

INFLUÊNCIA DE *BACILLUS SUBTILIS* NA ECLOSÃO, ORIENTAÇÃO E INFEÇÃO DE *HETERODERA GLYCINES* EM SOJA

INFLUENCE OF *BACILLUS SUBTILIS* ON THE *HETERODERA GLYCINES* ECLOSION, ORIENTATION AND INFECTION IN SOYBEAN

Fábio Fernando de Araújo¹ João Flávio Veloso Silva²
Ademir Sérgio Ferreira de Araújo³

RESUMO

A utilização de microrganismos para fins de controle biológico de doenças em plantas tem sido muito estudada no mundo. No caso do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*), uma das principais doenças da soja, o controle biológico é de grande importância devido à ausência de controle químico eficiente. Para se estudar o efeito de *Bacillus subtilis* sobre *H. glycines*, foram conduzidos alguns experimentos de casa de vegetação e laboratório. Nos trabalhos de laboratório, verificou-se, em câmara de eclosão, que a presença de *B. subtilis* reduz a eclosão de ovos de *H. glycines* estimulados com exsudatos de sementes de soja. Foi observado também que o tratamento de raiz de soja com a bactéria inibiu a migração de larvas juvenis de *H. glycines* para a planta em comparação à raiz não tratada com a bactéria. Nos ensaios de casa de vegetação, utilizando-se vasos com solo infestados com ovos de *H. glycines*, observou-se uma redução de fêmeas na raiz de soja quando o solo ou sementes foram tratadas previamente com formulação pó-molhável ou calda contendo *B. subtilis*, respectivamente. Com base nesses resultados e sabendo-se que *H. glycines* apresenta dependência de estímulo de exsudatos vegetais para eclosão e orientação das larvas, pode-se afirmar que *B. subtilis* interfere nesse estímulo prejudicando o desenvolvimento do ciclo do nematóide.

Palavras-chave: *Heterodera glycines*, *Bacillus subtilis*, soja.

SUMMARY

The utilization of microorganisms for biological control of plant diseases has been studied in the world. In soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*), an important

diseases in soybeans, biological control strategies are important tools mostly because the lack of an efficient chemical control. The effect of *Bacillus subtilis* on *H. glycines* was studied on greenhouse and laboratory experiments. The presence of *B. subtilis* reduced the number of appeared *H. glycines* eggs when under stimulus of soybean exudes. Also, treatment of soybean roots with *B. subtilis* inhibited the juvenile larvae of *H. glycines* migration towards the soybean roots. In greenhouse experiments using soil infested with eggs of *H. glycines*, a reduction in the number of females was observed in the soybean root when both soil and seeds were previously treated with either wettable powder or solution containing *B. subtilis*. Considering the results of this research, and that *H. glycines* depends on plant exude for show up and orientation of larvae, it can be assumed that *B. subtilis* might interfere in the nematode life cycle.

Key words: *Heterodera glycines*, *Bacillus subtilis*, soybean.

INTRODUÇÃO

Os nematóides fitoparasitas são responsáveis por grandes perdas na produção agrícola. Inúmeros microrganismos do solo são conhecidos como parasitas ou predadores de fitonematóides (SHARMA & VIVALDI, 1999). A ação desses microrganismos pode ser resultante de efeito direto ou indireto através da interferência em etapas do ciclo vital do patógeno. Bactérias do

¹ Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Proteção de Plantas, (UNESP/Botucatu), Professor do Curso de Agronomia, UNOESTE, Rodovia Raposo Tavares, km 572, 19067-175, Presidente Prudente, SP. E-mail: araujoff@terra.com.br. Autor para correspondência.

² Engenheiro Agrônomo, Doutor, EMBRAPA-CNPSo, CP 231, 86001-970, Londrina, PR.

³ Engenheiro Agrônomo., Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, ESALQ/USP, CP 96, 13400-000, Piracicaba, SP.

gênero *Bacillus*, principalmente *B. subtilis*, além de componentes da população microbiana do solo, rizoplano e filoplano, apresentam características atrativas para os estudos de controle biológico de doenças de plantas (NORONHA *et al.*, 1995). O potencial antagonístico de bactérias foi estudado em vários trabalhos de controle biológico de doenças em plantas (BETTIOL & KIMATI, 1990; KREBS *et al.*, 1993; SHARMA & GOMES, 1999). Microrganismos rizosféricos, principalmente do gênero *Bacillus*, possuem um grande potencial de controle biológico de nematóides fitopatogênicos. NEIPP & BECKER (1999), avaliando a atividade biocontroladora de isolados de rizobactérias sobre *Heterodera schachtii*, encontraram estirpes de bactérias, incluindo *Bacillus megaterium*, que reduzem a infecção de nematóides em beterraba. Anteriormente, KLOEPPER *et al.* (1992) isolaram bactérias da rizosfera de plantas antagonistas à nematóides e encontraram espécies que exibiam um antagonismo a *Heterodera glycines* e *Meloidogyne incognita* em soja, com predominância de isolados do gênero *Bacillus*. Outros estudos evidenciaram o uso de bactérias como biocontroladoras de *Heterodera glycines* em soja, (TIAN *et al.*, 2000 ; TIAN & RIGGS, 2000). SIDDIQUI & MAHMOOD (1995) concluíram que a aplicação de três microrganismos (*Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Glomus fasciculatum*) resultou em aumento da nodulação em feijão-guandu (*Cajanus cajan*) e redução da multiplicação de nematóide (*Heterodera cajani*).

O objetivo deste trabalho foi estudar a interferência de *Bacillus subtilis* em etapas do ciclo de vida de *Heterodera glycines*, observando o efeito da bactéria no desenvolvimento do nematóide para infecção de raízes de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpe de *B. subtilis* - O isolado utilizado nesse trabalho foi a estirpe AP-3 de *Bacillus subtilis*. Essa estirpe foi isolada do filoplano de arroz, sendo caracterizada como de grande potencial inibitório ao desenvolvimento micelial de fungos fitopatogênicos (BETTIOL & KIMATI, 1990). A bactéria foi multiplicada em meio de cultura Batata-dextrose (BD) durante sete dias a 25°C, sob agitação constante de 130rpm. Após esse período a calda, contendo a bactéria, foi utilizada diretamente nos experimentos em concentração final de 2,0. 10⁸ células/ml determinada pela técnica de número mais provável (NMP) em placas. Para formulação do Pó Molhável (PM) a calda foi centrifugada (5000rpm) e o precipitado misturado

a caulinita e surfactantes com posterior secagem em equipamento "spray-drier" para concentração final de 2,0.10⁸ células/g do produto.

Teste de inibição de desenvolvimento de *Heterodera glycines* na rizosfera - Foram utilizados vasos plásticos contendo 1,0kg de mistura areia:solo (1:1v/v). Os vasos foram acondicionados em casa de vegetação na qual foi conduzido o experimento. Sementes de soja (*Glycine max*) cv. BR-37 foram tratadas com a formulação PM contendo *B. subtilis* nas dosagens de 1000g e 500g para 50kg de semente correspondendo, respectivamente, à concentração de 1,0.10⁶ e 5,0.10⁵ células/semente, seguindo-se a semeadura nos vasos (uma semente/vaso). Outro tratamento foi conduzido com adição da calda bacteriana diretamente no solo 30 minutos antes da semeadura. Nesse caso, foi determinada uma concentração em torno de 1,0.10⁸ células/g de solo. Após onze dias da semeadura foram introduzidos ovos de nematóide (*Heterodera glycines*), na concentração de 4.000 ovos/vaso. Os ovos foram adicionados através de um orifício com 1cm de diâmetro no solo distante 2cm da haste da planta de soja.

Cada tratamento foi composto por seis repetições. Além dos vasos com os tratamentos, foram conduzidos outros vasos para monitoramento da infecção pelo nematóide, sendo considerados tratamentos controle. Após 62 dias, foi realizada a coleta do experimento sendo avaliado o desenvolvimento das plantas, presença de cistos de nematóide na rizosfera e população de *Bacillus* na rizosfera.

O solo aderido às raízes foi coletado e após secagem (45°C), foram retiradas amostras de 10g de solo seco para diluição em 100ml de água esterilizada. Após diluições sucessivas (10⁻³ a 10⁻⁵), o material foi submetido a choque térmico (70°C/10 minutos) visando selecionar as bactérias formadoras de esporos. Das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵, foi retirado 0,1ml e foi espalhado em placa de Petri contendo meio de cultivo BDA. As colônias formadas foram contadas e caracterizadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, de acordo com a metodologia descrita por LI & ALEXANDER (1988). A partir dessa avaliação, foi determinada a concentração de *Bacillus* spp. em cada tratamento.

Teste de eclosão - Exsudatos de sementes de soja foram obtidos conforme metodologia descrita por NISHI (1995): 10g de sementes de soja cv. (BR-37) foram desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio e adicionados em recipiente com 100ml de água deionizada estéril. Em seguida o material foi incubado a 25°C, sob

agitação constante e ausência de luz. As sementes foram removidas após 24 horas, e a solução contendo os exsudatos foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,45µm. A solução que continha os exsudatos foi diluída 100x em água estéril, sendo utilizada posteriormente para estimular a eclosão de larvas jovens de *H. glycines*. Câmaras plásticas medindo 10x10x3cm foram montadas para avaliar a eclosão de nematóides através da inserção de peneira (10 mesh), coberta com papel absorvente, dentro da câmara. No fundo da câmara foi adicionada a solução que continha os exsudatos de soja até cobrir totalmente o papel absorvente sobre a peneira. Sobre o papel foi adicionado uma suspensão com 8000 ovos de *H. glycines*. Após sete dias, o número de juvenis eclodidos na solução contendo os exsudatos foi avaliado, sendo os mesmos em seguida descartados. Os ovos restantes foram novamente incubados na câmara, sendo realizada a mesma avaliação após oito dias.

Influência de *B. subtilis* sobre a eclosão *H. glycines*- Foram conduzidos três ensaios para avaliar o efeito de *B. subtilis* sobre a eclosão de *H. glycines*. No primeiro ensaio adicionaram-se 10ml de calda contendo *B. subtilis* na solução final com exsudatos de soja (diluídos 100X conforme citado anteriormente) estabelecendo-se uma concentração de $1,0 \cdot 10^7$ células/ml. Em seguida, esta solução contendo a bactéria foi colocada na câmara de eclosão descrita acima; a metodologia também foi igual à do experimento anterior.

No segundo ensaio, a calda com *B. subtilis* foi centrifugada (4500rpm/20min.), para separar as células do sobrenadante visando ao tratamento da solução contendo os exsudatos e estabelecendo-se o mesmo procedimento anterior.

No último ensaio, 90ml da solução de exsudatos foi misturada com 10ml de calda contendo em torno de 10^8 células de *B. subtilis*/ml. Após 24 horas a bactéria foi removida por centrifugação (4500rpm/20min.) e o sobrenadante contendo os exsudatos foi utilizado na câmara de eclosão. Todos os ensaios foram conduzidos com quatro repetições.

Teste de atração- Sementes de soja foram desinfetadas e colocadas para germinar em câmara gerbox. Após 72h as raízes das plântulas foram imersas em suspensão contendo $5,0 \cdot 10^8$ células de *B. subtilis*/ml. Aproximadamente 0,1ml da suspensão aderiu ao sistema radicular da plântula. As mesmas

foram plantadas em caixa acrílica (9,0x2,0x1,5cm) contendo areia fina. O nematóide foi adicionado na forma de juvenis ou ovos no lado oposto à planta, distante 6,0cm através de orifício na areia. Os blocos de areia foram umedecidos com 4,0ml de água destilada e deixados em laboratório, sob temperatura de 28°C, durante dez dias. Os blocos de areia foram separados em seções de 1,0cm com auxílio de um escalpelo. O número de juvenis por seção foi determinado separando-se os nematóides da areia por flutuação e decantação. A avaliação do experimento, no qual se utilizaram juvenis de *H. glycines* foi realizada com sete dias, enquanto no experimento em que se utilizaram ovos, a avaliação foi realizada com doze dias de incubação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições e utilizou-se o teste de Tukey para comparação de médias dos tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atração de *Bacillus* por exsudatos radiculares tem sido estudada na espermosfera (FUKUI *et al.*, 1994); na rizosfera esta atração pode estar relacionada com produção de hormônios por estirpes de *Bacillus* (ARAÚJO, 1995). *Bacillus subtilis* é um agente eficiente de controle biológico sendo utilizado freqüentemente no controle de fitopatógenos de solo, sendo esse efeito devido, principalmente, à produção de antibióticos (MATSUNO *et al.*, 1992). Esse mecanismo desenvolvido na rizosfera influencia outros habitantes de solo de forma positiva ou negativa. ARAÚJO (1995) concluiu que o tratamento de semente de soja com *Bacillus* spp. junto ao *Bradyrhizobium japonicum* teve efeitos benéficos para a nodulação e desenvolvimento da planta; esse

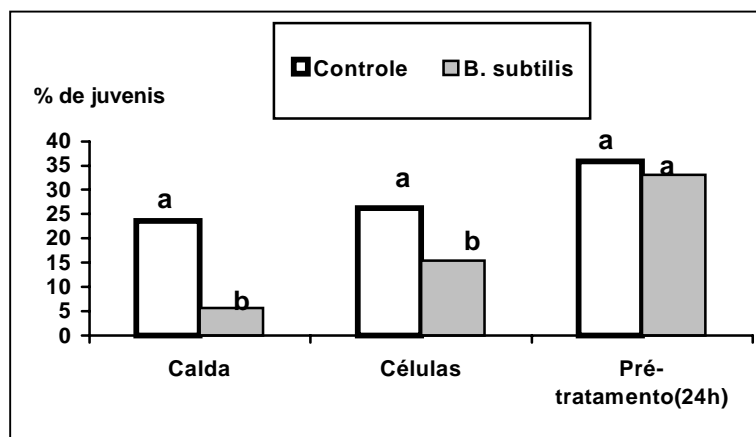


Figura 1 - Influência do tratamento de exsudatos de soja com *Bacillus subtilis* na eclosão de *H. glycines* após quinze dias. Colunas com letras diferentes são significativas pelo teste de Tukey .

mesmo tratamento reduziu a incidência de fungos nas sementes.

A calda contendo *B. subtilis* reduziu significativamente a eclosão de juvenis de *H. glycines in vitro* comparando-se com exsudatos não tratados com a bactéria (Figura 1). O tratamento em que se utilizou separadamente as células de *B. subtilis* reduziu a eclosão de *H. glycines*, embora num patamar inferior à utilização da calda bruta. O pré-tratamento dos exsudatos por 24 horas com *B. subtilis* não foi suficiente para reduzir, significativamente, a eclosão de juvenis em comparação ao controle.

A interferência no processo estimulatório para eclosão de juvenis de *Heterodera glycines* foi o efeito mais considerável encontrado com a bactéria testada nesse trabalho. Esse mesmo efeito associado à redução de penetração de *H. schachtii* foi encontrado tratando-se beterraba com rizobactérias (OOSTENDORP & SIKORA, 1990). O mecanismo que interfere no estímulo à eclosão deve estar relacionado a metabólitos produzidos no desenvolvimento da bactéria, pois a utilização de células separadamente não proporcionou a mesma redução encontrada quando do uso da calda com a bactéria. Bergmann & Van Duuren (1959) citados por OOSTENDORP & SIKORA (1990) observaram uma completa inibição da eclosão de *H. schachtii* por filtrados de culturas bacterianas. Por outro lado, o contato direto da calda contendo *B. subtilis* com juvenis de *H. glycines* recém-eclodidos, não ocasionou redução significativa da população de nematóide após sete dias de incubação.

A migração de *H. glycines* para as raízes de soja foi influenciada pela presença de *B. subtilis*. Os juvenis migraram até 4cm de distância do ponto

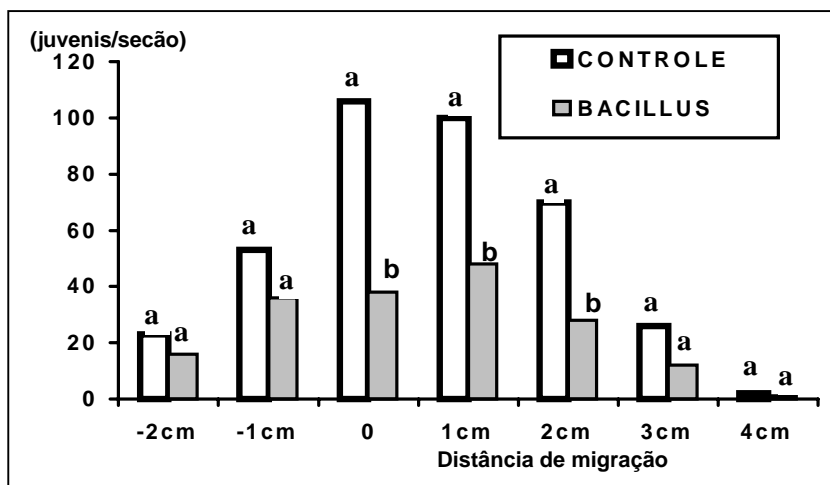


Figura 2 - Influência do tratamento de raiz de soja com *Bacillus subtilis* na orientação de juvenis de *Heterodera glycines* para as raízes. Avaliação realizada após sete dias. Diferenças significativas do controle de acordo com o teste de Tukey. Médias de quatro repetições.

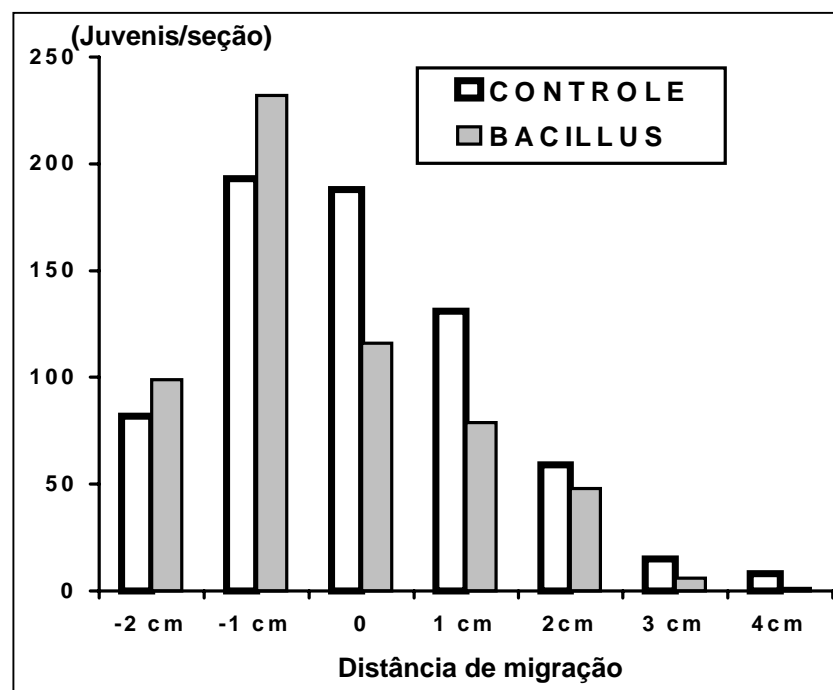


Figura 3 - Influência do tratamento de raiz de soja com *Bacillus* na orientação de juvenis de *Heterodera glycines* para as raízes. Avaliação realizada após 12 dias do plantio. Valores não diferiram significativamente através do teste de Tukey. Médias de quatro repetições.

inicial até a planta. A maioria de juvenis migrou em média 2cm, sendo que parte desses juvenis também migraram no sentido oposto à planta. A presença de *B. subtilis* afetou a orientação do nematóide reduzindo a migração em direção a raiz de soja tanto no experimento que utilizou juvenis quanto no que utilizou ovos de *H. glycines* (Figuras 2 e 3).

O efeito de *B. subtilis* na migração de *H. glycines* revelou que a interferência na orientação provocou dispersão dos juvenis mais desordenadamente do que nos tratamentos que não receberam a bactéria. Este resultado pode ser interpretado como uma degradação bacteriana dos componentes dos exsudatos que estimulam a migração dos juvenis recém eclodidos. A redução da presença de cistos na rizosfera de soja tratada com *B. subtilis*, em casa de vegetação, pode ter sido devido a interferências nos processos de eclosão e orientação de juvenis de *H. glycines*. A hipótese de redução na penetração do nematóide nas raízes pode ser esclarecida como habilidade da bactéria envolver-se ou ligar-se às lectinas de superfície, que neste caso pode ser mínima devido à bactéria ser gram-positiva. Em solo pausterizado, rizobactérias reduziram a infecção por nematóide, variando de 45 a 68% em várias culturas (SIKORA, 1988). Esse mesmo autor cita que o efeito das rizobactérias está relacionado com a eclosão de juvenis ou eficácia de feromônios para atração dos machos.

Os resultados encontrados com o tratamento das sementes de soja com *Bacillus subtilis* demonstraram ter havido uma redução, significativa, em cerca de 70%, da presença de cistos de nematóides viáveis nas raízes das plantas, quando se trataram as sementes com a formulação PM na dosagem 1000g/50kg de semente. No caso da adição

direta de *B. subtilis* no solo (conc. inicial de $1,0 \cdot 10^7$ cels./g de solo), a redução da presença de cistos foi maior em cerca de 80% de controle (Figura 4).

A colonização e distribuição uniforme das bactérias na rizosfera é importante para eficiência no controle das infecções por nematóides. A concentração inicial do biocontrolador a ser introduzido tem de garantir população suficiente para o nível de controle esperado durante o ciclo da cultura. O número de unidades formadoras de colônias no inóculo que atualmente é aplicado via semente tem sido demonstrado como de extrema importância para se determinar o nível de atividade antagonista (RACKE & SIKORA, 1992).

Na análise da população de *Bacillus* spp. na rizosfera, após a coleta do experimento, foi encontrado colonização dessas bactérias na ordem de $7,0 \cdot 10^6$ cels./g no tratamento que recebeu *B. subtilis* no solo. Colonizações inferiores foram encontradas no tratamento que recebeu a dosagem 500g da formulação/50kg de sementes e no tratamento controle, esses dois tratamentos expressando colonização da ordem de 10^4 céls/g de solo (Figura 5). Como não foram utilizados marcadores genéticos para identificação da estirpe de *B. subtilis* usada no solo, não se pode confirmar se as colônias detectadas na avaliação eram dessa estirpe, contudo a morfologia em ágar e visualização das células em microscópio permite identificar a estirpe de *B. subtilis* utilizada.

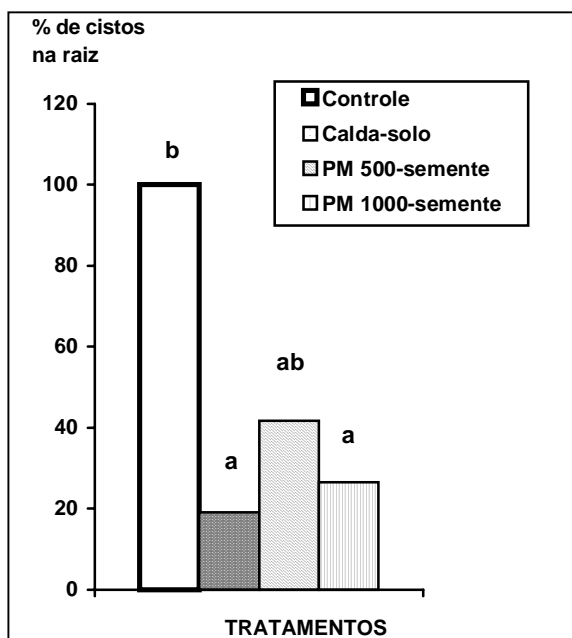


Figura 4 - Influência de *B. subtilis* aplicado em tratamento de solo ou de semente na incidência de cistos de *H. glycines* na rizosfera de soja, em plantas com 62 dias de idade. Colunas com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Neste trabalho, não foi determinada a população final da estirpe testada de *B. subtilis*,

especificamente, devido ao não emprego de marcadores. Entretanto, pela semelhança das colônias detectadas na população com a da referida estirpe, além da população reduzida de *Bacillus* spp. no tratamento controle, pode-se afirmar que a maioria das colônias detectadas foi de *B. subtilis* utilizada no inóculo inicial. Esta afirmação é reforçada pelo fato de que existiu redução significativa da infecção por *H. glycines* nas plantas tratadas com *B. subtilis*.

Os resultados encontrados neste trabalho reforçam a tese de que o controle biológico de nematóides em plantas através de rizobactérias não seja devido a um efeito direto do biocontrolador sobre o nematóide. A interferência em algum estágio do ciclo de vida do nematóide pode ser a explicação mais coerente para o controle encontrado nos bioensaios com rizobactérias. Essa interferência pode estar relacionada com fatores químicos ou metabólicos envolvidos na interação de diversos microrganismos de solos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado parcialmente pela Turfal Ind. e Com. Ltda (Curitiba, PR).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, F.F. Efeito de *Bacillus* spp e seus metabólitos na competitividade e na nodulação da soja (*Glycine max* [L.] Merrill) por *Bradyrhizobium* spp. Londrina, 1995. 117p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, 1995.
- BETTIOL, W., KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal de bruzone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.25, p.1165-1174, 1990.
- FUKUI, R., POINAR, E.I., BAUER, P.H., *et al.* Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. *Phytopathology*, v.84, p.1338-1345, 1994.
- KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZKABANA, R., MCINROY, J.A. *et al.* Rhizosphere bacteria antagonist to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes identification by fatty-acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant and Soil*, v.139, n.1, p.75-84, 1992.
- KREBS, B., JUNGE, H., OCKHARDT, A., *et al.* *Bacillus subtilis*: an effective biocontrol agent. *Pesticides Sciences*, v.37, p.427-429, 1993.
- LI, D.M., ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-

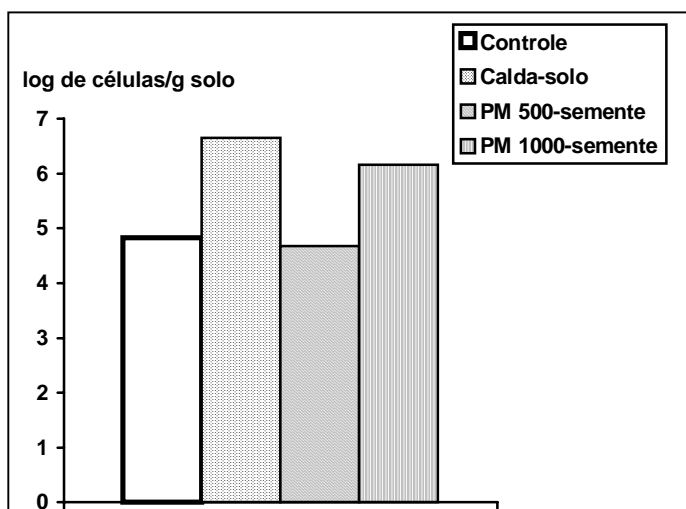


Figura 5 - Colonização da rizosfera de soja por *Bacillus* spp., em plantas inoculadas com ovos de *H. glycines*. Avaliação após 62 dias de plantio. Experimento conduzido em casa de vegetação.

producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant and Soil*, v.108, p.211-219, 1988.

MATSUNO, Y., ANO, T., SHODA, M. Cloning of a gene responsible for the specific production of an antifungal antibiotic iturin with n-C₁₆-β-amino acid residue. *Journal of General and Applied Microbiology*, v.38, p.505-509, 1992.

NEIPP, P.W., BECKER, J.O. Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta vulgaris* against *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology*, v.31, n.1, p.54-61, 1999.

NISHI, C.Y.M. Infecção, competitividade e eficiência da fixação biológica do nitrogênio em soja (*Glycine max* [L.] Merrill) inoculada com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Londrina, 1995. 110p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, 1995.

NORONHA, M.A., MICHHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, v.20, n.2, p.174-178, 1995.

OOSTENDORP, M., SIKORA, R.A. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Revue Nématol.* v.13, p.269-274, 1990.

RACKE, J., SIKORA, R.A. Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Soil Biol Biochem*, v.24, p.521-526, 1992.

SIDDIQUI, Z.A., MAHMOOD, I. Biological control of *Heterodera cajani* and *Fusarium udum* by *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Glomus fasciculatum* on "pigeonpea". *Fundam. Appl. Nematol.* v.18, p.559-566, 1995.

SHARMA, R. D., GOMES, A. C. Controle biológico de *Meloidogyne arenaria* com *Pausteria penetrans*. *Nematologia Brasileira*, v.23, n.1, p.47-52, 1999.

- SHARMA, R.D., VIVALDI, L.J. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pausteria penetrans*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.11, p.2065-2069, 1999.
- SIKORA, R.A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Med Fac Landbouww Rijksuniv Gent**, v.53, n.2b, p.867-878, 1988.
- TIAN, H.L., RIGGS, R.D., CRIPPEN, D.L. Control of soybean cyst nematode by chitinolytic bacteria with chitin substrate. **Journal of Nematology**, v.32, n.4, p.370-376, 2000.
- TIAN, H.L., RIGGS, R.D. Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.32, n.4, p.377-388, 2000.