

# EFEITO DE *BACILLUS SUBTILIS* SOBRE *PYRICULARIA ORYZAE* AGENTE CAUSAL DA BRUSONE DO ARROZ<sup>1</sup>

WAGNER BETTIOL<sup>2</sup> e HIROSHI KIMATI<sup>3</sup>

RESUMO - O antagonismo apresentado por *Bacillus subtilis* contra a *Pyricularia oryzae* foi do tipo antibiose. Os antibióticos produzidos por *B. subtilis* inibiram, *in vitro*, tanto o crescimento micelial quanto a germinação de conídios de *P. oryzae*. Estas substâncias demonstraram ser termooestáveis e apresentaram alta eficiência em inibir o patógeno. A multiplicação de *B. subtilis* em meio líquido, com e sem agitação constante, liberou metabólitos em concentração suficiente para inibir completamente o crescimento micelial de *P. oryzae* após um dia de incubação. A capacidade de *B. subtilis* em inibir o crescimento micelial do agente causal da brusone do arroz foi influenciada pelas condições de luminosidade, sendo a luz fluorescente e o escuro, mais apropriados, e a próxima do ultravioleta, prejudicial.

Termos para indexação: controle biológico, brusone, *Oryza sativa*.

## EFFECTS OF *BACILLUS SUBTILIS* ON *PYRICULARIA ORYZAE*, CAUSAL AGENT OF RICE BLAST

ABSTRACT - Antibiosis was the mechanism of antagonism showed by *Bacillus subtilis* against *Pyricularia oryzae*. Antibiotics secreted by *B. subtilis* were *in vitro* inhibitory to mycelial growth as well as to conidial germination. The antagonistic substances produced by *B. subtilis* were thermo-stable and they acted at low concentrations. In liquid medium with and without constant agitation, *B. subtilis* secreted metabolites in adequate concentration to inhibit totally mycelial growth of *P. oryzae* after one day of incubation. The capacity of *B. subtilis* to inhibit the mycelial growth of *P. oryzae* was not affected by fluorescent light and darkness, but the near ultraviolet light was prejudicial.

Index terms: biological control, leaf blast, *Oryza sativa*.

## INTRODUÇÃO

Sob todas as condições de cultivo, a brusone, doença causada por *Pyricularia oryzae*, é considerada a mais séria da cultura do arroz, tanto por sua larga distribuição quanto pelo poder de destruição, não só no Brasil mas em todo o mundo (Cardoso & Kimati 1980, Ou 1985). As medidas de controle são baseadas principalmente na utilização de variedades re-

sistentes, de fungicidas e de práticas culturais adequadas (Toledo et al. 1975, Cardoso & Kimati 1980, Ribeiro 1981, Ou 1985).

O controle biológico, nos últimos anos, vem despontando como uma das alternativas de controle para vários fitopatógenos em culturas de expressão econômica. Para a brusone, o primeiro relato é de Ioshii (1949), citado por Fukunaga (1965), que mostra a possibilidade de controle de *P. oryzae* através de antibióticos produzidos por *Cephalothecium* spp. Este relato estimulou a busca de microrganismos produtores de antibióticos, culminando na seleção de *Streptomyces griseochromogenes* e *S. Kasugaensis*, produtores de blasticidina S e Kasugamicina, respectivamente (Fukunaga 1965 e Umezawa et al. 1965), produtos esses utilizados até hoje. Mais recentemente, Sy et

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 6 de fevereiro de 1990.  
Extraído da Tese de doutoramento do primeiro autor.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., Dr., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura (CNPDA), Caixa Postal 69, CEP 13820 Jaguariúna, SP. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Eng. - Agr., Dr., Prof. - Titular, ESALQ/USP. Dep. de Fitopatologia, Caixa Postal 9, CEP 13400 Piracicaba, SP.

al. (1978a, b), Sy et al. (1983a, b) e Sy et al. (1984) verificaram inibição do crescimento micelial por *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum*, *Myrothecium verrucaria*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *Fusarium* sp., *T. pseudo-koningii*, *Aspergillus niger*, *Micromonospora* sp., *T. roseum* e duas bactérias. Ribeiro (1987) verificou *Trichoderma*, *Trichothecium* e *Nigrospora* inibindo o crescimento de colônias de *P. oryzae*.

Bettiol & Kimati (1989) observaram a ocorrência de grande quantidade de microrganismos antagonísticos a *P. oryzae* na superfície das plantas de arroz, sendo que os mais eficientes em inibir o seu crescimento micelial pertencem à espécie *Bacillus subtilis*, atuando através de antibiose. Há vários relatos do potencial inibidor de *B. subtilis* para diversos patógenos: *Rhizoctonia solani*, *R. bataticola*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium udum* e *Colletotrichum falcatum* (Vasudeva & Chakravarthi 1954); *R. solani* (Dunleavy 1955); *Erwinia amylovora* (Abo-El-Dahab & El. Gorani 1964); *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* (Kommendahl & Mew 1975); *Colletotrichum gloeosporioides* (Bastos & Figueiredo 1976); *Nectria galligena* (Swinburne et al. 1975); *Macrophomina phaseolina* e *Botryodiplodia solani-tuberosi* (Thirumalachar & O'Brien 1977); *Crinipellis perniciosus* (Bastos 1978); *Phytophthora palmivora* (Odigie & Ikotun 1982); *Uromyces phaseoli* (Stavely et al. 1981, Baker et al. 1983, 1985); *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Yven et al. 1985); *Phomopsis* sp. (Cubeta et al. 1985); *Verticillium dahliae* (Hall et al. 1986); *Monilinia fructicola* (Pusey & Wilson 1984, Mckeen et al. 1986); *Alternaria* sp., *Fusarium moniliforme*, *Pestalotia* sp., *Phomopsis* sp., *Dothiorella gregaria*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Sordaria* sp. (Medina 1986); *H. oryzae* (Nunes et al. 1986a, b) e *Cylindrocladium* sp. (Bettiol et al. 1988).

O presente trabalho teve por objetivos verificar:

1. o efeito da concentração de caldo, onde isolados de *B. subtilis* foram multiplicados, na

inibição do crescimento micelial de *P. oryzae*;

2. o efeito do período de incubação de *B. subtilis*, em meio líquido, na inibição de *P. oryzae*;

3. a influência do caldo onde *B. subtilis* foi multiplicado, sobre a germinação de esporos de *P. oryzae*;

4. a influência das condições de luminosidade na incubação de *B. subtilis* multiplicados em meio líquido, na inibição do crescimento micelial de *P. oryzae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da concentração de caldo, onde isolados de *Bacillus subtilis* foram multiplicados, na inibição do crescimento micelial de *Pycicularia oryzae*.

Para avaliar o efeito da concentração do caldo [Batata - Dextrose (BD)] onde isolados de *B. subtilis* obtidos de plantas de arroz (Bettiol et al. 1988) foram multiplicados, na inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* os isolados AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115, AP-137, AP-150, AP-165, AP-181, AP-183, AP-203, AP-323, AP-332, AP-339, AP-365, AP-366, AP-401, AP-420, AP-429 e AP-471 foram colocados para multiplicação em 100 ml de meio líquido (BD), contidos em frasco-de-erlenmeyer de 250 ml, por dez dias, sob agitação constante e em condições ambientes. Após este período, a cultura foi esterilizada em autoclave a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Posteriormente, este caldo foi incorporado em BDA nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 20,0% (V/V), novamente autoclavados a 120°C e 1 atm por 20 minutos e vertidos em placas-de-petri. Para o centro de cinco placas-de-petri foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura (BDA) com *P. oryzae* em pleno desenvolvimento, e mantidos em condições ambientes com temperatura variando entre 25 e 27°C, por cinco dias. Decorrido este período, foi realizada a leitura do crescimento micelial de *P. oryzae* através do diâmetro da colônia e determinada a percentagem de inibição.

Para excluir o efeito da diluição dos nutrientes do meio de cultura foi realizado ensaio semelhante ao descrito anteriormente usando as mesmas diluições com água destilada.

A partir da percentagem de inibição foi calculado o ED<sub>60</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>95</sub>, para cada antagonista, trans-

formando a percentagem de inibição em probitos e a concentração da dosagem em  $\text{Log}_{10}$ .

#### **Efeito do período de incubação de *Bacillus subtilis*, em meio líquido (BD), na inibição de *Pyricularia oryzae***

Para dois frascos-de-erlenmeyer de 250 ml com 100 ml de BD autoclavados por 20 minutos a 120°C e 1 atm, foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura (BDA) com isolado AP-51 de *B. subtilis* em pleno desenvolvimento. Um frasco permaneceu estacionário e outro sob agitação constante, ambos em condições ambientes com temperatura variando entre 25 e 28°C. Este procedimento foi repetido durante quinze dias. Terminado este período, obtiveram-se culturas líquidas do antagonista com um até quinze dias e intervalos de um dia de incubação, com ou sem agitação. Neste momento foi acrescentado 1,6 g de ágar às culturas; foram esterilizadas e vertidas para seis placas-de-petri. Para o centro de três placas-de-petri, foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura (BDA) com *P. oryzae* em pleno desenvolvimento. A incubação foi feita sob condições de luz constante, fornecida por três lâmpadas Philips, de 40 watts, a uma altura de aproximadamente 30 cm, e temperatura entre 25 e 27°C. Após cinco dias foi realizada a leitura do crescimento micelial do fungo através do diâmetro da colônia.

A fim de se avaliar a estabilidade das substâncias inibidoras de *P. oryzae*, produzidas pelo isolado AP-51, as outras três placas-de-petri contendo meios de cultura onde o antagonista foi multiplicado, permaneceram armazenadas em condições ambientes durante 30 dias. Decorrido este período, para o centro das placas foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura (BDA) com *P. oryzae*. A leitura do diâmetro da colônia foi realizada após cinco dias de incubação nas mesmas condições anteriores.

#### **Influência do caldo onde o *Bacillus subtilis* foi multiplicado sobre a germinação de conídios de *Pyricularia oryzae***

O isolado AP-471 de *B. subtilis*, foi colocado para multiplicação em 100 ml de meio líquido (BD), contidos em frasco-erlenmeyer de 250 ml, por dez dias, sob agitação constante, em condições ambientes e temperatura entre 25 e 28°C. Após este período, a cultura foi incorporada em ágar-água nas concentra-

ções de 0,1; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 20,0% (V/V), esterilizada em autoclave a 120°C e 1 atm, por 20 minutos, e vertida em placas-de-petri Pyrex. Com o auxílio de uma pipeta de 1 ml, esterilizada, 0,1 ml de uma suspensão de conídios (concentração  $3,1 \times 10^5$  conídios/ml) foi transferido para as placas-de-petri. Com o auxílio de uma alça-de-drigalski, a suspensão foi uniformizada sobre o meio de cultura. Após 24 horas de incubação, sob condições ambientes e com temperatura entre 25 e 27°C, foi realizada a leitura determinando-se o número de esporos germinados e não germinados por campo de microscópio óptico comum. Foram avaliados dez campos por placa, sendo cinco em duas direções perpendiculares entre si. Foram considerados como conídios germinados todos aqueles que apresentavam tubo germinativo normal ou não.

#### **Influência das condições de luminosidade na incubação de *Bacillus subtilis* multiplicados em meio líquido na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae***

Os isolados AP-12, AP-85, AP-114, AP-420, AP-429 e AP-471 de *B. subtilis* foram colocados sob três condições de luminosidade (escuro, luz fluorescente e próxima ao ultravioleta) para multiplicação em 100 ml de meio líquido (BD), contidos em frasco-erlenmeyer de 250 ml, por um período de sete dias. Os frascos mantidos no escuro e à luz fluorescente permaneceram sob agitação constante, em condições ambientes (temperatura entre 22,5 e 24,5°C), enquanto os incubados em ultravioleta-próxima foram agitados por um minuto, quatro vezes ao dia, e mantidos numa temperatura entre 20 e 22°C. Após este período as culturas foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm, por 20 minutos.

Posteriormente, as culturas esterilizadas foram incorporadas em BDA nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0% (V/V), autoclavadas a 120°C e 1 atm por, 20 minutos, e vertidas em cinco placas-de-petri. Para o centro dessas placas-de-petri foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA contendo micélio de *P. oryzae* em pleno desenvolvimento, a seguir, as placas foram mantidas em condições ambientes com temperatura entre 23 e 26°C, por quatro dias. Decorrido este período foram determinados os diâmetros das colônias de *P. oryzae* e a percentagem de inibição. Após o cálculo da percentagem de inibição foram obtidos os  $\text{ED}_{50}$ ,  $\text{ED}_{90}$  e  $\text{ED}_{95}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Avaliação da concentração do caldo onde isolados de *Bacillus subtilis* foram multiplicados, na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae***

Com o aumento da concentração de caldo no meio de cultura onde os isolados de *B.*

*subtilis* foram multiplicados, houve um aumento na percentagem de inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* (Tabela 1).

Nas concentrações de 5; 7,5 e 10,0% de caldo, ocorreu inibição média de 85, 89 e 92%, respectivamente, no crescimento micelial de *P. oryzae*. Por outro lado, se forem considerados os antagonistas mais eficientes, a média sobe para 92, 94 e 96%, respectivamente.

**TABELA 1. Influência da concentração de caldo (BD) onde os isolados de *Bacillus subtilis* foram multiplicados na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*.**

Isolados	Percentagem de inibição <sup>1</sup>							
	0,0 <sup>2</sup>	0,1	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	20,0
AP-3	0,0 <sup>3</sup>	5,0	54,0	84,0	82,0	92,0	92,0	98,0
AP-12	0,0	-	-	90,0	93,0	94,0	96,0	98,0
AP-42	0,0	12,0	39,0	78,0	84,0	92,0	96,0	100,0
AP-48	0,0	12,0	24,0	40,0	77,0	84,0	88,0	-
AP-49	0,0	5,0	59,0	71,0	89,0	92,0	98,0	-
AP-51	0,0	14,0	82,0	88,0	90,0	93,0	95,0	-
AP-85	0,0	9,0	32,0	66,0	91,0	92,0	93,0	97,0
AP-91	0,0	9,0	48,0	83,0	88,0	90,0	94,0	100,0
AP-94	0,0	21,0	73,0	79,0	76,0	76,0	80,0	94,0
AP-105	0,0	-	-	74,0	82,0	86,0	84,0	87,0
AP-114	0,0	-	-	80,0	85,0	90,0	91,0	100,0
AP-115	0,0	3,0	29,0	71,0	86,0	89,0	93,0	98,0
AP-137	0,0	0,0	13,0	43,0	86,0	92,0	96,0	100,0
AP-150	0,0	4,0	40,0	79,0	84,0	85,0	87,0	100,0
AP-165	0,0	6,0	48,0	85,0	90,0	91,0	93,0	-
AP-181	0,0	6,0	30,0	76,0	81,0	85,0	94,0	100,0
AP-183	0,0	3,0	50,0	82,0	86,0	92,0	94,0	100,0
AP-323	0,0	3,0	37,0	74,0	84,0	93,0	96,0	99,0
AP-332	0,0	7,0	72,0	80,0	89,0	93,0	94,0	100,0
AP-339	0,0	6,0	8,0	26,0	71,0	54,0	59,0	-
AP-365	0,0	8,0	23,0	38,0	65,0	94,0	95,0	-
AP-366	0,0	-	-	85,0	83,0	88,0	96,0	98,0
AP-420	0,0	13,0	33,0	76,0	93,0	97,0	99,0	-
AP-429	0,0	9,0	48,0	53,0	93,0	97,0	100,0	-
AP-471	0,0	12,0	27,0	60,0	94,0	95,0	98,0	-
Média	0,0	7,9	41,4	70,4	84,9	89,0	92,0	98,0

<sup>1</sup> Percentagem de inibição = crescimento da testemunha - crescimento do tratamento/crescimento da testemunha x 100.

<sup>2</sup> Concentração (%).

<sup>3</sup> Os dados são médias de 5 repetições.

O AP-12 inibiu 90% do crescimento micelial de *P. oryzae*, na concentração de 2,5%.

O efeito da diluição dos nutrientes do meio de cultura foi excluído, visto que não houve redução no crescimento micelial do fungo em diluições de até 50% com água destilada.

Os dados de ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>95</sub> facilitam a observação dos isolados de *B. subtilis* que se comportam como mais eficientes em inibir o crescimento de *P. oryzae*. Verifica-se que os isolados AP-12, AP-51, AP-332 são os que inibem em 90 e 95% o crescimento com as menores doses do produto (média de 3,69 e 8,24, respectivamente), e portanto, são os mais eficientes. Enquanto, os isolados AP-94, AP-339 e AP-105 são os menos eficientes, pois as dosagens sobem, em média, para 41,69 e 142,62, respectivamente, para a obtenção da mesma percentagem de inibição (Tabela 2).

#### Efeito do período de incubação de *Bacillus subtilis*, em meio líquido (BD), sobre a inibição de *Pyricularia oryzae*

A multiplicação de *B. subtilis* (isolado AP-51) em meio líquido (BD), com ou sem agitação constante, liberou metabólitos em concentração suficiente para inibir completamente o crescimento micelial de *P. oryzae*, após um dia de incubação. Os meios de cultura onde o isolado AP-51 foi multiplicado por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 dias, com ou sem agitação, inibiram completamente o crescimento de *P. oryzae*.

As substâncias que inibem o fungo apresentam, no mínimo, estabilidade por 30 dias. Isto porque nos meios armazenados (em condições ambientes), por este período, o crescimento do agente causal da brusone foi nulo. Fato interessante foi que mesmo armazenando os meios em condições ambientes (sobre o balcão) não houve contaminação em nenhuma das 45 placas.

Não foi possível verificar o efeito do período de incubação de *B. subtilis*, pois a avaliação foi qualitativa. Na testemunha (zero hora de incubação) houve crescimento de *P. oryzae* o diâmetro médio das colônias foi de

4,35 cm, enquanto nos demais tratamentos não houve crescimento. Também não foi possível diferenciar o efeito da agitação do meio de cultura na produção de substâncias inibidoras de *P. oryzae*, visto que o crescimento foi nulo tanto para as culturas estacionárias quanto para as culturas agitadas, quando a incubação foi superior ou igual a um dia.

Os metabólitos liberados por *B. subtilis*, os quais inibem *P. oryzae*, são termoestáveis, pois as culturas foram autoclavadas a 120°C e 1 atm, por 30 minutos, e ainda permaneceram ativas contra o patógeno.

TABELA 2. Doses estimadas do caldo (BD) onde isolados de *Bacillus subtilis* foram multiplicados, que inibem o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae* em 50, 90 e 95% (ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>95</sub>).

Isolado	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>95</sub>
AP-3	0,91	6,35	11,01
AP-12	0,07	2,74	7,73
AP-42	0,93	6,45	11,18
AP-48	1,89	18,43	35,15
AP-49	0,90	5,40	8,98
AP-51	0,42	3,74	6,96
AP-85	11,19	7,69	13,06
AP-91	0,85	5,78	9,96
AP-94	0,51	18,38	50,84
AP-105	0,06	38,70	242,26
AP-114	0,73	6,65	12,46
AP-115	1,53	7,50	11,76
AP-137	2,53	6,63	8,71
AP-150	1,24	8,09	13,77
AP-165	0,89	5,66	9,53
AP-181	1,34	7,93	13,12
AP-183	1,01	5,48	8,85
AP-323	1,29	6,23	9,73
AP-332	0,65	4,61	8,02
AP-339	5,34	66,00	134,75
AP-365	2,06	13,17	22,29
AP-366	0,39	6,20	13,58
AP-420	0,89	5,16	8,50
AP-429	1,01	5,84	9,58
AP-471	1,14	6,77	11,21

### Influência do caldo onde *Bacillus subtilis* foi multiplicado, sobre a germinação de conídios de *Pyricularia oryzae*

Com o aumento na concentração do caldo no meio de cultura onde *B. subtilis* (isolado AP-471) foi multiplicado, houve redução na percentagem de germinação dos conídios de *P. oryzae* presentes no meio (Tabela 3). Foram considerados conídios germinados todos os que apresentavam tubo germinativo normal ou não. No entanto, foi verificado que com o aumento na concentração do caldo presente no meio, houve aumento no número de conídios considerados germinados, cujo tubo germinativo apresentava-se deformado. Verifica-se desta forma, que os metabólitos liberados por *B. subtilis* causam inibição na germinação e alteração na estrutura do tubo germinativo dos conídios de *P. oryzae*.

### Influência das condições de luminosidade na incubação de *Bacillus subtilis* multiplicado em meio líquido, na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*

A multiplicação de *B. subtilis* em meio líquido (BD), sob diferentes condições de lumi-

TABELA 3. Influência da concentração do caldo onde *Bacillus subtilis* (AP-471) foi multiplicado sobre a germinação de conídios de *Pyricularia oryzae*.

Concentração (%)	Conídios germinados (%)
0,0	81,75 <sup>1</sup> a
0,1	69,50 ab
1,0	60,45 b
2,5	60,30 b
5,0	54,45 b
7,5	52,15 bc
10,0	54,30 b
20,0	34,00 c

<sup>1</sup> Média de 20 leituras. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

nosidade durante a incubação (escuro, luz fluorescente e luz próxima ao ultravioleta), possibilitou a produção de metabólitos antagônicos a *P. oryzae*. No entanto, a produção foi diferenciada de acordo com a incubação. Para todos os isolados de *B. subtilis* testados, foi verificado que quando incubados em condições de luz fluorescente apresentaram maior percentagem de inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* do que aqueles incubados no escuro ou em luz próxima ao ultravioleta (Tabela 4). Os isolados incubados no escuro apresentaram menor capacidade de inibição de *P. oryzae* do que aqueles em luz fluorescente, no entanto, as diferenças foram pequenas. A incubação de *B. subtilis* numa fonte luminosa próxima ao ultravioleta foi altamente prejudicial para a produção de metabólitos antagônicos a *P. oryzae* (Tabela 4).

Os resultados apresentados em valores de ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>95</sub>, confirmam as afirmações anteriores, haja vista que, em média, os valores estimados dos EDs, quando o caldo foi incubado em luz próxima ao ultravioleta, são muito superiores àqueles apresentados para a incubação no escuro e à luz fluorescente (Tabela 5).

Pelos resultados obtidos, não é possível determinar se o efeito foi o de induzir menor produção desses metabólitos, de inibir a multiplicação da bactéria, ou de inativar os metabólitos produzidos.

É interessante observar que os isolados AP-12, AP-114 e AP-471 apresentaram valores de ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>95</sub> muito inferiores aos isolados AP-85, AP-420 e AP-429, indicando diferença de comportamento em relação à luz (Tabela 5).

*B. subtilis* apresenta grande antagonismo a *P. oryzae*, pois quando multiplicado em meio líquido por um dia, produz antibióticos suficientes para impedir completamente o crescimento do patógeno. Aboel-Dahab & El-Goorani (1964) demonstraram que com o aumento no período de incubação de *B. subtilis*, ocorreu aumento na inibição de *Erwinia amylovora*. Contudo, nesse trabalho não foi possível essa detecção porque o crescimento de

*P. oryzae* foi completamente inibido quando a incubação de *B. subtilis* foi superior a um dia. Os antibióticos produzidos por *B. subtilis* inibem o crescimento micelial (Tabelas 1 e 2) e a germinação dos conídios de *P. oryzae* (Tabela 3), sendo que muitos dos conídios germinados exibem o tubo germinativo mal formado. Resultados semelhantes foram obtidos por Vasudeva & Chakravarthi (1954) com *Alternaria solani*; Swinburne et al. (1975) com *Nectria galligena*; Thirumalachar & O'Brien (1977) com *Macrophomina phaseolina*; Fravel & Spurr Júnior (1977) com *Alternaria alternata*; Baker et al. (1983) com *Uromyces phaseoli*; e Pusey & Wilson (1984) com *Monilinia fructicola*.

Foi demonstrada a termoestabilidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* que controlam *P. oryzae* (Tabelas 1, 3 e 4). Esta característica coincide com a verificada por Landy et al. (1948), Dunleavy (1955), Baker et al. (1985) e Medina (1986). A termoestabilidade, juntamente com a estabilidade das substâncias antagonistas na forma seca e no armazenamento, observadas por Landy et al. (1948) e Swinburne et al. (1975), são importantes para sua industrialização. Nos estudos para verificar o efeito da luz sobre *B. subtilis* foi verificado que quando incubados em meio líquido e iluminados com luz próxima ao ultravioleta (NUV), os caldos onde os antagonistas foram multiplicados inibiram o cresci-

**TABELA 4.** Influência das condições de luminosidade na incubação de *Bacillus subtilis*, multiplicado em meio líquido na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*.

Concentração (%)	Porcentagem de inibição																	
	AP-12			AP-85			AP-114			AP-420			AP-429			AP-471		
	ES	LF	NUV	ES	LF	NUV	ES	LF	NUV	ES	LF	NUV	ES	LF	NUV	ES	LF	NUV
0,0	0,0 <sup>1</sup>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	11,0	14,0	11,0	7,0	13,0	11,0	8,0	10,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	8,0	0,5	0,1	13,0	0,0
2,5	16,0	33,0	31,0	8,5	16,0	13,0	21,0	61,0	6,0	3,0	7,0	4,0	0,1	18,0	4,0	14,0	63,0	10,0
5,0	41,0	58,0	40,0	28,0	46,0	-	44,0	-	14,0	5,0	22,0	4,4	7,5	71,0	4,5	21,0	87,0	15,0
10,0	88,0	89,0	74,0	93,0	96,0	25,0	89,0	94,0	24,0	10,0	64,0	10,0	22,0	95,0	3,0	38,0	89,0	45,0
20,0	91,0	93,0	77,0	96,0	100,0	28,0	93,0	94,0	52,0	90,0	91,0	11,0	83,0	100,0	9,0	87,0	96,0	69,0

<sup>1</sup> Média de 5 repetições.

ES = escuro; LF = luz fluorescente; NUV = luz próxima ao ultravioleta.

AP = antagonista a *P. oryzae*.

**TABELA 5.** Doses estimadas do caldo (BD) onde isolados de *Bacillus subtilis* foram multiplicados, sobre diferentes condições de luminosidade que inibe o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae* em 50, 90 e 95% (ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>95</sub>).

Isolado	Escuro			Luz fluorescente			Próxima ao ultravioleta		
	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>95</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>95</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>95</sub>
AP-12	4,93	17,37	24,82	3,60	14,27	21,08	5,67	36,46	61,80
AP-85	5,44	14,16	18,58	4,04	11,27	15,06	217,61	50231,32	234929,03
AP-114	4,67	15,14	21,13	2,53	9,24	13,34	20,02	95,20	148,13
AP-420	13,23	26,78	32,69	7,78	21,04	27,90	1231,75	105360,54	371891,52
AP-429	13,00	26,15	31,87	3,57	8,56	10,98	3622,28	412276,86	1577956,59
AP-471	9,66	32,07	45,07	2,23	8,28	12,00	11,97	44,60	64,76

mento micelial de *P. oryzae* em menor grau que quando incubados com luz fluorescente ou escuro (Tabelas 4 e 5). Mesmo sendo os incubados em NUV pouco aerados e permanecendo sob temperatura inferior à dos outros, esses efeitos são minimizados quando observados os resultados obtidos no item 2.

No estudo não foi possível determinar se NUV inibe a multiplicação de *B. subtilis*, se inibe a produção de antibióticos ou se destrói as substâncias produzidas. Esta possível sensibilidade à luz ultravioleta poderá ser vencida através de seleção dos isolados mais adaptados, pois o comportamento em relação ao NUV foi diferente (Tabelas 4 e 5), ou pelo melhoramento dos microrganismos em relação a essa característica ou ainda por uma adequada formulação do produto.

A inibição de *P. oryzae* com os metabólitos produzidos por *B. subtilis* ocorre em baixas concentrações, haja vista que 1,0% do caldo onde os AP-3, AP-49, AP-51, AP-94 e AP-332 foram multiplicados por dez dias, inibiu 54, 59, 82, 73 e 72% do crescimento micelial do fungo, respectivamente. Faz-se necessário salientar que foi em 1,0% do caldo que *B. subtilis* foi multiplicado, sendo que a quantidade de metabólito no caldo é desconhecida, e, possivelmente baixa, mostrando que produzem substâncias altamente efetivas na inibição de *P. oryzae*. Assim, há necessidade de estudar meios de culturas mais apropriados para multiplicação dos antagonistas e produção de substâncias inibidoras, condições de incubação e purificação da toxina e sua efetividade. Na Tabela 3, é interessante observar, que os valores do ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>95</sub> apresentados pelos caldos onde *B. subtilis* foi multiplicado são diferenciais. Assim, cálculos desta natureza podem ser utilizados para seleção dos antagonistas mais eficientes.

A purificação e a identificação das substâncias inibidoras de *P. oryzae* produzidas por *B. subtilis* são necessárias para entendimento do completo mecanismo de controle expresso no patossistema. Uma vez realizado este trabalho, a modificação da sua estrutura poderia levar a

um produto mais eficiente e conduzir o controle para um método mais seguro e eficaz.

Encontra-se em estudo, em condições de campo, testes para avaliar o efeito de *B. subtilis* e seus metabólitos no controle da brusone do arroz.

## CONCLUSÕES

1. Os antibióticos produzidos por *B. subtilis* inibem, *in vitro*, tanto o crescimento micelial quanto a germinação dos conídios de *P. oryzae*, sendo que muitos tubos germinativos são deformados.

2. A multiplicação de *B. subtilis* em meio líquido (BD), com e sem agitação constante, libera metabólitos em concentração suficiente para inibir completamente o crescimento micelial de *P. oryzae*, após um dia de incubação.

3. A capacidade de *B. subtilis* em inibir o crescimento micelial de *P. oryzae* é influenciada pelas condições de luminosidade, sendo a luz fluorescente e o escuro mais apropriados, e a luz próxima ao ultravioleta prejudicial.

4. As substâncias antagonistas liberadas por *B. subtilis* apresentam termoestabilidade e alta eficiência em inibir *P. oryzae in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ABO-EL-DAHAB, M.K. & EL-GOORANI, M.A. Antagonistic effect of a *Bacillus subtilis* strain upon *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, St. Paul, 54:1285-6, 1964.
- BAKER, C.J.; STANVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, St. Paul, 73:1148-52, 1983.
- BAKER, C.J.; STANVELY, J.R.; MOCK, N. Bio-control of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Dis.*, St. Paul, 69: 770-2, 1985.
- BASTOS, C.N. Antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, causador da vas-soura-de-bruxa do cacauzeiro. *R. Theobroma*, Itabuna, 8:147-50, 1978.



- BASTOS, C.N. & FIGUEIREDO, J.M. Inibição *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., agente causal da antracnose do cajueiro, por uma substância produzida por *Bacillus* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 9, Campinas, 1976. **Anais...** Campinas, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1976. p.26.
- BETTIOL, W. & KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagonísticos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle do Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). **Summa Phytopathol.**, Jaguariúna, SP., 15:257-66, 1989.
- BETTIOL, W.; AUER, C.G.; CAMARGO, L.E.A.; KIMATI, H. Controle da mancha foliar de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium scoparium* com *Bacillus* sp. **Summa Phytopathol.**, Jaguariúna, 14(3/4): 210-18, 1988.
- CARDOSO, C.O.N. & KIMATI, H. Doenças do arroz - *Oryza sativa* L. In: GALLI, F. Coord. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** São Paulo, Ceres, 1980. p.75-86.
- CUBETA, M.A.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. **Plant Dis.**, St. Paul, 69:506-9, 1985.
- DUNLEAVY, J. Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St. Paul, 45:252-8, 1955.
- FRAVEL, D.R. & SPURR JÚNIOR, H.W. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment. **Phytopathology**, St. Paul, 67:930-2, 1977.
- FUKUNAGA, K. Fungicide development for blast control. In: SYMPOSIUM AT THE INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, Baltimore, MD, 1963. **The rice blast disease; Proceedings...** Baltimore, MD, Johns Hopkins Press, 1965. p.409-14.
- HALL, T.J.; SCHREIBER, L.R.; LEBEN, C. Effects of xylem colonizing *Bacillus* spp. on *Verticillium* wilt in maples. **Plant Dis.**, St. Paul, 70:521-4, 1986.
- KOMMENDAHL, T. & MEW, J.C. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonist. **Phytopathology**, St. Paul, 65:296-300, 1975.
- LANDY, M.; WARREN, G.N.; ROSENMAN, S.B.; COLIO, L.G. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. **Soc. Exp. Biol. Med. Proc.**, New York, 67:539-41, 1948.
- MCKENN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St. Paul, 76:136-9, 1986.
- MEDINA, R.A.A.D. **Isolamento e caracterização de um produto metabólico de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. T-41, com atividade antibiótica a fungos fitopatogênicos.** Brasília, UnB 1986. Tese Mestrado.
- NUNES, M.E.T.; BETTIOL, W.; KIMATI, H. Influência de isolados de *Bacillus* no crescimento micelial de *Helminthosporium oryzae*, causador da mancha parda foliar do arroz (*Oryza sativa* L.). In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1, Piracicaba, 1986. **Anais...** Campinas, Fundação Cargill, 1988a. p.59.
- NUNES, M.E.T.; BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagonísticos a *Helminthosporium oryzae* para controle de mancha parda do arroz. **Fitopatol. bras.**, Brasília, 11:336, 1986b.
- ODIGIE, E.E. & IKOTUN, T. *In vitro* and *In vivo* inhibition of growth of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. by antagonistic microorganisms. **Fitopatol. bras.**, Brasília, 7:157-67, 1982.
- OU, S.H. **Rice diseases.** London, Commonwealth Mycological Institute, 1985. 380p.
- PUSEY, P.L. & WILSON, C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Dis.**, St. Paul, 68:753-6, 1984.
- RIBEIRO, A.S. Influência da época de semeadura do arroz sobre os danos da brusone. **Fitopatol. bras.**, Brasília, 6:604, 1981.
- RIBEIRO, A.S. **Controle integrado das doenças do arroz irrigado: relatório do Projeto nº 039-85001/1.** Brasília, EMBRAPA-CPATB/CNPDA, 1987.
- STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; BAKER, C.J.; MACFALL, J.S. Greenhouse control of bean rust with *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St. Paul, 71:771, 1981. ,

- SWINBURNE, T.R.; BARR, J.G.; BROWN, A.E. Production of antibiotics by *Bacillus subtilis* by their effect on fungal colonists of apple leaf scabes. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, **65**:211-7, 1975.
- SY, A.A.; ALBERTINI, L.; HAMANT, C. Recherches sur la lutte biologique contre le *Pyricularia oryzae* Cav. I. Action *In vitro* d'antagonistes fongiques sur la croissance mycélienne du parasite. *Rev. Gen. Bot.*, Paris, **85**:63-81, 1978a.
- SY, A.A.; ALBERTINI, L.; HAMANT, C. Recherches sur la lutte biologique contre le *Pyricularia oryzae* Cav. II. Action *In vitro* d'antagonistes fongiques sur la germination des conidies du parasite. *Rev. Gen. Bot.*, Paris, **85**:83-90, 1978b.
- SY, A.A.; ALBERTINI, L.; ZOHOURI, P.; NORNG, K. Lutte biologique contre *Pyricularia oryzae* Cav. parasite du riz par application de microorganismes antagonistes: premiers résultats *in vitro*. In: COLLOQUE DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE PHYTOPATHOLOGIE, 24, Bordeaux, 1983. **Les antagonismes microbiens modes d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes**. Bordeaux, INRA, 1983a. p.137-44.
- SY, A.A.; NORNG, K.; ALBERTINI, L.; BARRAULT, G. [Research on biological control of *Pyricularia oryzae* Cav. III. Effect of temperature on the capacity of antagonistic microorganisms to inhibit mycelial growth of the parasite *in vitro*]. Recherches sur la lutte biologique contre *Pyricularia oryzae* Cav. III. Influence de la température sur l'aptitude de germes antagonistes à inhiber *in vitro* la croissance mycélienne du parasite. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, **4**:245-9, 1983b.
- SY, A.A.; NORNG, K. ALBERTINI, L.; PETITPREZ, M. [Research on biological control of *Pyricularia oryzae* Cav. IV. Effect of pH on the ability of antagonistic microorganisms to inhibit mycelial growth of the parasite *in vitro*]. Recherche sur la lutte biologique contre *Pyricularia oryzae* Cav. IV. Influence du pH sur l'aptitude de germes antagonistes à inhiber *in vitro* la croissance mycélienne du parasite. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, **3**:59-65, 1984.
- THIRUMALACHAR, M.J. & O'BRIEN, M.J. Suppression of charcoal rot in potato with a bacterial antagonist. *Plant Dis. Rep.*, Beltsville, **61**:543-6, 1977.
- TOLEDO, A.C.D.; IAMAMOTO, T.; UYENO, M.N.; OLIVEIRA, D.A. Comparação de fungicidas no controle da "brusone" do arroz. *Summa Phytopathol.*, Piracicaba, **1**:295-8, 1975.
- UMEZAWA, H.; OKAMI, Y.; SUHARA, Y.; HAMADA, M.; TAKENCHI, T. A new antibiotic, Kasuganicin. *J. Antibiot.*, Tokyo, **18**:101-3, 1965.
- VASUDEVA, R.S. & CHAKRAVARTHI, B.P. The antibiotic action of *Bacillus subtilis* in relation to certain parasitic fungi, with special reference to *Alternaria solani* (Eff. & Mart.) Jones & Grout. *Ann. Appl. Biol.*, Cambridge, **41**:612-8, 1954.
- YVEN, G.Y.; SCHROTH, M.N.; MACCAIN, A.H. Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppression soils and antagonistics bacteria. *Plant Dis.*, St. Paul, **69**:1071-5, 1985.