantas de tomateiros crescidas em solo esterilizado não apresentaram galhas e nem massa de ovos. Concordando com os resultados de contagem de nematoides no solo, apresentado anteriormente, o T3 foi o tratamento mais eficiente para inibição de galhas nas raízes.

Entretanto, o índice de massa de ovos para os tratamentos com *B. subtilis* não diferiram estatisticamente do tratamento testemunha. Já no caso do índice de galhas, pode-se observar que o T3 não diferiu estatisticamente do solo esterilizado. Porém o T2 apresentou um maior índice de galhas quando comparado com os demais.

Através da escala de Taylor e Sasser (1978) (item 3.8.8) foi possível avaliar o índice de galhas e massa de ovos nas raízes. De acordo com essa escala, as raízes das plantas testemunha T1 e T2 se classificaram na escala 3, já o T3 e o solo esterilizado ficaram na escala de 2 e 0, respectivamente. Como pode ser visualizado também na Tabela 11, o solo esterilizado não se apresentou suscetível a formação de galhas.

A escala quando utilizada para o índice de galhas demonstrou que o tratamento T2 obteve o valor 4, sendo o maior valor em comparação com todos os tratamentos analisados, pois, as raízes testemunha e T1 e T3 ficaram na escala 3, enquanto o solo esterilizado foi 0. Portanto, considerando a escala de Taylor e Sasser (1978), os tratamentos realizados não ajudaram na diminuição de galhas, visto que o T1 e T3, permaneceram na mesma escala que a testemunha.

Almaghari, Massoud e Abdelmoneim (2013) estudaram seis rizobactérias promotoras de crescimento, incluindo o *Bacillus subtilis*, em plantas de tomates e avaliaram a reprodução de nematoides *Meloidogyne incognita*. Pelos resultados pode-se observar resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para o *B. subtilis*, considerando que o tratamento com essa bactéria apresentou uma diminuição no número de galhas e de massa de ovos no sistema radicular dos tomateiros em relação às raízes das plantas sem tratamento.



## 5 CONCLUSÃO

Biorreator *airlift* é eficiente para o cultivo de *B. subtilis* para produção de inoculante para controle biológico. Entretanto, é importante considerar a necessidade de algumas variações na operação do biorreator. Por exemplo, algum nível de pressão poderá ser utilizado para redução da formação de espuma. Além disso, maior pressão interna, que permite aumentar o gradiente  $C_s-C$ , permitirá manter o cultivo mais tempo em condições não limitantes de oxigênio dissolvido, resultando em cultivos que possam ser realizados dentro de 24 horas.

Meios com menos proteínas deverão ser implementados já que as proteínas tem relação estreita com a formação de espuma. Por outro lado, meios minerais são menos tamponantes e deverão exigir sistemas de controle de pH, já que essa variável se mostrou importante. Deve-se também acoplar um sistema de quebra da espuma e retorno da biomassa ao biorreator, de forma asséptica.

Quanto a aplicação do inoculante nos tomateiros, pode-se observar, que o *B. subtilis* não apresentou diferenças significativas, em relação ao crescimento da planta, porém para o controle de nematoides pode-se observar que o tratamento 3 (T3) foi o mais eficiente, diminuindo significativamente a quantidade inicial de nematoides no solo.

Porém, mesmo que a aplicação do inoculante nas plantas seja simples e segura, os experimentos com plantas estão sujeitos a muitas variáveis que podem prejudicar os resultados. Assim, para verificação adequada dos efeitos da utilização de biocontroladores, deverá ser conduzido maior número de experimentos, em solos estéreis com inoculação de nematoides e condições ambientais, de modo a compreender e aferir melhor o papel dos microrganismos. Isso é fundamental para respaldar o uso do biocontrole em detrimento dos agroquímicos.



## 6 SUGESTÕES

- Estudar meio de cultura mineral para a produção de *Bacillus subtilis*;
- Utilizar um meio alternativo, como um resíduo agroindustrial, para diminuir, ainda mais os custos de produção do produto a base de *B. subtilis*;
- Realizar cultivo de de *B. subtilis* em sistema descontínuo alimentado, com vazão controlada;
- Realizar cultivo de *B. subtilis* em biorreator *airlift* em sistema de cultivo contínuo;
- Estudar concentrações adequadas de *B. subtilis* em cultura agrícola, para analisar os efeitos tanto para nematoides quanto para crescimento das plantas;
- Utilizar substrato estéril nos experimentos, para não se ter interferência das bactérias originais.



## REFERÊNCIAS

ABAWI, G. S., WIDMER, T. L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p.37-47. 2000.

AFFOKPONA, A.; COYNE, D. L.; HTAYE, C.; AGBÈDÈA, R. D.; LAWOUBIN, L.; COOSEMANS, J. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology e Biochemistry**, v.43, p. 600-608. 2011.

AKHTAR, M. ; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 35-47. 2000.

ALMAGHRABI, O. A.; MASSOUD, S. I.; ABDELMONEIM, T. S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 57–61. 2013.

ALVARENGA, M. A. Origem Botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. **Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras, editora: UFLA, 2004. p. 15-23. a

ALVARENGA, M. A. Valor alimentício. In: ALVARENGA, M. A. **Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras, editora: UFLA, 2004. p. 27-30. b

ALVES, G. C. S.; SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. M.; JESUS, F. G.; ALMEIDA, E. J.; THULER, R. T. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne Incognita*, *M. Javanica* e *Pratylenchus Zeae*. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.78, n.4, p.557-564. 2011.

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, n. 2, p. 456-462. 2008.

ARAÚJO, F. F.; CARVALHO, M. H. Crescimento de tomateiro após tratamento de mudas com *Bacillus subtilis* e *Carbofuran*. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 59-64. 2009.

ARAÚJO, 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 and Biotechnology**, p. 639-1645. 2005.

ARAÚJO, F. F.; SILVA, J. B.; ARAÚJO, A. S. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.32, n.2, p.197-202. 2002.

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.

BETTIOL W.; MORANDI, M. A.; PINTO, Zavame; PAULA JR, T. J.; CORRÊA, É.; MOURA, A.; LUCON, C. M.; COSTA, J.; BEZERRA, J. L.. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. São Paulo: Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2012. p.155.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL W. MORANDI, M. A. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, SP. 2009. p. 187-208.

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

CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.12, p. 1283-1288. 2011.

CARES, J.; HUANG, S. Nematóides de solo. In: HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: Amostra e**

**caracterização da biodiversidade.** Lavras: Edidora UFLA. 2010. p. 151-163.

CARVALHO, A. L.; OLIVEIRA, F. H.; MARIANO, R. L.; GOUVEIA, E. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.3, p. 643-652. 2010.

CARVALHO, J. G. ; BASTOS, A. R.; ALVARENGA, M. A. Nutrição mineral e adubação. In: ALVARENGA, M. A. **Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia.** Lavras, editora: UFLA, 2004. p. 61-120.

CHARCHAR, J. M.; LOPES, C. A. Nematóides. In: LOPES, C. A.; AVILA, A. C. **Doenças do tomateiro.** Embrapa hortaliças: Brasília, 2005.p. 96-100.

CHEN, H., WANG, L., SU, C. X., GONG, G. H., WANG, P., YU Z. L. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 47, n. 3, p. 180-186, 2008.

CHEVALIER, P.; NOÛE, J. Enhancement of  $\alpha$ -amylase production by immobilized *Bacillus subtilis* in an airlift fermenter. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 53-56. 1987.

CHO, M. R.; NA, S. Y.; YIEM, M. S. Biological Control of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans*. **Journal Asia-Pacific Entomology**, v.3, n. 2, p. 71-76. 2000.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 1, n.28, p. 346-354. 2001.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F.; CRANEIRO, G. E.; Nematóides em Soja: Identificação e Controle. **Circular técnica 76.** Embrapa, 2010.

EL-HADAD, M. E.; MUSTAFA, M.I.; SELIM, Sh.M.; EL-TAYEB, T. S.; MAHGOOB, A. E. A.; AZIZ, N. H. Abdel. The nematicidal effect of

some bacterial biofertilizers on meloidogyne incognita in Sandy soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.1, p. 105-113. 2011.

ESMERALDO, F. S. **Influência da temperatura na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005**. 2010. 44f. Monografia (Graduação em Engenharia Química)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C.; TEIXEIRA, P. C.; MARCANTÔNIO, A. S.; STÉFANI, M. V.; ANTONUCCI, A.; ROCHA, G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; FERREIRA, C. Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 34, n. 3. p. 403-412. 2008.

FREITAS, L.; NEVES, W.; OLIVEIRA, R. D. **Métodos em nematologia vegetal**. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia. Viçosa: Editora UFV, p. 253-292. 2007.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **American Phytopathological Society Journal**, v. 94, n. 11, p. 1245-1248. 2004.

GARCIA, G. R. **Caracterização microbiológica e avaliação de uma cepa de *Bacillus subtilis* no desempenho de bezerros da raça holandesa**. 2008. 68 f. Tese de doutorado (Microbiologia Agropecuária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v.2, p. 2046-2048. 2010.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 247-256. 1992.

HOOGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. California. **Agricultural Experiment STA, Circular**, 1950. 347 p.

HUANG, Y.; XU, C.; MA, L.; ZHANG, K.; DUAN, C.; MO, M. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 417-422. 2010.

HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **Journal of Fermentation Technology**, v. 44, p. 881-889. 1966.

IBGE- Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. 88p. 2012.

JENKINS, W. R. **A rapid centrifugal- flotation technique for separating nematodes from soil**. Plant Disease Report, v. 48, 1964. 692 p.

KIERAN, P. M.; MACLOUGHLIN, P. F.; MALNE, D. M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 39-52. 1997.

KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNG, H.; SCHMIEDEKNECHI, G.; HAIN, R. FZB24 *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzen-schutz Nachrichten Bayer**, v1. p. 72-93. 2000.

KINSELLA, K.; SCHULTHESS, C. P.; MORRIS, T. F.; STUART, J. D. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 374–379. 2009.

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

LAZZARETTI, E.; MELLO, I. S. Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 19 p. 2005.

LI, Y.; SHI, Z.; WU, C.; LI, H.; LI, F. Determination of potential management zones from soil electrical conductivity, yield and crop data. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 09, n. 01, p.68-76. 2008.

LIMA JUNIOR, G. A. **Obtenção de surfactina pelo micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633**. 2012. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LIMA, F. F. ***Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho**. 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

LIMA, L. P. Elementos de microbiologia. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Editora Blücher, 1975. p. 1-18.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rede Brasileira de Justiça Ambiental, Rio de Janeiro, 2011. 188p.

LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. Doenças fúngicas. In: LOPES, C. A.; AVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Embrapa hortaliças, Brasília, 2005. p. 33-34

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: Produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.;

MORANDI, M. A. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 15-28.

LÓPEZ-VALDEZ, F.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; CEBALLOS-RAMÍREZ, J. M.; MARSCH, R.; OLALDE-PORTUGAL, V.; DENDOOVEN, L. A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 499–505. 2011.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. **Controle de doenças radiculares**. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E.; MENEZES, M. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Imprensa Universitária, 2006. p. 303-322.

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

MATAR, S. M.; EL-KAZZAZ, S. A.; WAGIH, E. E.; EL-DIWANV, A. I.; MOUSTAFA, H. E.; EL-SAADANI, M. A.; ABO-AZAID, G. A.; HAFEZ, E. E. Bioprocessing and scaling-up cultivation of *Bacillus subtilis* as a potential antagonist to certain plant pathogenic fungi, III. **Biotechnology**, v. 8, p.138-143. 2009.

MAZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360 p.

MEDEIROS, P. R.; DUARTE, S.; UYEDA, C.; SILVA, E.; MEDEIROS, J. Tolerância da cultura do tomate à salinidade do solo em ambiente protegido. **Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.1, p. 51-55. 2012.

MELO, I. S.; SANHUEZA, R. S. V. Métodos de Seleção de Microorganismos Antagônicos a Fitopatógenos: **Manual Técnico**. EMBRAPA-CNPMA, p. 40. 1995.

MENA-VIOLANTE, H. G.; OLALDE-PORTUGAL, V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. **Scientia Horticulturae**, v. 113. p. 103-106. 2007.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E.; PERUCH, L. A.; MENEZES, M. **Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais**. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E.; MENEZES, M. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Imprensa Universitária, 2006. p. 1-18.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428. 1959.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M.; ARRUDA, R. O. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, São Paulo: Blucher, 2001. p. 249-278.

- NOAH, K. S.; FOX, S. L.; BRUNH, D. F.; THOMPSON, D. N.; BALA, G. A. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, n.100, p. 803-813. 2002.
- OH, J. S.; KIM, B.; PARK, T. Importance of specific growth rate for subtilisin expression in fed-batch cultivation of *Bacillus subtilis spoIIIG* mutant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 747-751. 2002.
- OKA, Y.; KOLTAL, H.; BAR-EYAL, M.; MOR, M.; SHARON, E.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. **Pest Management Science**, v. 56, p. 983-988. 2000.
- ONGENA, M; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiology**, v. 16, p. 115-125. 2008.
- PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A.. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187–193. 2011.
- PRADELLA, J. G.; OLIVEIRA, M. S.; URENHA, L. C. Produção de inoculantes agrícolas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, São Paulo: Blucher, 2001. p. 279-305.
- RAIJ, B. V.; GHEYI, H. R.; BATAGLIA, O. C. Determinação da condutividade elétrica e de cátions solúveis em extratos aquosos de solos. In: RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade dos solos tropicais**. Instituto Agrônômico: Campinas, p.277-281. 2001.
- REIS, F. A.; SÉRVULO, E. F.; DEFRANÇA, F. P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116. p. 899-912, 2004.

ROSSI M. J.; OLIVEIRA, V. L. Growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in different nutritional conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 624-632. 2011.

ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift**. 2006. 188f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SAYRE, R. M. Bacterial diseases of nematodes and their role incontrolling nematode populations. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, n. 24, p. 263-279, 1988.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**, v. 2, São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 277-331.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. Biorreatores e processo fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**, v. 2, São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 179-192.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521. 2000.

SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. The Genus *Bacillus*-Nonmedical. **Prokaryotes**, v.4, p. 530-562. 2006.

SIEGEL, M.H., ROBINSON, C.W. Application of *Airlift* Gas-Liquid-Solid Reactors in Biotechnology. **Chemical Engineering Science**, v.47, p. 3387-3394. 1992.

SILVA, S. B. **Produção e otimização do progresso de obtenção de ácido  $\gamma$ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL 53**. 2010. 115f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SINDAG-Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em:

<[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2256](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256)>. Acesso 25 fev. 2013.

SOARES, P. L. **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos**. 2006. 217f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v.56, p. 845–857. 2005.

STOPPELLI, I. M.; CRESTANA, S. Pesticide exposure and cancer among rural workers from Bariri, São Paulo State, Brazil. **Environment International**, v.31, p. 731-738. 2005.

SWAIN, M. R., RAY, R. C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. **Microbiological Research**, v. 164, p. 121-130. 2009.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978. 111p.

Toca do verde. Disponível em: < <http://www.tocadoverde.com.br/h-tomate-santa-cruz-paulista.html>>. Acesso 25 de janeiro de 2013.

WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J.; KUNG, S.. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n.2, p. 174-178. 2003.

VALENTE, D. S.; QUEIROZ, D. M.; PINTO, F. A.; SANTOS, N. T.; SANTOS, F. L. The relationship between apparent soil electrical conductivity and soil properties. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 683-690. 2012.

VAZ, M. V.; CANEDO, E. J.; MACHADO J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A.. Controle biológico de *Meloidyne javanica* e *Meloidyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Revista do Núcleo**

**interdisciplinar de Pesquisa e Extensão-Patos de Minas: UNIPAM**, v. 1, n. 8, p. 203-212. 2011.

VENDRUSCOLO, F.; ROSSI, M. J.; SCHMIDELL, W.; NINOW, J. L. Determination of oxygen solubility in liquid media. **ISRN Chemical Engineering**, p. 1-5. 2012.

VIAL, C., PONCIN, S., WILD, G., MIDOUX, N. Experimental and theoretical analysis of the hydrodynamics in the riser of an external loop airlift reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 4745-4762. 2002.

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

YEH, M.; WEI, Y.; CHANG, J. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1799-1805. 2006.

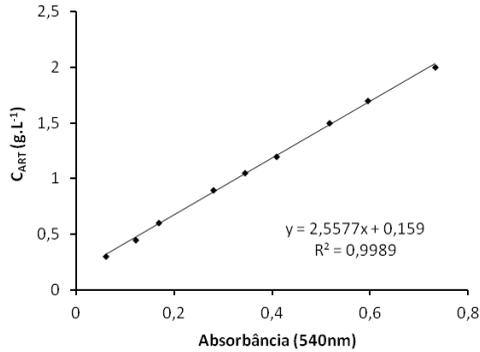
YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 138-145. 2011.

ZHANG, B., XIE, C., YANG, X. A novel small antifungal peptide from *Bacillus* strain B-TL2 isolated from tobacco stems. **Peptides**, v. 29, p. 350-355. 2008.



## APÊNDICE

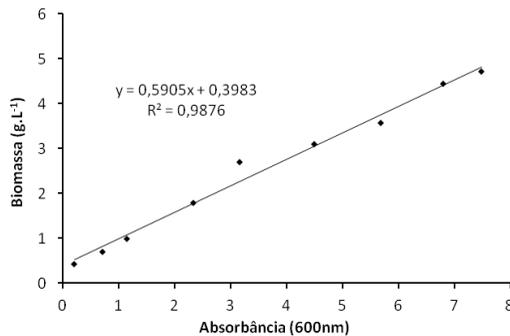
**Figura 1-** Correlação entre concentração de glicose e absorvância para determinação da concentração de açúcares redutores totais



**Figura 2-** Coloração das amostras com diferentes concentrações de glicose utilizadas para confecção da curva de calibração concentração *versus* absorvância



**Figura 3-** Correlação entre biomassa e absorvância para determinação da concentração celular durante o tempo de cultivo em biorreator *airlift*





## ANEXO A



ESTADO DE SANTA CATARINA  
SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DA PESCA  
COMPANHIA INTEGRADA DE DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA  
Laboratório Físico Químico e Biológico



## RELATÓRIO DE ENSAIO

## SOLO

Nº 139/ 2013

Interessado.....: JORGE LUIZ NINOW  
Município interessado: ITAJAI  
Remetente.....: E-MAIL: GLENISEVOSS@YAHOO.COM.BR  
Localidade.....: CENTRO  
Município remetente.: ITAJAI  
Endereço remetente ..: 96048059  
Material.....: Solos  
Recebimento.....: 05/02/2013

Determinação	277/01								Unidade
	Res	Ref	Res	Ref	Res	Ref	Res	Ref	
Textura	26.00	Classe 3							% Argila
pH	5.50	Medio							
Índice SMP	6.20								
Fósforo	>50.00	Muito Alto							ppm
Potássio	470.00								ppm
Mat.Orgânica	2.30	Baixo							%(m/v)
Alumínio	<0.30								cmolc/l
Cálcio	8.90	Alto							cmolc/l
Magnésio	5.10	Alto							cmolc/l
Sódio	109.00								ppm
H + Al	3.47								cmolc/l
Soma Bases-S	15.69	Alta							cmolc/l
CTC	19.16	Alta							cmolc/l
Saturação Bases-V	81.89	Alta							%

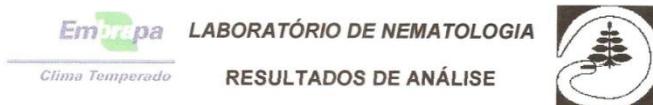
Obs: Interpretação conforme recomendações de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, SBSC - Núcleo Regional Sul / EMBRAPA-CNPQ, 2004.

FLORIANÓPOLIS, 13 de fevereiro de 2013

*Rosângela Bassi Astronacas*  
Rosângela Bassi Astronacas  
Responsável Técnico  
CRPA-SC-65499-2



## ANEXO B



**Requerente:** Jorge Luiz Ninow

**Endereço:** Santa Catarina; fone: 048- 3721-5232

**Material:** amostra de raízes de tomate enviada Glenise Bierhalz Voss

**Número de amostras:** 1

**Metódo(s) de análise:** Identificação de espécies de *Meloidogyne* por isoenzimas

**Deteção e identificação do nematóide das galhas (*Meloidogyne* sp.)**

Amostra	Espécie(s) identificada(s)
Amostra 1	<i>Meloidogyne javanica</i> <i>Meloidogyne incognita</i>

\* Material biológico inoculado em planta isca suscetível para confirmação da(s) espécie(s).

*Cesar Bauer Gomes*  
PESQUISADOR III  
FITOPATOLOGIA - NEMATOLOGIA  
EMBRAPA CLIMA TEMPERADO

Pesq. Cesar Bauer Gomes/Nematologia  
Responsável Técnico  
Pelotas, 20 de Fevereiro de 2013.