
Boletim de Pesquisa 28 **e Desenvolvimento**

ISSN 1516-4675
Janeiro, 2005

**Influência de *Bacillus subtilis* na
Promoção de Crescimento de Plantas
e Nodulação de Raízes de Feijoeiro**



República Federativa do Brasil

Luis Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

Luís Carlos Guedes Pinto

Presidente

Silvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Silvio Crestana

Diretor-Presidente

Kleper Euclides Filho

José Eugênio França

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores-Executivos

Embrapa Meio Ambiente

Paulo Choji Kitamura

Chefe Geral

Geraldo Stachetti Rodrigues

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Cristina Martins Cruz

Chefe-Adjunto de Administração

Ariovaldo Luchiari Junior

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 1516-4675

Janeiro, 2005

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 28

Influência de *Bacillus subtilis* na Promoção de Crescimento de Plantas e Nodulação de Raízes de Feijoeiro

Eduardo Lazzaretti
Itamar Soares de Melo

Jaguariúna, SP
2005

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 - Km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 - Cep.13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3867-8750
Fax: (19) 3867-8740
www.cnpma.embrapa.br
sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Geraldo Stachetti Rodrigues
Secretário-Executivo: Sandro Freitas Nunes
Bibliotecário: Maria Amélia de Toledo Leme
Membros: Heloisa F. Filizola; Manoel Dornelas de Souza; Cláudio César de Almeida Buschinelli; Maria Conceição Peres Young Pessoa; Osvaldo Machado R. Cabral; Marta Camargo de Assis
Normalização Bibliográfica: Maria Amélia de Toledo Leme
Editoração eletrônica: Silvana Cristina Teixeira

1ª edição

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Lazzaretti, Eduardo

Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro / Eduardo Lazzaretti e Itamar Soares de Melo. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005.

21p. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).

1. Reguladores de crescimento – Agricultura. I. Melo, I.S. de. II. Título. III. Série.

CDD 631.89

© Embrapa 2005

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	14
Conclusão	19
Referências	19

Influência de *Bacillus subtilis* na Promoção de Crescimento de Plantas e Nodulação de Raízes de Feijoeiro

Eduardo Lazzaretti¹

Itamar Soares de Melo²

Resumo

Linhagens de *B. subtilis* têm sido bem estudadas como agentes de controle biológico, e também como produtoras de antibióticos. Uma linhagem de *B. subtilis* OG isolada de solos supressivos a *Fusarium solani* foi avaliada quanto à utilização conjunta com *Rhizobium phaseoli* em feijoeiro, visando aumento de biomassa e nodulação de raízes.

Em condições de casa de vegetação, a aplicação de *B. subtilis*, via sementes, promoveu um aumento na nodulação, em mais de 100%, em solo natural quando aplicado isoladamente ou em conjunto com *R. phaseoli* e em mais de 160% em solo esterilizado, quando comparado com o tratamento onde o *Rhizobium* foi aplicado isoladamente. Em solos esterilizados, a aplicação de *B. subtilis*, em conjunto com *Rhizobium*, promoveu um aumento significativo no peso da matéria seca das raízes (89%) e da parte aérea (83%). O tratamento de sementes com *B. subtilis* não afetou a emergência de plântulas em nenhum dos solos estudados.

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que a utilização de *B. subtilis* é bastante promissora para aumentar a nodulação de raízes e promover o crescimento de plantas de feijoeiro.

¹ Bio – Brasil Limpeza Biológica Ltda, CEP 05625-000 - São Paulo, SP. E-mail: edulazzaretti@hotmail.com

² Núcleo de Microbiologia Ambiental, Embrapa Meio Ambiente, C Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP. E-mail: itamar@cnpma.embrapa.br

Influence of *Bacillus subtilis* on Plant Growth Promotion and Nodulation of Common Bean

Abstract

B. subtilis strains have been very well studied as a biocontrol agent and also as hyperproducers of antibiotics. One strain, isolated from suppressive soil to *Fusarium solani*, was evaluated in order to study its effects when co-inoculated with *Rhizobium phaseoli* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

In green house tests, the seed treatment with *B. subtilis* resulted in an increase of the nodulation of more than 100% in natural soil, when applied alone or in combination with *Rhizobium*, and more than 160% in sterilized soil, when compared to the treatment involving the application of *Rhizobium*. In sterilized soils, the application of *B. subtilis* in conjunction with *Rhizobium* resulted in a significant increase in the dry weight of roots (89%) and shoots (83%), when compared to the treatment without *B. subtilis*. The treatment of seeds did not affect the germination in the studied soils.

Judging by the results obtained one can conclude that the utilization of *B. subtilis* is quite promising in increase nodulation of roots by *Rhizobium*.

Introdução

O feijão constitui-se num dos alimentos básicos e na principal fonte de proteína do povo brasileiro e de grande parte da América Latina. Seu teor de proteínas varia de 15% a 33%, sendo que a maioria das cultivares nacionais apresentam composição aproximada de 20% a 25% desses compostos (Fancelli, 1990). Entretanto, a produtividade média nacional de feijão é baixa e um dos fatores desta produtividade é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, nos solos agrícolas. A adição de nitrogênio, na forma de fertilizantes, é cara e, em muitos casos, ineficiente, principalmente devido às perdas do elemento causadas por práticas culturais inadequadas. Neste sentido, torna-se importante a fixação biológica de nitrogênio, por meio da simbiose feijoeiro x *Rhizobium* (Araújo, 1994).

A inoculação de sementes com *Rhizobium* é pouco utilizada pelos produtores de feijão, principalmente por desconhecimento dos seus benefícios. Concorrem também para a não adoção dessa prática históricos de insucessos, particularmente por grandes produtores que cultivam o feijão irrigado e buscam altos níveis de produtividade (Vargas et al., 1994). Dentro desse contexto, estudos têm mostrado que a adição de estirpes selecionadas de *Rhizobium*, em sementes de feijão, aumentaram a produção em até 230%, indicando a importância desta associação para a cultura do feijoeiro (Siqueira, 1993).

Problemas no estabelecimento do rizóbio em alguns solos têm sido atribuídos a baixa capacidade competitivas, baixa eficiência em fixar nitrogênio, instabilidade genética do simbionte (Raposeiras et al., 2002) e à predominância de microrganismos antagonísticos (Peres et al., 1992). Exemplo deste antagonismo refere-se à bactéria *Bdellovibrio* que parasita células de rizóbio na rizosfera e reduz a nodulação de leguminosas (Siqueira, 1993).

O efeito benéfico de *B. subtilis*, quando aplicado junto às sementes ou ao solo, não é exclusivamente devido ao antagonismo proporcionado aos patógenos. A bactéria influencia positivamente a germinação, desenvolvimento e rendimento da cultura devido, também, à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas pela solubilização de fósforo, como foi demonstrado por Gaid & Gaur (1991), Srinivasan et al. (1996) e Luz (2001).

Somando-se às vantagens, *B. subtilis* apresenta um efeito benéfico sobre a nodulação de leguminosas conforme observado por Li & Alexander (1988); Gaind & Gaur (1991); Turner & Backaman (1991); Rossall & Mcknight (1992); Araújo (1994); Siddiqui & Mahmood (1995), Srinivasan et al. (1996) e Araujo et al. (2002), o que o torna especialmente importante como agente de controle biológico nestas culturas.

O cultivo intensivo de feijoeiro, aliado ao inadequado preparo do solo, levou ao incremento de doenças causadas por diversos fungos de solo, os quais são de difícil controle. Os métodos de controle fitossanitário, como o tratamento de solo, uso de variedades resistentes e a rotação de culturas nem sempre podem ser utilizados, restando como alternativa o tratamento químico de sementes. Entretanto, esse tratamento, restringe-se ao período de emergência e desenvolvimento inicial da plântula e não é efetivo em áreas onde os patógenos já estão estabelecidos (BIANCHINI et al., 1989; BALARDIN, 1992). Outro inconveniente é que alguns agrotóxicos podem afetar a fixação biológica de nitrogênio por bactérias do gênero *Rhizobium* (Graham et al., 1980; Kataria et al., 1985; Ramos & Ribeiro, 1993)

Neste sentido, faz-se necessário a busca de métodos de controle alternativos e, entre as opções disponíveis, está a aplicação, via semente, de agentes de controle biológico. Dos microrganismos com potencial de controle biológico, destacam-se alguns gêneros bacterianos e, entre eles *Bacillus subtilis*, que em diversos estudos, mostrou-se promissor no controle de fungos de solo ou associados às sementes (Merriman et al., 1974; Venkatasubbaiah, 1985; Weller, 1988; Reedy & Rahe, 1989; Jindal & Thind, 1990; Turner & Backaman, 1991; Luz, 1993; Lazzaretti, 1993; Lazzaretti & Bettiol, 1997; Luz, 2001; Amorim & Melo, 2002).

Desse modo, considerando-se as abordagens acima o presente trabalho teve por finalidade avaliar o efeito de *Bacillus subtilis* OG e de seus metabólitos, sobre a germinação de sementes e a promoção de crescimento de plantas de feijoeiro e sobre a nodulação de raízes por *Rhizobium phaseoli*.

Material e Métodos

Linhagens de *Bacillus subtilis* e *Rhizobium phaseoli*

Bacillus subtilis, linhagem OG, foi isolada da rizosfera de plantas sadias de feijoeiro cultivadas em solos supressivos a *Fusarium solani* na região de Guaira, SP (Melo et al., 1995). A bactéria foi cultivada em meio LB (triptona - 1g; extrato de levedura - 0,5g; NaCl - 0,5 g; água destilada -100 ml) a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ sob agitação constante durante 24 horas. Aliquotas de 0,85 ml do meio de cultura, onde *B. subtilis* foi desenvolvido, foram transferidas para tubos "ependorfs" esterilizados, contendo 0,15 ml de glicerol. Após agitação, os mesmos foram acondicionados em "freezer" (-18°C), para utilização nos testes subsequentes.

R. phaseoli, linhagem CN-01, pertencente à coleção de cultura do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, foi gentilmente cedida pela Dra. Sui Mui Tsai. Para produção de inóculo dessa bactéria utilizou-se do meio YM (manitol-10,0g; K_2HPO_4 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2 g; NaCl-0,1 g; extrato de levedura-0,5 g; água destilada-1000 ml; pH 6,8).

Produção de Metabólitos por *B. subtilis* e seu Efeito no Desenvolvimento de *R. phaseoli*.

Para verificar a influência dos metabólitos secundários de *B. subtilis*, esta bactéria foi cultivada por sete dias, sob agitação constante a 180 rpm e a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, nos seguintes meios de cultura: GPL (glucose-10g; peptona-10g; extrato de levedura-5g; NaCl-3g; KH_2PO_4 1g; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5g; água destilada-1000 ml, pH-6,0), caldo nutriente (CN) e batata-dextrose (BD). Devido às características do meio BD, este foi filtrado em papel de filtro para retirada de todo o material particulado que poderia interferir na extração de metabólitos. Para extração de metabólitos do tipo antibióticos, após fermentação, os meios de culturas foram centrifugados (Sorvall modelo RC 5B plus) a 18000 g, por 15 minutos, a 5°C para separação das células. O sobrenadante obtido foi transferido para funil de separação.

Ao volume total do sobrenadante, contido no funil de separação, foi adicionado 1/3 do volume de diclorometano, que foi vigorosamente agitado e, após separação, a fase orgânica foi coletada. O volume final do solvente contendo

metabólitos de *B. subtilis* foi filtrado em papel de filtro acondicionando nele sulfato de sódio anidro para retirada de todo resíduo de água. O material foi evaporado em rotavapor (Büchi RE 121), à temperatura entre 30 – 35 °C. Uma vez evaporado, o balão foi lavado com 2 ml do mesmo solvente.

Em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (manitol-10,0g; K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,2 g; NaCl-0,1 g; extrato de levedura-0,5 g; água destilada-1000 ml; pH 6,8; ágar) foi espalhado, com auxílio de alça de Drigalsky, 200 ml de meio YM onde *R. phaseoli* foi desenvolvido por três dias. Em seguida, após rápida secagem, foram colocados no centro das placas, discos de papel (S&S antibiotic-assay discs n.º 740-E diam.1/4 IN - Schleicher & Schuell) esterilizados contendo 10 ml do extrato bruto obtido em cada um dos meios de cultura.

As culturas foram incubadas, por três dias a 28 °C, quando avaliou-se o tamanho do halo de inibição formado. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Influência de *B. subtilis* (OG) sobre a emergência de plântulas, promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro.

Em quatro sacos de polipropileno contendo 40 g de turfa esterilizada em autoclave, durante 20 minutos, foram adicionados, em um deles, 8 ml de meio de cultura YM, onde *R. phaseoli* se desenvolveu por três dias. Em outro foram adicionados 8 ml de meio de cultura GPL onde *B. subtilis* se desenvolveu por sete dias e num terceiro saco, com 40 g de turfa, foram misturadas as duas bactérias em igual proporção. No quarto saco nada foi adicionado servindo com testemunha.

Aliquotas de turfa presentes nos sacos de polipropileno, após secagem à temperatura ambiente, foram adicionada sobre 14 g de sementes de feijão cv. Carioca, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (2,5% por 5 min.) e secas à temperatura ambiente por quatro horas. Para melhor cobertura das sementes pela turfa foram adicionados 120 ml de água esterilizada e o frasco contendo as sementes foi agitado até que as mesmas fossem completa-

mente envolvidas pela turfa. Após o tratamento, as sementes foram secas à sombra e à temperatura ambiente, quando realizou-se a semeadura em vasos de três litros de capacidade, contendo solo natural e solo esterilizado por autoclavagem.

Foram tratadas sementes de feijão com turfa esterilizada, turfa contendo somente *B. subtilis*, turfa contendo *B. subtilis* e *R. phaseoli* e turfa contendo somente *Rhizobium*. A concentração de *B. subtilis* e *Rhizobium*, por semente de feijão, foi de 10^8 u.f.c. Foram semeadas cinco sementes por vaso e, após a emergência, foi executado desbaste, deixando-se três plantas por vaso. Os vasos permaneceram na casa-de-vegetação durante três semanas quando as plantas de feijoeiro foram cuidadosamente retiradas e as raízes lavadas com água corrente. Foram comparados quatro tratamentos, cada um representado por quatro repetições de cinco plantas por parcela experimental. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições. As médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Resultados e Discussão

Efeitos de metabólitos secundários produzidos por *B. subtilis* (OG) sobre *R. phaseoli*.

Os metabólitos de *B. subtilis* produzidos em meios GPL e BD inibiram o crescimento *in vitro* da linhagem comercial de *Rhizobium*, formando halo de inibição de, em média, 2,54 cm e 2,42 cm, respectivamente. As bactérias crescidas no meio de cultura, caldo nutriente (CN), não produziram metabólitos suficientes para inibição do crescimento de *R. phaseoli* (Figura 1). O mesmo ensaio foi repetido com duas linhagens nativas de *Rhizobium*, isolados de plantas de feijoeiro da região de Guaira. Neste, *B. subtilis* não inibiu o crescimento de nenhuma destas linhagens. Em experimento sob condições de campo, a inoculação de *B. subtilis* em sementes de feijoeiro plantadas em solos naturalmente infestados com *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* também proporcionou um aumento na produção de grãos (Valarini, 1994).

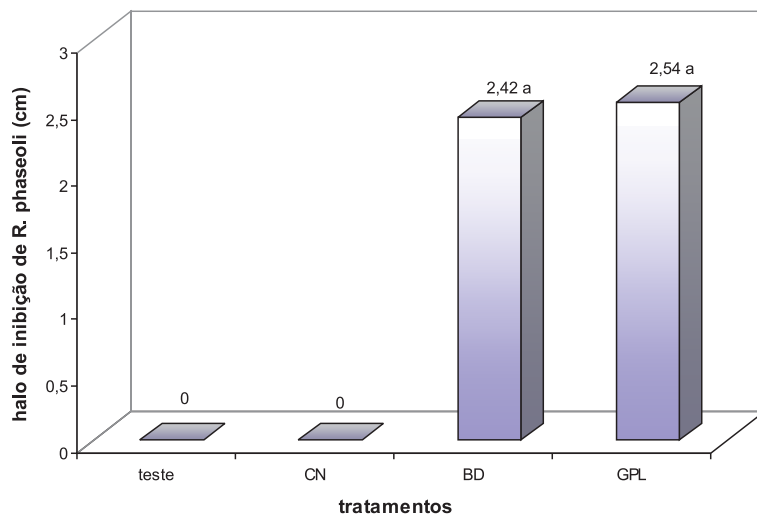


Figura 1 – Efeitos dos metabólitos de *Bacillus subtilis* (OG), extraídos de diferentes meios de cultura: Caldo Nutriente (CN), Batada dextrose (BD) e GPL (glucose-10g; peptona-10g; extrato de levedura-5g) sobre o crescimento de *Rhizobium phaseoli*.

Influência de *B. subtilis* (OG) sobre a emergência de plântulas, promoção de crescimento de plantas e nodulação das raízes em plantas de feijoeiro.

Quando introduzida via sementes, isolada ou concomitantemente a *Rhizobium*, *B. subtilis* não afetou a emergência das plântulas em quaisquer dos solos utilizados, quer seja natural ou esterilizado. Em solo esterilizado, *B. subtilis*, isoladamente ou em conjunto com *Rhizobium*, aumentou o peso da matéria seca das raízes e da parte aérea, além de aumentar o número de nódulos nas raízes. Em solo natural, os mesmos tratamentos aumentaram significativamente o número e o peso de nódulos. Ainda em solo natural, *B. subtilis*, quando aplicado isoladamente, promoveu um incremento significativo no peso da matéria seca das raízes. Não foram observados *in vivo*, tanto em solo natural, quanto em solo esterilizado, influência negativa de *B. subtilis* sobre *R. phaseoli*, quando aplicados simultaneamente nas sementes (Tabela 1).

Tabela 1. Influência de *Bacillus subtilis* (OG) sobre a germinação de sementes, peso da matéria seca da raiz e da parte aérea e peso e número de nódulos na presença e ausência de *Rhizobium phaseoli*, em solos natural e autoclavado.

	Testemunha		<i>Rhizobium</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Bacillus</i> + <i>Rhizobium</i>	
Solo natural								
Emergência de plântulas (%)	95	a*	90	a	90	a	90	a
Peso matéria seca raiz (g)	0,903	a	1,166	a	1,237	b	1,070	a
Peso matéria seca parte aérea (g)	1,157	a	1,175	a	1,255	a	1,542	a
Peso nódulos (g)	0,005	a	0,013	ab	0,054	bc	0,059	c
Número nódulos	16	a	56,2	ab	176,5	b	178,5	b
Solo esterilizado								
Emergência (%)	95	a	100	a	90	a	95	a
Peso matéria seca raiz (g)	0,547	a	0,637	a	1,387	b	1,203	b
Peso matéria seca parte aérea (g)	0,622	a	0,850	a	1,562	b	1,563	b
Número nódulos	6,25	a	22,75	ab	88,5	b	59,25	b

* valores na linha com mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%)

A linhagem de *Rhizobium phaseoli* CN-01 utilizada neste trabalho mostrou-se sensível *in vitro* aos metabólitos de *B. subtilis* (OG), o que não ocorreu quando aplicado simultaneamente nas sementes e posterior semeadura em solo esterilizado ou não. Observa-se que a aplicação via sementes de *R. phaseoli* e *B. subtilis* ou *B. subtilis* isoladamente não interferiu na emergência das plântulas. Entretanto, quando avaliado o peso da matéria seca das raízes e da parte aérea e o número de nódulos nas raízes, a aplicação de *B. subtilis* afetou positivamente estes parâmetros, observando-se um aumento no número de nódulos, em relação à testemunha, em mais de 100%. Este aumento na nodulação, obtido por meio da aplicação de *B. subtilis* via sementes, isoladamente ou concomitante a *R. phaseoli*, pode contribuir para evitar os problemas na utilização de *R. phaseoli* em inoculação de feijoeiro observado por VARGAS *et al.* (1994). Estes autores citam que a pouca utilização de inoculação de sementes com bactérias fixadoras de nitrogênio, por parte dos produtores, é devido à baixa nodulação observada .

Resultados semelhantes foram obtidos por Podile (1995) que observou um incremento na nodulação de raízes de *Cajanus cajan* na ordem de 45% a 61%, quando as sementes foram tratadas concomitantemente com *B. subtilis* e *Rhizobium* spp., enquanto que com a aplicação de *B. subtilis* e *Rhizobium* spp. isoladamente, o incremento da nodulação variava de 18% a 24% e 29% a 46%, respectivamente.

O estímulo na nodulação por bactérias do gênero *Bacillus*, quando aplicado às sementes isoladamente ou em co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, também foi observada em plantas de soja. Halverson & Handelsman (1991) observaram um incremento na nodulação de soja entre 30 a 133% por *B. japonicum* nativo, quando trataram as sementes somente com *B. cereus*. Li & Alexander (1988) também observaram que, quando co-inocularam a bactéria fixadora com *Bacillus* sp. em soja, houve um aumento significativo na nodulação. Neste experimento, os autores utilizaram mutantes de *B. japonicum* resistentes aos metabólitos produzidos pela estirpe de *Bacillus* utilizada nos ensaios.

No presente trabalho, o aumento na nodulação nas raízes de feijoeiro foi obtido com um isolado de *Rhizobium phaseoli* que, em testes *in vitro*, mostrou-se sensível aos metabólitos da bactéria utilizada em co-inoculação, indicando que a inibição observada *in vitro* não se repete em condições naturais. Resultados semelhantes foram encontrados por Turner & Backman (1991), os quais observaram um aumento na nodulação de raízes de amendoim por *Rhizobium* sensíveis aos metabólitos de *B. subtilis* *in vitro* quando as sementes foram tratadas com a bactéria.

Esta contradição observada entre os testes *in vitro* e *in vivo* poderia estar ligada aos diferentes metabólitos produzidos pela bactéria nos dois ambientes, uma vez que, segundo Besson et al. (1990) e Phae & Shoda (1991), a síntese e o modo de ação dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* dependem da disponibilidade do substrato e dos nutrientes presentes no meio de cultura, devido à necessidade desses à síntese de uma elevada gama de metabólitos. Assim, permite a produção de metabólitos antagonísticos ao *Rhizobium in vitro* o que não ocorre *in vivo*, onde as condições nutricionais na rizosfera, embora rica, pode não fornecer os nutrientes necessários e em quantidades adequadas para a produção de toda a gama de metabólitos capazes de serem sintetizados por *B. subtilis*. Não se deve esquecer também que, em condições de meio de cultura, os fatores externos como pH, temperatura, umidade e oxigênio são controlados, o que não acontece no solo. Outro fenômeno que poderia estar envolvido neste aumento da nodulação por *R. phaseoli* seria a liberação de substâncias indutoras da nodulação nos solos.

Sabe-se que a infecção da planta pela bactéria simbiote ocorre em duas etapas. Na primeira, substâncias indutoras liberadas pela planta hospedeira, que são em sua maioria compostos fenólicos da família dos flavonóides, induzem a transcrição dos genes de nodulação do microssimbionte (Firmin et al., 1986; Zaat et al., 1989; Hungria et al., 1992). Na segunda etapa, as bactérias, pela ação dos genes da nodulação induzidos, produzem sinais que são responsáveis pelas modificações no fenótipo das raízes que ocorrem no estágio de pré-infecção como encurtamento e engrossamento da raiz principal, incremento no número de pêlos radiculares e deformação e encurvamento dos pêlos radiculares (Zaat et al., 1987; Van Brussel et al., 1996).

B. subtilis pode estar influenciando a nodulação na primeira fase, por meio do estímulo à liberação dos compostos fenólicos pela planta hospedeira, ou a própria bactéria libera no meio compostos semelhantes que estimulam as alterações no fenótipo da raiz como mostrou Araújo (1995), quando observou estímulo na emissão de pêlos radiculares e aumento na espessura das raízes pelos metabólitos de *B. subtilis*. Srinivasan et al. (1996) atribuíram o crescimento das raízes e consequentemente maior nodulação, observada em feijoeiro por *Rhizobium etli*, à produção de ácido indol acético (AIA) por isolados de *Bacillus* sp. que produziam este fitohormônio em meio de cultura, o que não ocorria quando utilizavam mutantes do *Bacillus* sp. que não produzia o ácido *in vitro*.

Outro aspecto que poderia interferir no processo de nodulação seria a alteração no ambiente da rizosfera. A competitividade do rizóbio é influenciada por diversos fatores relacionados com o genótipo da bactéria, da planta hospedeira e com diversos fatores ambientais (Bottomley, 1992; Streeter, 1994), sendo que *B. subtilis* pode alterar o ambiente através da redução da comunidade de fungos e bactérias e aumento de actinomicetos, como observado por Podile (1994), ou através de competição por fatores de crescimento e espaço, com possíveis agentes antagonistas ao *Rhizobium* ou patógenos da planta hospedeira presentes na rizosfera (Turner & Backman, 1991; Shen, 1997).

Segundo Siqueira (1993), a baixa tensão de oxigênio e a baixa disponibilidade de nitrogênio na rizosfera, provocada pela proliferação microbiana, favorecem a fixação biológica de nitrogênio. Este fenômeno pode ocorrer mais rapidamente quando uma elevada população microbiana é introduzida via sementes, como ocorreu no presente trabalho.

Conclusão

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que a utilização de *B. subtilis* é bastante promissora para aumentar a nodulação de raízes e promover o crescimento de plantas de feijoeiro.

Referências

- AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de riobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, n.2, p.565-568, 2002.
- ARAÚJO, F.F. Co-inoculação de bactérias: *Rhizobium* e *Bacillus*. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-CNPAP, 1994. p. 376-381 (Embrapa-CNPAP. Documentos, 46).

ARAÚJO, F.F. Efeito de *Bacillus* spp. e seus metabólitos na competitividade e nodulação da soja (*Glycine max* (L.) Merril) por *Bradyrhizobium* spp. 1995. 111 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ARAÚJO, F.F.; SILVA, J.F.V.; ARAÚJO, S.F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. *Ciência Rural*, v.32, n.2, p.197-203, 2002.

BALARDIN, R.S. Doenças do feijoeiro. In: FLESCHE, R. D. (Coord.). **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1992. p.195-225.

BESSON, F.; HOURDOU, M.; MICHEL, G. Studies on the biosynthesis of iturin an antibiotic of *Bacillus subtilis* and a lipopeptide containing B-hydroxy fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1036, p.101-106, 1990.

BIANCHINI, A.; MENEZES, J. R.; MARINGONI, A. C. Doenças e seu controle. In: IAPAR. **O feijão no Paraná**. Londrina, 1989. p.189-216. (IAPAR. Circular, 63).

BOTTOMLEY, P.J. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman Hall, 1992. p. 293-348.

FANCELLI, A. L. Fenologia e exigências climáticas do feijoeiro. In: FANCELLI, A. L. (Coord.). **Feijão irrigado**. Piracicaba: ESALQ-FEALQ, 1990. p.7-24.

FIRMIN, J. L.; WILSON, C.E.; ROSSEN, L.; JOHNSTON, A.W.R. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature*, v. 324, n.1, p.90-92, 1986.

GAIND, S.; GAUER, A.C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mugbean. **Plant and Soil**, v.133, n.1, p.141-149, 1991.

GRAHAM, P.H.; OCAMPO, G.; RUIZ, L.D.; DUQUE, A. Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. **Agronomy Journal**, v.72, n.4, p.625-627, 1980.

HALVERSON, L.J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* VW 85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.9, p.2767-2770, 1991.

HUNGRIA, M.; JOHNSTON, A.W.B.; PHILLIPS, D.A. Effects of flavonoids released naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on nodD-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.5, p.199-203, 1992.

JINDAL, K.K.; THIND, B.S. Microflora of cowpea seeds and its significance in the biological control of seed borne infection of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. **Seed Science and Technology**, v.18, p.393-403, 1990.

KATARIA, H.R.; YADAV, J.S.; GARG, F.C.; GROVER, R.K. Inactivation of seed treatment fungicides by Rhizobium. **Pesticide Science**, v.16, n.4, p.337-340, 1985.

LAZZARETTI, E. **Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis***. 102 p. 1993. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, v.54, n.1/2, p.89-96, 1997.

LI, D.M.; ALEXANDRER, M. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v.108, n.1, p.211-220, 1988.

LUZ, W.C. Controle microbiológico do mal do pé do trigo pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, n.1, p.82-85, 1993.

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

MELO, I.S.; VALARINI, P.J.; FAULL, J.L. Controle biológico de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, supl., p.342, 1995.

MERRIMAN, P.R.; PRICE, R.D.; KOLLMÖGEN, J.F.; PIGGOTT, T.; RIDGE, E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.25, p.219-226, 1974.

PERES, J.R.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.T. Fixação do N₂ em leguminosas cultivadas em solos de cerrados. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Coord.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 213-218.

PHAE, C.; SODHA, M. Investigation of optimal conditions for separation of iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.71, n.2, p.118-121, 1991.

PODILE, A.R. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF-1 enhances seedling emergence, growth and nodulation of pigeonpea. **Indian Journal of Microbiology**, v.35, n.3, p.199-204, 1995.

RAMOS, M.L.G.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v.152, n.1, p.145-150, 1993.

RAPOSEIRAS, R.; PINTO, P.P.; PASSOS, R.V.M. Variabilidade de colônias isoladas de estirpes de *Rhizobium* efetivas na nodulação do feijoeiro, antes e após exposição a temperaturas elevadas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.2, p.149-154, 2002.

REEDY, M.S.; RAHE, J.E. Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of *Bacillus subtilis* inoculant in onion seedling rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, n.3, p.373-378, 1989.

ROSSAL, S.; McKNIGHT, S.E. Some effects of *Bacillus subtilis* (MBI 600) on the development of cotton and peanut. **Bulletin OILB/SROP**, v.14, n.8, p.88-92, 1991.

SHEN, D. Microbial diversity and application of microbial products for agricultural purposes in China. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.62, p.237-245, 1997.

SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of *Heterodera cajani* and *Fusarium udum* by *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Glomus fasciculatum* on pigeonpea. **Fundamental and Applied Nematology**, v.18, n.6, p.559-566, 1995.

SIQUEIRA, J.O. **Biologia do solo**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1993. 230p.

SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D.J.; HOLL, F.B. Influence of indoleacetic acid producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, n.10, p.1006-1014, 1996.

STREETER, J. G. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, n.5, p.513-522, 1994.

TURNER, J.T.; BACKAMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, v.75, n.4, p.347-353, 1991.

VALARINI, P.J. Manejo de doenças do solo em culturas de feijoeiro sob irrigação por pivô central. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOEIRO, 5., 1994, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: [s.n.], 1994. p.59-74.

VAN BRUSSEL, A.A.N.; ZAAT, S.A.J.; CANTER-CREMERS, H.C.J.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; TALK, T.; LUGTENBERG, B.J.J. Role of plant root exudate and Sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of Tsr factor which causes thick and short roots on common vetch. **Journal of Bacteriology**, v.165, p. 517-522, 1986.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; PERES, J.R.R. **Fixação biológica de nitrogênio em solos de cerrados**. Brasília: Embrapa-CPAC, 1994. p.83.

VENKATASUBBIAH, P. Efficacy of *Bacillus subtilis* as a biocontrol for rot of coffee pathogen. **Geobios**, v.12, n.3/4, p.101-104, 1985.

WELLER, D.M. Biological control of rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, n.3, p.379-407, 1988.

ZAAT, S.A.S.; SCHRIPEMA, J.; WIJFFELMAN, C.A.; LUGTENBERG, B.J.J. Analysis of the major inducers of the *Rhizobium* nod A promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different nod D genes. **Plant Molecular Biology**, v.13, n.1, p.175-188, 1989.

Embrapa

Meio Ambiente

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

