

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

Sandra Regina Carvalho dos Santos

**Avaliação de bactérias isoladas de milho (*Zea mays*) e de camarão (*Litopenaeus vannamei*)
quanto ao potencial de antagonizar patógenos desta planta**

**Belo Horizonte
2017**

Sandra Regina Carvalho dos Santos

**Avaliação de bactérias isoladas de milho (*Zea mays*) e de camarão (*Litopenaeus vannamei*)
quanto ao potencial de antagonizar patógenos desta planta**

**Monografia apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia Aplicada do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito para a obtenção do
título de Especialista em Microbiologia.**

Orientador

**Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos
(Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG)**

Co-Orientadora: Ubiana de Cássia Mourão Silva

**Laboratório de Microbiologia Aplicada
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
UFMG Belo Horizonte**

2017

043 Santos, Sandra Regina Carvalho dos.

Avaliação de bactérias isoladas de milho (*Zea mays*) e de camarão (*Litopenaeus vannamei*) quanto ao potencial de antagonizar patógenos desta planta [manuscrito] / Sandra Regina Carvalho dos Santos. – 2017.

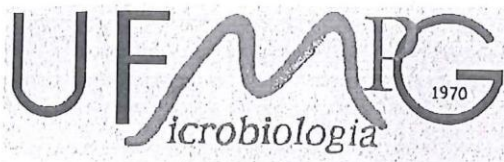
51 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos. Co-Orientadora: Ubiana de Cássia Mourão Silva.

Monografia (especialização) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Bactérias. 3. Endófitos. 4. *Zea mays*. 5. Antibiose. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Silva, Ubiana de Cássia Mourão. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



Caba
ou

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

Às 10:00 horas do dia 15 de dezembro de 2017, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Banca Debatedora constituída pela Profa. Regina Maria Nardi Drummond, Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG, Ms. Ubiana de Cássia Silva-coorientadora e Profa. Vera Lúcia dos Santos - Orientadora, para avaliar a Monografia intitulada "Avaliação do potencial de bactérias isoladas de milho (*Zea mays*) e de camarão (*Litopenaeus vannamei*) em antagonizar patógenos desta cultura", da aluna Sandra Regina Carvalho dos Santos. Após a apresentação oral pública seguida de uma arguição, a aluna foi APROVADA, considerando as sugestões feitas pela Banca debatedora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que será assinada pelos membros participantes da Banca Debatedora. Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2017.

Profa. Regina Maria Nardi Drummond Regina Maria Nardi Drummond

Ms. Ubiana de Cássia Silva - Co-orientadora Ubiana de Cássia Silva

Profa. Vera Lúcia dos Santos - Orientadora [Assinatura]

Profa. Vera Lucia dos Santos

Coordenadora do Curso de Especialização em Microbiologia

ICB/UFMG

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida, e por iluminar os meus caminhos abrindo portas para grandes oportunidades e por me manter perseverante perante os desafios.

À minha família, principalmente aos meus pais, Sônia e Evaristo, que por vezes não dormiam enquanto eu não chegava em casa e sempre fizeram de tudo para que eu concretizasse meus objetivos.

À professora Vera, minha orientadora, pela imensa paciência e disposição em me apresentar o “mundo das bactérias” e abrir as portas do laboratório de microbiologia aplicada para que eu pudesse obter um dos maiores tesouros desta vida que é o conhecimento. Aproveito aqui para me desculpar caso em algum momento a tenha desapontado.

À Ubi, anjo que entrou em minha vida e razão pela qual eu não desisti de realizar este trabalho. Em vários momentos, principalmente naqueles de dificuldade por conta do tempo escasso e inexperiência com as metodologias, pensei em desistir e deixar tudo de lado. Porém, me deparava sempre com a sua imensa boa vontade e paciência em me ajudar a executar este projeto, e a forma que achei de retribuir tão imenso carinho e dedicação foi não desistir. Não há palavras que transmitirão minha eterna gratidão a você.

A todos os integrantes do LMA, pelas gentilezas e disponibilidade em ajudar no que pudessem para execução dos meus experimentos. Em especial à Débora, Daliane e Aline, que além de contribuírem com seus conhecimentos também alegravam meu dia com seu bom humor e positividade, mesmo em momentos de dificuldade. Obrigada, vocês tornaram meus dias mais leves.

Aos meus colegas de Especialização pelo ano de troca de experiências e aprendizado, em especial Demian e Lídia, que sempre me incentivaram nos momentos em que pensei em desistir.

À minha chefia na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG, que foi compreensiva com relação à flexibilização do meu horário de trabalho e pelas ausências em compromissos de trabalho importantes, devido ao comprometimento que assumi com a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de formação.

Obrigada e que Deus abençoe a cada um imensamente.

Resumo

O milho é um dos mais importantes cereais no cenário agrícola mundial e brasileiro. Entretanto, assim como para muitas outras culturas, para sua produção em larga escala é necessária a adição de elevadas doses de insumos químicos, sejam eles fertilizantes ou pesticidas. A grande área plantada em conjunto com as técnicas de manejo que favorecem a permanência de microrganismos patogênicos no solo tem contribuído para a reincidência de doenças nesta cultura. Dentre os fitopatógenos mais importantes que acometem a cultura do milho, pode-se citar os fungos *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* e a bactéria *Pantoea ananatis*, sendo que a busca por estratégias de combate a estes microrganismos tem sido bastante incentivada e um dos métodos possíveis é o controle biológico, utilizando-se bactérias que antagonizam esses fitopatógenos. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de bactérias endofíticas de milho e outras isoladas do trato gastrointestinal da espécie de camarão *Litopenaeus vannamei* em antagonizar os fitopatógenos *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* e *Pantoea ananatis* e a bactéria gram positiva *Bacillus subtilis*, bem como investigar a propriedade surfactante/emulsificante das moléculas produzidas por estas bactérias antagonistas. Dos 36 isolados bacterianos avaliados, 31 bactérias apresentaram algum nível de atividade antagonista contra o patógeno *Colletotrichum graminicola*, 32 antagonizaram *Stenocarpella maydis* e 17 *Fusarium verticillioides*. O gênero *Bacillus* destacou-se quanto ao potencial antagonista, tendo seus representantes com os melhores resultados dentre as bactérias antagonistas e o fungo *F. Verticillioides* foi o patógeno mais resistente. Além disso, as estirpes RT2C-11, BC 6, BC 9 e BC5 estão nos grupos de melhores antagonistas para todos os fitopatógenos e apresentaram em seus extratos, compostos com atividade emulsificante. Assim, estes resultados sugerem o uso dessas bactérias em experimentos de inoculação de plantas, para validar seu potencial como agentes de controle biológico contra fungos patogênicos avaliados neste estudo.

Palavras chave: Bactérias; Endofíticos; Milho; Antagonismo.

Abstract

Maize is one of the cereals most important in the world and Brazilian agricultural scenario. However, like many other crops it is necessary to add high doses of chemical inputs as fertilizers or pesticides. The large area planted together management techniques that favor the permanence of pathogenic microorganisms in the soil, has contributed to increase the incidence of diseases. Among the phytopathogens of maize can be mentioned the fungi *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium verticillioides* and *Stenocarpella maydis* and the bacterium *Pantoea ananatis*. The search of strategies to combat these microorganisms is highly encouraged and one of the possible methods is biological control using bacteria that antagonize these phytopathogens. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of endophytic bacteria isolated of maize and others isolated from the gastrointestinal tract of shrimp species to antagonize these phytopathogens, as well as to investigate the surfactant / emulsifying properties of the molecules produced by these antagonistic bacteria. Of the 36 bacterial isolates evaluated against fungal phytopathogens, *P. ananatis* and positive gram bacteria *B. Subtilis* in the antagonism test by pairing was observed that 31 bacterias had antagonistic activity against the pathogen *C. graminicola*, 32 antagonized *S. maydis* and 17 were positive in the antagonism against the *F. verticillioides* fungus. The genus *Bacillus* stood out among the best results of the antagonistic bacteria and *F. Verticillioides* was the most resistant pathogen. Some of the bacteria, like RT2C-11, BC6, BC 9 and BC 5 are in the groups of best antagonists for all the phytopathogens and presented in their extracts compounds with high emulsifying activity. So, this results suggest the use of these bacteria in plant inoculation experiments for validation of the potential of these bacteria as agents of biological control.

Key words: Bacteria; Endophytes; Maize; Antagonism.

Sumário

1 Introdução.....	10
1.1 A cultura do Milho (<i>Zea mays</i>) e doenças.....	10
1.2 Microrganismos associados às plantas	12
1.3 Antagonismo e controle biológico.....	14
2 Objetivos	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3 Material e Métodos.....	17
3.1 Obtenção e ativação dos microrganismos	17
3.2. Avaliação da atividade antagonista por compostos solúveis.....	19
3.2.1. Obtenção dos Inóculos.....	19
3.2.2. Antagonismo Fúngico – Método Pareamento	19
3.2.3. Antagonismo bacteriano – Método de sobrecamada	20
3.3. Avaliação da atividade antagonista mediada pela produção de compostos voláteis.....	20
3.4. Avaliação da atividade surfactante e emulsificante dos isolados de <i>Bacillus</i> sp.....	21
3.5. Análise estatística	22
4. Resultado e discussão.....	22
5. Conclusão	30
6 Referencias	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura do Milho (*Zea mays*) e doenças

O milho é uma cultura de grande importância mundial, não apenas por seu papel econômico, como também pelo fator social. A produção total de milho na safra 2016/17 foi de 97,84 milhões de toneladas, a maior da história e 47 % superior à temporada anterior (USDA, 2018). O Brasil é o terceiro maior produtor deste cereal no ranking mundial, ficando atrás de Estados Unidos e China (CEPEA, 2018). Trata-se de um cereal versátil, com as mais diversas utilizações, fazendo parte tanto da dieta humana quanto animal, podendo ser utilizado na forma de farinha de milho, fubá, quirera, farelos, óleo, farinha integral, rações, etc. (DUARTE et al., 2011).

Diante da alta demanda de produção desta cultura ocasionada pelas diversas utilizações, este cereal possui elevada expressividade em área plantada. Isso traz consigo o estreitamento das relações patógeno-hospedeiro-ambiente que é intensificada pelo cultivo em áreas irrigadas, com mais de uma safra por ano e cultivos sucessivos, permitindo a perpetuação e o acúmulo de inóculo de patógenos no ambiente, culminando assim na incidência e severidade de muitas doenças (EMBRAPA, 2015).

Dentre as diversas doenças que podem acometer o milho, pode-se citar a mancha-branca, a antracnose, a podridão branca da espiga e a podridão rosada da espiga (PINTO et al., 2007). Diversos pesquisadores têm considerado a bactéria *Pantoea ananatis* como o agente causal da mancha branca no milho (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). Os sintomas iniciam pelo aparecimento, nas folhas, de manchas cloróticas aquosas do tipo anasarca, as quais se tornam necróticas de coloração palha (BOMFETI et al., 2007). Folhas com 10 a 20 % de severidade da doença apresentam uma redução na taxa fotossintética líquida em torno de 40 %, o que pode resultar em redução na produção de grãos em até 60 % ou mais quando o patógeno encontra as condições favoráveis de sobrevivência (FERNANDES & OLIVEIRA, 1997; GODOY et al., 2001; COSTA et al., 2012).

A antracnose, por sua vez, é causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* e está presente em todas as regiões onde se cultiva milho (FERNANDES & BALMER, 1990). Os danos causados a planta não são restritos à área foliar, mas também envolvem a podridão do colmo, resultando em morte prematura e acamamento das plantas (FERREIRA & CASELA, 2001). O acometimento do colmo deve-se ao fato de as lesões nas folhas servirem como fonte de inóculo para infecções neste tecido (BERGSTROM & NICHOLSON, 1999). Por sua vez, essa infecção compromete a translocação de água e de nutrientes do solo para os órgãos aéreos da planta afetando o rendimento potencial e a qualidade dos grãos (CHRISTENSEN & WILCOXSON, 1966). Os estudos de Cota e colaboradores (2009) demonstraram a interferência negativa nos grãos de milho acometidos por

Colletotrichum graminicola, em que se constatou que plantas doentes apresentaram uma redução média de peso na espiga de 28%, e no peso dos grãos de 27 %.

No caso das podridões de espiga, estas podem ser causadas por diversos fungos, incluindo *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora* e *Fusarium verticillioides*. Os dois primeiros podem provocar a podridão do colmo e mancha foliar (CASA & ZAMBOLIM, 2006). A associação destas duas espécies à mancha foliar pode ser baseada somente na sintomatologia, que se apresenta como lesões alongadas, grandes, com um pequeno círculo, denominado de ponto da infecção, que pode ser visualizado ao se observar o tecido foliar contra a luz, sendo o sintoma mais marcante da infecção (SILVA et al., 2012). No caso das podridões, não é possível determinar se a infecção é causada por *S. maydis* ou *S. macrospora* apenas com base nos sintomas, sendo necessária observação dos esporos característicos destas espécies (CASA & ZAMBOLIM, 2006). *S. maydis* apresenta picnídios subepidérmicos, globosos ou alongados, com coloração marrom-escuro a preta, paredes grossas, diâmetro de 150 a 300 µm e um ostíolo protuberante papilado. Os conidióforos são usualmente ausentes (SUTTON & WATERSTON, 1966; SUTTON, 1980). *S. macrospora* apresenta picnídio e conídios semelhantes aos descritos para *S. maydis*, porém seus esporos são 2 a 3 vezes maiores, medindo 44-82 x 7,5-11,5 µm e apresentando 1-2 septos (SUTTON & WATERSTON, 1966; SUTTON, 1980).

A colonização das espigas por *Fusarium verticillioides* pode ser sintomática ou assintomática. No primeiro caso, a presença de grãos ardidos é uma característica que pode ser observada (LANZA et al., 2013). Este fitopatógeno tem grande destaque por acometer uma variedade de cereais em todo o mundo e por ser uma espécie produtora de micotoxinas, substâncias que podem causar danos sérios à saúde humana e animal (DESJARDINS & PROCTOR, 2007). A principal micotoxina produzida pelo fungo *Fusarium verticillioides* é a fumonisina. (SANTIN, 2000; LEE et al., 2017).

Tais patologias que acometem o milho tem provocado queda de produtividade e da qualidade das sementes, gerando perdas econômicas consideráveis, por isso seu controle faz-se necessário (BRITO et al., 2008). O controle pode envolver várias medidas, tais como o uso de variedades resistentes, rotação de culturas, eliminação de plantas daninhas e controle químico (SANTOS et al., 2013). Este último, apesar de predominante devido à eficácia, apresenta como desvantagens a possível contaminação do ambiente, dos alimentos e dos animais, bem como pode provocar intoxicações ao trabalhador rural e consumidor final (MONRAD, 2009). Além disso, a utilização intensa de produtos químicos para o controle de doenças pode favorecer o surgimento de populações de patógenos resistentes aos produtos utilizados (COMPANT et al., 2005).

É interessante ressaltar que os produtos químicos registrados no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle das doenças aqui citadas possuem classificações toxicológicas que variam entre o medianamente tóxico à extremamente tóxico, e são enquadrados como muito perigosos ao meio ambiente na classificação de periculosidade ambiental (AGROFIT, 2017). Devido a isso, a utilização de tais produtos deve ser preferencialmente evitada, ou no mínimo reduzida. Além disso, existe uma demanda da sociedade por métodos que diminuam os índices de contaminação de alimentos por resíduos de agrotóxicos e os impactos causados pela agricultura no ambiente e, o que tem possibilitado o surgimento de métodos alternativos de controle, como a substituição de produtos químicos sintéticos por biológicos (MONRADI et al., 2009).

1.2 Microrganismos associados às plantas

As interações que os microrganismos estabelecem com as plantas podem ser classificadas em neutras, positivas ou negativas. A condição de neutralidade é considerada como a ausência de qualquer interação, o que é raro em ambientes naturais. Nas interações positivas (comensalismo, mutualismo e protocooperação), há vantagens seletivas para um ou ambos os organismos envolvidos, enquanto nas interações negativas (competição, amensalismo, parasitismo e predação), pelo menos um dos membros é prejudicado (SANTOS & MONTEIRO, 2015).

No que diz respeito à colonização, os microrganismos são encontrados em todos os tecidos vegetais, tanto na parte aérea como nas partes subterrâneas vegetais, sendo que grande parte está presente no ambiente rizosférico (GAIERO et.al., 2013; COMPANT et al., 2010). O termo rizosfera é utilizado para nomear a região do solo ocupada pelas raízes das plantas, sendo composta pela ectorizosfera (região na qual as raízes estão aderidas ao solo), pelo rizoplano (consiste na superfície externa das raízes) e as superfícies internas desta estrutura, denominada de endorizosfera (RAMOS & ESPINOSA-URGEL, 2002). Na região rizosférica ocorre a liberação de uma série de compostos que ao serem exsudados pelos tecidos radiculares formam um nicho bastante atraente para os microrganismos (DANTAS et al., 2009). Os exsudados são produzidos a partir do carbono fixado pelas plantas, possuindo composição variável de acordo com a espécie vegetal e com as características do solo, incluindo, em sua maioria, açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, que dependendo da sua constituição atraem ou repelem determinadas populações microbianas (COMPANT et al., 2010; CHANDRA & SINGH, 2016). Assim, para a colonização do ambiente rizosférico é necessária a interação dos microrganismos com tais exsudados presentes no solo, o que induz uma quimiotaxia microbiana em direção às raízes, constituindo o primeiro passo para a

colonização rizosférica (BAIS et al., 2004). Contudo, além da quimiotaxia por exsudados radiculares, a capacidade de utilizá-los, bem como de utilizar fontes de carbono complexas, a produção de fímbrias e secreção proteica são consideradas características importantes para o processo de colonização das raízes (LUGTENBERG et al., 2001; SHARMA et al., 2003). Outro aspecto importante é a capacidade de competir com a microbiota indígenas presentes do solo (Compant et al., 2010; AHMAD et al., 2011), uma vez que a elevada atividade microbiana exercida por esses seres leva a um estresse biótico devido a competição por nutrientes (WELLER, 1988). Há também o estresse abiótico rizosférico, que é gerado devido a produção de toxinas pelas plantas, que respondem a estresses externos. Tais toxinas exercem pressões seletivas na microbiota e, neste caso, são favorecidos aqueles microrganismos que possuem estratégias para lidar com esses compostos, como a retirada das toxinas de dentro da célula, produção de enzimas oxidativas de compostos aromáticos, e alteração da composição dos ácidos graxos e fosfolípidos da membrana (BAIS et al., 2006; Silva et al., 2016). A capacidade de expressar esses fatores determina a habilidade de um microrganismo de colonizar a rizosfera, o que é denominado competência rizosférica (HEIKKI et al., 2003; Souza et al., 2015; WELLER, 1988).

Entretanto, o contato entre plantas e microrganismos não se restringe ao ambiente rizosférico. Há também os microrganismos endofíticos que, assim como os microrganismos rizosféricos, fazem parte do microbioma vegetal e possuem importantes papéis no desenvolvimento das plantas (ROBINSON et al., 2016). São caracterizados como aqueles que colonizam o interior das plantas em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais sadios como raízes, ramos, folhas, frutos e sementes, sem causar danos à planta hospedeira (AZEVEDO & ARAUJO, 2007).

A diversidade endofítica de uma planta é dinâmica, sendo influenciada por fatores abióticos e bióticos, como condições do solo, biogeografia, espécies de plantas, interações inter/intraespecíficas e relações microrganismo planta, tanto no nível local, quanto em maiores escalas (GAIERO et al., 2013). Assim, a presença de um dado microrganismo em uma planta é o resultado da sua capacidade adaptativa frente ao conjunto de características favoráveis ou desfavoráveis associados a planta e pelas demais populações microbianas também presentes na planta (DANTAS et al., 2009). Existem mecanismos comuns entre grupos de bactérias que facilitam a colonização de um nicho endofítico, sendo que um dos mais comuns se refere ao fenômeno de "quorum sensing". O "quorum sensing" consiste no modo de comunicação entre bactérias utilizando-se de sinais químicos por pequenas moléculas difundíveis. A partir da liberação de tais moléculas como forma de sinalização, ocorre então o reconhecimento e adesão a uma superfície, a quebra de barreiras protetoras de plantas, invasão de tecidos e finalmente a colonização (OLIVEIRA et al., 2003; BOER et al., 2005).

As relações que os microrganismos endofíticos podem estabelecer com as plantas são várias. Bactérias endofíticas podem beneficiar as culturas vegetais por meio da promoção direta de crescimento vegetal, que envolve o aumento da disponibilização de nutrientes que ocorre pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato mineral e o fornecimento de substâncias como reguladores do crescimento de plantas como ácido indol acético (AIA), giberelinas, citocininas, etileno, aminoácidos (DÖBEREINER, 1995; BALDANI, 2005; GONZALEZ-LOPEZ et al., 2005). Além disso, algumas bactérias endofíticas possuem a capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis, conforme pode ser visto no trabalho de Tahir e colaboradores (2017) em que tais compostos produzidos por *Bacillus subtilis* SYST2 promoveram o crescimento de mudas de tomateiro, além de induzirem a expressão de genes envolvidos na biosíntese de auxina, giberelina, citocinina e etileno. Endofíticos podem ainda promover o antagonismo a fitopatógenos por meio da produção de antibióticos, bacteriocinas e biosurfactantes (BENEDUZI et al., 2012; MENDES et al., 2013).

1.3 Antagonismo e controle biológico

Estudos têm demonstrado o potencial de uso de alguns microrganismos como agentes antagonistas para o controle biológico de doenças em plantas (LANNA FILHO et al., 2010). Os mecanismos de ação utilizados por estes microrganismos para exercer o biocontrole dos fitopatógenos são diversos, podendo envolver a competição por nutrientes e parasitismo direto, secreção de enzimas hidrolíticas, bem como de quitinases e glucanases, e a produção de metabólitos bioativos voláteis e solúveis (SANTOS & MONTEIRO, 2015). As atividades biológicas exercidas por esses microrganismos, como a desestabilização da permeabilidade da membrana celular ou a atividade oxidativa, resultam na inibição do crescimento de patógenos (SANTOS & MONTEIRO, 2015).

Alguns gêneros de bactérias são descritos na literatura como promissores em biocontrolar o desenvolvimento de fitopatógenos, como é o caso de *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Bacillus* (SCHREY et al., 2008; PRATIWI et al., 2016; GOS et al., 2017). Com relação aos membros do gênero *Bacillus*, esses são gram-positivos, aeróbios, formadores de endósporos e são caracterizados pela morfologia de bastonetes com extremidades retas ou arredondados de tamanhos variáveis (PEREZ, 2014). Apresentam distribuição ubíqua, sendo encontrados em ambientes diversos como solos, argilas, pedras, poeira, alimentos, plantas, ar e trato gastrintestinal de insetos e animais e em ambientes aquáticos (NICHOLSON, 2002). Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura relatando antagonismo de membros do gênero *Bacillus* a patógenos de plantas tanto *in vitro* como *in vivo* (AHMAD et al., 2017; SARTORI et al., 2017; TAHIR et al., 2017; LI et al., 2018), o que demonstra o potencial destas bactérias para utilização como agentes de controle biológico em plantas.

Com relação ao trato gastrointestinal de animais aquáticos, bactérias probióticas que inibem patógenos pela liberação de substâncias antimicrobianas e estímulo da resposta imune não específica do hospedeiro têm sido usadas na carcinocultura, pois traduz-se em uma alternativa mais eficaz que a administração de antibióticos na saúde dos camarões (VERSCHUERE et al., 2000; RAMÍREZ et al., 2013). Por exemplo, Rengpipat e colaboradores (2000) observaram que *Bacillus S11* forneceu proteção contra doenças pela ativação da defesa celular imune e humoral, assim como estabeleceu uma exclusão competitiva no intestino do camarão. Em experimento conduzido por Dantas e colaboradores (2008), o uso de um probiótico comercial a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na água ou na ração influenciou positivamente a resistência de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* ao patógeno *Vibrio harveyi*.

Além disso, os membros deste gênero são considerados bons produtores de substâncias antimicrobianas, incluindo bacteriocinas e lipopeptídeos. *Bacillus subtilis* é uma espécie que pode ser citada como exemplo, uma vez que cerca de 4-5% de seu genoma é dedicado à síntese de antibióticos, possuindo assim um potencial para produzir mais de duas dúzias de compostos antimicrobianos (STEIN, 2005). Essa espécie também é capaz de exercer antagonismo por intermédio de mecanismos de competição por espaço e nutrientes, bem como pela síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008). No estudo conduzido por Touré e colaboradores (2004), a bactéria *Bacillus subtilis* GA1 foi capaz de inibir o crescimento de vários patógenos de solo, de pós colheita e de área foliar. Os mesmos autores também associaram o efeito da diminuição da incidência de mofo cinzento em maçã, causada por *Botrytis cinerea*, à capacidade de *Bacillus subtilis* GA1 de produzir lipopeptídeos, como a iturina, surfactina e fengicina.

Lipopeptídeos são moléculas de baixa massa molecular formados por peptídeos cíclicos ou lineares (ARNUSCH et al., 2012) e sua ação antimicrobiana pode estar associada a formação de poros condutores de íons e aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, sendo usados como agentes antimicrobianos, hemolíticos, antivirais, antitumorais e inseticidas (SCOTT et al., 2007).

A surfactina é um dos lipopeptídeos mais conhecidos e exibe atividade de superfície elevada (COOPER et al., 1981), sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN m⁻¹ para 27,9 mN m⁻¹ (ARIMA et al., 1968). Visando determinar o papel da surfactina no biocontrole de *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis* por *B. Subtilis*, BAIS e colaboradores (2004) testaram uma estirpe mutante, M1 com uma deleção do gene surfactina sintase e, portanto, deficiente na produção de surfactina. O *B. subtilis* M1 foi ineficaz como agente de biocontrole e também ineficiente na formação de biofilme na superfície das raízes. A partir destas observações os autores inferiram que a atividade antagônica está diretamente envolvida com a síntese de surfactina.

Além da surfactina, a Iturina A é um lipopeptídeo com atividade antifúngica com um espectro amplo de ação, o que a torna um agente de controle biológico potencialmente ideal com o objetivo de reduzir o uso de antifúngicos químicos na agricultura (SANDRIN et al., 1990; STEIN, 2005; ARREBOLA et al., 2010). A atividade antifúngica de *B. subtilis* pode ser atribuída, em grande parte, a este lipopeptídeo (ARREBOLA et al., 2010).

As Fengicinas também mantêm uma forte atividade antifúngica, especificamente contra fungos filamentosos (KOUMOUTSI et al., 2004; HOFEMEISTER, 2004). Seu mecanismo de ação é menos conhecido em comparação com outros lipopeptídeos, mas sabe-se que detêm potencial para alterar a estrutura da membrana celular e da permeabilidade de uma maneira dose-dependente (DELEU et al., 2005). Além destes compostos, o gênero *Bacillus* também é bem conhecido por produzir uma variedade de bacteriocinas. A Subtilina, por exemplo, é uma bacteriocina do tipo lantibiótico sintetizada por *Bacillus subtilis*, com atividade antimicrobiana contra diversas bactérias gram-positivas tais como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp. (COTTER et al., 2005).

Alguns trabalhos tem demonstrado a associação dessas moléculas lipopeptídicas com a capacidade de antagonizar patógenos. No trabalho realizado por Li e colaboradores (2016) foi demonstrada a capacidade de *B. amyloliquefaciens* SYBC H47 isolado de mel em antagonizar os fitopatógeno *Botryosphaeria dothidea*, agente etiológico da gomose no pessegueiro em ensaios *in vitro* e em condições de campo. A inibição foi associada à produção de lipopeptídeos e bacteriocinas, como a fenigincina e a bacilomicina, respectivamente. Estudo conduzido por Nigris e colaboradores (2018) também revelou a capacidade de *Bacillus licheniformis* GL174 produtora de lipopeptídeo de biocontrolar fitopatógenos *in vitro* e *in vivo*. A bactéria foi capaz de inibir o crescimento micelial *in vitro* dos fitopatógenos *Phaeoemoniella* spp, *Botryosphaeria* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora infestans*, e de reduzir o tecido foliar necrosado nos testes *in vivo*. Além disso, o sequenciamento de seu genoma revelou a presença de muitos genes codificadores de proteínas envolvidos no processo de biocontrole, como enzimas líticas, sideróforos e outros metabolitos secundários.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de bactérias endofíticas isoladas de milho e de camarão em antagonizar fitopatógenos de milho (*Zea mays*), bem como investigar o mecanismo relacionado à inibição.

2.2. Objetivos Específicos

a) Avaliar a capacidade antagonista de 23 bactérias isoladas de milho (*Zea mays*) e 13 bactérias isoladas de camarão (*Litopenaeus vannamei*) contra os fitopatógenos de milho *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis*, *Fusarium verticillioides* e *Pantoea ananatis* (gram negativa), além da bactéria *Bacillus subtilis* (gram positiva) por método de confrontação direta e pela produção de compostos voláteis.

b) Avaliar a produção de compostos com atividade emulsificante e surfactante pelas bactérias *antagonistas*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e ativação dos microrganismos

Foram utilizadas 36 bactérias pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais (Tabela 1). Destas, 23 são endofíticas isoladas de folhas, raiz e seiva da cultivar de milho híbrido Pioneer 30F35 Herculex (VIEIRA, 2015) e 13 foram isoladas de tecidos internos de camarão (*Litopenaeus vannamei*). As bactérias foram reativadas a partir dos estoques criopreservados a -80°C em meio TSA (Trypticase Soy Agar, Difco) utilizando o método de esgotamento por estrias seguido de incubação a 37°C por 48 horas. Posteriormente, foram feitos estoques em meio Ligniere (caldo nutriente 13 g L^{-1} ; ágar 7 g L^{-1} ; gelatina 5 g L^{-1} ; água destilada 1000ml) para uso nos experimentos do estudo. A identidade e origem dos isolados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Identificação de bactérias isoladas das folhas, raiz e seiva de milho e dos tecidos internos da espécie de camarão *Litopenaeus vannamei*

Código	Identificação	ORIGEM
BC 1	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>
BC2	<i>B. vallismortis</i>	
BC 3	<i>Bacillus subtilis</i>	
BC 4	<i>Bacillus subtilis</i>	
BC 5	<i>B. mojavensis</i>	
BC 6	<i>Bacillus subtilis</i>	
BC 7	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	
BM 1	<i>Bacillus megaterium</i>	
BC 8	<i>B. mojavensis</i>	
BC 9	<i>B. vallismortis</i>	
BC 10	<i>B. vallismortis</i>	
BC 11	<i>B. vallismortis</i>	
BC 18	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	
FT3C 14	<i>Staphylococcus warnei</i>	
RT2A 12	<i>Bacillus sp</i>	
RT3C 21	<i>Bacillus sp</i>	
RP3C 01	<i>Bacillus subtilis</i>	
SP2 12	nd*	
ST2 12	nd	
RT3C 11	<i>Bacillus sp</i>	
RT2C 11	<i>Bacillus subtilis</i>	
RT2A 16	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	
RP1A 35	<i>Leuconost holzapfelli</i>	
RT2A 10	<i>Bacillus safensis</i>	
RT3B 22	<i>Bacillus sp</i>	
FP1A 13	nd	

ST3 116	<i>Raoultella ornithinilyca</i>	
ST3 23	<i>Microbacterium sp</i>	
RT1C 219	<i>Pseudomonas mosseli</i>	
FP1A 16	<i>Obesumbacterium proteus</i>	
FP2A 32	ENTEROBACTERIACEA	
FP1C 12	<i>Serratia marcescens</i>	
RP2A 23	<i>Pseudomonas protengis</i>	
ST3 110	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	
RT2A 01	<i>Serratia marcescens</i>	
SP3 11	<i>Bacillus subtilis</i>	

*Nd: Não identificado

3.2. Avaliação da atividade antagonista por compostos solúveis

3.2.1. Obtenção dos Inóculos

Os inóculos bacterianos foram feitos a partir das bactérias ativadas por esgotamento em placas contendo TSA e incubadas a 37 °C por 48 h. Decorrido esse tempo, as colônias foram ressuspensas com o auxílio de uma alça de repicagem em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril e a concentração de células foi padronizada segundo escala McFarland n°1, equivalente a 3×10^8 UFC mL⁻¹.

3.2.2. Antagonismo Fúngico – Método Pareamento

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto o potencial de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos de milho pelo método qualitativo de culturas pareadas, que consiste na confrontação direta dos fitopatógenos pelas bactérias possíveis antagonistas através do cultivo numa mesma placa contendo meio de cultura sólido (MARIANO, 1993). Os fungos utilizados foram *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola* e *Stenocarpella Maydis*, gentilmente cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo.

Os ensaios foram conduzidos em placas contendo o meio Batata Dextrose Agar (BDA) (Acumedia), nas quais foram inoculados dois isolados bacterianos por meio de estrias simples, distantes 1 cm da borda da placa, formando um quadrado, de forma que as mesmas não se misturassem. Os três fungos fitopatogênicos foram previamente cultivados, em meio BDA a 30 °C por sete dias. Dessas placas foi retirado um cilindro de aproximadamente 5 mm das bordas das

colônias dos fungos, que foi transferido para o centro das placas contendo as bactérias próximas às bordas. Após um período de incubação de 10 dias a 30 °C, foram feitas medições do raio de crescimento fúngico na presença das bactérias antagonistas e da placa controle (placa sem adição de bactéria). Os resultados de inibição foram expressos como a diferença em cm entre o raio das colônias fúngicas nos ensaios controle e nos ensaios inoculados com as bactérias. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.2.3. Antagonismo bacteriano – Método de sobrecamada

Alíquotas de 3 µL das suspensões bacterianas padronizadas (Item 3.2.1) foram depositadas na superfície de placas contendo meio de cultura TSA, e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Concomitantemente, as bactérias reveladoras *Pantoea ananatis* e *Bacillus subtilis* foram crescidas em caldo TSB sob agitação de 180 rpm a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, as células das bactérias potencialmente produtoras de substâncias bioativas foram expostas por 20 min a vapores de clorofórmio, gerados após adição de 1 mL do reagente na tampa, para inativação celular. A seguir, as placas foram mantidas abertas por 20 min para evaporação do clorofórmio residual. Por último, adicionou-se às placas uma sobrecamada formada por 4 mL de meio TSB semi-sólido (0,6 % de ágar) na temperatura de 45-50 °C e 0,1 mL das culturas das bactérias reveladoras (*P. ananatis* e *B. subtilis*). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Ao final deste período, as bactérias que apresentaram colônias envoltas por halo de inibição de crescimento da bactéria reveladora foram consideradas produtoras das substâncias bioativas. Os halos foram medidos e os valores expressos utilizando-se a média e desvio padrão.

3.3. Avaliação da atividade antagonista mediada pela produção de compostos voláteis

Os isolados bacterianos que apresentaram atividade antagonista nos ensaios do método de pareamento contra os patógenos fúngicos e/ou bacterianos (indicativo de produção de substâncias solúveis) foram avaliados quanto ao potencial de produção de compostos voláteis, utilizando placas de petri subdivididas no centro e vedadas com filme plástico que não permite a passagem de ar, como descrito por Fernando e colaboradores (2004) com modificações. As divisões impedem o contato direto entre as bactérias antagonistas e os patógenos, permitindo associar a inibição de crescimento dos patógenos avaliados também a algum composto volátil.

Em um dos compartimentos da placa de petri, adicionado de meio TSA, foi estriada a bactéria e no segundo compartimento, contendo meio de cultura BDA, foi depositado um disco de

aproximadamente 5 mm de diâmetro dos fungos fitopatogênicos. Placas contendo apenas o disco do fungo em seu respectivo compartimento foram utilizadas no tratamento controle. As placas foram incubadas a 28 °C. Os raios das colônias dos fungos foram medidos e comparados quanto ao tratamento controle (placa inoculada apenas com o fungo fitopatogênico) no período em que o mesmo atingiu a subdivisão das placas. Os resultados de inibição da expansão micelial (IEM) dos fungos foram expressos como a diferença em mm entre o raio das colônias fúngicas dos ensaios controle e dos ensaios com bactéria. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.4. Avaliação da atividade surfactante e emulsificante dos isolados de *Bacillus* sp

O potencial de produção de substâncias tensoativas pelos 21 isolados de *Bacillus* sp. foi avaliado por meio da determinação da atividade surfactante (mN/m) e emulsificante (E24) de sobrenadantes das culturas livres de células, de acordo com metodologia descritas a seguir de acordo com Cooper (1981) e Nakano e colaboradores (1988), com modificações.

Inicialmente, foi feito um pré-inóculo das bactérias por meio da inoculação em tubos de ensaio contendo 3 ml de caldo Landy, composto por 20g de glicose, 5 gramas de glutamato ou arginina, 0,5 g MgSO₄, 0,5 g de KCl, 1 g de KH₂PO₄, 0,15g de FeSO₄.7H₂O, 0,016g CUSO₄. 5H₂O e 0,1% de extrato de levedura para 1000ml. Seguido de incubação sob agitação de 150 rpm por 24 horas a 30° C. Uma alíquota do pré-inóculo 1% (v/v) foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo 80 ml de Caldo Landy. Estes foram incubados por 48 horas a 30°C sob agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, as culturas de cada isolado foram centrifugadas a 10.000 x g, por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a avaliação da atividade emulsificante, surfactante e produção das biomoléculas.

Para avaliação da produção, o sobrenadante foi submetido a precipitação com HCL 5M (Quimex, São Paulo, SP, Brasil) ajustando o pH para 2,0. A suspensão foi mantida a 4°C por 18 horas. Após este período foi realizada nova centrifugação por 15 minutos a 10 000 x g a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Após evaporação da água remanescente por intermédio da utilização de *speed vacuum*, foi obtido um precipitado que teve sua massa determinada para cada um dos isolados de *Bacillus* avaliados.

A atividade emulsificante (E24) foi avaliada segundo o método descrito por Cameron e colaboradores (1988). Nos ensaios, alíquotas de 1 mL do sobrenadante de cada cultura foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 1,5 ml de tolueno. Cada tubo foi submetido à homogeneização vigorosa em agitador de tubo (Tipo Vortex) por 2 min e deixado em repouso por 24 h. O índice de emulsificação (E24) foi determinado pela divisão da altura da camada emulsionada

pela altura total do líquido contido no tubo, segundo a equação abaixo: $E_{24} = (\text{altura da camada de emulsão (cm)}/\text{altura (cm)total}) \times 100$.

A medida de tensão superficial foi avaliada nos sobrenadantes livres de células de cada isolado de *Bacillus* spp utilizando o tensiômetro Kruss modelo K100-MK2, equipado com placa de platina. As análises foram comparadas à tensão de água ultra pura ($71,63\text{mN m}^{-1}$).

3.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de média Scott Knott ao nível de significância de 5 % usando o programa SISVAR.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antagonista dos 36 isolados bacterianos testados frente aos fitopatógenos fúngicos, *Pantoea ananatis* e *B. Subtilis* estão apresentados na tabela 2. Do total de bactérias avaliadas, 31 apresentaram atividade antagonista contra o patógeno *C. graminicola*, 32 antagonizaram o fungo *S. maydis* e 17 inibiram o *F. verticilioides*. O gênero *Bacillus* foi aquele que mais se destacou nos ensaios de atividade antagonista, visto que 15 das 21 (75 %) bactérias pertencentes a este gênero antagonizaram todos os fitopatógenos confrontados no desafio (Tabela 2). *Bacillus megaterium* - BM1 foi o isolado que resultou na maior redução do crescimento do fungo *C. graminicola*, enquanto que os isolados *B. Vallismortis*- BC 9 e *Bacillus grupo subtilis* - BC 6 foram os mais eficientes contra os patógenos *F. verticilioides* e *S. maydis*, respectivamente. Diversos estudos têm observado a atividade de antagonizar patógenos de plantas por isolados do gênero *Bacillus*, característica que os torna potenciais candidatos a utilização no controle biológico contra diversos fitopatógenos (HANDELSMAN et al., 1948 & 1990; ASAKA & SHODA, 1996; RAUPACH et al., 1998; JACOBSEN et al., 2004; MCSPADDEN GARDENER & DRIKS, 2004; NELSON et al., 2014).

O fitopatógeno *F. verticilioides* foi o menos inibido pelas bactérias testadas. Contudo, dentre as 17 bactérias que apresentaram atividade contra este fungo, somente uma não pertence ao gênero *Bacillus*, qual seja *Raoultella ornithinolytica* ST3 116. Padrão semelhante foi descrito por Figueroa-López e colaboradores (2016), que observaram que de um total de 622 bactérias, 341 isolados de *Bacillus* inibiram este patógeno, com percentuais de redução variando de 53 a 99 %.

Com relação ao fungo *C. Graminicola* spp, foi observado um halo de inibição de 3,03 cm, que representa um percentual de inibição de 27 % em relação ao controle (4,13 cm) quando confrontado

com a bactéria *Bacillus megaterium* BM1. Pinheiro e colaboradores (2016) realizaram experimento semelhante, em que duas rizobactérias do gênero *Bacillus*, B23 e B14, diminuíram a expansão micelial de *C. graminicola* em relação a testemunha em 17,3 e 17,1, respectivamente. Kumar e colaboradores (2012) também investigaram a atividade antagonista de bactérias do gênero *Bacillus* contra os patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, e *Colletotrichum* spp. Após sete dias de incubação em meio BDA, foi constatada a inibição de todos os fitopatógenos avaliados, e o percentual de inibição foi em torno de 52,39 % para o *Colletotrichum* spp.

Para a bactéria fitopatogênica *P. ananatis*, 17 isolados apresentaram atividade antagonista, sendo o maior valor observado para o isolado *Bacillus grupo subtilis* BC1. O antagonismo de bactérias do gênero *Bacillus* frente a bactéria *P. ananatis* também já foi relatado por Karagoz e colaboradores, (2017). Estes autores observaram, ainda, que o halo de inibição formado pelas bactérias (20,33 mm) foi semelhante àquele produzidos pelos antibióticos estreptomicina (23,66), canamicina (21,33) e tetraciclina (20,00).

Tabela 2: Isolados bacterianos que apresentaram atividade antagonista contra os fitopatógenos fúngicos e bacterianos confrontados.

Isolado	Identificação	<i>C.graminicola</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>S.maydis</i>	<i>P. ananatis</i>	<i>B. subtilis</i>
BC 1	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	2,93 ±0,07d	1,70 ±0,21c	2,45 ±0,21d	0,70 ±0,00b	0,10 ±0,07 a
BC 2	<i>B. vallismortis</i>	2,48 ±0,14c	1,70 ±0,07c	1,90 ±0,35c	0,25 ±0,07a	0,40 ±0,07c
BC 3	<i>Bacillus subtilis</i>	3,23 ±0,07d	1,90 ±0,28c	2,55 ±0,07e	0,45 ±0,07b	-
BC 4	<i>Bacillus subtilis</i>	3,08 ±0,07d	1,75 ±0,14c	2,35 ±0,14d	0,40 b ±0,14	-
BC 5	<i>B. mojavensis</i>	3,13 ±0,07d	1,85 ±0,35c	2,65 ±0,14e	0,50 ±0,00 b	-
BC 6	<i>Bacillus subtilis</i>	3,13 ±0,07d	1,8 ±0,21c	3,15 ±0,78e	0,4 ±0,00b	-
BC 7	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	2,98 ±0,14d	1,95 ±0,07c	2,35 ±0,00d	0,40 ±0,07b	-
BM 1	<i>Bacillus megaterium</i>	3,03 ±0,07d	1,85 ±0,14c	1,90 ±0,14c	0,25 ±0,07a	-
BC 8	<i>B. mojavensis</i>	3,33 ±0,00d	1,93 ±0,14c	2,35 ± 0,07 d	-	-
BC 9	<i>B. vallismortis</i>	3,13 ±0,00d	2,03 ±0,14 c	2,20 ±0,21 d	-	0,25 ±0,00 b
BC 10	<i>B. vallismortis</i>	3,13 ±0,00d	1,83 ±0,14 c	2,35 ±0,00 d	0,40 ±0,14 b	0,20 ±0,00 b
BC 11	<i>B. vallismortis</i>	2,83 ±0,07 d	1,93 ±0,00 c	2,20 ±0,07 d	0,35 ±0,21 b	0,10 ±0,00 a
BC 18	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	2,83 ±0,07 d	0,80 ±0,35 b	0,30 ±0,00 a	-	-
FT3C 14	<i>Staphylococcus warnei</i>	0,35 ±0,07 a	-	2,40 ±0,07 d	-	-
RT2A 12	<i>Bacillus sp</i>	0,10 ±0,07 a	0,10 ±0,00 a	2,40 ±0,21 d	0,16 ±0,00 a	0,15 ±0,00

						a
RT3C 21	<i>Bacillus sp</i>	0,10 ±0,00 a	0,10 ±0,00 a	2,90 ±0,14 e	0,13 ±0,00 a	0,13 ±0,12 a
RP3C 01	<i>Bacillus subtilis</i>	0,35 ±0,35 a	0,35 ± 0,07 a	2,15 ±0,00 d	0,13 ±0,00 a	0,13 ±0,12 a
SP2 12	nd	1,0 ±0,57 b	-	2,70 ±0,14 e	-	-
ST2 12	nd	0,20 ±0,00 a	-	2,5 ±0,57 e	-	-
RT3C 11	<i>Bacillus sp</i>	0,1 ±0,00 a	0,10 ±0,14 a	2,45 ±0,07 d	0,17 ±0,00 a	0,17 ±0,00 a
RT2C 11	<i>Bacillus subtilis</i>	0,15 ±0,07 a	-	2,15 ±0,14 d	0,15 a ±0,07	0,15 ±0,00 a
RT2A 16	<i>Arthrobacter nicotinovarans</i>	-	-	2,55 ±0,35 e	-	0,20 ±0,00 b
RP1A 35	<i>Leuconost holzapfelli</i>	0,20 ±0,00 a	-	2,90 ±0,28 e	-	-
RT2A 10	<i>Bacillus safensis</i>	0,25 ±0,07 a	-	2,10 ±0,00 d		0,24 ±0,59 b
FP1A 13	<i>Pantoea sp</i>	-	-	-	0,12 ±0,00 a	0,12 ±0,00 a
ST3 116	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-	0,30 ±0,28 a	-	-	0,12 ±0,00 a
ST3 23	<i>Microbacterium sp</i>	0,35 ±0,35 a	-	3,0 ±0,14 e	-	-
RT1C 219	<i>Pseudomonas mosseli</i>	0,10 ±0,00 a	-	3,0 ±0,28 e	-	-
FP1A 16	<i>Obesumbacterium proteus</i>	0,50 ±0,14 a	-	-	-	-
FP2A 32	Enterobactereacea	-	-	-	-	0,15 ±0,00 a
FP1C 12	<i>Serratia marcescens</i>	0,30 ±0,14 a	-	0,75 ± 0,28 b	-	+
RP2A 23	<i>Pseudomonas protengis</i>	-	-	2,57 a5±0,35	-	0,57 ±0,60 d
ST3 110	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	0,35 ±0,07 a	-	2,95 ±0,00 e	-	-
RT2A 01	<i>Serratia marcescens</i>	0,25 ±0,07 a	-	1,60 ±0,00 c	-	-
RT3B 22	<i>Bacillus sp</i>	0,20 ±0,14 a	-	1,90 ±0,00 c	-	-
SP3 11	<i>Bacillus subtilis</i>	0,35 ±0,07 a	-	0,75 ±0,28 b	-	-

Os valores estão em centímetros. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Scott knott a 5% de significância. Média de duas repetições seguida por desvio padrão.

De acordo com os resultados da inibição da expansão micelial dos fungos fitopatogênicos frente a produção de compostos voláteis pelas bactérias antagonistas observa-se que o isolado *B. vallismortis* BC2 não apresentou inibição ao fungo *C. graminicola* no ensaio de avaliação de produção de compostos voláteis (Tabela 3), embora tenha inibido este fitopatógeno no ensaio de confrontação direta. Tal fato nos leva a inferir que este isolado não possui a característica de produção de composto volátil como mecanismo de inibição dos fitopatógenos. As bactérias que apresentaram maior percentual de inibição frente ao fungo *C. graminicola* foram RP1A-35 (*Leuconost holzapfelli*), RT1C-219 E ST3-110 (*Pseudomonas mossel* e *Pseudoclavibacter helvolus*), com valores de inibição da expansão micelial de 1,43cm, 1,34cm e 1,32cm, Isolados do gênero *Pseudomonas* com atividade antifúngica já foram descritos. Planchamp e colaboradores (2015), por exemplo, demonstraram a capacidade de *Pseudomonas putida* KT2440 em diminuir a área foliar infectada por *C. graminicola*. No experimento, as plântulas que foram inoculadas apresentaram uma área foliar colonizada 20 vezes

menor em relação à plantas não inoculadas com a bactéria. Ao avaliar o mecanismo de inibição de *Pseudomonas donghuensis*. SVBP6 ao fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*, Agaras e colaboradores (2017) constataram que houve atividade inibitória, porém devida à expressão de um gene *gacS* funcional, a partir da regulação cascata Gac-Rsm e não pela produção de compostos orgânicos voláteis. A redução da expansão micelial do patógeno *F. Verticilioides* frente a produção de compostos voláteis foi bem reduzida, sendo que o isolado BM1 (*Bacillus megatherium*) o mais eficiente. Para o fungo *S. Maydis*, os melhores isolados foram *Bacillus sp* - RT3B-22 e *Serratia marcescens* - FP1C-12, com valores de inibição de 1,44CM e 1,3CM, respectivamente.

Tabela 3. Inibição da expansão micelial (IEM) dos fungos fitopatogênicos *C. graminicola*, *F. verticilioides* e *S. maydis* frente a produção de compostos voláteis pelas bactérias antagonistas.

Isolado	Identificação	<i>C.graminicola</i>	<i>F. Verticilioides</i>	<i>S.maydis</i>
BC 1	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	0,36 ±0,18 a a	0,05 ±0,00 a	0,34 ±0,08 a
BC 2	<i>B. vallismortis</i>	0,00 ±0,00 a	0,00 ±0,00 a	-
BC 3	<i>Bacillus subtilis</i>	0,23 ±0,00 a	0,17 ±0,02 a	0,72 ±0,52 a
BC 4	<i>Bacillus subtilis</i>	0,33 ±0,21 a	0,19 ±0,01 b	0,37 ±0,16 a
BC 5	<i>B. mojavensis</i>	0,24 ±0,28 a	0,05 ±0,07 a	0,58 ±0,03 a
BC 6	<i>Bacillus subtilis</i>	0,07 ±0,09 a	0,25 ±0,00 b	0,37 ±0,02 a
BC 7	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	0,24 ±0,12 a	0,00 ±0,00 a	-
BM 1	<i>Bacillus megatherium</i>	0,36 ±0,03 a	0,33 ±0,03 b	0,15±0,21a
BC 8	<i>B. mojavensis</i>	0,26 ±0,00 a	0,00 ±0,00 a	0,26 ±0,11a
BC 9	<i>B. vallismortis</i>	0,33 ± 0,25 a	0,07 ± 0,05 a	0,61 ±0,04a
BC 10	<i>B. vallismortis</i>	0,06 ± 0,00 a	0,19 ±0,08b	0,69 ±0,40a

BC 11	<i>B. vallismortis</i>	0,07 ±0,01a	0,05 ±0,07 a	0,30 ±0,14a
BC 18	<i>Bacillus grupo subtilis</i>	0,29 ±0,01a	0,00a	0,36 ±0,04a
FT3C 14	<i>Staphylococcus warnei</i>	0,34 ±0,01a	-	0,09 ±0,13a
RT2A 12	<i>Bacillus sp</i>	0,40 ±0,40a	0,23 ±0,07b	0,28 ±0,07a
RT3C 21	<i>Bacillus sp</i>	0,44 ±0,13a	0,14 ±0,08 a	0,82 ±0,37a
RP3C 01	<i>Bacillus subtilis</i>	0,39 ±0,09a	0,09 ±0,13 a	-
SP2 12	nd	0,12 ±0,01a	-	0,51 ±0,04a
ST2 12	nd	0,33 ±0,00a	-	0,56 ±0,53a
RT3C 11	<i>Bacillus sp</i>	0,05 ±0,07a	0,18 ±0,11b	0,60 ±0,28a
RT2C 11	<i>Bacillus subtilis</i>	0,98 ±0,07b	-	0,23 ±0,14a
RT2A 16	<i>Artrhobacter nicotinovarans</i>	-	0,11 ±0,16 a	-
RP1A 35	<i>Leuconost holzapfelli</i>	1,43 ±0,25c	-	-
RT2A 10	<i>Bacillus safensis</i>	1,05 ±0,35b	-	0,73 ±0,53a
FP1A 13	<i>Pantoea sp</i>	-	-	-
ST3 116	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-	-	-
ST3 23	<i>Microbacterium sp</i>	0,43 ±0,07a	-	-
RT1C 219	<i>Pseudomonas mosseli</i>	1,34 ±0,37c	-	0,82 ±0,09a

FP1A 16	<i>Obesumbacterium proteus</i>	0,29 ±0,01a	-	-
FP2A 32	<i>Enterobactereacea</i>	-	-	-
FP1C 12	<i>Serratia marcescens</i>	0,46 ±0,11 a	-	1,30 ±0,92a
RP2A 23	<i>Pseudomonas protengis</i>	-	-	0,84 ±0,48a
ST3 110	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	1,32 ±0,40c	-	
RT2A 01	<i>Serratia marcescens</i>	0,08 ±0,11a	-	0,81 ±0,25a
RT3B 22	<i>Bacillus sp</i>	0,57 ±0,19a	-	1,44 ±0,08a
SP3 11	<i>Bacillus subtilis</i>	0,29 ±0,09a	-	0,41 ±0,04a

Os valores referem-se ao raio do micélio nos tratamentos inoculados com as bactérias antagonistas subtraído do raio do controle em cm. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Scott knott a 5% de significância. Média de duas repetições seguida por desvio padrão.

Dado ao elevado potencial de inibição dos fitopatógenos por isolados de *Bacillus* e aos relatos na literatura associando a atividade bioativa de representantes deste gênero a moléculas tensoativas (SAGGESE et al., 2018; DOMINGOS et al., 2015; DAS et al., 2008; FERNANDES et al., 2007; MAGET-DANA et al., 1992), buscou-se avaliar se a atividade desses isolados avaliados neste trabalho também está associada a compostos tensoativos.

Os resultados dos ensaios de avaliação da atividade emulsificante e surfactante estão apresentados na Tabela 4. Os 21 isolados avaliados foram classificados em dois grupos segundo o teste de médias Scott-Knott ($p < 0,05$) (Apêndice 1). Os isolados que apresentaram maiores atividades emulsificantes foram RT2C-11 (81 %), BC 6 (80 %), BC 9 (78 %) e BC 5 (77 %). Interessantemente, estes isolados também estão no grupo que apresentou maior inibição do crescimento de todos os patógenos, exceto para BC 9 nos ensaios tendo *Pantoea ananatis* como alvo. Contudo, alguns isolados apresentaram baixa ou nenhuma propriedade emulsificante, como foi o caso de BC 1 e RP3C 01 e, BC 18, RT2A 10, SP3 11 E RT3C 21, respectivamente. Observa-se de acordo com outros trabalhos que dentro do gênero *Bacillus* há estirpes que apresentam perfis diferentes com relação a capacidade emulsificante. Por exemplo, França e colaboradores (2015) obtiveram elevados índices de

emulsificação para uma amostra de biossurfactante bruto produzido por *Bacillus subtilis* ICA56 em diferentes substratos. O maior índice relatado foi obtido a partir do cultivo da bateria em glicerol, cuja valor foi de 92%. XXXXXXXX. Contudo, no trabalho de Bueno e colaboradores (2010), isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilis* produziram baixo ou nenhum índice de emulsificação sob diferentes valores de pH e tempo de cultivo, sendo que no tempo de 48 horas de crescimento da bactéria *B. subtilis* a um pH 6, não houve nenhuma produção de emulsão do sobrenadante de células.

Uma substância com potencial surfactante eficiente deve diminuir a tensão da água de 72 a 35 mNm⁻¹ (Mulligan, 2004). Cooper & Goldenberg (1987) também consideram como potencialmente avaliados microrganismos capazes de reduzir a tensão superficial para valores inferiores a 40mNm⁻¹. Assim sendo, houveram isolados neste trabalho que apresentaram valores que se enquadram dentro das faixas citadas, como é o caso de *Bacillus valismortis* (BC2), *Bacillus Grupo Subtilis* (BC 11) e *Bacillus sp* (RT3B 22), que reduziram a tensão superficial do meio para valores inferiores a 39,42mN/m. O isolado RT3B 22 apresentou valor de 29,81 N/m próximo ao descrito por Barros e colaboradores (2008) para um isolado da mesma espécie. Contudo, exceto para o isolado BC 11 que apresentou alta atividade antagonista para todos os fitopatógenos, as demais bactérias com alta atividade surfactante não estão presentes nos grupos de maior inibição como verificado para a atividade emulsificante.

Com relação aos compostos com atividade emulsificante e surfactante, os isolados de *Bacillus subtilis* apresentaram maiores produções, com valores acima de 40 mg. Plaza e colaboradores (2015) obtiveram valor semelhante para a cepa de *B. subtilis*, que produziu 40,2 mg l⁻¹ de surfactina quando cultivada em meio LB. No entanto, outros trabalhos demonstram que a produção destes tipos de compostos por bactérias do gênero *Bacillus* pode ser variável. Paraszkiwicz e colaboradores (2017), por exemplo, constataram a habilidade de *Bacillus subtilis* KP7 em produzir iturina em diferentes meios de cultura, onde o isolado produziu menos de um mg deste biossurfactante em um meio preparado a partir de água residuária de indústria e em meio LB produziu 12 mg. Cita-se também os resultados encontrados por Pemmaraju e colaboradores (2012), que obtiveram uma biomassa máxima de surfactina produzido por *B. subtilis* DSV23 de 6,9 g/l cultivado em “meio salt” enriquecido com 2 % de óleo. Esta variação também pode ser observada em outras espécies de bactérias capazes de produzir biossurfactantes. No trabalho de Santos et al (2018), a bactéria *Streptomyces sp.* DPUI1559 cultivada em meio mineral contendo 1 % de óleo residual de soja como fonte de carbono produziu 2,24g/l de biossurfactante, enquanto que no trabalho de Zambry e colaboradores (2017) *Streptomyces sp.* RI produziu 8,47g/l em meio caldo de caseína com 3% de azeite de oliva e sob a maior velocidade de agitação. A produção de um biosurfactante denominado

BS-L1011 por *Pseudomonas taiwanensis* L1011 também variou sob diferentes fontes de carbono fornecidas para o crescimento da bactéria, sendo que o maior valor de produção foi de 0,47g/l quando o glicerol foi utilizado como fonte de carbono (LIU et al., 2017). Outros trabalhos relataram diferentes valores de produção de bissurfactante por espécies de *Pseudomonas* (XIA et al., 2014; APARNA et al., 2012; ZHANG & MILLER, 1992).

Tabela 4. Índice de Emulsificação, tensão superficial e massa dos compostos obtidos por precipitação ácida

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (%)	TENSÃO (mNm ⁻¹)	Massa Precipitado (mg/80ml)
BC 1	<i>Bacillus Grupo Subtilis</i>	3,61 ±5,10a	43,72	44
BC 2	<i>Bacillus valismortis</i>	0,00 ±0,00a	33	14
BC 3	<i>Bacillus Subtilis</i>	47,86 ±3,03b	40,03	12
BC 4	<i>Bacillus Subtilis</i>	20 ±2,83a	40,58	27
BC 5	<i>Bacillus monjavenisis</i>	77,09 ±0,25b	40,63	27
BC 6	<i>Bacillus Subtilis</i>	80 ±0,00b	40,7	24
BC 7	<i>Bacillus Grupo Subtilis</i>	0,00 ±0,00a	43,83	45
BM1	<i>Bacillus megaterium</i>	55,00 ±14,85b	42,89	15
BC 8	<i>Bacillus Grupo Subtilis</i>	37,05 ±31,18a	40,67	18
BC 9	<i>Bacillus Grupo Subtilis</i>	78,64 ±1,93b	40,46	48
BC 10	<i>Bacillus Grupo Subtilis</i>	0,00 ±0,00a	44,34	51
BC 11	<i>Bacillus Grupo Subtilis</i>	30,16 ±22,15a	39,42	29
BC 18	<i>Bacillus Grupo Subtilis</i>	0,00 ±0,00a	42,81	10
RT2C 11	<i>Bacillus subtilis</i>	81,35 ±4,31b	41,60	37
RT2A 10	<i>Bacillus safensis</i>	0,00 ±0,00a	33,71	9
RT3B 22	<i>Bacillus sp</i>	20,84 ±29,47a	29,81	23
RT2A 12	<i>Bacillus sp</i>	63,34 ±4,72b	40,22	38
SP3 11	<i>Bacillus subtilis</i>	0,00 ±0,00a	38,33	29

RT3C 21	<i>Bacillus sp</i>	0,00 ±0,00a	44,66	47
RPP3C 01	<i>Bacillus subtilis</i>	4,35 ±0,00a	43,63	9
RT3C 11	<i>Bacillus sp</i>	8,00 ±11,31a	43,49	-

Os valores referem-se ao índice de emulsificação em porcentagem e tensão superficial dos sobrenadantes das células de *Bacillus* spp. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Scott knott a 5% de significância. Média de duas repetições seguida por desvio padrão.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível identificar isolados bacterianos com potencial para a antagonizar fitopatógenos de milho. O gênero *Bacillus* se destacou quanto ao número de isolados com atividade antagonista e o fungo *F. Verticilioides* foi o patógeno mais resistente. Algumas das bactérias, como RT2C-11, BC 6, BC 9 e BC 5 estão nos grupos de melhores antagonistas para todos o fitopatógenos e apresentaram em seus extratos, compostos com atividade emulsificante.

Dado o exposto, os resultados sugerem o uso dessas bactérias em experimentos de inoculação na planta para validação do potencial destas como agentes de controle biológico dos fungos patogênicos avaliados neste estudo.

6 REFERENCIAS

AGROFIT: Julho, 2017. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons . Acesso em 27/06/2017.

AGARAS, B.C; IRIARTE, A; VALVERDE, C. F. Genomic insights into the broad antifungal activity, plant-probiotic properties, and their regulation, in *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6. **PLOS ONE**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194088>.

AHMAD, Z.; WU, J.; CHEN, L.; DONG, W. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. Scientific **Report**. Disponível em: . Acesso em 12/12/2018.

AHMAD, F; HUSAIN, F.M; AHMAD, I. Rhizosphere and Root Colonization by Bacterial Inoculants and Their Monitoring Methods: A Critical Area in PGPR Research. , p.363-391, 2011.

ARREBOLA, E.; JAVOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 108, p. 386-395, 2010.

ARNUSCH, C.J.; ULM, H.; JOSTEN, M.; SHADKCHAN, Y.; OSHERO, V. N. SAHL, H. G.; SHAI, Y. Ultrashort peptide bioconjugates are exclusively antifungal agents and synergize with cyclodextrin and amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n.1, p. 1-9, 2012.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A., TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.

APARNA, A., SRINIKETHAN, G., SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloid Surf. B Biointerfaces**, 2012.

BAIS, H. P.; PARK, S.-W.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 1, p. 26-32, 2004.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: **special emphasis on the Brazilian experience**. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas, 2008.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose: Knowledge to Exploit for Improved Management . **Plant Disease** ; Vol. 83 No. 7.1999.

BOMFETI, C.A; MEIRELLES, W.F; SOUZA-PACCOLA, E.A.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; MARRIEL, I.E.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Avaliação de produtos químicos comerciais, in vitro e in vivo no controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.63-67, 2007.

BRITO, A. H.; PINHO, R. G. V.; SOUZA FILHO, A. X.; ALTOÉ, T. F. Avaliação de severidade da cercosporiose e rendimento de grãos em híbrido comerciais de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.7, n.1, p. 19-31, 2008.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C.H. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE EM CALDO DE FERMENTAÇÃO. **Revista Química Nova**, Vol. 33, No. 7, 2010.

CASA, R.T., REIS, E.M. & ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**. 2006.

CHANDRA, PREM; SINGH, Enespa . Applications and Mechanisms of Plant Growth-Stimulating Rhizobacteria. In: DEVENDRA , K.; VARMA, Ajit ;TUTEJA, Narendra . **Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture**. 1. ed. Noida, UP, India: Springer, 2016. cap. 3, p. 37-62

CHRISTENSEN, J.J; WILCOXSON, R.D. Stalk rot of corn. Saint Paul: **The American Phytopathological Society**. 1966b.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

COOPER, G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, p. 224-229, 1987.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacterial antibiotics: strategies to improve therapeutic potential. **Current Protein & Peptide Science**. v. 6, p. 61-75, 2005 a.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LANZA, F. E.; FIGUEIREDO, J. E. F. EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS PARA O CONTROLE DA MANCHA BRANCA DO MILHO. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.3, p. 291-301.2012.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry** , v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010

COTA, L.V.; COSTA, R. V.; CASELA, C. R. Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola* , na produção da cultura do milho. Sete Lagoas: **Circular Técnica 120**. Sete Lagoas, 2009. Disponível em:

DANTAS, D; ALVES, E; REGO, M; SOARES, R; PEIXOTO, S; GALVEZ, A. Desempenho do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probiótico quando submetido à infecção por *Vibrio harveyi*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v.4, n.1, p.85-90, jan.-mar., 2009.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology** 104 (2008) 1675-1684.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface - implications for the effect of fengycin on biological membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 358-365, 2005.

Desjardins, A.E.; Procto, R.H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. **International Journal of Food Microbiology** 119 , 47- 50 (2007).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, José Ivo. Como isolar e 2489 identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: 2490 Embrapa, SPI, 1995. 60 p.

DOMINGOS, D.F.; DE FARIA, A.F.; GALAVERNA, R.S.; EBERLIM, M.N.; GREENFIELD,P.; ZUCCHI, T.,D.; MELO, I.S.; TRAN-DINH, N.; OLIVEIRA DE, V.M. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. *Applied genetics and molecular biotechnology*, April 2015, Volume 99, Issue 7, pp 3155–3167.

DUARTE, J. de Oliveira ; MATTOSO , M. J ; GARCIA , J. C. Importância Socioeconômica Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_8_168200511157.html. Acesso em: 04 dez. 2017.

ESPINOSA-URGEL, M. R. K.; RAMOS, AND J.-L. Root colonization by *Pseudomonas putida* : **love. Microbiology** , v. 148, p. 341–344, 2002

FRANÇA, I. W. L.; L, A. P.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, C.G.F.; MELO, V.M.M.; SANT'ANA, H.B.; GONÇALVES, L.R.B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, v. 255, P. 10-15, 2015.

FERNANDES, F. T.; BALMER, E. Situação das doenças de milho no Brasil. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, V. 14, n. 165, p. 35-37, 1990.

FERNANDES, P.A. V.; ARRUDA, I. R.; SANTOS, A. F.A.B.; ARAUJO, A. A.; MAIOR, A. M.S.;XIMENES, E. A. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* r14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:704-709 ISSN 1517-8382. 2007.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. de. Principais doenças na cultura do milho. Sete Lagoas: **Circular Técnica 26**. Sete Lagoas, 1997. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/478849/principais-doencas-na-cultura-do-milho>

FERREIRA, A.S.; CASELA, C. R. de. Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: *Circular Técnica 13*. Sete Lagoas, 2001. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30147/1/circ-13.pdf>

GODOY, C.V., AMORIM, L. & BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**. 2001.

GAIERO J., CRYSTAL A. MCCALL , KAREN A. THOMPSON , NICOLA J. DAY , ANNA S. BEST, A. K. E. D. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany** , v. 100, n. 9, p. 1738–1750, 2013

DE, Karla joseane perez tese. Caracterização de lipopeptídeos antimicrobianos e surfactantes produzidos por *Bacillus* spp. isolados de puba. 2014. 135 f. **Tese** (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

FRANÇA, I. W. L.; LIMA, A. P.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, C. G. F.; MELO, V. M. M.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R.B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, V. 255, P. 10-15, 2015.

L. D. PACCOLA-MEIRELLES.; A. S. FERREIRA.; W. F. MEIRELLES.; I. E. MARRIEL.; C. R. CASELA. Detection of a Bacterium Associated with a Leaf Spot Disease of Maize in Brazil. **Journal of Phytopathology** 149, 275 - 279 (2001).

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

LANZA, F. E. Prevalência de *Fusarium verticillioides* e manejo de grãos ardidos e fumonisinas em milho. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. 2013.

Lee, T.; Park, D.; Kim, k.; Lim, S. M., et al. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 Showing Potent Antifungal Activity against Mycotoxigenic *Fusarium* Species. **The Plant Pathology Journal**.33(5) : 499-507.2017

LI et al. Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*. PLoS ONE 13(10): e0203505. Disponível em: .pone.0203505 . Acesso em 12/12/2018.

LI,X.; ZHANG, Y., WEI, Z., GUAN, Z., CAI Y, LIAO, X. Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. PLoS ONE 11(9): e0162125. doi:10.1371/journal.pone.0162125. 2016.

MONRADI, M.A.B; JUNIOR PAULA DE, T.J; BETIOL, W; TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte , v . 3 0, n. 2 5 1, p.73 - 82,jul / ago . 2009

NICHOLSON, W. L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 410-416, 2002.

NIGRIS et al. Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv. Glera.. BMC Microbiology, 2018. Disponível em: Acesso em 10/12/2018.

PINTO, N. F. J. A.; OLIVEIRA, E. de.; FERNANDES, F. T. Manejo das Principais Doenças do Milho. **Circular técnica 92**. Sete Lagoas, 2007.

PLANCHMP C, GLAUSER G e MAUCH-MANI B (2015) Inoculação da raiz com *Pseudomonas putida* KT2440 induz alterações transcricionais e metabólicas e resistência sistêmica em plantas de milho. **Frente. Plant Science**, 2014.

PLAZA G., CHOJNIAK, J., RUDNICKA, K., PARASZKIEWICZ, K., BERNAT P. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. Journal of Applied Microbiology 119, **The Society for Applied Microbiology**. 2015.

PARASZKIEWICZ, K., BERNAT, P., KUSMIERSKA, A., CHOJNIAK, J., PLAZA, G. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. **Journal of Environmental Management**, 2017.

PERMMARAJU, S. C., SHARMA, D., SINGH, N., PAWAR, R., CAMEOTRA, S.S., PRUTHI, V. Production of Microbial Surfactants from Oily Sludge-Contaminated Soil by *Bacillus subtilis* DSVP23. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol.167(5), 2012.

RAMÍREZ, N. B.; SEIFFERT, W.Q.; VIEIRA, F N.; MOURIÑO, J. L. P.; JESUS, G. F.A.; FERREIRA, G. S.; ANDREATTA, E. R. Dieta suplementada com prebiótico, probiótico e simbiótico no cultivo de camarões marinhos. **Pesquisa agropecuária Brasileira** , Brasília, v.48, n.8, p.913-919, ago. 2013

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORn, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). **Aquaculture**, n.191, n.4, p.271-288, 2000.

Saggese, A.; Culurciello, R.; Casillo, A.; Corsaro, M.M.; Ricca, E.; Baccigalupi, L. A Marine Isolate of *Bacillus pumilus* Secretes a Pumilacidin Active against *Staphylococcus aureus*. *Mar. Drugs* 2018.

SANTOS, V. L.; MONTEIRO AS . Strategies Based in Microbial Metabolites for Microbial Control in Agriculture. **In: ANA RITA.**

SANTOS, A. P. P; SILVA, M. D.S; COSTA, E. V. L; RUFINO, R. D; SANTOS, V.A; RAMOS, C. S; SARUBBO, L.A; PORTO, A. L. F. Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2018.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON.; L. Micotoxinas do *Fusarium spp* na avicultura comercial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.185-190, 2000.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.12, p.370–375, 1990.

SARTORI, M.; NESCI, A.; GARCÍA, J.; PASSONE, M.; MONTEMARANI, A.; ETCHEVERRY, M. Efficacy of epiphytic bacteria to prevent northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* in maize. **Revista Argentina de Microbiología**. vol. 49, núm. 1, enero-marzo, pp. 75-82, 2017.

SUTTON, B.C. & WATERSTON, J.M. *Diplodia maydis*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 84. London C.M.I., 1966.

SUTTON, B.C. The coelomycetes. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, Surrey, England. 1980.

TOURÉ, Y; ONEGA, M; JAQUES, P; GUIRO, A; THONART, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **Journal of Applied Microbiology** 2004.

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

SCOTT, W. R.; BAEK, S. B.; JUNG,D.; HANCOCK, R. E.; STRAUS, S. K. NMR structural studies of the antibiotic lipopeptide daptomycin in DHPC micelles. **Biochimica e Biophysica Acta**, p. 3116-26, 2007

TAHIR, H. A. S; Gu, Q; HUIJUN, W; RAZA, W; Hanif, A; Wu, L; Colman, M. V; Gao, X. Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology**. February 2017.

VERSCHUERE, L; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P; VERSTRAETE , W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.64, n.4, p.655-671, 2000.

XIA, W; du, Z; Cui, Q; Dong, H; WANG, F; He, P; TANG, Y. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal Hazard. Mater**, 2014.

ZHANG, Y; MILLER, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). **Appl. Environ. Microbiol.** 1992.

APENDICE A Análise da atividade antagonista das bactérias testadas frente ao fitopatógeno *Fusarium verticillioides*. As letras seguidas por número iguais indicam que não houve diferença estatística nas médias pelo teste de Scott Knott 0,05 %

Variável analisada: HALO_CM_

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

Micélio Tratamento Contrle:3,6 cm

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

F__VERTICI 17 20.444100 1.202594 37.003 0.0000

erro 18 0.585000 0.032500

Total corrigido 35 21.029100

CV (%) = 13.54

Média geral: 1.3316667 Número de observações: 36

Teste Scott-Knott (1974) para a FV F__VERTICI

NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 2

Erro padrão: 0,12747548783982

Tratamentos Médias Resultados do teste

RT3C 11 0.100000 a1

RT2A 12 0.100000 a1

RT3C 21 0.100000 a1

ST3 116 0.300000 a1

RP3C 01 0.350000 a1

BC 18 0.800000 a2

BC 2 1.700000 a3

BC 1 1.700000 a3

BC 4 1.750000 a3
BC 6 1.800000 a3
BAC10 1.830000 a3
BM1 1.850000 a3
BC 5 1.850000 a3
BC 3 1.900000 a3
BC 8 1.930000 a3
BC 11 1.930000 a3
BC 7 1.950000 a3
BC 9 2.030000 a3

APENDICE B Análise da atividade antagonista das bactérias testadas frente ao fitopatógeno

Colletotrichum graminicola. As letras seguidas por número iguais indicam que não houve diferença estatística nas médias pelo teste de Scott Knott 0,05 %

Variável analisada: HALO_CM_

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

C__GRAMINI 31 112.804300 3.638848 104.433 0.0000

erro 32 1.115000 0.034844

Total corrigido 63 113.919300

CV (%) = 13.32

Média geral: 1.4012500 Número de observações: 64

Teste Scott-Knott (1974) para a FV C__GRAMINI

NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 2

Erro padrão: 0,131991950512143

Tratamentos Médias Resultados do teste

RT3C 21 0.100000 a1

RT3C 11 0.100000 a1

RT1C 219 0.100000 a1

RT2A 12 0.100000 a1

RT2C 11 0.150000 a1

RT3B 22 0.200000 a1

ST2 12 0.200000 a1

RP1A 35 0.200000 a1

RT2A 01 0.250000 a1

RT2A 010 0.250000 a1

FP1C 12 0.300000 a1

RP3C 01 0.350000 a1

ST3 23 0.350000 a1

ST3 110 0.350000 a1

SP3 11 0.350000 a1

FT3C 14 0.350000 a1

FP1A 16 0.500000 a1

SP2 12 1.000000 a2

RT2B 13 1.000000 a2

BC 18 2.230000 a3

BC 2 2.480000 a3

BC 11 2.830000 a4

BC 1 2.930000 a4

BC 7 2.980000 a4

BM 1 3.030000 a4

BC 4 3.080000 a4

BC 6 3.130000 a4

Tratamentos Médias Resultados do teste

BC 18 0.300000 a1

FPIC 12 0.750000 a2

SP3 11 0.750000 a2

RT2A01 1.600000 a3

BM 1 1.900000 a3

RT3B 22 1.900000 a3

BC 2 1.900000 a3

RT2A10 2.100000 a4

RP3C01 2.150000 a4

RT2C 11 2.150000 a4

BC 9 2.200000 a4

BC 11 2.200000 a4

BC 7 2.350000 a4

BC 4 2.350000 a4

BC10 2.350000 a4

BC 8 2.350000 a4

RT2A 12 2.400000 a4

FT3C 14 2.400000 a4

RT3C 11 2.450000 a4

BC 1 2.450000 a4

RP2A 16 2.550000 a5

BC 3 2.550000 a5

RP2A 23 2.570000 a5

ST2 12 2.650000 a5

BC 5 2.650000 a5

SP2 12 2.700000 a5

RT3C21 2.900000 a5

RP1A35 2.900000 a5

ST3 110 2.950000 a5

ST3 23 3.000000 a5

RT1C 219 3.000000 a5

ST3110 3.050000 a5

APENDICE D Análise da atividade antagonista das bactérias testadas frente ao fitopatógeno *Pantoea ananatis*. As letras seguidas por número iguais indicam que não houve diferença estatística nas médias pelo teste de Scott Knott 0,05 %

Variável analisada: HALO_CM_

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

P__ANANATI 16 0.903053 0.056441 5.298 0.0007

erro 17 0.181100 0.010653

Total corrigido 33 1.084153

CV (%) = 34.54

Média geral: 0.2988235 Número de observações: 34

Teste Scott-Knott (1974) para a FV P__ANANATI

NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 2

Erro padrão: 0,0729826732055992

Tratamentos Médias Resultados do teste

FP1A 13 0.120000 a1
 RP3C 01 0.125000 a1
 RT2B 13 0.125000 a1
 RT3C 21 0.130000 a1
 RT2C 11 0.150000 a1
 RT2A 12 0.160000 a1
 RT3C 11 0.170000 a1
 BM1 0.250000 a1
 BC 2 0.250000 a1
 BC 11 0.350000 a2
 BC 4 0.400000 a2
 BC10 0.400000 a2
 BC 7 0.400000 a2
 BC 6 0.400000 a2
 BC 3 0.450000 a2
 BC 5 0.500000 a2
 BC 1 0.700000 a2

APENDICE E Análise da atividade antagonista das bactérias testadas frente a bactéria gram positiva *Bacillus subtilis*. As letras seguidas por número iguais indicam que não houve diferença estatística nas médias pelo teste de Scott Knott 0,05 %

Variável analisada: HALO__CM_

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

B__SUBTILI 20 0.812462 0.040623 25.427 0.0000

erro 21 0.033550 0.001598

Total corrigido 41 0.846012

CV (%) = 17.84

Média geral: 0.2240476 Número de observações: 42

Teste Scott-Knott (1974) para a FV B__SUBTILI

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 2

Erro padrão: 0,0282632185677697

Tratamentos Médias Resultados do teste

BC 1 0.100000 a1

BC 11 0.100000 a1

FP1A 13 0.120000 a1

ST3 116 0.120000 a1

RT2B 13 0.125000 a1

RP3C 01 0.125000 a1

RT3C 21 0.130000 a1

FP2A 32 0.150000 a1

RT2A 12 0.150000 a1

RT2C 11 0.150000 a1

RT3C 11 0.170000 a1

RT2A 16 0.200000 a2

BC 10 0.200000 a2

RP3B 11 0.200000 a2

FP1C 12 0.205000 a2

RT2A 10 0.240000 a2

BC 9 0.250000 a2

BC 2 0.400000 a3

BM1 0.500000 a4

BC 7 0.500000 a4

APENDICE F Análise da produção de compostos voláteis das bactérias testadas frente ao *Colletotrichum graminicola*. As letras seguidas por número iguais indicam que não houve diferença estatística nas médias pelo teste de Scott Knott 0,05 %

Variável analisada: HALO__CM_

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

BACT_RIAS 30 8.997397 0.299913 9.334 0.0000

erro 31 0.996050 0.032131

Total corrigido 61 9.993447

CV (%) = 42.30

Média geral: 0.4237097 Número de observações: 62

Teste Scott-Knott (1974) para a FV BACT_RIAS

NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 2

Erro padrão: 0,126749053569031

Tratamentos Médias Resultados do teste

BC 2 0.000000 a1

RT3C 11 0.050000 a1

BC 10 0.060000 a1
BC 6 0.065000 a1
BC 11 0.070000 a1
RT2A 01 0.075000 a1
SP2 12 0.120000 a1
BC 3 0.230000 a1
BC 7 0.245000 a1
BC 5 0.250000 a1
BC 8 0.260000 a1
FP1A 16 0.290000 a1
BC 18 0.290000 a1
SP3 11 0.315000 a1
BC 9 0.325000 a1
BC 4 0.330000 a1
ST2 12 0.330000 a1
FT3C 14 0.340000 a1
BC 1 0.355000 a1
BM 1 0.355000 a1
RP3C 01 0.385000 a1
RT2A 12 0.395000 a1
ST3 23 0.430000 a1
RT3C 21 0.440000 a1
FP1C 12 0.455000 a1
RT3B 22 0.565000 a1
RT2C 11 0.980000 a2
RT2A 10 1.050000 a2
ST3 110 1.315000 a3
RT1C 219 1.340000 a3
RP1A 35 1.425000 a3

APENDICE G Análise da produção de compostos voláteis das bactérias testadas frente ao *Fusarium verticillioides*. As letras seguidas por número iguais indicam que não houve diferença estatística nas médias pelo teste de Scott Knott 0,05 %

Variável analisada: HALO__CM_

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

BACT_RIA_ 15 0.264400 0.017627 3.302 0.0116
erro 16 0.085400 0.005338

Total corrigido 31 0.349800

CV (%) = 56.20

Média geral: 0.1300000 Número de observações: 32

Teste Scott-Knott (1974) para a FV BACT_RIA_

NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 2

Erro padrão: 0,0516599457994296

Tratamentos Médias Resultados do teste

BC 7 0.000000 a1

BC8 0.000000 a1

BC5 0.050000 a1

BC1 0.050000 a1

BC11 0.050000 a1

BC9 0.065000 a1

RP3C01 0.090000 a1

RT2A16 0.110000 a1

RT3C21 0.140000 a2

BC3 0.165000 a2

RT3C11 0.175000 a2

BC10 0.190000 a2

BC4 0.190000 a2

RT2A12 0.230000 a2

BC6 0.250000 a2

BM1 0.325000 a2

APENDICE H Análise da produção de compostos voláteis das bactérias testadas frente ao *Stenocarpella maydis*. As letras seguidas por número iguais indicam que não houve diferença estatística nas médias pelo teste de Scott Knott 0,05 %

Variável analisada: INIBI__O__

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

BACT_RIA 24 5.204628 0.216859 2.052 0.0401

erro 25 2.641550 0.105662

Total corrigido 49 7.846178

CV (%) = 57.41

Média geral: 0.5662000 Número de observações: 50

Teste Scott-Knott (1974) para a FV BACT_RIA

NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 2

Erro padrão: 0,229849951055031

Tratamentos Médias Resultados do teste

FT3C 14 0.090000 a1

BM1 0.150000 a1

RT2C 11 0.230000 a1

BC8 0.255000 a1

RT2A 12 0.280000 a1

BC 11 0.300000 a1

BC1 0.340000 a1

BC 18 0.355000 a1

BC 4 0.365000 a1

BC 6 0.365000 a1

SP3 11 0.405000 a1

SP2 12 0.505000 a1

ST2 12 0.555000 a1

BC 5 0.575000 a1

RT3C 11 0.600000 a1

BC 9 0.605000 a1

BC 3 0.715000 a1

RT2A10 0.725000 a1

RT2A 10 0.725000 a1

RT2A 01 0.805000 a1

RT1C 219 0.815000 a1

RT3C 21 0.815000 a1

RP2A 23 0.840000 a1

FPIC 12 1.300000 a1

RT3B 22 1.440000 a1

APENDICE I Analise atividade emulsificante de bacterias do genero Bacillus sp. As letras seguidas por numero iguais indicam que nao houve diferenca estatistica nas medias pelo teste de Scott Knott 0,05 %

Variável analisada: ÍNDICE_EMU

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

BACTÉRIA 24 41723.481040 1738.478377 11.727 0.0000

erro 17 2520.169200 148.245247

Total corrigido 41 44243.650240

CV (%) = 41.39

Média geral: 29.4154762 Número de observações: 42

Teste Scott-Knott (1974) para a FV BACTERIA

NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 1,51515151515152

Erro padrão: 9,89150459024427

Tratamentos Médias Resultados do teste

RT3C 21 0.000000 a1

BC 2 0.000000 a1

RT2A 10 0.000000 a1

BC 7 0.000000 a1

BC 18 0.000000 a1

BC 10 0.000000 a1

SP3 11 0.000000 a1

BC 1 3.605000 a1

RP3C01 4.350000 a1

RP3C 01 4.350000 a1

RT3C 11 8.000000 a1

BC 4 20.000000 a1

RT3B 22 20.835000 a1

BC4 24.000000 a1

BC 11 28.165000 a1

BC 8 37.045000 a1

BC 3 47.855000 a2

BM1.1 55.000000 a2

RT2A 12 63.335000 a2

BM1 76.000000 a2

BC 5 77.095000 a2

RT2C 11 78.260000 a2

BC 9 78.635000 a2

BC 6 80.000000 a2

RT2C11 84.350000 a2