

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

RAFAEL DE ALMEIDA VIDAL FERES ROSIELLO

**TESTES DE CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA NA
PRODUÇÃO DE INÓCULO À BASE DE *Bacillus subtilis* SOBRE O
CRESCIMENTO DO TRIGO.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2017

RAFAEL DE ALMEIDA VIDAL FERES ROSIELLO

**TESTES DE CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA NA
PRODUÇÃO DE INÓCULO À BASE DE *Bacillus subtilis* SOBRE O
CRESCIMENTO DO TRIGO.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) do Campus Campo Mourão.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

Co-orientador: Prof. Me. Cristian Coelho Silva

CAMPO MOURÃO
2017



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Campo Mourão
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Departamento Acadêmico de Ambiental - DAAMB
Curso de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

TESTES DE CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA NA PRODUÇÃO DE INÓCULO
À BASE DE *Bacillus subtilis* SOBRE O CRESCIMENTO DO TRIGO.

por

RAFAEL DE ALMEIDA VIDAL FERES ROSIELLO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 20 de junho de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

Prof. Me. Cristian Coelho Silva

Prof. Me. Osvaldo Valarini Junior

Prof(a). Dr(a). Debora Cristina de Souza

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na coordenação do curso de Engenharia Ambiental.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Vera Lúcia de Almeida Vidal, por sempre ter confiado e protegido todos os seus filhos com unhas e dentes, demonstrando a guerreira que sempre foi. Sinto muito a sua falta. Você conseguiu realizar seu maior sonho, o de dar uma educação de qualidade para todos os seus filhos, para que possamos caminhar por nossas próprias pernas. Agradeço também a minha irmã, Lilian de Almeida Vidal Rosiello, meu irmão, Lucas de Almeida Vidal Rosiello, e meu pai, Marcelo Feres Rosiello, por me apoiarem nas minhas decisões e me acolherem quando preciso.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial ao Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno e o Prof. Me. Cristian Coelho Silva, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia. A Professora Dr(a). Cristiane Kreutz e Prof.(a) Dr(a) Márcia Aparecida de Oliveira, companheiras de caminhada ao longo do curso. Eu posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem o carinho, a paciência e a dedicação de vocês.

Agradeço a cada um que tive o privilégio de conhecer em meu intercâmbio para o Canadá. Em especial para a família Sorongon, que me deu o devido suporte em um momento difícil de minha vida, não deixando eu desistir dos meus sonhos.

Agradeço a todos que de alguma forma participaram desse período inesquecível de minha vida, repleta de emoções e crescimento pessoal. A todos os amigos da faculdade, em especial para Daniel Ferreira Tomaz, Henrique Gregg, Tamyris Tavares, Gigliolla BIASON, que fizeram parte da minha vida, dividindo o mesmo teto durante um bom período da graduação. Aos amigos, não menos importantes, Caio Evandro Santos, Júlio Barreto Cristófoli e Carolina Ballestrin pelo suporte e ajuda nesta última etapa do processo de graduação.

Por fim, agradeço a vida por ter me proporcionado as melhores sensações que eu poderia viver e por ter colocado as melhores pessoas possíveis para viver isso comigo. Enfim, um sincero obrigado a todos.

RESUMO

ROSIELLO, Rafael de Almeida Vidal Feres. **Testes de Concentrações de Manipueira na Produção de Inóculo à Base de *Bacillus subtilis* sobre o Crescimento do Trigo.** 2017. (43f). Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão - PR, 2017.

A preocupação com o impacto que a agricultura tradicional acarreta por utilizar em seu manejo agroquímicos para resultados mais imediatos, tem aumentado a demanda por pesquisas a procura de novas alternativas de aumento de produção sem haver a expansão das fronteiras agrícolas. O presente trabalho visou avaliar a efetividade de diferentes concentrações de manipueira, um subproduto industrial de alto potencial poluidor, usado como substrato no desenvolvimento da bactéria *Bacillus subtilis* como agente de controle biológico e promotor de crescimento de planta para fins de proteção agrícola de baixo custo de processo, aliado ao benefício de fornecer uma destinação adequada a um dos maiores passivos ambientais das indústrias de farinha e fecularias. Três meios foram formulados diferenciando-se na proporção de manipueira em sua composição. O meio 2 (M2) que dispunha da concentração de 45% manipueira, 45% água destilada e 10% melão se destacou dos demais chegando a concentração de aproximadamente 6×10^{11} UFC por grama do inoculante final produzido. A taxa de germinação do cultivo de trigo foi maior em todas as diluições, a diluição 0,5% obteve a maior taxa com 87,8% de sementes germinadas em 8 dias após o plantio, diferindo em 43,4% das amostras controle que tiveram 44,4% das plantas germinadas no mesmo período de tempo. Não houve diferença significativa entre o ganho de massa da raiz e do caule do cultivo ao utilizar o inóculo nas concentrações de 0,1% e 0,5% comparadas ao controle, porém as altas dosagens do inoculante afetaram o ganho de massa tanto da raiz quando do caule como também na estatura da planta.

Palavras-chaves: Biotecnologia. Biocontrole. Rizobactérias. Agricultura. Agroquímicos.

ABSTRACT

ROSIELLO, Rafael de Almeida Vidal Feres. **Concentration test on cassava waste in the Production of Inoculum based on *Bacillus subtilis* on Wheat Growth.** 2017. (43f). Completion of course work. Bachelor in Environmental Engineering. Federal Technological University of Paraná. Campo Mourão - PR, 2017.

The concern with the impact that traditional agriculture entails in using agrochemicals for more immediate results has increased the demand for research in search of new alternatives to increase production without expanding agricultural frontiers. The present work aimed to evaluate the effectiveness of different concentrations of manipueira, an industrial residue with great potential for pollution, used as a substrate in the development of the bacterium *Bacillus subtilis* as a biological control agent and plant growth promoter for the purpose of low cost agricultural protection of Process, together with the benefit of providing an adequate destination for one of the major environmental liabilities of the flour and starch industries. Three media were formulated differing in the proportion of manipueira in its composition. Medium 2 (M2) with a concentration of 45% manipueira, 45% distilled water and 10% molasses stood out from the others reaching the concentration of approximately 6×10^{11} UFC per gram of the final inoculant produced. The germination rate of wheat was higher at all dilutions, the 0.5% dilution obtained the highest rate with 87.8% germinated seeds at 8 days after planting, differing in 43.4% of the control samples with 44.4% of the plants germinated in the same period of time. There was no significant difference between root and stem mass gain when using the inoculum at concentrations of 0.1% and 0.5% compared to the control, however, the high inoculant dosages affected both the root gain when of the stem as well as in the stature of the plant.

Keywords: Biotechnology. Biocontrol. Rizobacteria. Agriculture. Agrochemicals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diluição seriada seguida por plaqueamentos para quantificação da densidade microbiana do inoculante final.....	12
Figura 2 - Sequência de procedimentos para determinação da concentração de microrganismos no inoculante líquido. Materiais necessários para a diluição em série (A); Contagem das placas após 24 horas aproximadamente (B).	13
Figura 3 - Sequência de placas de Bacillus subtilis em meio nutriente ágar.....	13
Figura 4 - Técnica de coloração de Gram.	14
Figura 5 - Visualização em microscópio do Bacillus subtilis após a coloração de Gram.	15
Figura 6 - Diluições do inoculante final em água destilada nas proporções de 0,1%; 0,5%; 1% e 5% mais o controle com apenas água destilada.....	16
Figura 7- Desenho experimental para o método de plantio utilizado no projeto.	17
Figura 8 - Visualização da bancada anteriormente a pesagem do peso fresco e acondicionamento das plântulas em sacos de papel Kraft para secagem.	20
Figura 9 - Visualização das três maiores plântulas de uma das amostras do experimento regado com diluição de 0,1%.	20
Figura 10 - Avaliação da concentração microbiana do Bacillus subtilis durante cinco dias consecutivos para cada um dos meios.	23
Figura 11 - Média de sementes germinadas por recipiente em oito dias de experimento.	24
Figura 12 - Altura média das plantas em milímetro nos dias 9, 12, 15 e 18.....	27
Figura 13 - Demonstração do efeito de cada diluição do inoculante biológico a base de Bacillus subtilis sobre o trigo ao final do experimento no décimo oitavo dia. Ordem das fotos: Controle, 0,1%, 0,5%, 1% e 5%.	28
Figura 14 - Número médio de folhas por planta nos dias 9, 12, 15 e 18.	29
Figura 15 - Comparação das médias de ganho de massa fresca e seca em estágio inicial e tardio de desenvolvimento do trigo.....	30
Figura 16 - Comparação das médias de ganho de massa fresca e seca em estágio inicial e tardio de desenvolvimento do trigo.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3 REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 A manipueira como um passivo ambiental	7
3.2 Possibilidades de utilização da manipueira.....	8
3.3 A bactéria <i>Bacillus subtilis</i> como agente de biocontrole	8
4 MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Estirpe de <i>Bacillus Subtilis</i>	10
4.2 O resíduo manipueira	10
4.3 Material vegetal.....	10
4.4 Avaliação do crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> em meio contendo manipueira.....	11
4.4.1 Contagem das unidades formadoras de colônia	12
4.5 Coloração de Gram	14
4.6 Avaliação da eficiência do produto biológico.....	15
4.6.1 Método de plantio.....	15
4.6.2 Desenho experimental	17
4.6.3 Análise das variáveis do desenvolvimento do cultivo.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 A produção do inoculante biológico	22
5.2 Análises do desenvolvimento do trigo.....	24
5.2.1 Taxa de germinação	25
5.2.2 Índice de velocidade de germinação	25
5.2.3 Tempo médio de germinação	26
5.2.4 Altura média da plântula	27
5.2.5 Número médio de folhas por planta	28
5.2.6 Fitomassa fresca e seca da raiz do trigo	29
5.2.7 Fitomassa fresca e seca da parte aérea do trigo	31
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Há tempos, as técnicas de agricultura são aprimoradas com objetivo de aumentar a produção, sem necessariamente, haver a expansão das fronteiras agrícolas. O controle químico foi usado de maneira contínua e indiscriminada durante anos, provocando alterações no ambiente através do acúmulo de resíduos no solo, na água e nos alimentos (JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

Entretanto, a preocupação da sociedade atual com o impacto da agricultura, é consequência da subsequente contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos, o qual vem alterando o cenário agrícola mundial. O cenário alterado tem causado maior demanda por alimentos isentos desses contaminantes, gerando assim mercados mais exigentes em relação à segurança alimentar (CARVALHO, 2006).

Assim, estratégias de biocontrole podem ser vistas como alternativa que visam preservar, restabelecer ou copiar os mecanismos naturais do controle biológico na agricultura. Tais estratégias foram concentradas em três grupos: o controle biológico inoculativo ou clássico, o reforço indireto dos agrossistemas por meio da diversificação de plantas e a preservação de espécies nativas, e por fim, o controle biológico gradativo inundativo (CARVALHO, 2006).

Para este trabalho, o controle biológico clássico será utilizado. Tal grupo baseia-se na exploração dos inimigos naturais de pragas na agricultura, coletados em áreas afetadas para então serem introduzidas nos locais de interesse (VACARI, 2015).

Os gêneros de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) mais estudados como agentes de controle biológico são: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Bacillus* (ARAÚJO, 2008). Os *Bacillus* spp. destacam-se pela tolerância a altas temperaturas, rápido crescimento em culturas líquidas, onipresença em solos, além de ser considerado um agente de biocontrole seguro de ser aplicado (SHODA, 2000).

Costa (2012) destaca duas características de promoção de crescimento de plantas de origem biológica, a solubilização de fosfato e a produção de compostos indólicos, hormônio vegetal capaz de regular o crescimento das plantas. Porém, segundo o mesmo autor, tais fatores não se aplicam simultaneamente, não havendo bactérias catalogadas capazes de executar as duas características previamente citadas ao mesmo tempo de maneira satisfatória.

A fixação de nitrogênio em plantas não-leguminosas também é citada como uma vantagem do uso de microrganismos para redução do uso de fertilizantes nitrogenados e fosfatados quimicamente. Tal uso diminui o impacto ambiental da lixiviação dos excessos desses produtos na agricultura como também o impacto da produção desses fertilizantes devido à alta exigência energética em seu processo de produção (PEDRINHO et al.; 2010).

A atividade microbiana na rizosfera pode afetar a aquisição de nutrientes minerais de maneira direta e/ou indireta, consequência da mobilização ou imobilização desses nutrientes no solo próximo as raízes ou por mudanças fisiológicas e/ou morfológicas advindas do processo de simbiose entre a planta e o micro-organismo, respectivamente (BABALOLA, 2010).

Diversos são os fatores que influenciam a eficiência das bactérias promotoras de crescimento vegetal, como por exemplo, a compatibilidade do microrganismo com a planta, a propriedade físico-química do solo, interações com a microbiota nativa, o clima da região entre outros, mostrando-se assim a importância de estudos na área em busca de agentes de controle biológico apropriados em cultivares específicos (COSTA, 2012).

Para a produção do inóculo à base de *Bacillus subtilis* será empregado diferentes concentrações de manipueira como meio de cultivo. Os meios de cultivo podem ser complexos ou quimicamente definidos, caracterizando assim o meio de cultivo a ser utilizado pelo projeto como complexo, o que significa de composição complexa e variável. Tal distinção se deve pela formulação do meio, com base em subprodutos industriais e extratos naturais como o melão, a milhocina, extrato de leveduras entre outros (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008).

Assim, o presente trabalho visa avaliar a efetividade de diferentes concentrações de manipueira, um subproduto industrial de alto potencial poluidor, usado como substrato no desenvolvimento da bactéria *Bacillus subtilis* como agente de controle biológico e promotor de crescimento de plantas para fins de proteção agrícola de baixo custo de processo, aliado ao benefício de fornecer uma destinação adequada a um dos maiores passivos ambientais das indústrias de farinha e fecularias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a efetividade de diferentes concentrações de manipueira na produção de inóculo à base de *Bacillus subtilis* sobre o crescimento do trigo.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar diferentes concentrações de manipueira como meio de cultura para desenvolvimento do *Bacillus subtilis*;
- Otimizar a reprodução dos microrganismos para pelo menos a concentração mínima de 10^9 unidades formadoras de colônia por mililitro da amostra (UFC/mL), sugerido por CARVALHO; HUNGRIA; MIURA, 2009.
- Monitorar o desenvolvimento do trigo tratado com o inóculo produzido;
- Testar diferentes concentrações do inóculo no desenvolvimento do trigo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A manipueira como um passivo ambiental

A água residual proveniente do processamento das raízes de mandioca apresenta-se com variadas concentrações em sua composição, principalmente com relação à matéria orgânica e ao potencial tóxico. A toxidez é decorrente de um glicosídeo cianogênico, denominado Linamarina, que por hidrólise gera glicose, acetona e ácido cianídrico (SANTOS, 2008). Originado na etapa de prensagem da massa de mandioca descascada e ralada das farinheiras, o teor de matéria orgânica deste resíduo pode chegar a 100g de DQO/L e ainda apresentar um alto potencial tóxico devido a Linamarina, que pode gerar 14mg/L de cianeto no meio (BARANA, 2000). A Lotaustralina também é citada pela sua toxicidade e acidez se não tratados, podendo contaminar o solo bem como seus organismos, a água, as plantas, além de apresentar um odor característico que pode atrair certos vetores de doenças, afetando assim a saúde pública (OKUNADE; ADEKALU, 2013).

A exposição aguda a níveis elevados de HCN, em humanos, causa um breve estágio de estimulação do sistema nervoso central (SNC) seguida de depressão, convulsões, coma e em alguns casos morte por falência respiratória (ATSDR, 2006). Em casos de exposição aguda a doses não-letais são comuns sintomas menos severos, como tontura, respiração ofegante, entorpecimento e cefaleias (ATSDR, 2006).

O potencial poluidor de uma fecularia de médio porte pode equivaler a um índice de poluição urbana de 150 a 250 habitantes/dia, necessitando-se do uso de lagoas aeróbias, decantação e polimento, sendo posteriormente, conduzido aos riachos e rios das proximidades. Porém, tal tratamento além de insuficiente na taxa de redução do potencial tóxico do resíduo é economicamente inviável em termos de investimento pela construção das lagoas, maquinário de oxigenação do líquido, sacrifício de áreas produtivas como também o treinamento dos operários (WOSIACKI; CEREDA, 2002).

Em um estudo de caso feito por Santos (2008) no município de Vitória da Conquista-BA, a destinação inadequada da manipueira restringiu a atividade econômica da região, por impor limites físicos de espaço destinado a industrialização, obrigando os produtores de farinha a reduzir suas atividades por impossibilidade de descarte destes resíduos nas proximidades das casas de farinha em determinadas épocas do ano.

Ainda segundo Santos (2008), o descarte da manipueira sem nenhum tipo de tratamento gera poluição em regiões com pouca disponibilidade de água de boa qualidade, como a região da bacia do rio Santa Rita, expondo moradores ao resíduo despejado e, em adição, podendo levar ao colapso de alguns processos naturais desse corpo receptor, como por exemplo: a capacidade de autodepuração do rio e a eutrofização do mesmo.

3.2 Possibilidades de utilização da manipueira

O resíduo manipueira pode ser aproveitado para diversas utilidades, seja para fazer tijolos, na alimentação animal, controle de pragas, doenças de plantas, produção de biogás, substrato para processos biotecnológicos, entre outras, mesmo sendo um potente agente poluidor, dezenas vezes maior quando comparado ao esgoto doméstico (SANTOS, 2008). A utilização de manipueira como matéria-prima nos processos biotecnológicos é uma alternativa viável que pode contribuir para uma redução dos custos de produção, diminuição dos impactos ambientais além de aumentar o valor econômico do resíduo (COELHO, 2011). O uso de manipueira no cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* B103 obteve resultados satisfatórios, obtendo-se como produto 41,58g/L de ácido lático em 48 horas de fermentação, sendo classificado pelo autor como um dos melhores resíduos para produção de ácido lático. Assim, conclui-se que o uso de manipueira como substrato para crescimento de certos microrganismos é viável.

3.3 A bactéria *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole

O gênero *Bacillus* spp. se enquadra no grupo de rizobactérias promotora de crescimento de plantas e bioproteção (RPCPBs) pela sua multiplicidade de mecanismos antagônicos, comprovada em vários estudos contra patógenos, auxiliando na germinação de sementes, no crescimento de plantas, como também no rendimento de grãos de vários cultivos como arroz, milho, feijão, dentre outras (LUZ, 2001; NGUGIA et al., 2005; YAO et al., 2006).

Os mecanismos de controle do antagonista são diversos, destacando-se o processo de antibiose, competição, parasitismo e predação. Em adição, possui também a capacidade de indução da defesa do hospedeiro, mostrando-se promissor para a agricultura (REMUSKA; PRIA, 2007).

O *Bacillus subtilis* promove o crescimento de plantas pela sua capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios além da melhoria nas condições do solo que acabam por influenciar na taxa de germinação e crescimento das plantas (RIBEIRO; SEI; LEITE, 2011). Produtos à base de *Bacillus subtilis* apresentam uma boa viabilidade no mercado devido a produção de metabólitos secundários que auxiliam no controle de diversos patógenos agrícolas, como também a capacidade de produção de endósporos resistentes a altas temperaturas, o que garante sua permanência no local de tratamento por longo período de tempo (VOSS, 2013).

A demanda crescente do uso de inoculantes biológicos vem se intensificando e gerando mudanças na legislação brasileira, limitando à concentração mínima de 1×10^9 células viáveis por grama ou mL do produto, valor este que proporciona no mínimo 1,2 milhões de células viáveis por semente (CARVALHO; HUNGRIA; MIURA, 2009)

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de produção do inoculante líquido deram início no mês de julho de 2016 nas dependências da empresa CELF – Energias Renováveis & Bioenergia de Campo Mourão, Paraná. Testes foram feitos semanalmente durante três meses utilizando o microrganismo *Bacillus subtilis* como componente biológico do inoculante final e o resíduo industrial de farinhas e fecularias, manipueira, como meio de cultura para esses organismos.

4.1 Estirpe de *Bacillus Subtilis*

A cepa de bactéria utilizada nos testes pertence ao isolado de *Bacillus subtilis* denominado UFPEDA – 764 em concentração previamente informada em rótulo de 3×10^9 UFC/mL de um inoculante líquido comercial.

4.2 O resíduo manipueira

O resíduo de mandioca, manipueira, utilizado neste trabalho foi adquirido em uma indústria de farinha da cidade de Araruna nominada Mandionorte Indústria e Comércio de Farinha Ltda., no estado do Paraná. Uma amostra de 2000mL deste resíduo foi encaminhada para o laboratório de análises ambientais e agronômicas, Acqua Sollus, para a análise de sua composição química (Tabela 1) a respeito dos macronutrientes inertes neste resíduo.

Tabela 1 - Composição química do resíduo de manipueira para macronutrientes.

pH	Nitrogênio (g kg ⁻¹)	Fósforo (g kg ⁻¹)	Potássio (g kg ⁻¹)
4,0	53,20	94,00	64,00

4.3 Material vegetal

O material vegetal destinado à avaliação da promoção de crescimento pelo inoculante biológico produzido foi o cultivar CD 1104 de trigo, categoria C1, lote 01/341 da safra de 2015/2015. Tais sementes foram adquiridas na Fundação Pró-Sementes em Campo Mourão-PR sem nenhum tratamento prévio.

4.4 Avaliação do crescimento de *Bacillus subtilis* em meio contendo manipueira

A metodologia de avaliação da concentração do agente biológico *Bacillus subtilis* em meio manipueira foi adaptada de Cardoso (2009) em sua dissertação a respeito da multiplicação do *Bacillus subtilis* em vinhaça.

Três meios foram formulados diferenciando-se na proporção de manipueira em sua composição (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição dos meios de cultura formulados para teste de promoção de crescimento

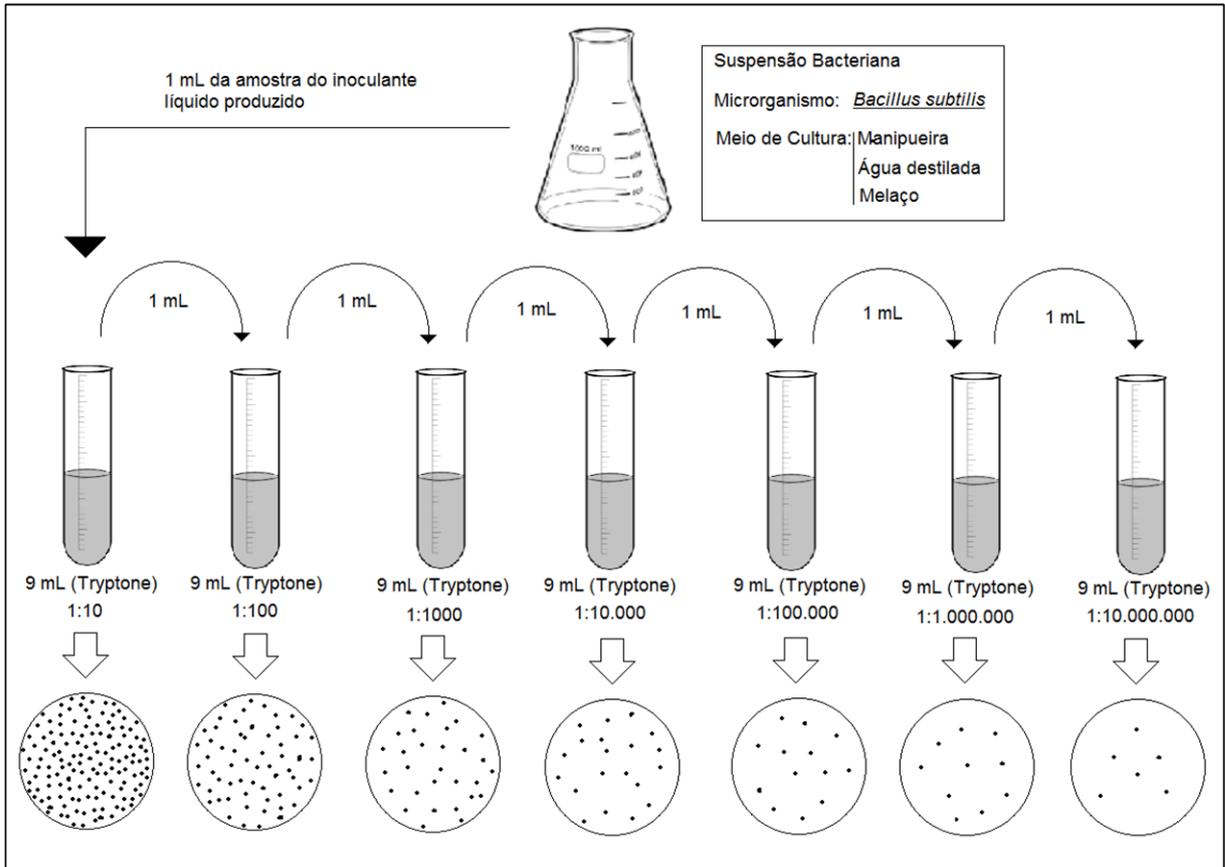
	Meio 1 (M ₁)		Meio 2 (M ₂)		Meio 3 (M ₃)	
	Volume (mL)	Relação (Manipueira/Melaço)	Volume (mL)	Relação (Manipueira/Melaço)	Volume (mL)	Relação (Manipueira/Melaço)
Manipueira	62,5	15:1	125	5:1	250	8:1
Melaço	4		25		30	
Água Destilada	187,5		125		55	

Para cada um dos meios foram formulados no mínimo 250 mL, separando-se esse volume em 5 Erlenmeyer com 50 mL do meio em cada um deles para os testes de crescimento em quintuplicata. Posteriormente, um grama do inoculante líquido comercial contendo as cepas de bactérias foi adicionado em cada Erlenmeyer e levado a mesa agitadora por 5 dias consecutivos a 160 rpm a fim de averiguar o crescimento das unidades formadoras de colônia em plaqueamentos diários.

Adicionalmente, devido ao baixo pH (< 4) do meio produzido, uma correção do pH para 7 (neutro) com solução de hidróxido de sódio 10% mostrou-se necessário para todas as formulações supracitadas, favorecendo a promoção de crescimento desses organismos no meio em estudo.

A metodologia para determinação da concentração de unidades formadoras de colônia existente em 1 mL do inoculante líquido produzido consiste em plaqueamentos em placas de Petri contendo ágar nutriente em triplicata, posteriormente à diluição seriada (Figura 1).

Figura 1 - Diluição seriada seguida por plaqueamentos para quantificação da densidade microbiana do inoculante final.



Fonte: Autoria própria.

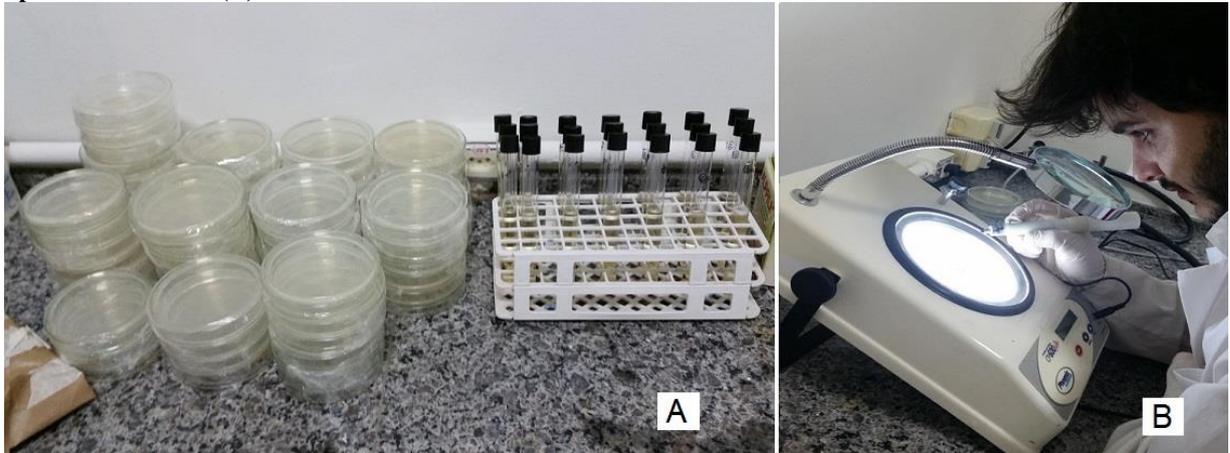
4.4.1 Contagem das unidades formadoras de colônia

A equação (1), utilizada para o cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC) existente em um mililitro de inóculo, foi retirada da metodologia para controle de qualidade de produtos biológicos a base de *Bacillus* da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2012).

$$(UFC/mL) = n^{\circ} \text{ médio de colônia na placa} \times \text{diluição da amostra} \times 10 \quad (1)$$

A metodologia empregada como base o uso das três últimas diluições advindas da diluição seriada anteriormente ao plaqueamento em nutriente ágar. As placas ideais para contagem das colônias são representadas pela faixa de 30 a 300 UFC por placa. A figura 2 a seguir ilustra a sequência de procedimentos para a coleta dos fatores da multiplicação da fórmula apresentada anteriormente.

Figura 2 - Sequência de procedimentos para determinação da concentração de microrganismos no inoculante líquido. Materiais necessários para a diluição em série (A); Contagem das placas após 24 horas aproximadamente (B).

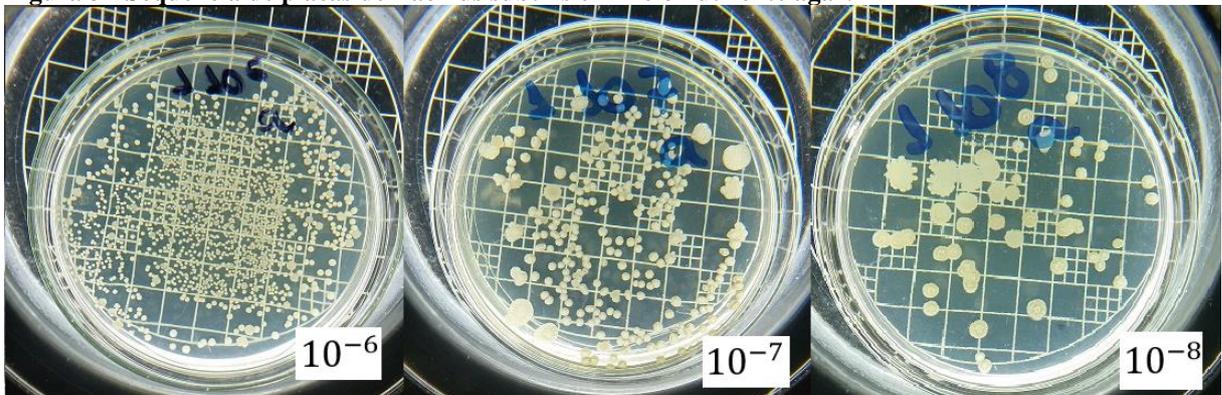


Fonte: Autoria Própria.

Diariamente, para cada um dos 5 Erlenmeyer contendo 50 mL do inoculante, foi feita uma diluição seriada em busca da diluição apropriada ou ideal para contagem das unidades formadoras de colônia. Os plaqueamentos das respectivas diluições foram feitos em triplicata para o cálculo da média quantitativa das unidades formadoras de colônia. Após a determinação da diluição ideal para contagem, o cálculo pôde ser feito multiplicando os fatores encontrados por 10, este 10 representando os 100µL de suspensão que foram plaqueados.

Cada um dos valores de concentração microbiana foi retirado da média aritmética das placas em triplicata. Um exemplo de placa ideal é a que podemos observar na diluição 10^{-8} da (Figura 3), contabilizados 52 UFC na placa com nutriente ágar, resultando na concentração aproximada de 5×10^{10} UFC/g do inóculo final produzido.

Figura 3 - Sequência de placas de *Bacillus subtilis* em meio nutriente ágar.

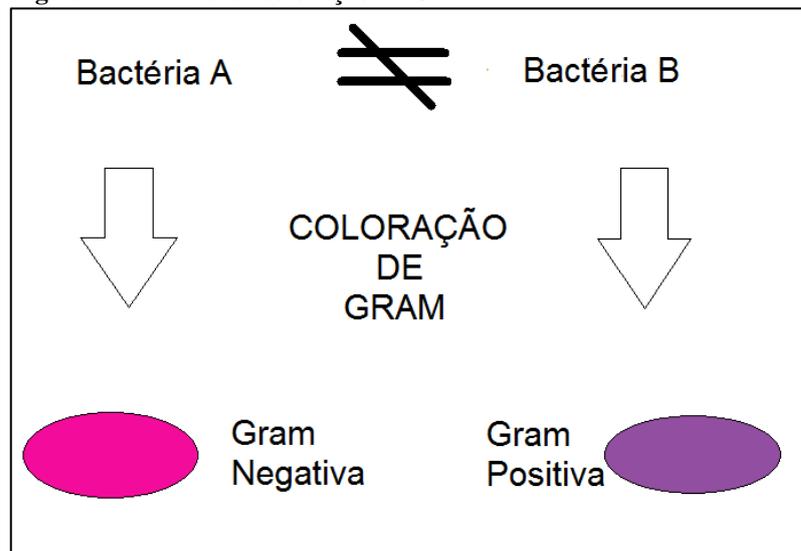


Fonte: Autoria Própria.

4.5 Coloração de Gram

A técnica de coloração de Gram (Figura 4), baseia-se em diferenciar espécies bacterianas em dois grupos, bactérias gram-positivas e gram-negativas. Tais grupos diferenciam-se na composição de suas paredes celulares como também em suas propriedades químicas e físicas. Tal técnica também ajuda na análise morfológica do organismo, auxiliando na identificação (EATON et al., 2005).

Figura 4 - Técnica de coloração de Gram.



Fonte: Autoria Própria

Ao final de cada dia de contagem, todas as placas passavam por uma vistoria rápida para averiguação da uniformidade da morfologia dos organismos nos mesmos, buscando placas livre de contaminantes. Contudo, quando alguma placa mostrava-se com diferentes morfologias das colônias, a coloração de Gram era feita para a diferenciação desses em Gram positiva e negativa como também para confirmar a presença do *Bacillus subtilis* de acordo com sua coloração roxeada, sendo uma bactéria representante do grupo Gram positiva, como também pelo seu formato de bastonete (Figura 5).

Figura 5 - Visualização em microscópio do Bacillus subtilis após a coloração de Gram.



Fonte: Autoria Própria.

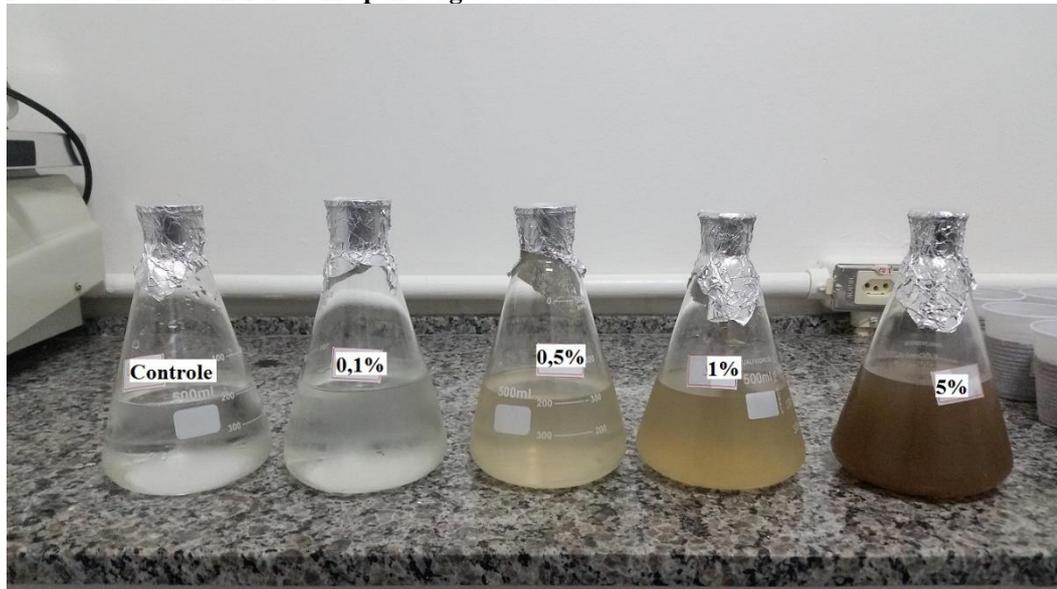
4.6 Avaliação da eficiência do produto biológico

4.6.1 Método de plantio

A semeadura das sementes de trigo foi feita em 50 recipientes plásticos, sendo estes divididos em 5 grupos com 10 exemplares cada, diferenciando-se entre si nas concentrações do inóculo. As concentrações de 0,1%, 0,5%, 1% e 5% do inóculo que apresentou o melhor resultado de UFC/mL na etapa anterior foram utilizadas para a rega do trigo diariamente, totalizando 40 do total dos 50 recipientes plásticos requeridos previamente. Os 10 recipientes restantes foram utilizados para o controle das amostras, sem a adição do inóculo na cova das plantas, utilizando-se apenas água destilada para a rega.

No preparo do solo, foram homogeneizados o mesmo volume de areia mais vermiculita expandida fina. Tal mistura foi esterilizada em autoclave (121 °C, 1 atm.) por aproximadamente uma hora para garantir apenas a presença do *Bacillus subtilis* no meio após sua inoculação (CARISSIMI, 2006). Completou-se cada recipiente com aproximadamente 3/4 ou 30mm de profundidade do composto para então serem plantadas as nove sementes em cada recipiente. Ao final do plantio, iniciou-se a rega com 20 mL do inoculante produzido nas mesmas proporções do meio que obteve a maior concentração microbiana na etapa anterior da pesquisa. Tais regas foram feitas diariamente, diferenciando as amostras pelas diluições do inoculante final produzido, como pode ser visto na Figura 6 a seguir, representando o Controle, a solução 0,1%, 0,5%, 1% e 5%, respectivamente.

Figura 6 - Diluições do inoculante final em água destilada nas proporções de 0,1%; 0,5%; 1% e 5% mais o controle com apenas água destilada.



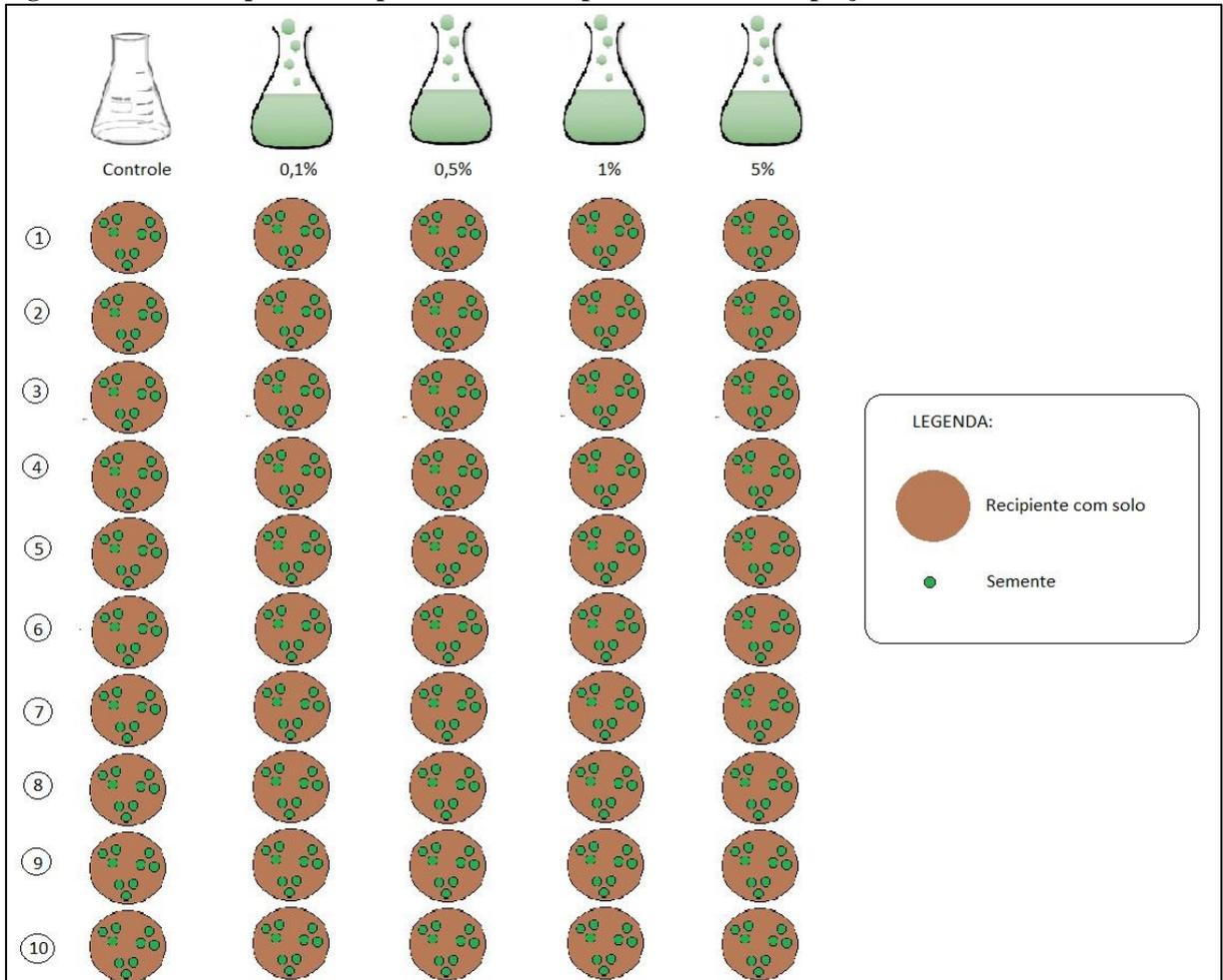
Fonte: Autoria Própria

Em adição, uma solução de NPK 30:10:10 foi adicionado a cada três dias em cada recipiente a partir do oitavo dia de germinação em todas as amostras, inclusive no controle para os testes de desenvolvimento do cultivo. Ao longo de todo o processo, os trigos eram armazenados em câmara germinadora (BOD) a 20°C e fotoperíodo de 14 horas (CARISSIMI, 2006).

4.6.2 Desenho experimental

Com a finalidade de facilitar o entendimento da metodologia proposta para o método de plantio, um croqui foi elaborado conforme a figura 7 a seguir.

Figura 7- Desenho experimental para o método de plantio utilizado no projeto.



Fonte: Autoria Própria

4.6.3 Análise das variáveis do desenvolvimento do cultivo.

Nove variáveis foram utilizadas para auxiliar na avaliação do inóculo sobre o desenvolvimento do trigo (*Triticum* spp.). Dentre as nove variáveis, cinco foram realizadas no estágio inicial de desenvolvimento da plântula, sendo elas: a taxa de germinação (TG), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), fitomassa fresca das partes aéreas e das raízes das plântulas e pôr fim a análise da fitomassa seca das partes aéreas e das raízes das plântulas. As outras quatro variáveis foram analisadas em estágio tardio de desenvolvimento, contando com as análises da altura da planta, do número médio de folhas por planta, como também a fitomassa fresca e seca das partes aéreas e raízes das plantas (LACERDA et al., 2011).

Foram contabilizadas diariamente, após a semeadura, as plântulas emergidas em cada uma das unidades com o cultivo. Ao final do oitavo dia, pode-se analisar a taxa de germinação (TG) pela contagem do número de plântulas emergidas neste espaço de tempo como também o índice de velocidade de germinação (IVG). Já para a determinação do tempo médio de germinação (TMG), foi empregado como base o número de sementes germinadas diariamente no mesmo espaço de tempo (LACERDA et al., 2011).

O cálculo do índice de velocidade de germinação foi feito seguindo a fórmula proposta por Maguire (1962) mostrada na equação (2) a seguir. Segundo ele, quanto maior o índice, maior será a velocidade de germinação.

$$IVG = \frac{G_1}{T_1} + \frac{G_2}{T_2} + \frac{G_i}{T_i} \quad (2)$$

Onde:

IVG – Índice de Velocidade de Germinação

G₁ até G_i – número de sementes germinadas por dia

T₁ até T_i – Tempo de incubação em dias.

A fórmula para o tempo médio de germinação foi retirada de Carvalho e Carvalho (2009) e pode ser observada na equação 3 a seguir.

$$TMG = \frac{\sum N_i \cdot T_i}{\sum N_i} \quad (3)$$

Onde:

TMG – Tempo médio de germinação em dia

N_i – Número de sementes germinadas por dia

T_i – Tempo de incubação em dias

Uma balança analítica de precisão foi utilizada para a determinação da massa fresca e seca, das partes aéreas e das raízes das plântulas, tanto no estágio inicial quanto para o tardio do desenvolvimento do cultivo. A massa fresca determinada pelos pesos das partes logo após a colheita e a massa seca após três dias em sacos de papel Kraft a 65°C em estufa.

Os dados das variáveis de fitomassa fresca e seca, das raízes e da parte aérea da plântula, passaram pela análise estatística ANOVA de um critério para o tratamento e melhor visualização dos mesmos, como também para comparar estatisticamente as médias das massas encontradas nas amostras, ao nível de 5% de probabilidade, quando aplicado o teste de Tukey, utilizado para comparar cada uma das amostras entre si de acordo com o valor de “p”, sendo significativa a diferença se este for menor que 0,05.

Após a análise estatística ANOVA de um critério revelar todos os valores de $p_{(s)}$, indicando se há ou não significância entre os dados adquiridos entre as amostras, outro teste foi aplicado para averiguar se tal significância foi positiva ou negativa em relação ao ganho de massa das raízes e da parte aérea das plantas. O teste aplicado foi uma análise descritiva dos dados quantitativos de massa, em grama. Tais análises geraram gráficos que possibilitam a visualização geral dos resultados.

Foram retirados de cada amostra do experimento as três maiores plântulas para a realização da pesagem do peso fresco e posteriormente secagem das raízes e do caule do trigo em estufa durante 72 horas, tanto no estágio inicial quanto no tardio de desenvolvimento das mesmas. Para tal procedimento, cento e cinquenta saquinhos de papel Kraft foram feitos e identificados para a realização da secagem das plantas colhidas, como pode ser visto na Figura 8 a seguir.

Figura 8 - Visualização da bancada anteriormente a pesagem do peso fresco e acondicionamento das plântulas em sacos de papel Kraft para secagem.



Fonte: Aatoria Própria

Para a retirada das três maiores plântulas de cada compartimento foi necessário o auxílio de pinças para evitar ao máximo possível danificar os outros indivíduos presentes nas amostras. Logo após a colheita, passavam por uma lavagem rápida para a retirada da areia impregnada nas raízes e assim evitar maiores erros de pesagem.

A Figura 9 mostra uma das amostras da diluição de 0,1%, anteriormente as pesagens a fresco e empacotamento em papel Kraft para secagem.

Figura 9 - Visualização das três maiores plântulas de uma das amostras do experimento regado com diluição de 0,1%.



Fonte: Aatoria Própria.

As variáveis, altura da planta e número médio de folhas por planta foram analisadas a cada três dias até o décimo oitavo dia após o plantio, representado como o período de maior crescimento das plantas, totalizando 4 medições. Ao final dos dezoito dias do experimento, a massa fresca da raiz e da parte aérea da planta pode ser determinadas em estágio tardio de desenvolvimento da mesma.

Para o cálculo da altura média das plântulas foram utilizadas fotografias de cada um dos recipientes em um fundo com papel milimetrado, posicionado sempre no mesmo local. Os valores das médias foram retirados do somatório das alturas máxima de cada um dos indivíduos, dividido pelo número de germinações que ocorreram no recipiente em questão. Para cada um dos valores de altura máxima encontrados, observados no papel milimetrado, eram subtraídos 30mm representados pela camada de areia mais vermiculita fina expandida. Para a averiguação dos dados retirados do experimento, uma régua era utilizada sempre que necessário para a medição das plântulas.

As contagens do número de folhas por planta foram feitas a cada três dias, aproveitando a coleta de dado da altura da planta como também para fazer a rega com solução NPK 30:10:10.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A produção do inoculante biológico

Os dados mostram que a formulação do meio 2 obteve maior sucesso para o desenvolvimento do *Bacillus subtilis*, contendo até dez vezes mais microrganismos comparado aos demais ao final do processo (Tabela 3).

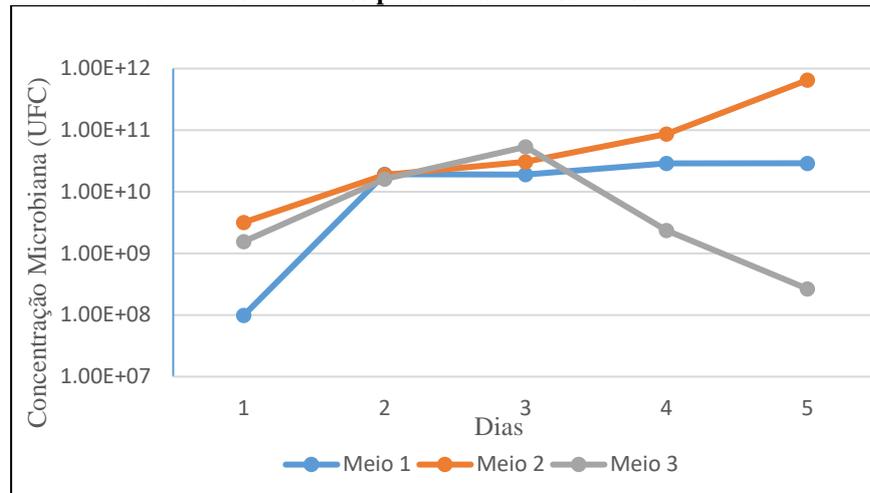
Tabela 3 – Concentração máxima de *Bacillus subtilis* encontrada em cada um dos meios.

	Meio 1 (M ₁)	Meio 2 (M ₂)	Meio 3 (M ₃)
Concentração máxima de microrganismos (UFC/g)	2,91x10 ¹⁰	6,49x10 ¹¹	5,36x10 ¹⁰

Fonte: Autoria Própria.

Observou-se (Figura 10) que todos os meios produzidos para teste obtiveram concentrações superiores a 1×10^{10} UFC/g em pelo menos um dos cinco dias após o início da semana de contagem, havendo um destaque para o meio 2 (M₂), formulado com 45% manipueira, 45% água destilada e 10% de melaço, que atingiu o valor de aproximadamente 6×10^{11} UFC/g no quinto dia de plaqueamento. O meio 3, representado pela maior concentração de manipueira no inoculante final, obteve seu ápice de concentração microbiana ao terceiro dia em mesa agitadora, chegando ao valor aproximado de 5×10^{10} UFC/g ao terceiro dia, porém, tal concentração diminuiu para 5×10^9 UFC/g no quarto dia e 6×10^8 UFC/g no quinto dia, diferenciando-se dos outros dois meios que continuaram sua ascensão em concentração de microrganismos durante os cinco dias.

Figura 10 - Avaliação da concentração microbiana do *Bacillus subtilis* durante cinco dias consecutivos para cada um dos meios.



Fonte: Autoria Própria.

Os possíveis diferenciais do meio com melhor desempenho estão relacionados provavelmente com sua composição mais equilibrada de nutrientes, uma vez que tem uma relação maniveira/melaço de aproximadamente 5:1. Essa relação com maior concentração de melaço e uma intermediária de maniveira pode ter sido o ponto ótimo de rendimento na multiplicação dos microrganismos. Principalmente pelo melaço ser um substrato rico em açúcares fermentescíveis e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio, sendo considerado um bom substrato para cultivo de bactérias ácido lácticas (DELGADO, 1975). Tal substrato complementa o preenchimento das necessidades nutricionais dos microrganismos, além de ser economicamente viável pelo baixo valor agregado ao produto (FELTRIN et al., 1998).

Em adição, nos ensaios com maniveira para multiplicação de *Trichosporon* sp., Efung e Wosiack (1998), obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde as condições de ensaio de concentração intermediária foram mais favoráveis para o desenvolvimento do microrganismo do que as de menor e de maior concentração. O autor explica que nas maiores concentrações, o nível de oxigênio é menor devido ao alto índice de matéria orgânica do meio, diminuindo a velocidade de formação de novas células. Já o meio de menor concentração há maior disponibilidade de oxigênio, porém, os microrganismos esgotam rapidamente os nutrientes disponíveis. Concluindo assim que as concentrações ideais para desenvolvimento de microrganismos são aquelas que alcançam o equilíbrio entre nutrientes disponíveis e oxigênio dissolvido no meio. O que pode justificar a maior concentração de microrganismos na formulação M₂, disponibilizando a carga de oxigênio e nutriente ideal para o desenvolvimento dos mesmos.

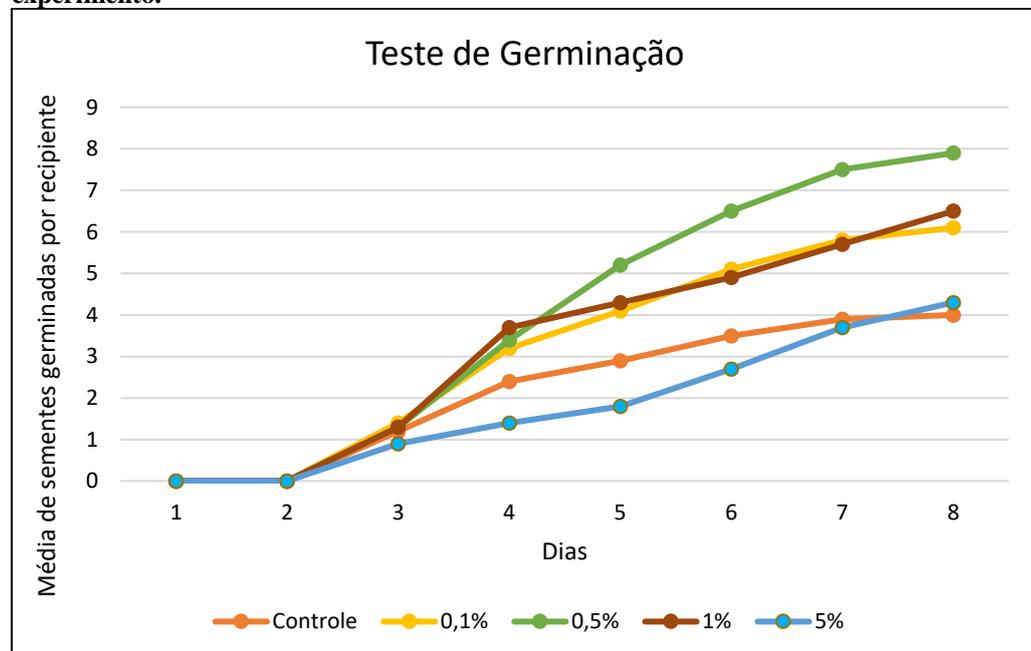
A utilização de manipueira como fertilizante é uma alternativa interessante para o reaproveitamento agrícola, pela possibilidade de transformar um resíduo problemático em um insumo orgânico para cultivar espécies, pela economia na composição e redução de impactos (CARDOSO, 2005)

Um novo teste de produção do inóculo com as mesmas proporções do meio 2 foi efetuado, chegando a concentrações muito próximas as alcançadas anteriormente, na faixa entre 1×10^{10} a 1×10^{11} UFC por grama do inoculante final, reafirmando sua eficiência e certificando que essa é a formulação mais equilibrada.

5.2 Análises do desenvolvimento do trigo

As primeiras aparições de sementes germinadas foram computadas ao terceiro dia em todas as diluições do inoculante, inclusive nas amostras controle. Ao final do oitavo dia após o plantio do trigo, foi possível analisar três das nove variáveis utilizadas para monitorar e avaliar o desenvolvimento do trigo de acordo com o teste de germinação (Figura 11).

Figura 11 - Média de sementes germinadas por recipiente em oito dias de experimento.



Fonte: Autoria Própria

5.2.1 Taxa de germinação

Todas as amostras de diluições mais o controle iniciaram suas germinações entre o segundo e o terceiro dia, contudo a diluição de 0,5% obteve destaque para o teste de germinação, chegando a uma taxa de 87,8% ou 79 sementes germinadas das 90 totais plantadas ao final do oitavo dia. As outras taxas de germinação em ordem decrescente foram 72,2%; 67,8%; 47,8% e 44,5% para as diluições 1%, 0,1%, 5% e o controle, respectivamente, com a menor taxa de germinação.

O mesmo efeito da inoculação de sementes com *Bacillus subtilis* sobre a emergência de plântulas, demonstrado nos cultivos de algodão e a soja, foi verificado no trabalho de Araujo (2008), pelo incremento nas emergências para todos os tratamentos do inóculo comparado ao controle. Já, Lazzareti e Bettioli (1997), encontraram respostas de aumento de emergências apenas para o cultivo de arroz utilizando o mesmo microrganismo, indicando a possível interação específica entre as estirpes de *Bacillus subtilis* e as culturas avaliadas. Esse efeito direto na germinação estimulando a emergência da plântula, pode ter relação com a acidificação da parede celular provocada pelo *Bacillus* durante o processo germinativo com ação de auxinas (ARAUJO, 2008).

5.2.2 Índice de velocidade de germinação

A diluição que apresentou o melhor índice de velocidade de germinação foi a diluição de 0,5%, obtendo-se como resultado o valor de aproximadamente 17,3. A segunda diluição que apresentou o maior índice foi a diluição de 1%, com o resultado de 14,7 sendo seguidos pelas diluições 0,1%, controle e 5% com os valores de 14; 9,7 e 8,7 respectivamente.

O teste é baseado no princípio que quanto maior a velocidade de germinação, mais vigorosas serão as plântulas (OLIVEIRA et al., 2009). Indicando assim a maior probabilidade da diluição 0,5% de gerar plantas mais vigorosas, comparada aos demais.

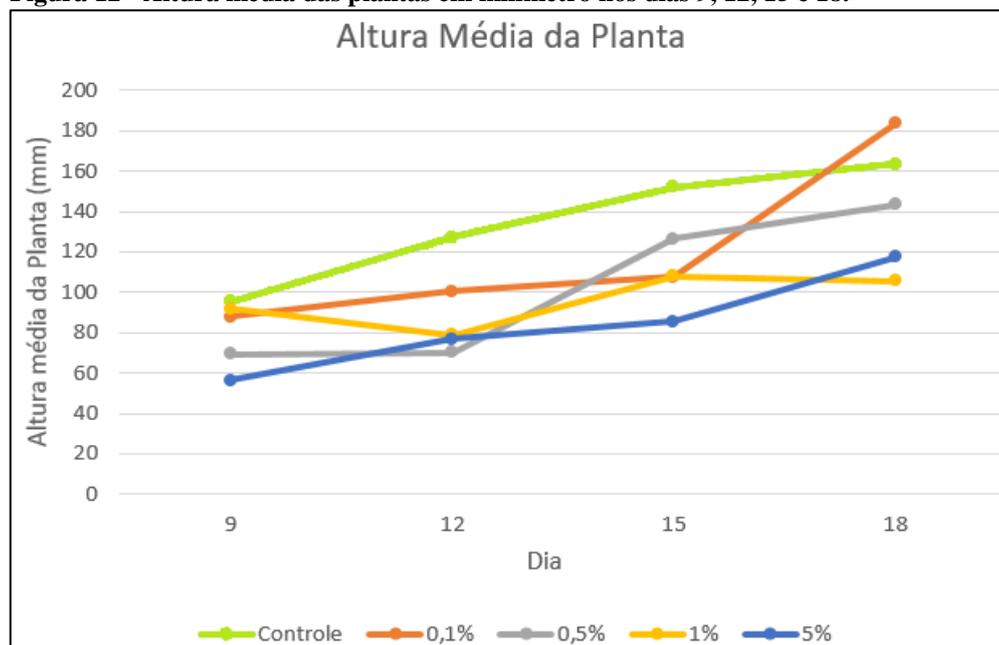
5.2.3 Tempo médio de germinação

O tempo médio de germinação para todas as diluições como também para o controle ficaram na faixa de 4,5 a 5,5 dias. Diferentemente dos outros dois parâmetros de germinação, as amostras que obtiveram o menor tempo médio de germinação, que corresponde ao resultado 4,5 dias, foram o controle, seguido de 4,8 dias para a concentração 0,1%, 5 dias para a diluição 0,5%, 5,4 dias para a 1% e finalmente 5,5 dias para o 5%. Como é evidenciado nos dados anteriores, conforme a concentração do inoculante biológico é aumentada, o tempo médio para germinação aumenta também. Porém, a diferença de tempo pode se tornar menos relevante levando-se em conta a taxa de sementes que germinaram ao final do oitavo dia, pois apesar do menor tempo médio de germinação ser das amostras controle, as mesmas possuem o menor porcentual de plântulas germinadas no mesmo espaço de tempo.

5.2.4 Altura média da plântula

Para a variável altura média das plântulas, a diluição que se destacou perante as demais foi a de 0,1% do inoculante biológico produzido, seguido do controle, 0,5%, 5% e 1% respectivamente (Figura 12). Pode-se observar, segundo o grau de inclinação da reta representada pela diluição 0,1%, que houve um aumento da altura média das plantas principalmente entre os dias 15 e 18, período em que as outras diluições, inclusive o controle, já estavam desacelerando seus crescimentos.

Figura 12 - Altura média das plantas em milímetro nos dias 9, 12, 15 e 18.



Fonte: Autoria Própria

O declínio da curva visualizado nas diluições 0,5% e 1% ao décimo segundo dia do experimento se deve ao fato de que o peso fresco do estágio inicial de desenvolvimento do trigo foi feito ao final do nono dia, posteriormente as medições de altura, onde foram retirados os três maiores exemplares em altura de cada um dos recipientes.

Observou-se que a concentração de 0,1% mostrou melhor desempenho no crescimento da parte aérea da planta. O controle e as demais concentrações foram menos eficientes mas com destaque para as maiores concentrações de inoculante, que apresentaram menor crescimento (Figura 13). Pode ocorrer de algum subproduto presente na formulação do inoculante ter efeito danoso ao crescimento nesse estágio de desenvolvimento das plantas de trigo quando em concentrações mais elevadas.

Figura 13 - Demonstração do efeito de cada diluição do inoculante biológico a base de *Bacillus subtilis* sobre o trigo ao final do experimento no décimo oitavo dia. Ordem das fotos: Controle, 0,1%, 0,5%, 1% e 5%.



Fonte: Autoria Própria

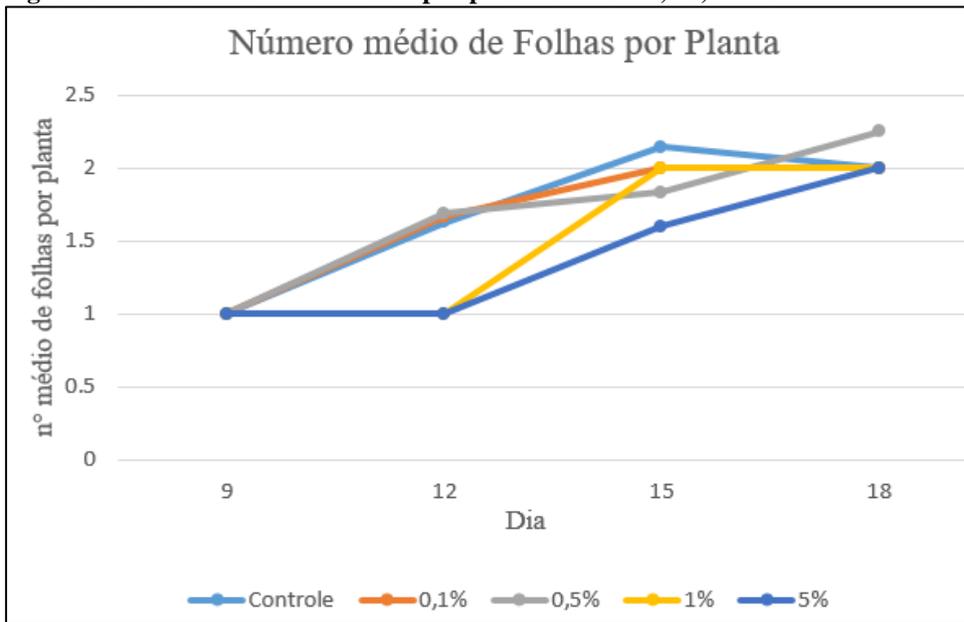
Assim como nesse estudo, Araujo (2008) observou que o milho respondeu à inoculação de *B. subtilis*, gerando o aumento da área foliar e altura das mesmas (ARAUJO, 2008). Cambolat et al (2006), em estudos com trigo e cevada, também tiveram resultados positivos de crescimento de plantas utilizando-se o inoculante a base de *Bacillus* sp. em suas regas, reafirmando a capacidade desse organismo de proporcionar um melhor desenvolvimento para esses cultivos.

A redução da estatura, segundo Penckowski et al. (2010), não é necessariamente um fator negativo para o desenvolvimento do cultivo do trigo, pois diminui os riscos de acamamento, tendência das plantas de caírem ao chão quando chegam a altas estaturas, o que compromete o desenvolvimento e a produtividade da cultura, além de evitar maiores gastos com redutores de crescimento químicos, manejo comum entre os agricultores para esse tipo de cultivo.

5.2.5 Número médio de folhas por planta

As maiores concentrações do inoculante biológico, representado pelas diluições 5% e 1%, levaram mais tempo para o surgimento da segunda folha do que os demais, que iniciaram logo na primeira coleta de dado. Porém, ao final do décimo oitavo dia, todas as diluições mais o controle terminaram com a média de 2 folhas por planta, exceto para a diluição 0,5% que terminou o experimento com a média de 2,25 folhas por planta (Figura 14).

Figura 14 - Número médio de folhas por planta nos dias 9, 12, 15 e 18.



Fonte: Autoria Própria.

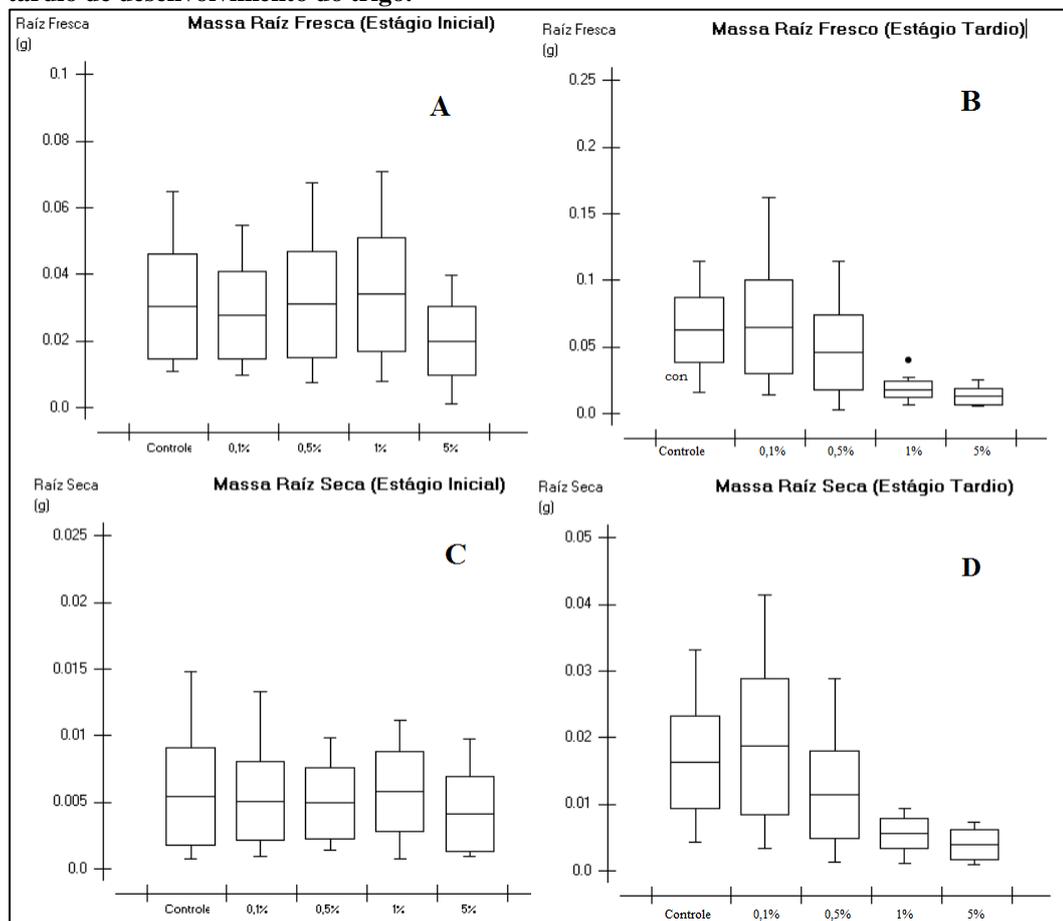
5.2.6 Fitomassa fresca e seca da raiz do trigo

Não houve diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) entre as variações das pesagens das raízes entre todas as diluições, inclusive com a controle, quando comparadas após a secagem (Figura 15C). Porém, as massas frescas das raízes em estágio inicial da planta diferiram estatisticamente entre as diluições 1% e 5% (Tukey, $p < 0,01$). As médias das massas em gramas apresentaram uma certa similaridade entre as diluições de 0,1%, 0,5%, 1% e o controle, já a diluição de 5% apresentou uma menor média de pesagens, diferindo estatisticamente dos demais (Figura 15A). Essa constatação está relacionada ao maior acúmulo de água por parte da planta quando fresca, sem necessariamente ter refletido no acúmulo de biomassa. Pode ocorrer que os microrganismos aumentem o metabolismo basal da planta, fazendo com que acumule mais água e não tenha, nesse estágio um papel efetivo no acúmulo de biomassa.

Há evidências de que o *Bacillus subtilis* induz a produção de fitormônios para o desenvolvimento radicular de vários tipos de cultivo. O cultivo de soja apresentou maior crescimento radicular quando inoculado com esses organismos (ARAÚJO et al., 2005).

Em estágio tardio de desenvolvimento, ao décimo oitavo dia, as médias das massas frescas e secas das raízes se comportaram da mesma forma, não havendo diferença entre o controle com a diluição de 0,1% e separadamente entre a diluição 1% com a 5% (Figuras 15B e 15D). Pode-se observar que as maiores concentrações no inoculante biológico, representadas pelas diluições 1% e 5%, afetaram negativamente a fitomassa das raízes, enquanto o maior valor médio de massa encontrado foi na diluição de 0,1%, porém não diferindo estatisticamente do controle.

Figura 15 - Comparação das médias de ganho de massa fresca e seca em estágio inicial e tardio de desenvolvimento do trigo.



Massa raiz fresca estágio inicial (A); Massa raiz fresco estagio tardio (B); Massa raiz seca estágio inicial (C); Massa raiz seca estagio tardio (D).

Fonte: Autoria Própria.

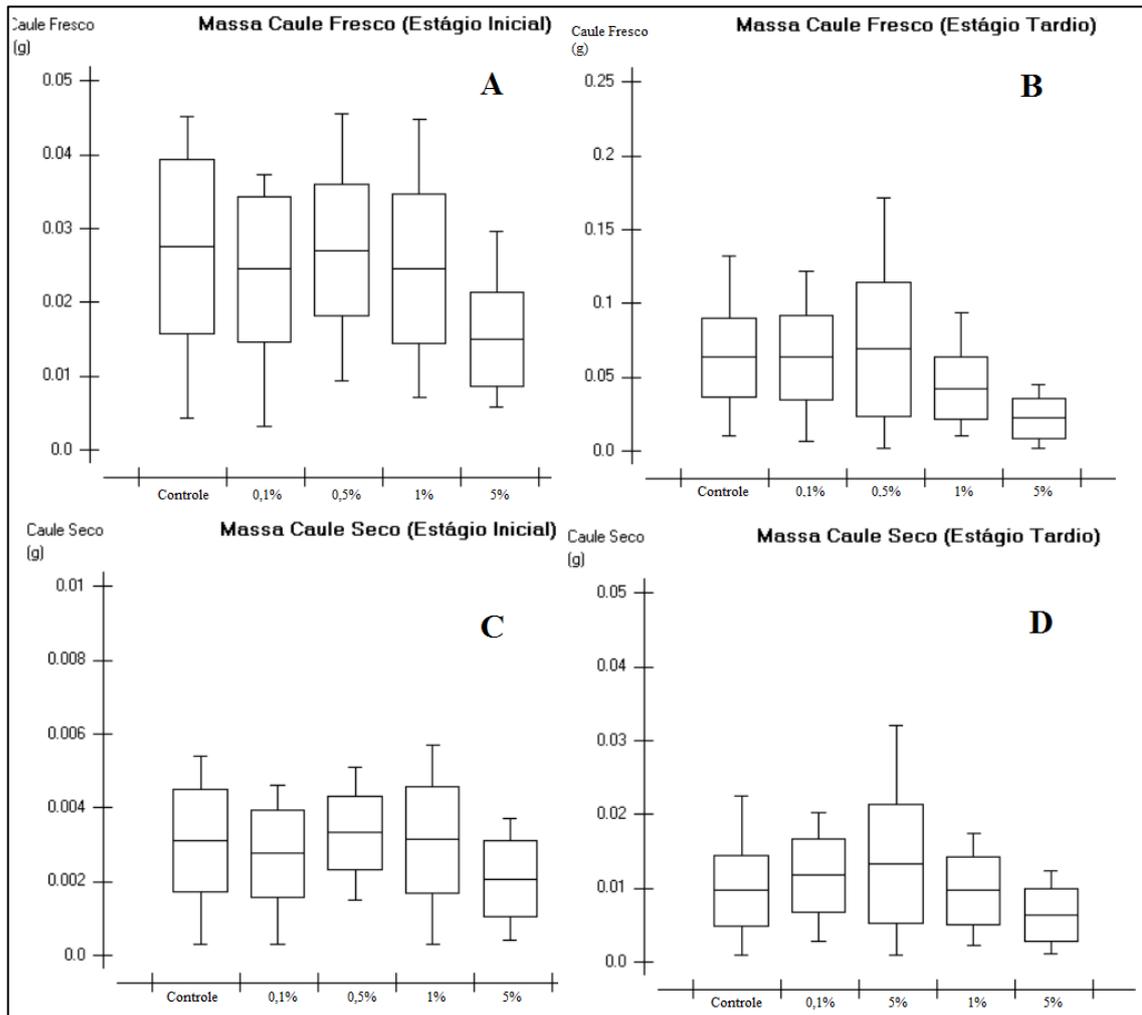
5.2.7 Fitomassa fresca e seca da parte aérea do trigo

A diluição de 5% também afetou negativamente no ganho de massa dos caules em estágio inicial de desenvolvimento do cultivo. Com uma significância de $p < 0,01$ (Tukey), todas as diluições mais o controle se diferiram estatisticamente da diluição de 5% (Figura 16A e 16C), onde esta última apresentou a menor média de massa de caule fresco e seco ao nono dia do experimento. Já para o estágio tardio, os caules tiveram resultados semelhantes aos encontrados pelas pesagens das raízes, não havendo significância entre as diferenças das médias encontradas pelas amostras regadas com inóculo em concentração de 1% com 5%, diferindo dos demais que apresentaram resultados semelhantes com diferenças não significativas $p > 0,05$ (Tukey) em termos estatísticos.

Os dados das pesagens das partes aéreas a fresco e seco, em estágio tardio de desenvolvimento do trigo (Figura 16B e 16D), mostraram que as duas maiores concentrações do inóculo afetaram no ganho de biomassa, sendo estes similares entre si. Como também mostra que as outras diluições se comportaram estatisticamente semelhante ao controle com maiores valores em massa para as partes aéreas.

Resultado semelhante foi verificado por Araujo e Guerreiro (2010), onde os isolados bacterianos avaliados não alteraram significamente a relação raiz/parte aérea de cultivos de milho.

Figura 16 - Comparação das médias de ganho de massa fresca e seca em estágio inicial e tardio de desenvolvimento do trigo.



Massa parte aérea fresco estágio inicial (A); Massa parte aérea fresco estágio tardio (B); Massa raiz seca estágio inicial (C); Massa raiz seca estágio tardio (D).

Fonte: Autoria Própria.

O aumento das dosagens de manipueira afetaram positivamente o ganho de massa fresca da parte aérea de cultivos de milho, utilizada como biofertilizante. Porém, segundo Barreto 2014, houve uma queda da altura das plântulas comparada as dosagens menos concentradas, indicando que concentrações brandas de manipueira pode ser usada como alternativa de adubação para culturas de milho. Os mesmos autores concluíram que o excesso de alguns nutrientes, provenientes da manipueira, afetaram negativamente o desenvolvimento dos cultivos de milho, destacando o elemento potássio.

A influência dos nutrientes é um dos fatores mais significativos para a qualidade do solo e posterior desenvolvimento da planta, podendo alterar o ciclo normal de desenvolvimento do cultivo se o solo não estiver em equilíbrio. Tais resultados indicam que o efeito deletério que os organismos regados com as duas diluições mais concentradas, 1% e 5%, seja derivada do alto valor de matéria orgânica (DQO) proveniente do resíduo manipueira usada como substrato para a formulação do inoculante biológico (SARAIVA, 2007).

6 CONCLUSÃO

A manipueira mostrou ser uma boa alternativa como meio de cultura para o desenvolvimento do *Bacillus subtilis*, chegando a concentrações de até 6×10^{11} UFC por grama do inoculante biológico quando formulado com 10% de melaço e corrigido o pH para 7, fornecendo mais células viáveis por semente do que o estabelecido pela legislação brasileira, sendo portanto efetivo para utilização como biofertilizante.

Já para a análise do desenvolvimento do cultivo de trigo, regado com diferentes concentrações do inoculante produzido, foi verificado um aumento da taxa de germinação de todas as diluições do inoculante quando comparadas com o controle, destacando-se a diluição 0,5% que obteve a maior taxa de 87,8% de sementes germinadas em 8 dias após o plantio, diferindo em 43,4% das amostras controle que tiveram 44,4% das plantas germinadas no mesmo período de tempo.

A concentração 0,5% também se destacou das demais para o cálculo do índice de velocidade de germinação, obtendo o maior valor entre as diluições e o controle, indicando assim a maior probabilidade de geração de plantas mais vigorosas. Porém, o controle foi o que obteve o menor tempo médio de germinação, com cerca de quatro dias e meio, não se distanciando do maior valor de tempo médio representado pela concentração 5% de 5 dias e meio.

Os testes de altura para o cultivo mostraram que o aumento das dosagens do inoculante reduzem a estatura das plantas, identificadas pelas maiores médias de altura para o controle e a diluição 0,1% e menores para 5% e 1%. Contudo, a menor estatura pode contribuir com o desenvolvimento da planta no futuro por diminuir o risco de tombamento, afetando a produção final de grãos.

Por fim, as análises a respeito da fitomassa fresca e seca, da raiz e do caule das plantas, mostraram que as menores concentrações do inoculante, representadas pelas diluições 0,1% e 0,5%, se comportaram estatisticamente iguais ao controle com maior média de massa de raiz e caule, quando comparadas com as diluições 1% e 5%. Mostrando assim que o inoculante a base de *Bacillus subtilis* pode ser efetivo para vários parâmetros de desenvolvimento do cultivo de trigo em dosagens amenas.

REFERÊNCIAS

- AYRES, Manuel; AYRES, Manuel Jr.; AYRES, Daniel L.; SANTOS, Alex S. S. **Análise de variância**. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém-PA. 2007.
- ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. **Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, Dordrecht, v. 21, p. 1639- 1645, 2005.
- ARAUJO, Fabio F. **Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão**. 2008. v. 32. n. 2. p.456-462. 2008.
- ARAUJO, Fabio F. GUERREIRO, Renato T. **Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural**. 2010. Ciênc. agrotec. vol.34 no.4 Lavras. 2010.
- ATSDR – **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. US DEPARTMENTE OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Toxicological Profile for Cyanide, 2006.
- BARRETO, Marcela T. L.; MAGALHÃES, Adriana G.; ROLIM, Mario M.; PEDROSA, Elvira M.R.; DUARTE, Anamaria de S.; TAVARES, Uilka E. **Desenvolvimento e acúmulo de macronutrientes em plantas de milho biofertilizadas com manipueira**. 2014. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental. v. 18. n.5. p. 487-494. 2014.
- BARANA, Ana C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Energia na Agricultura, Botucatu-SP, 2000.
- BABALOLA, Olubukola O.; **Beneficial bactéria of agricultural importance**. 2010. **Biotechnol. Lett.** v. 32. p. 1559-1570. África do Sul. 2010.
- CARDOSO, Éria. **Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo de milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho**. 2005. Dissertação de mestrado. Criciúma. 2005.
- CARISSIMI, Mariana. **Estudo da atividade antifúngica de *Bacillus* E164 contra *Bipolaris Sorokiniana***. 2006. Dissertação de mestrado. Porto Alegre. 2006.
- CARVALHO, Denise B.; CARVALHO, Ruy I. N.; **Qualidade fisiológica de sementes de guanxuma em influência do envelhecimento acelerado e da luz**. 2009. v. 31. n. 3. p. 489-494. 2009.
- CARVALHO, G. A. B.; HUNGRIA, M.; MIURA, L. M. **Análise e controle da qualidade de inoculantes microbianos de interesse agrícola: bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2009. Embrapa soja. p. 86-90. Londrina- PR. 2009.
- CARVALHO, Romulo S. **Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias**. **Bahia Agríc.** v. 7. n. 4. Cruz das Almas – BA. 2006.

- COELHO, Luciana F. **Isolamento e seleção de micro-organismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido láctico**. 2011. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. 2011.
- COSTA, Pedro B.; **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal de lavouras experimentais de arroz sob diferentes níveis de fertilização**. 2012. Dissertação (Mestre em genética e biologia molecular). Porto Alegre. 2012.
- DELGADO, A. A. **Tecnologia do açúcar e das fermentações industriais**. 1975. v.1. p.91. In: Tecnologia dos produtos agropecuários. Piracicaba. 1975.
- EATON, A. D.; CLESCERI, L.S.; RICE, E. W.; GREENBERG, A.E. **Standard methods, 2005 21st edition**. 2005.
- EFING, Luiza de M. A. C.; WOSIACK, Gilvan. **Estabelecimento de cultivos de uma cepa de Trichosporon sp. Isolada de manipueira**. 1998. B.CEPPA. Curitiba. v.16.n.1.p23-36. 1998.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Metodologia para controle de qualidade de produtos biológicos à base de bacillus**. 2012. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 2012.FELTRIN, Valdemar P.; SANT'ANNA, Ernani S.;
- PORTO, Anna C. S; TORRES, Regina C. O. **Produção de Lactobacillus plantarum em melão de cana de açúcar**. 1998. CEFET- Medianeira. 1998.
- GUIMARÃES, R.C.; SANSFIELD, C. Análise de variância. **Estatística**. p. 1-13. 2017.JUNIOR, Albino G.; SANTOS, Álvaro F. dos; AUER, Celso G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**. p. 155-165. Colombo- PR. 2000.
- LACERDA, Priscilla M.; RODRIGUES, Ronaldo F.; JÚNIOR, Hermínio A. N.; MALAFAIA, Guilherme; RODRIGUES, Aline S. L. Influência da irrigação com águas residuárias no desenvolvimento de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). **Rev. Acad. Cienc. Agríc. Ambient**. v.9. p. 159-168, Curitiba-PR, 2011.
- LAZZARETI, E.; BETTIOL, W. **Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de Bacillus subtilis**. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 54, p. 89-96, 1997.
- LUZ, Wilmar C. Evaluation of plant growth promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. 2001. **Fitopatologia Brasileira**. v. 26. p. 597-600. Passo Fundo-RS. 2001.
- MAGUIRE, J. D. **Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor**. Crop Science, Madison, v. 2, n. 1, jan./feb. 1962. 176-177p.
- NGUGIA, H.K.; DEDEJB, S.; DELAPLANEB, K.S.; SAVELLEA, A.T.; SCHERMA, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (Bacillus subtilis) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v.33, p.32-38, 2005.

OKUNADE, D.A; ADEKALU, K.O. Physico-chemical analysis of contaminated water resources due to cassava wastewater effluent disposal. **European International Journal of Science and Technology**, vol.2, 2013. OLIVEIRA, Anna C. S.; MARTINS, Gabriela N.; SILVA, Roberto F.; VIEIRA, Henrique D.; **Teste de vigor em sementes baseado no desempenho de plantas**. 2009. Inter Science Place. Ano 2. N 04. 2009.

PEDRINHO, Eliamar A.N.; JUNIOR, Renato F. G.; CAMPANHARO, João C.; ALVES, Lúcia M.C.; LEMOS, Eliana G.M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. 2010. **Bragantia**. v. 69. p. 905-911. 2010.

PENCKOWSKI, Luis H; ZAGONEL, Jerferson; FERNANDES, Eliana C. **Qualidade industrial do trigo em função do trinexapac-ethyl e doses de nitrogênio**. 2010. v.34. n.6.p. 1492-1499. Lavras. 2010.

PEREIRA JR, Nei; BON, Elba P. S.; FERRARA, Maria A. **Séries em biotecnologia: Tecnologia de Bioprocessos**. Escola de Química da UFRJ, Vol.1, Rio de Janeiro, 2008.

REMUSKA, Angie C.; PRIA, Maristella D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. No crescimento de fungos fitopatogênicos. 2007.

RIBEIRO, Rodrigo; SEI, Fernando B.; LEITE, Maria S. **Bacillus subtilis: agente de controle biológico e promotor de crescimento de plantas**. 2011. Acesso em: 23/05/2016. Disponível em:<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=24104&secao=Colunas%20e%20Artigos>.

SANTOS, Armínio. **Usos e impactos ambientais causados pela manipueira na microrregião sudoeste da Bahia-Brasil**. Aluno do Doutorado em Planificação Territorial e Gestão Ambiental, Universidade de Barcelona, 2008.

SARAIVA, Fernanda Z; SAMPAIO, Silvo C.; SILVESTRE, Marciane G.; QUEIROZ, Manuel M. F.; NÓBREGA, Lúcia H. P.; GOMES, Benedito M. **Uso de manipueira no desenvolvimento vegetativo do milho em ambiente protegido**. 2007. Rev. bras. eng. agríc. ambient. vol.11 no.1. 2007.

SHODA, Makoto. Bacterial control of plant disease. 2000. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 89. p. 515-521. Japão. 2000.

VACARI, Alessandra M.; **Bacillus thuringiensis apresenta eficiência no controle da traça-das-crucíferas**. 2015. Hortifrúti. Departamento de Fitossanidade, FCAV-UNESP. 2015. Acesso em: 21/06/2016. Disponível em: .

VOSS, Glenise B. **Produção de bacillus subtilis em biorreatores airlift e sua aplicação no controle de nematoides de galhas de tomateiro**. 2013. Dissertação (Curso de pós graduação em engenharia de alimentos). Florianópolis. 2013.

WOSIACKI, Gilvan; CEREDA, Marney P. **Valorização de resíduos do processamento de mandioca**. Faculdade de ciências agrônômicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita – Unesp, 2002.

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