

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Bacillus* E164 CONTRA *Bipolaris sorokiniana*

Dissertação de Mestrado

Mariana Carissimi

Porto Alegre, 2006

Agradecimentos

Agradeço a todos que, de alguma forma, participaram desse aprimoramento pelo qual passei durante os dois anos de mestrado.

Agradeço a minha orientadora, Sueli Teresinha Van Der Sand, pela orientação, nas horas do desespero, nos experimentos que não deram certo, e na hora da comemoração, naqueles que deram; e pela flexibilidade, ao compreender as idas e vindas da minha dicotômica vivência entre Porto Alegre e Caixas do Sul.

Agradeço aos colegas de laboratório, principalmente Alana Poloni, colega estagiária imediata de trabalho, ao compreender as constantes reelaborações da prática ao longo deste período; colegas estagiárias Cheila, Tatiana, Leila, Betânia e Newton, que levaram nos ombros uma boa parte do trabalho pesado.

Agradeço às colegas de curso, em especial Katiane, Sílvia Pavan, Sylvia Verdin, Anamáris e Ana Beatriz e aos professores do curso pela contribuição ao meu crescimento como pessoa.

Agradeço às professoras Maria Lúcia Scroferneker e Cleusa Brilhante pela amizade.

Agradeço, enfim, à minha família, especialmente minha mãe, pelo apoio e por instigar-me a perseverar, e ao meu filho, por compreender minha ausência.

Resumo

Estudo da atividade antifúngica de *Bacillus* E164 contra *Bipolaris sorokiniana*¹

Autor: Mariana Carissimi

Orientador: Sueli T. Van Der Sand

O trigo é o principal cereal componente dos produtos amiláceos atualmente consumido pela população. Além das limitações econômicas e políticas, a produção brasileira de trigo encontra obstáculos como a incidência de doenças, muitas delas causadas por fungos. O fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana* é o agente etiológico da helmintosporiose, cujo controle é baseado principalmente em antifúngicos sintéticos. O fungo não é o principal causador de patologias em trigo, mas é importante do ponto de vista fitossanitário nas plantações, pois se mantém no solo por longo período de tempo podendo atacar as plantações em climas úmidos e quentes. O presente estudo teve objetivos avaliar a maior atividade antifúngica de três isolados de *Bacillus* sp. contra 34 isolados *B. sorokiniana*, selecionar uma linhagem de *Bacillus* sp., elucidar sua atividade inibitória *in vivo* e avaliar as melhores condições de cultivo, propriedades físico-químicas do cultivo filtrado obtido e a atividade antifúngica *in vitro* do mesmo. A bactéria com a melhor ação antagonista foi analisada quanto à produção das enzimas caseinase e lipase, produção e atividade do filtrado de cultivo em diferentes meios e após tratamento térmico e variação de pH. Também foi realizado um teste *in vivo* do antagonista contra o isolado 98031 do fungo. Os três isolados de *Bacillus* foram capazes de inibir *in vitro* os isolados de *B. sorokiniana*, mas destacaram-se os isolados E164 e C98017. Quando testado *in vivo*, o isolado *Bacillus* E164 causou efeitos sobre a morfologia da planta, como redução significativa no comprimento das raízes. No entanto, não foi possível observar um nível elevado de proteção visto que mesmo as plantas infectadas não apresentaram os sintomas da doença. A produção do filtrado foi baseada em caldo triptona de soja, uma vez que a inibição foi similar ao meio com palha de milho e maior que o meio com extrato de malte. O filtrado antifúngico apresentou resistência à fervura por até 90 minutos, mas a atividade foi significativamente diminuída nesse tratamento quando comparada aos tratamentos de 50 a 80°C e temperatura ambiente. A refrigeração e o congelamento não causaram diminuição na atividade do filtrado. A influência do grau de ionização foi percebida nos pHs 5, 6, 8 e 10. O isolado de *Bacillus* E164 apresentou atividade proteolítica e lipolítica em meios específicos. O controle exercido pelo isolado *Bacillus* E164 sobre *B. sorokiniana* foi relevante nos testes *in vitro*. Porém, a influência e a importância da ação do(s) metabólito(s) produzido(s) por esse microrganismo devem ser mais estudados para uma possível aplicabilidade *in vivo*.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia do Controle Biológico, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (71 p.) Abril, 2006.

Abstract

Study of the antifungal activity of *Bacillus* E164 against *Bipolaris sorokiniana*²

Author: Mariana Carissimi

Adviser: Sueli T. Van Der Sand

Wheat is the main cereal component of starch products consumed by the population. Brazilian wheat production has many limitations such as government policies, economic problems, and apart from there is a large loss in production due to diseases caused by fungi. *Bipolaris sorokiniana* is a phytopathogen that causes helminthosporiosis in cereal crops, whose control is mainly rely on synthetical antifungal agents. It has phytosanitary importance, since it can live for a long period in the soil, and attack crops on wet and warm weather conditions. The objectives of this work were to evaluate the antifungal activity of three *Bacillus* sp. Strains against 34 *B. sorokiniana* isolates, to select the best inhibitor of them, to elucidate its action *in vivo* and evaluate the best cultivate conditions, physic and chemical properties of the filtrated obtained and *in vitro* antifungal capacity. The best bacterial strain was chosen and analyzed for the proteolytic and lipolytic activities, productions and activity of the cultivate filtrated after growing on different culture media and after thermal treatment or pH variation. *In vivo* test was made on wheat infected by 98031 isolate. All bacterial isolates were active against *B. sorokiniana* but E164 and C98017T were better than OR13. On *in vivo* test the isolate E164 caused morphological effects on the plant as significant root length reduction. Increase of plants protection was not observed, as even infected ones did not presented disease symptoms. Filtrated production was based in tryptic casein soy broth as the inhibition degree was similar to the corn straw culture and greater than malt extract broth culture. The antifungal filtrated resisted until 90 minutes at 100°C, but significant decrease of activity was observed in this treatment when compared to 50°C to 80°C and environment temperature. Refrigeration and freezing did not cause loss on filtrated activity. Ionization degree influence was observed in pH 5, 6, 8 and 10. *Bacillus* E164 showed proteolytic and lipolytic activities in specific media. Control exerted by *Bacillus* E164 over *B. sorokiniana* isolates was relevant *in vitro*, nevertheless the influence and importance of the metabolites produced must be elucidated for the application *in vivo*.

² Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (71 p.) April, 2006

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1. | Introdução | 1 |
| 2. | Revisão Bibliográfica | 4 |
| 2.1. | Fitopatógeno | 4 |
| 2.2. | Patogenia | 6 |
| 2.3. | Controle através de antifúngicos | 9 |
| 2.4. | Controle biológico de fungos | 12 |
| 3. | Materiais e Métodos | 22 |
| 3.1. | Microrganismos utilizados | 22 |
| 3.2. | Meios de cultura para manutenção | 22 |
| 3.3. | Caracterização dos isolados E164, C98017T e OR13 | 24 |
| 3.3.1. | Testes bioquímicos | 24 |
| 3.4. | Atividade enzimática específica do antagonista | 26 |
| 3.4.1 | Atividade proteolítica | 26 |
| 3.4.2 | Atividade lipolítica | 26 |
| 3.5. | Controle <i>in vitro</i> | 26 |
| 3.5.1.1. | Inoculo fúngico | 26 |
| 3.5.1.2. | Ensaio de antagonismo | 27 |
| 3.5.1.3. | Ensaio de inibição de germinação dos conídios | 27 |
| 3.5.2 | Produção do filtrado | 28 |
| 3.5.2.1. | Determinação da concentração mínima inibitória do filtrado | 28 |
| 3.5.2.2. | Concentração e purificação do filtrado | 29 |
| 3.6. | Controle <i>in vivo</i> | 29 |
| 3.6.1. | Produção do inóculo bacteriano | 29 |
| 3.6.2. | Produção do inóculo fúngico | 29 |
| 3.6.3. | Sementes de trigo sadias | 30 |
| 3.6.4. | Substrato para o cultivo do trigo | 30 |
| 3.6.5. | Ensaio <i>in vivo</i> | 30 |
| 3.6.6. | Análise das raízes | 31 |
| 3.7. | Propriedades químicas e físicas do filtrado antifúngico | 32 |
| 3.7.1. | Estabilidade térmica do filtrado antifúngico | 32 |
| 3.7.1.1. | Refrigeração | 32 |
| 3.7.1.2. | Aquecimento | 32 |
| 3.7.2 | Estabilidade iônica do filtrado antifúngico | 33 |
| 3.8. | Análise estatística | 33 |
| 4. | Resultados e Discussão | 35 |
| 4.1. | Identificação dos isolados bacterianos | 35 |
| 4.2. | Controle <i>in vitro</i> | 37 |
| 4.2.1. | Triagem do isolado bacteriano | 37 |
| 4.2.2. | Crescimento bacteriano em meio líquido | 42 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.2.3. | Concentração mínima inibitória | 45 |
| 4.2.4. | Inibição de germinação dos conídios | 46 |
| 4.3. | Atividade enzimática | 47 |
| 4.4. | Propriedades do filtrado | 49 |
| 4.4.1. | Temperatura | 49 |
| 4.4.2. | Estabilidade iônica | 51 |
| 4.5. | Controle <i>in vivo</i> | 52 |
| 4.6. | Purificação parcial por ultrafiltração | 59 |
| 5. | Conclusões | 60 |
| 6. | Referências Bibliográficas | 61 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01: Formulações comerciais de microrganismos utilizados em controle biológico | 14 |
| Tabela 02: Denominação, país de origem e fonte de inóculo dos isolados de <i>Bipolaris sorokiniana</i> utilizados em teste <i>in vitro</i> contra os isolados de <i>Bacillus</i> E164, C98017T e OR13 | 22 |
| Tabela 03: Comportamento fisiológico dos isolados E164, C98017T e OR13 frente aos testes bioquímicos de identificação segundo Sneath et al. (1986) | 36 |
| Tabela 04: Análise de variância entre os halos de inibição obtidos a partir de antagonismo <i>in vitro</i> entre os isolados bacterianos E164, C98017T e OR13 e 34 isolados de <i>B. sorokiniana</i> ¹ | 39 |
| Tabela 05: Contraste entre os diâmetros de halos obtidos a partir do teste de inibição <i>in vitro</i> exercido pelo isolado OR13 sobre 34 isolados de <i>B. sorokiniana</i> ¹ | 40 |
| Tabela 06: Análise de variância entre halos de inibição obtidos nos ensaios <i>in vitro</i> entre os filtrados de cultivo do isolado <i>Bacillus</i> E164 crescido em caldo tripton de soja, palha de milho e extrato de malte sobre cinco isolados de <i>B. sorokiniana</i> ¹ | 43 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 01: Halos de inibição produzidos pelo filtrado de cultura de *Bacillus* E164 contra o isolado 1992/19 de *B. sorokiniana* após 5 dias de incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. 39
- Figura 02: Conídios de *B. sorokiniana* após 28 horas de crescimento. 42
(A) isolado 98017 sem contato com o sobrenadante de *Bacillus* E164;
(B) 98017 em contato com o sobrenadante de *Bacillus* E164.
- Figura 03: Halo de inibição resultante da ação do filtrado antifúngico produzido pelo isolado E164 contra o isolado 98031 de *B. sorokiniana* em placa, após o tratamento térmico do filtrado por 30, 60 e 90 minutos. 46
- Figura 04: Massa micelial seca obtida a partir do crescimento do isolado 98031 de *B. sorokiniana* em caldos batata dextrose acidificados e alcalinizados com (*) e sem (□) o filtrado de cultura do isolado E164. 47
- Figura 05: Exemplos de cultivar 209 de trigo após 21 dias de crescimento em germinador. A- indivíduos livres de contaminação plantados em substrato estéril; B- indivíduos contaminados com *B. sorokiniana* 98031 plantados em substrato inoculado com o isolado *Bacillus* E164; C- indivíduos contaminados com *B. sorokiniana* 98031 plantados em substrato estéril. 48
- Figura 06: Comprimento de folhas e raízes de trigo sob diferentes tratamentos após 21 dias de crescimento em germinador. Colunas hachuradas correspondem ao comprimento médio das folhas; colunas em branco correspondem ao comprimento médio da raiz principal. * indica comprimento significativamente maior. 49
- Figura 07: Aspecto da bainha e porção proximal das raízes de trigo infectado após 21 dias nos tratamentos com (esquerda) e sem (direita) a presença da bactéria antagonista. 50

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

mm= milímetro

m= micrômetro

kDa= kiloDalton

g= grama

mL= mililitro

nm= nanômetro

M= molar

cm= centímetro

°C= graus Celsius

atm= atmosfera

1. INTRODUÇÃO

Os cereais compõem a dieta básica dos seres humanos e enriquecem a ração de animais. Acrescente demanda por tais produtos, seja na forma *in natura* ou manufaturada, implica na ampliação da área agrícola e em investimentos na proteção do plantio. Ambas as necessidades quando implementadas de forma intensiva e sem planejamento são prejudiciais aos ecossistemas naturais.

O trigo é o principal cereal componente dos produtos amiláceos atualmente consumidos. Tanto o trigo quanto a farinha são os únicos alimentos rotineiramente importados pelo Brasil, sendo a Argentina o maior provedor do mercado brasileiro. Segundo os dados do USDA, órgão de agricultura dos Estados Unidos, a auto-suficiência brasileira havia sido atingida, mas esse plano foi abandonado devido aos custos elevados das políticas protecionistas. Com o Mercosul, o estreitamento de relações com a Argentina, um exportador de trigo mundial, também afetou de forma significativa os produtores brasileiros. Na última década o Brasil tem produzido trigo em uma área bastante limitada, estimada em cerca de 2700 hectares segundo o Conab (Conselho Nacional de Abastecimento). Dados do mesmo órgão prevêem o consumo de 10,2 milhões de toneladas de trigo entre as safras de 2005/2006,

enquanto a produção nesse mesmo período fica em torno de 4,7 milhões de toneladas, comprovando a dependência do país das importações³. A área plantada tende a declinar, mas a produção aumentará devido aos crescentes incrementos na produtividade, e a importação também tende a crescer, sendo o Brasil o maior importador mundial.

Além dos fatores econômicos e políticos, a produção brasileira de trigo encontra obstáculos como a incidência de doenças, muitas delas fúngicas, que atacam a planta desde a raiz até o caule, as folhas e as sementes. Os patógenos que ocorrem com maior frequência na cultura de trigo gaúcha e do sul do país, citados pela Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Trigo, são *Oidium* sp., *Drechslera tritici-repentis* e *Bipolaris sorokiniana*; eles são responsáveis em grande parte pela perda ou menor rendimento na produção de grãos.

O fungo fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana* não causa perdas expressivas mas é importante do ponto de vista sanitário, visto que é um microrganismo cosmopolita, reside no solo saprofiticamente resistindo a condições pouco favoráveis e, com o incremento na logística dos grãos, pode causar danos na produção de outros países.

O controle biológico é um método em expansão no ambiente agrícola, utilizado com sucesso contra insetos e alguns fungos. A utilização de microrganismos como bactérias do solo e vírus como antagonistas de patógenos minimiza o impacto ambiental causado pelos defensivos agrícolas e

³ <http://www.conab.gov.br> em “Brasil: oferta e demanda de produtos selecionados”. Acesso em: 4 nov. 2005.

pode vir a diminuir o custo de produção. Porém é pouco sabido sobre a sua potencialidade contra a helmintosporiose na plantação de trigo.

Assim, esta dissertação teve como objetivos avaliar a maior atividade antifúngica de três isolados de *Bacillus* sp. contra *B. sorokiniana*, selecionar a melhor linhagem com capacidade inibitória de *Bacillus* sp., elucidar a sua atividade inibitória *in vivo* e avaliar as melhores condições de cultivo, propriedades físico-químicas do cultivo filtrado e a atividade antifúngica *in vitro* do mesmo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fitopatígeno

O fungo fitopatogênico *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In Sorokin) Shoemaker é a forma anamórfica (conidial), sinónímias *Helminthosporium sativum* Pamm, *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subaram & Jaim, do fungo cujo estado perfeito ou teleomórfico é classificado como pertencente à espécie do fungo Ascomiceto *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechs. Ex Dastur. A fase sexuada pode ser induzida em laboratório mas nunca foi relatada sua ocorrência no ambiente (Tinline, 1988).

Na forma anamórfica quando crescido em meio de cultivo apresenta micélio cotonoso, branco ou acinzentado claro a escuro, dependendo do isolado (Kumar et al., 2002). Os conidióforos marrons, na maioria simples, produzem conídios através de um poro apical, com crescimento simpodial formando conídios em pontas novas sucessivas. Os conídios são marrons, multicelulares, elípticos, retos ou curvos e germinam por ambas as extremidades (Barnett & Hunter, 1987). A variabilidade dessa espécie é ampla e pode ser percebida tanto em estudos morfofisiológicos quanto em estudos genéticos.

A dimensão e quantidade de células por conídio podem diferir dependendo do pH e da concentração de açúcar do substrato segundo Harding (1975). Alterações morfológicas podem estar relacionadas ao conteúdo lipídico intracelular em certos isolados (Geimba et al., 2005). No mesmo estudo, Geimba et al. (2005) observaram que há homogeneidade na produção de moléculas antigênicas. No entanto, os isolados utilizados apresentaram variações nas composições lipídica, protéica e de carboidratos. O crescimento do fungo *in vitro* é acentuado em vários meios de cultivo e a esporulação é intensa sob diversas temperaturas e pH (Tinline, 1988).

Quanto à variabilidade genética desta espécie, a investigação de polimorfismo no DNA total através da técnica de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) indicou ampla variação para os oligonucleotídeos testados, e os autores sugerem que essa característica está possivelmente relacionada à ocorrência de fluxo gênico entre os isolados (Oliveira et al., 2002). Distinto resultado foi observado por Müller et al. (2005), onde a similaridade entre a maioria dos isolados utilizados no estudo, através da mesma técnica, foi superior a 78%.

O fungo produz toxinas sesquiterpenóides sintetizadas a partir do farnesol. Toxinas como o di-hidro-pré-helmintosporol, a victoxinina e pré-helmintosporolactona causam danos às mitocôndrias (Marder et al., 2006). O pré-helmintosporol interfere na fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e na fotofosforilação nos cloroplastos da planta (Kumar et al., 2002) e a sorokinianina causa inibição da germinação de sementes (Nakajima et al., 1998).

2.2 Patogenia

O *B. sorokiniana* é conhecido por ser o agente etiológico da helmintosporiose denominada também de mancha, marrom, mancha porrada das folhas, carvão do nó, ponto preto das sementes (Tinline, 1988), provocando também podridão comum das raízes. A denominação da moléstica refere-se ao órgão vegetal infectado, uma vez que qualquer parte pode ser alvo de infecção pelo fungo.

Os sintomas iniciam como manchas ovais e pequenas, de coloração marrom-escura à negra, que com o tempo aumentam de tamanho, tornam-se elípticas e com esporulação abundante (Prates & Fernandes, 2001). Em campo foram relatadas duas fases distintas de crescimento do fungo sobre a planta: uma fase biotrófica, com penetração e subsequente invasão da hifa na célula vegetal viva, seguida da fase necrotrófica que é a invasão do mesófilo acompanhada de morte celular (Kumar et al., 2002).

O patógeno tem entre os principais hospedeiros os cereais de inverno como trigo (Metha, 1981), cevada (Almgren et al., 1999), triticale, aveia e centeio. No entanto o fungo já foi isolado de leguminosas, gramíneas e sementes oleaginosas, mostrando-se capaz de produzir lesões em feijão, milho, abóbora, pepino, ervilhas, girassol e tomate em condições experimentais (Duczek et al., 1996). Entretanto, ele não é considerado um patógeno importante para essas plantas.

Sua distribuição é cosmopolita, mas é mais agressivo sob condições de temperaturas e umidade relativa altas, além de desequilíbrio no balanço de minerais do solo (Duveiller & Altamirano, 2000). As perdas relacionadas a esse

patógeno já chegaram a 20% no sul da Ásia, mas há relatos de perdas de até 80% (Pandey et al., 2005). Apesar de também serem contaminados pelo fitopatógeno, a aveia e o centeio mostram menor suscetibilidade à infecção (Kumar et al., 2002).

A amplitude de possíveis hospedeiros-alvo comprova o baixo nível de especialização de *B. sorokiniana* e os isolados deste fungo demonstram grande variabilidade quanto à presença de grupos gênicos de virulência além do necessário para atacar um dado hospedeiro (Nelson & Kline, 1962). Tais genes têm procedências diversas e são adquiridos pelo fungo através de intercruzamento e hibridização (Tinline, 1988). Assim, um mesmo indivíduo é capaz de infectar plantas hospedeiras diferentes. Também a atividade enzimática de xilanase e β -glicosidase parece estar relacionada à adaptabilidade do patógeno, permitindo taxas maiores ou menores na digestão e absorção dos substratos (Geimba et al., 2005).

A origem de uma espécie patogênica pode estar relacionada ao microrganismo patogênico, à planta ou à interação entre os dois. Em *B. sorokiniana* esse fenômeno pode ocorrer devido à mutação ou à recombinação gênica que conseqüentemente afetam os processos bioquímicos específicos ou as características morfológicas (Nelson & Kline, 1962). A parassexualidade, evento onde o fungo obtém variabilidade genética sem entrar na fase sexuada de reprodução, explicaria a diversidade de agressividade entre isolados de uma mesma região (Duveiller & Altamirano, 2000). Outra hipótese é o padrão de indução e repressão da expressão gênica para genes de virulência, induzindo a compatibilidade entre o patógeno e o hospedeiro (Briggs & Johal,

1994; Gabriel & Rolfe, 1990). Segundo a teoria gene-a-gene tanto a resistência da planta quanto a avirulência do fungo necessitam de expressão gênica de forma que a perda da função desses genes causada por mutações leva à sensibilidade da planta ao patógeno e à virulência do microrganismo (Halverson & Stacey, 1986).

Além dos genes específicos para a interação do patógeno com o hospedeiro, outras substâncias pertencentes ao metabolismo natural do fungo exercem função durante a interação. O *B. sorokiniana* secreta uma matriz extracelular protéica com funções adesivas e protetoras contra a dessecação ou mesmo como fonte nutricional e que está presente apenas na hifa e no tubo germinativo. A composição dessa matriz varia ao longo do estágio de desenvolvimento e foi associada ao sucesso da invasão no hospedeiro (Apoga et al., 2001).

A planta apresenta diferentes respostas aos sinais moleculares ativando o sistema de defesa (Halverson & Stacey, 1986). Um exemplo é a produção de peróxido de hidrogênio, cuja efetividade está associada ao tempo e área de ação (Kumar et al., 2002). No entanto cada parte da planta pode responder de forma distinta ao patógeno. Duveiller & Altamirano (2000), em trabalho sobre as condições que favorecem a infecção causada por *B. sorokiniana* em trigo no México, observaram que isolados de raiz foram mais patogênicos que os isolados de folhas e sementes em teste com cultivar de trigo suscetível ao patógeno, confirmando a hipótese de que há uma seleção progressiva de isolados a determinadas partes da planta em resposta aos fatores ambientais. O estudo desenvolvido com centeio mostrou a mesma

expressão diferencial de resistência em folhas e raízes (Almgren et al., 1999). Outro fator que pode contribuir para a seleção de um patógeno é a baixa condição nutricional da planta, a qual permite o acúmulo de substâncias tóxicas no interior da célula vegetal que diminui a sua resistência (Alves et al., 2001).

Os resíduos de plantas infectadas contribuem para a permanência do fungo no solo entre as estações climáticas. A estimulação da germinação dos conídios depende de substâncias secretadas pelas plantas hospedeiras (Tinline, 1988). A associação dos mesmos à semente leva a uma alta da infecção pré-plantio. Pandey et al. (2005) observaram que a fonte de contaminação das plantações na Índia está nas sementes contaminadas e não no solo, principalmente devido ao clima de monções daquele país, onde a capacidade de drenagem do solo é insuficiente frente ao regime intenso de chuvas nas regiões de plantio. O encharcamento do solo leva a uma situação de anaerobiose onde o fungo é incapaz de se desenvolver. Ainda não há consenso, entretanto, se a fonte de inoculo em outras regiões produtoras do planeta provém de sementes infectadas ou de conídios dormentes no solo. Há consenso que ainda há muito que se investigar em relação às diferentes condições que favorecem as formas de infecção.

2.3. Controle através de antifúngicos

O controle do patógeno é feito principalmente por fungicidas que podem agir de forma generalizada sobre o fungo, ou interferir no contato do mesmo com a superfície da planta ou ainda agir sobre a síntese de estruturas específicas da célula fúngica como aqueles que atuam sobre o ergosterol. As

classes mais utilizadas, mas que pelo uso indiscriminado têm levado ao aparecimento de cepas resistentes são: i) os benzimidazóis (benomil) que atuam sobre a β -tubulina; ii) os inibidores da demetilação (*DMIs*), que agem sobre a rota de formação do ergosterol; iii) os inibidores do sítio *Qo* mitocondrial que agindo sobre a enzima *bc1* do citocromo causam deficiência na respiração celular; iii) as dicarboximidas (*DCFs*, iprodione, vinclozolin), cujo sítio de ação não é bem conhecido mas as principais formas de resistência são mutações em quinases (Ma & Michailides, 2005). Lasca et al. (2001) em estudos com fungicidas contra *B. sorokiniana* e *Pyricularia grisea* observaram redução significativa, no caso de *B. sorokiniana*, nos tratamentos com Carboxin (Vitavax 750 PM BR[®]), Thiram (Rodiauram 700[®]), Thiram combinado com Carboxin ou Iprodione (Rovrin[®]), Guazatine e Imazalil, enquanto Thiabendazol (Tecto 100[®]) e Benomyl (Benlate 500[®]) não demonstraram atividade eficiente.

O maior problema no uso de fungicidas tem sido atribuído a fatores como toxicidade, permanência no solo e interferência nas comunidades naturais. Goel et al. (2005) observaram que a quantidade de fungicidas é alta na água da chuva durante a estação entre o plantio e a colheita, cuja aplicação ocorre a cada 7-14 dias. A concentração desses compostos é influenciada pela precipitação total, sendo maior no início do evento e diminuindo após devido à perda dos resíduos que se dissipam no ar através de aerossóis. A meia-vida do fungicida analisado (clorotalonil) é de aproximadamente 35 dias no solo, podendo ser aumentada quando aplicado com outros defensivos. É importante ressaltar que nesse estudo a amostragem (coleta da água da chuva) ocorreu em pontos sem atividade agrícola próxima num raio de pelo menos 800 metros,

indicando a alta capacidade de dispersão desses produtos. As pesquisas mostram que os pesticidas utilizados na agricultura podem alterar os aspectos funcionais e estruturais da cadeia trófica estuarina (Goel et al., 2005). Além disso, podem induzir resistência no fungo levando a um aumento das concentrações a serem aplicadas e no número de aplicações (Alves et al., 2001).

Outros aspectos a serem evidenciados são os danos que compostos químicos utilizados na agricultura podem causar à saúde dos seres humanos. Hewitt et al. (2005) relatam os efeitos potencialmente teratogênicos do fungicida benomil utilizado em sistemas agrícolas e em plantas ornamentais sobre os embriões murinos. Tem-se mostrado que o benomil é capaz de alterar vários processos bioquímicos e fisiológicos incluindo a síntese protéica, a diferenciação celular, a montagem do citoesqueleto e pode ainda estar envolvido com anoftalmia em seres humanos. No mesmo estudo, diferentes concentrações do fungicida causaram alterações sobre o desenvolvimento em camundongos sendo o sistema óptico o mais sensível (Hewitt et al., 2005). Em outro trabalho, Corsini et al., (2005) correlacionaram os efeitos dos etileno-bis-di-tiocarbamatos (EBDCs) sobre a regulação do sistema imunológico em agricultores. O antifúngico aplicado em vinhedos através de tratores foi constatado na urina das pessoas envolvidas na aplicação e exerceu efeitos modulatórios sobre a multiplicação de linfócitos e sobre a excreção de diversas citocinas em teste *in vitro* de amostras de sangue periférico dos trabalhadores.

2.4. Controle biológico de fungos

Muitos estudos têm buscado formas alternativas ao uso de fungicidas. A procura por espécies vegetais resistentes para cruzamento (Metha, 1981) é um meio muito utilizado. Porém Duveiller & Altamirano (2000) relataram que o uso de espécies resistentes é insatisfatório por três motivos: i) as fontes de resistência são limitadas; ii) as características quali e quantitativas para resistência estão presentes no mesmo gene ou grupo gênico; iii) é difícil determinar os níveis da etiologia sem um sistema corretamente padronizado, condição essa inexistente no campo, desconsiderando a variabilidade do patógeno. Estudo onde foi realizada a mistura de cultivares com maior e menor nível de resistência na mesma plantação mostrou que aquelas resistentes protegem as suscetíveis da infecção (Sharma & Dubin, 1996). Essa metodologia é menos viável visto que é necessário o conhecimento da técnica e acesso do agricultor aos diferentes cultivares.

Duckzek et al. (1996) estudaram a rotação entre culturas de vegetais incluindo trigo, cevada, triticale, ervilha, aveia, entre outros e demonstraram que a rotação entre plantas de diferentes famílias pode auxiliar na diminuição da fonte de inoculo para a próxima geração, e é uma das formas indicadas para diminuir a incidência da doença no Brasil (Reunião, 2004). Entretanto o sortimento de possíveis gêneros a serem cultivados em plantios de inverno é escasso, dificultando a rotação e inviabilizando economicamente o agricultor.

O controle biológico é uma ferramenta em expansão devido à sua quase inesgotável fonte de recursos (Emmert & Handelsman, 1999). De acordo com a “National Academy of Sciences” o controle biológico inclui o uso de organismos naturais ou modificados, seus genes, ou produtos de genes para

reduzir os efeitos de organismos indesejáveis, e favorecer aqueles desejáveis, tais como plantas, árvores, animais, insetos e microrganismos benéficos (Stacey & Keen, 1996). O antagonismo pode se dar por exclusão de nicho e competição, parasitismo ou predação, indução de respostas sistêmicas de defesa da planta ou por antibiose direta, também chamada de interação amensal.

A supressão da doença por agentes de controle biológico também consiste em interações entre a planta, o patógeno, o agente responsável pelo controle, a comunidade microbiana sobre e ao redor da planta e o ambiente físico (Handelsman & Stabb, 1996). Em estudo de controle biológico de *F. graminearum* exercido por *B. subtilis* ZJY-116 e *Brevibacillus brevis* ZJY-1 em centeio, Zhang et al. (2005) observaram que as duas cepas investigadas ocuparam as espigas de forma diferencial, concentrando-se principalmente na bainha e na gluma e menos na semente, provavelmente causada pela ocupação dominante da população microbiana natural da semente e ampla assimilação dos nutrientes. Dessa forma um bom microrganismo supressão precisa ter habilidade de competir eficientemente por recursos limitados em ambientes como superfície de folhas e sementes, ou seja, expostos a uma baixa condição nutricional e à variação de temperatura e umidade (Stacey & Keen, 1996).

Microrganismos com atividade antagonista introduzidos no ambiente podem apresentar riscos à diversidade microbiana natural e nos processos biológicos exercidos por essa comunidade necessários à manutenção da fertilidade do solo e das condições favoráveis ao desenvolvimento da planta

(Thirup et al., 2003). Nas raízes a interação entre a concentração inicial de antagonistas introduzidos, a concentração do patógeno e o ambiente afeta a persistência dos agentes de controle, bem como sua capacidade de colonizar a rizosfera e, em última instância, a eficácia do controle biológico (Cavaglieri et al., 2005). Assim, a busca por antagonistas pode priorizar isolados pertencentes à própria comunidade nativa do ambiente onde é feita a aplicação, como as folhas ou o solo em que se encontra a planta.

Segundo Nielsen & Sørensen (1997), cerca de 20 a 40% das espécies de *Bacillus* isoladas de solo apresentam algum tipo de antagonismo contra fungos fitopatogênicos. A filosfera, incluindo populações endofíticas, é habitada por leveduras, fungos filamentosos e bactérias, sendo que muitos destes microrganismos podem antagonizar um ou mais patógenos (Perelló et al., 2002).

Existem muitos microrganismos comprovadamente capazes de inibir patógenos *in vitro* e *in vivo*, mas nenhum deles faz parte dos produtos de primeira escolha para aplicação em lavouras, pois nem todos os antagonistas confirmam sua atividade quando transpostos para larga escala (Spadaro & Gullino, 2005). Portanto devem ser investigados novos antagonistas, novas fontes ambientais de agentes de controle biológico e novas formulações.

Substratos como a compostagem, cuja constituição orgânica é bastante favorável ao crescimento de diversos microrganismos, são ambientes propícios ao isolamento de antagonistas capazes de degradar polímeros complexos e de sobreviverem e altas temperaturas (Czaczyk et al. 2000). Microrganismos primariamente isolados desses mesmos ambientes, com boa

atividade antagonista *in vitro* e que passaram por um processo de mutação induzida que provocou um aumento na sua capacidade inibitória constituem outras fontes importantes de produção de antifúngicos (Bernal et al., 2002).

Os fungos filamentosos encontrados tanto no solo quanto na filosfera também são interessantes para o uso em controle biológico. Na última década, a pesquisa aprofundada utilizando *Trichoderma* spp. como antagonista revelou a atividade inibitória intimamente relacionada à excreção avantajada de quitinases e de moléculas voláteis com atividade antifúngica (ver). Bons resultados foram obtidos com *Trichoderma harzianum* e *T. viridae*, isolados utilizados já na forma comercial contra *Claviceps africana*, fungo causador do *ergot* no sorgo (Bhuiyan et al., 2003) (Tabela 01). Outras enzimas líticas como proteases, amilases e celulases constituíram o mecanismo mais importante na interação entre um isolado de *T. viridae* e *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da “vassoura-de-bruxa” do cacauero (De Marco et al., 2003).

Outros resultados promissores têm sido obtidos com *Chaetomium globosum*, um fungo ascomiceto, contra *Pythium ultimum*, *Alternaria raphani*, *A. brassicola*, e *Cochliobolus sativus*, o teleomorfo de *B. sorokiniana* (Aggarwal et al., 2004). Antifúngicos produzidos por fungos filamentosos são incomuns, com poucos relatos na literatura, a exemplo da molécula eringina, produzida por *Pleurotus eryngii* (Wang & Ng, 2004).

A rizosfera da própria planta também contribui com populações de actinomicetos. Autores como Sabaratnam & Traquair (2002) investigaram a eficiência de uma cepa de *Streptomyces* isolada do solo e evidenciaram a capacidade deste microrganismo em degradar polímeros complexos como

quitina, inibindo *Rhizoctonia solani* em tomates. El-Tarabily et al. (2000) encontraram resultados similares em isolados de *Streptomyces* e *Micromonospora* contra *Sclerotinia minor*, também mediados por quitinases e β -glucanases.

Tabela 01: Formulações comerciais de microrganismos utilizados em controle biológico.

| Nome científico | Nome comercial | Fabricante/fornecedor |
|---|-------------------|-----------------------|
| <i>Streptomyces griseoviridis</i> | Mycostop® | Kemira Ou |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | Trichoflow® | Agrimm Technol. Ltd. |
| <i>T. harzianum</i> e <i>T. viridae</i> | Trichopel® | Agrimm Technol. Ltd. |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Kodiak | Bayer |
| <i>B. subtilis</i> | Subtilex | Becker Underwood Inc. |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | Bio Yield™ | Helena Chemical Co. |
| <i>Bacillus sp.</i> | EcoGuard™ | Ecospray Ltd. |
| <i>Bacillus sp.</i> | HiStick N/T | Becker Underwood Inc. |
| <i>Bacillus sp.</i> | Serenade | Agraquest Inc. |
| <i>B. thuringiensis</i> | Ecotech Pro | - |
| <i>B. thuringiensis</i> | Dipel | - |
| <i>Pseudomonas putida</i> | BioJect Spot-Less | Eco Soil Systems |

Diversos gêneros bacterianos têm sido testados em controle biológico de fungos, mas aqueles dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e alguns gêneros de actinomicetos têm se mostrado os mais viáveis. Algumas formulações já existem no mercado (Tabela 01). A comercialização de algumas delas, no entanto, não é tão difundida quanto a dos antifúngicos sintéticos.

Uma vez que o antagonismo foi verificado e comprovado, o passo seguinte constitui investigar o que de fato causa a inibição. Duas linhas de evidência normalmente são empregadas: a produção de enzimas líticas e/ou a produção de moléculas com atividade inibitória.

A evidência da função dos antifúngicos na supressão de doenças na raiz, segundo Haas & Keel (2003), pode ser comprovada através da produção *in vitro* pelo microrganismo, capacidade de inibição do organismo fitopatogênico *in vitro*, capacidade de identificação química da molécula, possibilidade de localização e caracterização dos genes responsáveis pela produção e regulação da produção e, finalmente, detecção dos antifúngicos no solo através de extração com solventes orgânicos.

Touré et al. (2004) observaram que o filtrado de cultivo de *B. subtilis* GA1 foi efetivo contra *Botrytis cinerea* em experimentos *in vitro*. Tal atividade foi atribuída a compostos antifúngicos, uma vez que não ocorreu contato entre os microrganismos. O mesmo foi observado por Shirokov et al. (2002) onde a atividade antifúngica da fração de baixo peso molecular derivada de cultivo do isolado *Bacillus* sp. 739 foi confirmada em experimentos *in vitro* contra *B. sorokiniana*.

Segundo Emmert & Handelsman (1999), os antibióticos purificados inibem diretamente o crescimento e desenvolvimento do patógeno suprimindo a doença, enquanto mutantes não produtores apresentam-se ineficientes na sua redução. Em estudo visando o controle de *B. cinerea* Leifert et al. (1995) sugeriram que o antagonismo exercido pelo isolado *B. subtilis* CL27 esteve relacionado à produção de antifúngicos, pois cepas mutantes não produtoras do antimicrobiano perderam completamente a atividade antagonista e mutantes deficientes na produção apresentaram atividade diminuída.

Nos casos em que o composto é purificado e sua estrutura molecular revelada, a atividade pode ser confirmada e mensurada e o sítio de ação também pode ser deduzido. Desta forma, a habilidade de antibióticos derivados da iturina de aumentar a permeabilidade da membrana dos microrganismos-alvo pode ser explicada pela formação de canais iônicos através de uma estrutura terciária constituída pela união entre a iturina, fosfolipídios e esterol. O mesmo mecanismo é associado à viscosinamida, polipeptídeo cíclico produzido por *Pseudomonas* (Nielsen et al., 1999). Os sideróforos produzidos por antagonistas estão associados à captura de metais como ferro e cobre inibindo os patógenos não produtores (Duffy & Défago, 1999). A micosubtilina, polipeptídeo cíclico produzido por *B. subtilis*, é capaz de inibir completamente *Monilinia fructicola* na concentração de 2,5µg/ml (McKeen et al., 1986). Vários fungos e oomicetos do solo são sensíveis a kanosamina produzida por *B. cereus* (Milner et al., 1996). Bernal et al. (2002) assumiram que o antifúngico produzido pelo isolado mutante de *Bacillus* sp. M40

apresentou padrões similares a iturina A, um composto antifúngico cujo sítio-alvo é a membrana plasmática.

Outra maneira de confirmar o antagonismo é através da produção de enzimas. A principal função das hidrolases extracelulares bacterianas é a liberação de nutrientes a partir dos diferentes substratos para o suprimento das necessidades nutricionais do microrganismo. Adicionado a isso, enzimas excretadas sozinhas ou em associação a outros compostos como antibióticos podem ser utilizadas pelo microrganismo produtor para a competição com outras espécies microbianas. Essas duas funções das enzimas extracelulares garantem um desempenho ecológico da cepa produtora no balanço populacional microbiano (Helistö et al., 2001).

As quitinases estão entre as hidrolases bacterianas com maior potencial no controle biológico. Vários isolados de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* foram investigados e têm sua capacidade inibitória atribuída a essa enzima. Endoquitinases excretadas pelo isolado *B. cereus* YQ308 estiveram envolvidas na inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* e *P. ultimum* em estudo desenvolvido por Chang et al. (2003). El-Tarabily et al. (2000) relacionaram a produção de quitinase e β -glucanase por *Serratia marcescens* e dois isolados de actinomicetos como o principal mecanismo na redução da infecção em alface causada por *Sclerotinia minor*, uma vez que, mesmo produzindo outros metabólitos concomitantemente à produção enzimática, a presença da enzima por si só foi capaz de causar a inibição do patógeno *in vitro*. O mesmo pôde ser observado por Singh et al. (1999) com seis iso-enzimas, quitinases produzidas por *Paenibacillus* sp. 300

contra *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Em estudo realizado por Zhang & Yuen (2000a) o controle exercido por filtrados de cultura de *Stenotrophomonas maltophilia* C3 sobre *B. sorokiniana* esteve relacionado à presença de quitinases, β -1,3-glucanases, proteases e lípases, principalmente quando havia pré-indução da produção enzimática. O mesmo efeito foi comprovado em trabalho posterior, onde quitinases termolábeis estavam envolvidas no controle do mesmo patógeno (Zhang & Yuen, 2000b).

Uma forma de antagonismo indireto é a resistência induzida, um mecanismo de controle biológico importante envolvendo bactérias não patogênicas, relacionada principalmente às rizobactérias promotoras do crescimento aplicadas em raízes ou sementes, ou então a bactérias colonizadoras da filosfera que podem estar envolvidas na proteção contra patógenos foliares (Perelló et al., 2002). Acredita-se que a resistência induzida seja ativada mais por sinais moleculares do que pela presença das bactérias *per se*, pois estudos comprovam que os mesmos indutores moleculares provocam resistência diferenciada quando aplicados em locais distintos da mesma planta e ainda, que nem todos os microrganismos podem levar à proteção, mesmo estando em quantidade elevada sobre a planta (Kilic-Ekici & Yuen, 2004). Outra forma de indução de resistência é a aplicação de extratos miceliais, de fungos relacionados, sobre a planta, causando um processo inconclusivo – resistência ou tolerância – mas com bons resultados de controle (Haugaard et al., 2001).

Os estudos que investigam controle biológico, na maioria das vezes, deparam-se com problemas como baixa produção de metabólitos secundários

em grande escala, formulação deficiente e alta especificidade (Spadaro & Gullino, 2005). Misturas de diferentes espécies de antagonistas compatíveis entre si podem permitir a colonização do substrato de forma mais eficiente, melhorando a adaptabilidade às mudanças ambientais e com mecanismos de supressão distintos, inibindo, inclusive, um maior espectro de patógenos (Cavaglieri et al., 2005). A combinação entre antagonistas e fungicidas para aplicação é uma alternativa para diminuir a concentração dos compostos químicos utilizados, tal como relatado por Kondoh et al. (2001), onde a concentração do fungicida aplicado conjuntamente com a cepa *B. subtilis* RB14-C capaz de suprimir *R. solani* foi cem vezes menor do que aquela utilizada em plantações. Faz-se necessário, portanto, que novos estudos sejam implementados buscando-se abordagens diferenciadas de forma a enriquecer o conhecimento dessa área.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos utilizados

Foram utilizados 28 isolados de *Bipolaris sorokiniana* de trigo proveniente de diversas regiões do Brasil, 3 isolados de *B. sorokiniana* isoladas de cevada e 3 amostras provenientes do exterior, como detalhado na Tabela 02.

Como antagonistas, foram avaliados 3 isolados de *Bacillus* sp., C98017T, E164 e OR13, considerados eficientes contra os isolados de *Bipolaris sorokiniana*, descrito em estudo prévio (Giraudó, 2001), sendo apenas um selecionado para posterior caracterização. Estes isolados foram obtidos de sementes de trigo aparentemente sadias, sem contaminação por *B. sorokiniana*.

3.2. Meios de cultura para manutenção

Os fungos foram inoculados em ágar batata dextrose inclinado (BDA) e estocados a 4°C. As bactérias foram mantidas em ágar triptona de soja inclinado (TSA) também a 4°C.

Tabela 02: Denominação, país de origem e fonte de inóculo dos isolados de *Bipolaris sorokiniana* utilizados em teste *in vitro* contra os isolados de *Bacillus* E164, C98017T e OR13.

| Isolado | Procedência | Substrato de isolamento |
|---------|-------------|-------------------------|
| 98003 | Brasil | Semente de trigo |
| 98004 | Brasil | Semente de trigo |
| 98006 | Brasil | Semente de trigo |
| 98007 | Brasil | Semente de trigo |
| 98010 | Brasil | Semente de trigo |
| 98011 | Brasil | Semente de trigo |
| 98012 | Brasil | Semente de trigo |
| 98013 | Brasil | Semente de trigo |
| 98014 | Brasil | Semente de trigo |
| 98017 | Brasil | Semente de trigo |
| 98018 | Brasil | Semente de trigo |
| 98019 | Brasil | Semente de trigo |
| 98021 | Brasil | Semente de trigo |
| 98022 | Brasil | Semente de trigo |
| 98023 | Brasil | Semente de trigo |
| 98025 | Brasil | Semente de trigo |
| 98026 | Brasil | Semente de trigo |
| 98028 | Brasil | Semente de trigo |
| 98029 | Brasil | Semente de trigo |

| | | |
|---------|--------|-------------------|
| 98030 | Brasil | Semente de trigo |
| 98031 | Brasil | Semente de trigo |
| 98032 | Brasil | Semente de trigo |
| 98033 | Brasil | Semente de trigo |
| 98034 | Brasil | Semente de trigo |
| 98041 | Brasil | Semente de trigo |
| 98042 | Brasil | Semente de trigo |
| 98043 | Brasil | Semente de trigo |
| 1992/19 | Brasil | Raiz de trigo |
| Cev13 | Brasil | Semente de cevada |
| Cev48 | Brasil | Semente de cevada |
| Cev53 | Brasil | Semente de cevada |
| A20 | Canadá | Não informado |
| M05 | México | Não informado |
| NRRL | África | Não informado |

3.3 Caracterização dos isolados E164, C98017T e OR13

3.3.1. Testes bioquímicos

Inicialmente foi realizada coloração de Gram e de esporos através da coloração com verde malaquita, para visualização da morfologia celular e detecção de esporos. Foram realizados os testes de comportamento fisiológico frente à presença ou ausência de oxigênio, como atividade catalase, que

detecta a enzima capaz de degradar radicais peróxidos resultantes da respiração aeróbia, crescimento em anaerobiose, testes de oxidação e fermentação de glicose em condições de aerobiose e anaerobiose. Para a assimilação de carboidratos foram realizados os testes de vermelho de metila para a detecção da produção de grandes quantidades de ácidos a partir da fermentação da glicose; Voges-Proskauer para a detecção da produção de moléculas neutras a partir da fermentação da glicose; hidrólise do amido através da produção da enzima amilase; e assimilação de carbono a partir de fontes simples, entre elas hexoses, citrato e manitol, pentoses, arabinose e xilose, esculina (glicosídeo) e lecitina (fosfolipídio). Para assimilação de fontes de nitrogênio foram utilizados os testes com uréia, deaminação da fenilalanina, liberação de indol a partir do triptofano e liberação de gás sulfídrico a partir do catabolismo anaeróbio de aminoácidos sulfurados como metionina, cisteína e cistina. Como fontes complexas foram testadas a gelatina, cuja molécula nitrogenada é o colágeno e a caseína, um polipeptídeo isento de resíduos de enxofre. Também foi analisada a capacidade dos microrganismos em utilizarem o nitrogênio como aceptor final de elétrons, demonstrando a respiração anaeróbia, e o crescimento em meio com alta osmolaridade (cloreto de sódio a 5, 7 e 10%), e em condições de altas temperaturas (55,0°C). Para a identificação foram utilizadas as chaves descritas em Sneath et al. (1986).

3.4. Atividade enzimática específica do antagonista

3.4.1. Atividade proteolítica

Para a verificação da excreção de proteases foi utilizado o meio agar leite, preparado segundo Nielsen & Sørensen (1997). Os halos de degradação da caseína foram verificados após cinco dias de incubação a 30°C.

3.4.2. Atividade lipolítica

Verificou-se a atividade das lipases através da degradação de óleo de oliva em ágar nutriente utilizando a Rodamina B como indicador, conforme descrito por Kouker & Jaeger (1987). O óleo de oliva foi esterilizado por filtração (Milipore, 0,45µm) e adicionado ao meio esterilizado com a Rodamina B. A degradação foi revelada através de exposição à luz ultravioleta A (365nm) após 24 horas de incubação a 37°C. Inocularam-se na mesma placa uma linhagem de *Serratia marcescens* (lipase positiva) e uma de *Escherichia coli* (lipase negativa) como testemunha.

3.5. Controle *in vitro*

3.5.1.1. Inóculo fúngico

Os isolados de *B. sorokiniana* foram inoculados em placas com BDA por 7 dias a 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas. 3mL de solução salina 0,85% foram vertidos sobre cada uma das colônias e os esporos removidos com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão foi coletada e transferida

para um tubo estéril. A contagem de conídios foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 5×10^3 conídios/mL. Um mL dessa suspensão foi adicionado a 99mL de BDA estéril a 45°C (proporção de 1:100 segundo Leifert et al., 1995) homogeneizado e vertido em placa.

3.5.1.2. Ensaio de antagonismo

Cada uma das cepas bacterianas foi inoculada em picada com o auxílio de uma agulha em 4 pontos de cada placa previamente preparada com o inóculo fúngico. Os halos de inibição foram medidos após cinco dias de incubação a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas.

3.5.1.3. Ensaio de inibição de germinação dos conídios

Este experimento foi adaptado de Lorito et al. (1993). As culturas de 24 horas em caldo triptona de soja dos isolados bacterianos foram centrifugadas a 10.000 rpm por 8 minutos e cada sobrenadante coletado. Uma suspensão conidial dos isolados 98017, 98031, 98032 e 1992/19 de *B. sorokiniana* foi obtida como descrito no item 3.5.1.1. Para o ensaio, a mesma proporção de caldo batata dextrose concentrado 3 vezes, suspensão de conídios e sobrenadante foram depositadas em microtubos de 1,5mL. Nas testemunhas o sobrenadante foi substituído por salina 0,85%. Os conídios foram coletados após incubação por 22 e 28 horas e $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, e após corados com azul de lactofenol sobre lâmina, observados ao microscópio óptico. Foi considerada como germinação positiva aquela em que a projeção linear da hifa ultrapassou o comprimento do conídio.

3.5.2. Produção do filtrado

O isolado que apresentou maior atividade *in vitro* (placas) contra *B. sorokiniana* foi inoculado em 100 mL de caldo triptona de soja (TSB), caldo extrato de malte (EM) e em caldo peptonado adicionado de palha de milho (PM, peptona de soja 15g/L; cloreto de sódio 1g/L; dextrose 2g/L; extrato de levedura 5g/L; palha de milho 5g/L). Após incubação a 37°C por 48 horas com agitação de 180 rpm, os meios foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes filtrados via membrana Milipore 0,22µm. Alíquotas de 50µL de cada filtrado e dos meios puros foram pipetados para poços de 5mm de diâmetro, perfurados em placas com ágar batata dextrose contendo previamente o inóculo fúngico de cada um dos isolados 98017, 98022, 98025, 98042 e 1992/19. A medição dos halos de inibição foi realizada após cinco dias de incubação a 25°C ± 2°C. O ensaio foi feito em duplicata e repetido três vezes.

3.5.2.1. Determinação da concentração mínima inibitória do filtrado

Para este ensaio foram selecionados os isolados 98017, 98022, 98025, 98031, 98042 e 1992/19 de *B. sorokiniana*. O filtrado preparado como descrito anteriormente foi diluído 5, 10, 25 e 50 vezes em meio TSB estéril. O filtrado de cada diluição, o filtrado puro e o TSB estéril usado como testemunha foram pipetados em volumes iguais ao descrito anteriormente.

3.5.2.2. Concentração e purificação do filtrado

O filtrado produzido em meio TSB como descrito no item 3.5.2 foi submetido à ultrafiltração em membrana de 10kDa. Tanto o retentato quanto o ultrafiltrado foram novamente esterilizados por filtração e testados em placa para detectar em qual das alíquotas permaneceu o complexo ativo.

3.6. Controle *in vivo*

3.6.1. Produção de inóculo bacteriano

Para a realização do experimento *in vivo*, foi preparado um inóculo do isolado antagonista em 100mL de TSB. Esse material foi incubado a 37°C por 48 horas em agitação. A cultura foi centrifugada e coletadas as células sedimentadas. A quantificação do inóculo foi padronizada para 10⁸ células por mL de água destilada estéril através da escala McFarland.

3.6.2. Produção do inóculo fúngico

O isolado 98031 foi inoculado em placas contendo BDA e incubado por seis dias em estufa a 25°C. 10mL de água destilada estéril foram vertidos sobre as colônias e os esporos removidos com auxílio de alça de Drigalski. A suspensão foi coletada e transferida para um frasco estéril e diluída até obtenção do inóculo de 10⁶ células por mL.

3.6.3. Sementes de trigo sadias

Para o ensaio *in vivo* foram utilizadas sementes de trigo da cultivar 209, cedidas pela EMBRAPA Trigo de Passo Fundo, RS, Brasil, livre de contaminação por *B. sorokiniana* e sem prévio tratamento com antifúngicos. Uma amostra de sementes foi aplicada a placas contendo meio BDA e a população fúngica presente foi isolada e identificada através de microcultivo e observação microscópica dos corpos de frutificação.

3.6.4. Substrato para o cultivo do trigo

Como substrato para o cultivo do trigo foi utilizada uma mistura de areia média lavada mais vermiculita expandida fina (1:1). A mistura foi acondicionada em pacotes e esterilizada em autoclave (121°C, 1atm) por uma hora em duas etapas intercaladas por 24 horas. Após, foi colocada em potes plásticos com capacidade de um litro, previamente lavados com solução de hipoclorito de sódio 2,5% diluído em água (1:250). Cada pote foi preenchido com cerca de 3/5 de sua altura com o substrato e 80mL de uma solução de NPK 30:10:10 mais microminerais foram adicionados a cada pote no 14º dia após o plantio.

3.6.5. Ensaio *in vivo*

No ensaio *in vivo* foram realizados três tratamentos: um controle negativo, cujas sementes de trigo foram plantadas sem contaminação prévia, um controle positivo, onde as sementes foram inoculadas apenas com o fungo, e o ensaio propriamente dito, onde as sementes contaminadas com o fungo

foram plantadas no solo inoculado com o antagonista. As sementes utilizadas como controle positivo e as do ensaio foram tratadas com 10 μ L de uma suspensão de 10⁶ conídios/mL de esporos do isolado 98031 de *B. sorokiniana*. As sementes utilizadas como controle negativo foram incubadas nas mesmas condições mas sem o inóculo fúngico. Todas as sementes foram mantidas em câmara úmida (placa com algodão umedecido com água destilada) por cinco dias a 25°C para promover a germinação dos esporos. Foram plantadas 24 sementes para cada tratamento, divididas em 4 sementes por pote. Nos potes para o ensaio de antagonismo foi adicionado ao solo durante o preparo 20mL de solução com células bacterianas descrita no item 3.6.1. Os potes foram incubados em germinador a 20°C com fotoperíodo de 14 horas e irrigados periodicamente com água destilada.

Após o período de 21 dias as plantas foram coletadas e o solo da rizosfera removido por enxágüe com água destilada estéril. Após, avaliou-se o comprimento e a presença de lesões características e outros sintomas na segunda folha das plantas e nas raízes.

3.6.6. Análise das raízes

As raízes analisadas incluíram uma amostragem de 10 raízes do controle negativo, 10 do controle positivo e as 6 plantas que cresceram nos potes do ensaio de antagonismo foram cortadas em duas partes sendo uma inoculada em meio BDA para confirmar a presença de *B. sorokiniana* e a outra clarificada através do método modificado de Philip & Hayman (1970) para visualização das células vegetais. Para tal, cada parte de raiz obtida foi

identificada e acondicionada em tubo próprio contendo KOH 10% em banho de água a 100°C por 15 minutos. Após duas lavagens em água destilada, as raízes foram estocadas em solução FAA 50% (mistura de clorofórmio 10%, ácido acético e etanol 50%, 1:1:18) para posterior análise em microscópio. No microscópio foram visualizadas a presença de esporos na raiz e na bainha (cerca de 1,5 centímetros acima da raiz) e a presença de outras estruturas como picnídios, esporos de outros fungos e micorrizas. Para coloração foi utilizada uma mistura de ácido acético 1M, glicerina e água (1:1:1) adicionada de azul de toluidina perfazendo a concentração final de 0,05%.

3.7. Propriedades químicas e físicas do filtrado antifúngico

3.7.1. Estabilidade térmica do filtrado antifúngico

3.7.1.1. Refrigeração

O filtrado preparado como descrito foi submetido à refrigeração (4°C) e ao congelamento (<10°C) por 5, 7, 14 e 20 dias. Após este tratamento foi testada a atividade como descrito no item 3.5.2. Os tratamentos foram testados com os isolados 98017, 98022, 98025, 98042 e 1992/19.

3.7.1.2. Aquecimento

As alíquotas de 1mL do filtrado foram submetidas ao aquecimento em banho de água em temperaturas de 50°C a 100°C (em intervalos de 10°C) por 30, 60 e 90 minutos. Após o tratamento foi realizado o procedimento

descrito no item 3.5.2. Os tratamentos do filtrado foram testados com os mesmos isolados do item 3.7.1.1.

3.7.2. Estabilidade iônica do filtrado antifúngico

Para a análise da estabilidade iônica do filtrado foram preparados tampões em caldo batata dextrose (BD). As soluções de sais, ácidos e bases utilizados foram preparados segundo Assumpção (1968). Na faixa de pH de 4 a 8 foi utilizado fosfato dissódico tamponado com ácido cítrico e para a faixa de 9 e 10 utilizou-se o mesmo sal tamponado com hidróxido de sódio. Alíquotas de 4mL de cada tampão foram adicionadas a tubos de ensaio, sendo dois tubos para o teste com o composto, e dois tubos foram utilizados como testemunha. Um volume de 0,9mL do filtrado foi adicionado aos dois tubos de teste e a mesma quantidade de TSB foi adicionada aos tubos da testemunha. Um volume de 0,1mL de suspensão de esporos de 10^6 conídios/mL foi adicionada a todos os tubos e estes foram incubados em estufa a 25°C por 10 dias. A biomassa resultante do crescimento de cada tubo foi filtrada em papel filtro e secada em estufa a 80°C. Realizaram-se pesagens intercaladas com o processo de secagem até a estabilização do peso de massa seca.

3.8. Análise estatística

Para a comparação dos resultados obtidos sobre a inibição do fungo in vitro, bem como para avaliar a atividade do filtrado antifúngico após diferentes tratamentos utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA). Para comparações cruzadas entre as amostras, em cada tratamento, o teste

de Scheffe foi utilizado. O nível de significância estipulado foi de 95% para ambos os testes. Os testes foram realizados através do programa Analyse-it + General 1.73 para Microsoft Excel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos isolados bacterianos

Os três isolados bacterianos utilizados no presente estudo pertencem ao gênero *Bacillus* e caracterizados pela morfologia como bastonete Gram-positivos formadores de endósporos. As bactérias do gênero *Clostridium* também apresentam estas características, e diferem das primeiras pela maioria delas ser anaeróbia estrita e não produzir a enzima catalase, a qual é responsável pela captura de átomos de oxigênio ionizados liberados pela cisão da molécula de peróxido e está presente na membrana dos microrganismos aeróbios (McFaddin, 2000).

Os isolados E164 e C98017T foram identificados *Bacillus firmus*, um fato relevante em se tratando de controle biológico, uma vez que outras espécies deste gênero foram mais utilizadas como cepas antagonistas. Um caso é o da espécie *Bacillus subtilis*, microrganismo comum na rizosfera de cereais e que pode ser facilmente investigado quanto ao potencial inibitório e produção de antibióticos *in vitro* contra fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas (Földes et al., 2000). Muitos isolados dessa espécie também são produtores de sideróforos e exoenzimas líticas (Marten et al., 2000). As formulações já comercializadas com esse microrganismo são eficazes na

proteção contra *Fusarium* e *Rhizoctonia* (Tabela 01), além de estimularem o crescimento das plantas (Emmert & Handelsman, 1999).

Tabela 03: Comportamento fisiológico dos isolados E164, C98017T e OR13 frente aos testes bioquímicos de identificação segundo Sneath et al. (1986).

| Característica | Isolado E164 | Isolado C98017T | Isolado OR13 |
|---|--------------|-----------------|--------------|
| Catalase | + | + | + |
| Crescimento em anaerobiose | - | - | - |
| Vermelho de metila | - | - | - |
| Voges-Proskauer | - | - | - |
| Utilização de citrato | - | - | - |
| Formação de indol | - | - | - |
| H ₂ S | - | - | - |
| Motilidade | + | + | + |
| Hidrólise de caseína | + | + | + |
| Hidrólise de amido | + | + | + |
| Liquefação de gelatina | + | + | + |
| Fenilalanina deaminase | - | - | - |
| Redução de nitrato | - | + | + |
| Oxidação | - | + | + |
| Fermentação | + | + | + |
| Crescimento em diferentes fontes de carbono | | | |

| | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|
| Esculina | + | + | + |
| Arabinose | - | - | - |
| Manitol ¹ | - | - | - |
| Xilose | - | - | - |
| Condições de crescimento | | | |
| Temperatura | <55°C | <55°C | >55°C |
| Tolerância a NaCl | 7% | 7% | 7% |

¹ A única prova bioquímica não confirmada em todas as realizadas foi a de crescimento em manitol, na qual para a espécie *B. firmus* o resultado deveria ser positivo.

A outra cepa foi identificada como *B. stearothermophyllus*, a qual tem capacidade de crescer em temperaturas elevadas, o que lhe garante a ocupação de nichos diferenciados, comparado às outras espécies desse gênero. O teste de amplificação da seqüência do DNA codificador da região 16S do ribossomo bacteriano será necessário para confirmar as espécies uma vez que muitas delas estão sendo classificadas em novos gêneros como *Paenibacillus* e *Brevibacillus*.

4.2. Controle *in vitro*

4.2.1. Triagem do isolado bacteriano

Os três isolados de *Bacillus* utilizados na triagem apresentaram diferença significativa na atividade inibidora (Tabela 04), pois todos foram

capazes de inibir o crescimento dos isolados do fungo no entorno da colônia. No entanto, apesar de a bactéria e o fungo estarem presentes, foi possível observar que a inibição resultou da excreção de metabólitos e não da competição espacial, pois o fungo foi incapaz de desenvolver hifas no entorno das colônias bacterianas e sob elas no ágar.

Muitos isolados deste gênero têm sido investigados quanto ao seu potencial de uso no controle biológico através da produção de metabólitos inibitórios. Touré et al. (2004) observaram inibição do crescimento micelial acima de 45% através do antagonismo entre um isolado de *B. subtilis* contra diversos fungos fitopatogênicos no solo, como *Fusarium* spp., *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Rhizopus* sp., sendo que esta atividade foi atribuída pelos autores à produção de lipopeptídeos. Ademais, muitos dos compostos produzidos por *B. subtilis* são de natureza polipeptídica, tais como a eumycina e iturinas (McKeen et al., 1986). Handelsman & Stabb (1996) estudando a ação de *B. cereus* UW85 observaram que a supressão de doenças causadas por oomicetos esteve relacionada aos antibióticos zwittermicina A e kanosamina produzidos pela bactéria.

É comum que bactérias investigadas para controle biológico excretem mais de um antimicrobiano ao mesmo tempo (Handelsman & Stabb, 1996), e, portanto, cada cepa pode ter atividades sobre estruturas distintas do fungo. Assim, apesar da eficiência inibitória diferencial entre os isolados bacterianos neste trabalho a escolha do isolado E164 para os testes posteriores foi aleatória, mesmo apresentando atividade similar a do isolado C98017T.

Tabela 04: Análise de variância entre os halos de inibição obtidos a partir de antagonismo *in vitro* entre os isolados bacterianos E164, C98017T e OR13 e 34 isolados de *B. sorokiniana*¹

| Fonte de variação | SSq | DF | MSq | F | p |
|---------------------------|--------|-----|-------|-------|---------|
| Isolados bacterianos (IB) | 25,32 | 2 | 12,66 | 23,58 | <0,0001 |
| Isolados fúngicos (IF) | 158,54 | 33 | 5,87 | 1,94 | <0,0001 |
| IB x IF | 71,89 | 66 | 1,33 | 3,63 | <0,0001 |
| Halos | 164,32 | 372 | 0,54 | | |
| Total | 348,18 | 407 | | | |

¹ SSq = soma dos quadrados; DF = graus de liberdade; MSq = média dos quadrados (n = 408).

Quando analisados individualmente os isolados bacterianos exerceram antagonismo diferenciado sobre cada isolado de *B. sorokiniana*. Comparando-se os contrastes dos halos obtidos através do teste de Scheffe ($p < 0,0001$) o isolado C98017T apresentou atividade inibitória superior nos isolados 98031, CEV53 e 1992/19; em relação ao isolado OR13 a atividade foi maior sobre 98013 e 98043; para o isolado E164 a maior atividade ocorreu sobre 98007, 98010, 98012, 98013, 98014, 98030, CEV48 e Can13. Diferenças significativas entre os halos de inibição também foram observadas entre os isolados fúngicos confrontados pelo isolado OR13 (Tabela 05) enquanto o mesmo não pôde ser observado nos halos obtidos pelos isolados E164 e C98017T, os quais apresentaram homogeneidade na inibição.

Tabela 05: Contraste entre os diâmetros de halos obtidos a partir do teste de inibição *in vitro* exercido pelo isolado OR13 sobre 34 isolados de *B. sorokiniana*¹

| | 98003 | 98007 | 98010 | 98011 | 98012 | 98014 | 98018 | 98022 | 98028 | 98030 | CEV53 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 98004 | | | x | | | | | | | | |
| 98006 | | | x | | | | | | | | |
| 98013 | x | x | x | x | x | x | x | x | | x | x |
| 98017 | | x | x | | | x | | | | | |
| 98029 | x | x | x | x | x | x | x | x | | x | x |
| 98041 | | x | x | | x | x | x | x | | | |
| 98042 | | | x | | | | | | | | |
| 98043 | | | x | | | | | | | | |
| NRRL | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| MEX05 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 92/19 | | | x | | | | | | | | |

¹Isolados constantes na primeira coluna apresentaram halo de inibição significativamente maior que os constantes na primeira linha (Teste de Scheffe: $F = 17,67$; $p < 0,0001$; $n = 136$). Foram apresentados apenas os isolados que apresentaram diferenças significativas entre si.

As diferentes suscetibilidades de cada isolado do fungo frente às bactérias antagonistas podem se dever à produção diferencial de metabólitos inibitórios pelas bactérias. Os mecanismos de resistência ou de resiliência do

próprio fungo, como apresentado na Tabela 05, também devem estar envolvidos, uma vez que cada isolado do fungo pode responder de forma distinta a um mesmo isolado bacteriano. Do ponto de vista do controle biológico de fungos é importante que a produção de antifúngicos seja alta e ao mesmo tempo iniba o maior número de patógenos, uma característica apresentada pelos isolados E164 e C98017T.

Outros microrganismos extensamente investigados quanto a capacidade antagonista são aqueles do gênero *Pseudomonas*. Isolados bacterianos desse gênero utilizados em controle biológico têm recebido atenção pelo fato de apresentarem um rápido crescimento *in vitro* e fácil manipulação genética (Haas & Keel, 2003). Entre os principais metabólitos produzidos por *Pseudomonas* estão os antifúngicos peptídicos com propriedades surfactantes como a viscosinamida (Nielsen et al., 1999), o gás hidrocianeto, os antibióticos floroglucinóis, fenazinas, pioluteorina e pirrolnitrina (Haas & Keel, 2003) além de sideróforos, entre eles o ácido salicílico, a pioverdina e a pioquelina, que quelam ferro e outros metais e contribuem para a supressão da doença conferindo uma vantagem competitiva para os microrganismos produtores causando uma supressão ainda maior desses elementos essenciais já limitados em ambientes naturais (Duffy & Défago, 1999).

A biossíntese de antibióticos é controlada por sistemas regulatórios que coordenam os processos metabólicos durante o crescimento em resposta às mudanças no ambiente. As características dessas redes regulatórias ubíquas são conservadas entre as bactérias, mas a sua organização

hierárquica e a complexidade não foram bem elucidadas. Assim, alguns mecanismos amplos parecem ativar a produção de todos os antibióticos já estudados, enquanto outros podem influenciar de forma distinta rotas biossintéticas individuais (Thomashow, 1996).

4.2.2. Crescimento bacteriano em meio líquido

A produção do filtrado com atividade antifúngica foi obtida através do crescimento do isolado E164 por 48 horas em caldo triptona de soja. O controle *in vitro* do filtrado de cultura do isolado E164 foi investigado utilizando-se a excreção dos produtos do metabolismo bacteriano em meio líquido sem a presença do fungo como indutor. O filtrado foi testado em placas como descrito no item 3.5.2 e a formação de halos foi observada. Esse resultado é compatível com o observado por Leifert et al. (1995), onde o caldo fermentado por *B. subtilis* foi capaz de prevenir o desenvolvimento de *Botrytis cinerea*, mesmo sem a presença das células bacterianas. A ação primária de antibióticos tem sido associada à inibição da germinação dos esporos ou desenvolvimento do tubo germinativo e a eficácia do controle biológico *in vivo* está relacionada à capacidade do isolado em inibir o patógeno nas fases iniciais de penetração do hospedeiro (Zhang & Yuen, 1999). No entanto, a zona de inibição no ensaio em placas permaneceu após três semanas de incubação, resultado compatível ao observado por McKeen et al. (1986), revelando a capacidade do filtrado em agir também sobre hifas adultas.

Quando foi comparada a produção de metabólitos antifúngicos em meios de cultura contendo outras fontes de carbono como a maltose presente

no extrato de malte, a diferença de produção foi significativamente menor daquela obtida em TSB e em meio com palha de milho (Tabela 06).

Tabela 06: Análise de variância entre os halos de inibição obtidos nos ensaios *in vitro* entre os filtrados de cultivo do isolado *Bacillus* E164 crescido em caldo triptona de soja, palha de milho e extrato de malte sobre cinco isolados de *B. sorokiniana*¹

| Fonte de variação | SSq | DF | MSq | F | p |
|-------------------|------|----|-------|-------|--------|
| Entre os meios | 1,66 | 2 | 0,83 | 10,29 | 0,0002 |
| Entre os halos | 4,04 | 50 | 0,081 | | |
| Total | 5,07 | 52 | | | |

¹ $n_{total} = 53$; triptona de soja $n = 23$; extrato de malte $n = 13$; palha de milho $n = 17$. SSq = soma dos quadrados; DF = graus de liberdade; MSq = média dos quadrados

Contrastando os três meios de cultivo utilizados foi observada diferença significativa entre halos de inibição de filtrados de cultivo em palha de milho/caldo triptona de soja e extrato de malte.

O cultivo do isolado em meios contendo fontes complexas de carbono visou investigar se substratos que já faziam parte da biota natural do microrganismo, como a maltose e o glúten presentes no extrato de malte e nas sementes e o material foliar como a palha de milho, poderiam surtir efeito sobre a produção do metabólito, a exemplo de Milner et al. (1996), onde a produção

de kanosamina por *B. cereus* UW85 foi aumentada pelos metabólitos secretados por sementes de alfafa e pela presença de ferro. Grandes diferenças na inibição foram observadas por Czaczyk et al. (2000) quando comparados os meios de extrato de cenoura, batata e ervilhas com o caldo nutriente. Resultado similar foi observado por Nilsen et al. (1999), onde a concentração de viscosinamida produzida por *Pseudomonas fluorescens* DR54 divergiu entre os meios com glicose, sacarose e amido, apesar de a produção da molécula estar mais associada à fase logarítmica de proliferação celular do que à fonte de carbono.

Em diversos casos a presença de carbono em excesso pode interferir nas rotas de formação de metabólitos secundários (Moat & Foster, 1995). Bernal et al. (2002) observaram que a síntese de antibiótico estava aumentada quando um isolado de *Bacillus* mutante foi crescido em meio contendo manitol como fonte de carbono, diferente da glicose, que reprimiu o catabolismo, e conseqüentemente o metabolismo secundário. As altas concentrações de glicose no meio ágar batata dextrose reprimiram a síntese de mananase e celulase por *B. pumilus*, em estudo realizado por Nielsen & Sorensen (1997). Em alguns casos, a suplementação do meio com concentrações diferenciadas de sais pode levar à indução da expressão de determinados compostos, demonstrado por Duffy & Défago (1999), onde a produção dos antibióticos floroglucinol e pioluteorina por *P. fluorescens* foi estimulada pela suplementação do meio com sais de zinco, molibdênio e cobalto. Deve-se considerar que a síntese de antibióticos está intimamente relacionada ao estado metabólico geral da célula que por sua vez é definido

pela viabilidade de nutrientes e outros estímulos do ambiente (Tomashow, 1996).

4.2.3. Concentração mínima inibitória

A concentração inibitória mínima do filtrado foi observada até a diluição de dez vezes, podendo significar que mesmo não sendo purificado sua atividade inibitória é alta. Algumas moléculas inibitórias mesmo em baixas concentrações podem causar efeitos fisiológicos profundos nos organismos-alvo sem inibir o seu crescimento. Nesses casos, a excreção da molécula inibitória pode servir mais como um sinal ou uma forma de defesa do que como um ataque, a exemplo de antibióticos produzidos pelo isolado de *P. fluorescens* CHA0, os quais reprimem a produção de enzimas líticas por mixobactérias, protegendo o próprio produtor da lise (Haas & Keel, 2003).

A Figura 1 apresenta o aspecto geral do crescimento do fungo no ágar batata dextrose na presença de diferentes diluições do filtrado obtido a partir do cultivo do isolado bacteriano E164 em caldo tripton de soja (dados não apresentados).

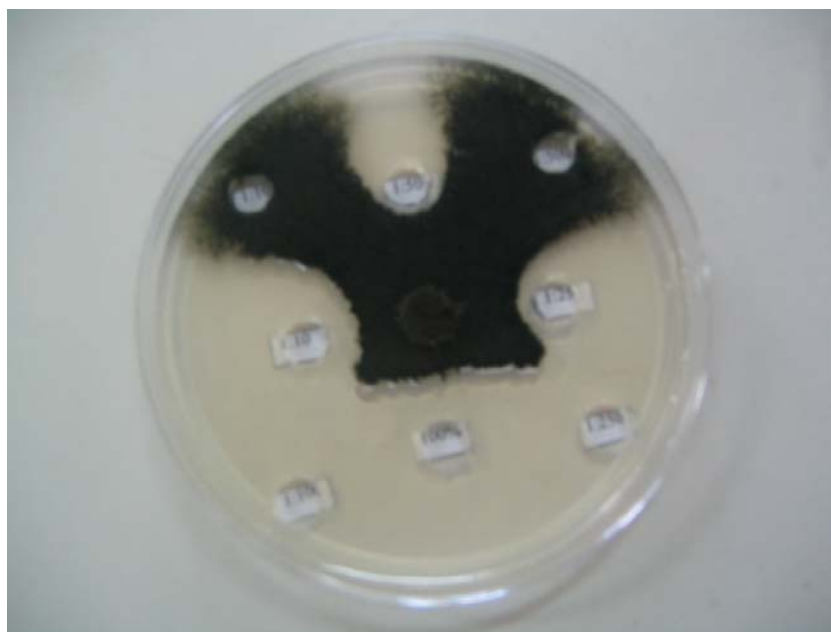


Figura 01: Halos de inibição produzidos pelo filtrado de cultura de *Bacillus* E164 diluído 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 vezes contra o isolado 1992/19 de *B. sorokiniana* após 5 dias de incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas.

4.2.4. Inibição de germinação dos conídios

A inibição sobre a germinação dos conídios foi analisada após 28 horas de incubação, uma vez que não houve germinação após 22 horas.

Os efeitos dos sobrenadantes dos três isolados bacterianos sobre a hifa em crescimento foram similares. Observaram-se intensa vacuolização do citoplasma, alteração morfológica do tubo germinativo, formação de micélio anormal e lise parcial dos conídios (Figura 02). O mesmo efeito foi constatado por Shirokov et al. (2002) em antagonismo entre *Bacillus* sp. e *B. sorokiniana* e por Perelló et al. (2002) em antagonismo entre *Chaetomonium globosum* e *B. sorokiniana*. Nestes casos os autores apenas descrevem as alterações

morfológicas sem analisar, no entanto, os possíveis sítios-alvo dos metabólitos utilizados nos referidos estudos.

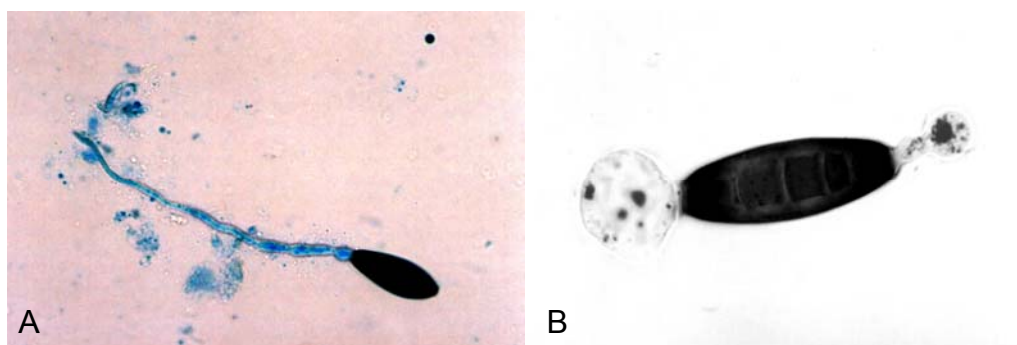


Figura 02: conídios de *B. sorokiniana* após 28 horas de crescimento - (A) isolado 98017 sem contato com o sobrenadante de *Bacillus* E164; (B) 98017 em contato com o sobrenadante de *Bacillus* E164.

No presente trabalho, tal alteração pode ser atribuída à formação defeituosa da parede celular. Porém uma melhor caracterização deve ser realizada a fim de elucidar em qual etapa da síntese da parede celular a interferência ocorre, pois diversas enzimas estão envolvidas nesse processo (Carlile & Watkinson, 1996).

4.3. Atividade enzimática

O isolado E164 apresentou atividade de caseinolítica e lipolítica. A investigação da produção de enzimas líticas como fonte de antagonismo visa o controle biológico baseado na predação. Nesses casos, ocorre a degradação da parte estrutural do organismo-alvo como a parede e a membrana. A caseína, uma proteína fosfatada presente no leite que não contém resíduos de

cistina e cisteína com um baixo grau de dobramento, é bastante suscetível ao ataque de proteases (Leninger, 1986). Como a enzima caseinase a excreção de outras proteases tem se mostrado um fator importante na inibição de patógenos e que, conjuntamente com quitinases ou isoladamente, são capazes de causar alterações estruturais na parede fúngica (De Marco & Felix, 2002).

A atividade lipolítica foi observada através da observação de fluorescência laranja quando a placa era posicionada sob luz ultravioleta (365nm). Os testes para a verificação de atividade lipolítica empregam a gema do ovo ou detergentes como substrato. No entanto, tais substratos são inadequados para a detecção de lipases propriamente ditas (triacilglicerol acil-hidrolases), pois a gema é substrato para fosfolipases e os detergentes são capazes de detectar atividade de esterase. A trioleína contida no óleo de oliva permite não só a detecção da atividade lipolítica, mas também sua quantificação (Kouker & Jaeger, 1987).

Pouca literatura evidencia o papel de lipases no controle biológico. A parede fúngica contém lipídios e proteínas, de forma que o antagonista deve produzir lipases e proteases que tenham atividade sobre essa estrutura (De Marco et al., 2003). Foi observado que a excreção de tais enzimas é intensa quando o substrato contém micélio, diferente de quando há uma prévia purificação da parede ou utiliza-se quitina coloidal, onde claramente ocorre apenas a excreção de enzimas específicas, como quitinases, quitosanases e laminariases (Helistö et al., 2001). Neste trabalho a atividade quitinase não pôde ser investigada pela falta de substrato.

A atividade enzimática é uma característica vantajosa na escolha de um agente de controle biológico. Uma maior variedade de enzimas líticas produzidas significa espectro da ação mais amplo (Nielsen & Sørensen, 1997), e também menor possibilidade de seleção de microrganismos resistentes (Handelsman & Stabb, 1996). Quitinases, quitosanases e glucanases estão entre as enzimas mais investigadas com finalidade de substituir defensivos químicos, com desempenho comprovado em exemplares dos gêneros bacterianos *Bacillus* e *Paenibacillus* (Nielsen & Sørensen, 1997). A produção e excreção de enzimas líticas, como quitinases, foi o principal fator atribuído à inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* por um isolado de *Bacillus cereus* (Chang et al., 2003). O mesmo mecanismo pode estar relacionado ao antagonismo de *B. pumilus* a *Aphanomyces cochleoides*, *P. ultimum* e *R. solani*, mas os autores não excluem a presença de antibióticos agindo sinergicamente às enzimas (Nielsen & Sørensen, 1997). A inibição do crescimento de *F. oxysporum* e *P. ultimum* pôde ser atribuída à ação de endoquitinases de *B. cereus* YQ308, em trabalho realizado por Chang et al. (2003).

4.4. Propriedades do filtrado

4.4.1. Temperatura

O filtrado com capacidade inibitória apresentou comportamento diferenciado frente aos tratamentos. Nenhuma das temperaturas utilizadas no aquecimento, mesmo por diferentes períodos, foi significativamente mais eficaz

que o controle. Um decréscimo significativo de atividade foi observado após o tratamento do filtrado a 100°C ($F = 11,7$; $p < 0,0001$; $n = 42$), quando comparado à testemunha e às outras temperaturas. Deve-se considerar, no entanto, que mesmo após a fervura por 90 minutos o filtrado ainda possuía atividade inibitória residual, com cerca de 30% de atenuação em relação aos outros tratamentos (Figura 03).

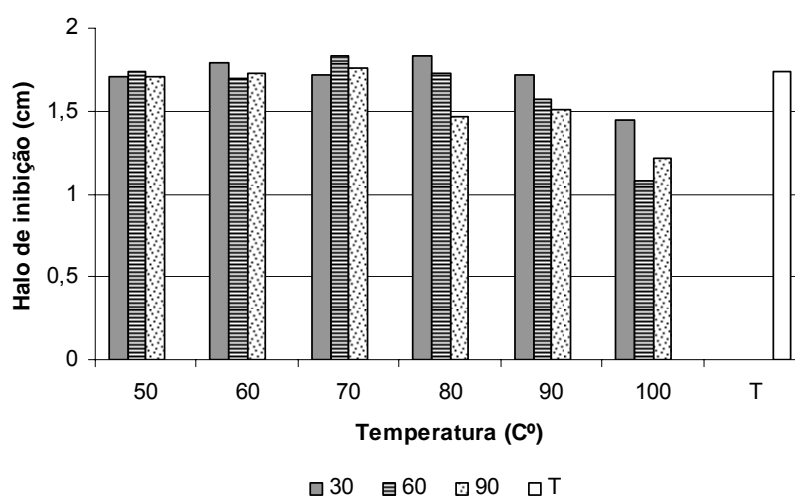


Figura 03: Halo de inibição resultante da ação do filtrado antifúngico produzido pelo isolado E164 contra o isolado 98031 de *B. sorokiniana* em placa, após o tratamento térmico do filtrado por 30, 60 e 90 minutos. T = testemunha, temperatura ambiente (25°C).

Este resultado difere daquele encontrado por Shirokov et al. (2002), onde já a 70°C ocorreu perda de 60% da atividade do filtrado, provavelmente devido à alteração conformacional das moléculas. No entanto, dependendo do tamanho e estrutura o composto pode ser altamente resistente ao tratamento

com temperatura elevada, como exposto por Bernal et al. (2002), onde nenhuma alteração sobre a atividade inibitória foi percebida nos tratamentos por 20 minutos a 20°C, 50°C e mesmo após autoclavação (121°C, 1 atm), uma característica das iturinas produzidas por espécies de *Bacillus*.

Quanto ao congelamento e refrigeração, nenhuma alteração pôde ser observada após 21 dias. Diferente do aquecimento, resultante do aumento de colisões entre as moléculas bem como o enfraquecimento de ligações e interações entre os átomos levando à desnaturação, o congelamento pode causar a precipitação de algumas proteínas, mas uma vez retornando ao estado líquido, as mesmas são capazes de retomar a atividade.

4.4.2. Estabilidade iônica

Observou-se que a alcalinização do pH causou um decréscimo na aquisição de massa micelial. A mesma curva foi observada na presença do filtrado, diluído em cinco vezes de sua concentração inicial (Figura 04).

As faixas de pH que apresentaram diferença significativa entre o peso de massa seca obtido do controle e do tratamento foram 5, 6, 8 e 10 ($F = 4118,3$; $p < 0,0001$; $n = 28$). Diferente do teste de temperatura, o teste de estabilidade iônica foi realizado em meio líquido tamponado, uma vez que a única maneira de perceber a atividade é através do crescimento do fungo. Assim, nos tubos controle, além de o fungo crescer sem o filtrado, foi necessário que se soubesse até que ponto o próprio pH, e não o filtrado inibiria seu desenvolvimento.

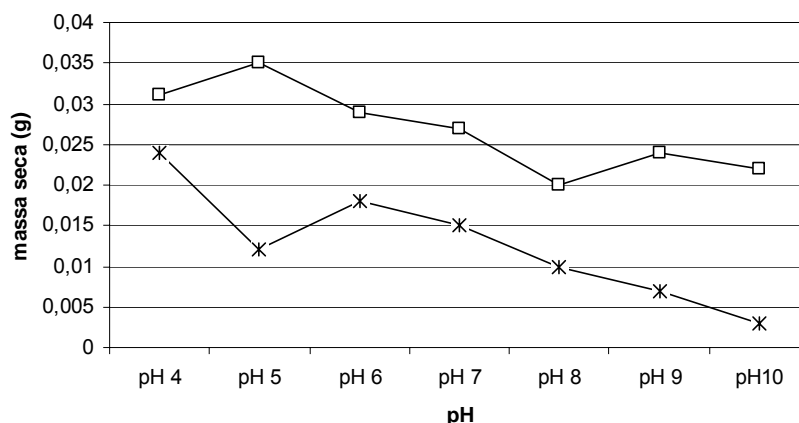


Figura 04: Massa micelial seca obtida a partir do crescimento do isolado 98031 de *B. sorokiniana* em caldos batata dextrose acidificados e alcalinizados com (*) e sem (□) o filtrado de cultura do isolado E164.

Mesmo ocorrendo inibição significativamente maior pelo filtrado em algumas faixas de pH, deve-se considerar que a inibição ocorreu ao longo de todo o gradiente ácido-base. Em pH alcalino, o efeito antifúngico relevante pode estar relacionado a um sinergismo entre o filtrado inibitório e o pH desfavorável ao fungo e não a uma melhor atividade do filtrado em si.

4.5. Controle *in vivo*

No aspecto geral, as plantas cujo substrato foi inoculado o antagonista apresentaram maior quantidade de folhas, e raízes mais espessas diferindo dos controles (Figura 05 A, B e C).

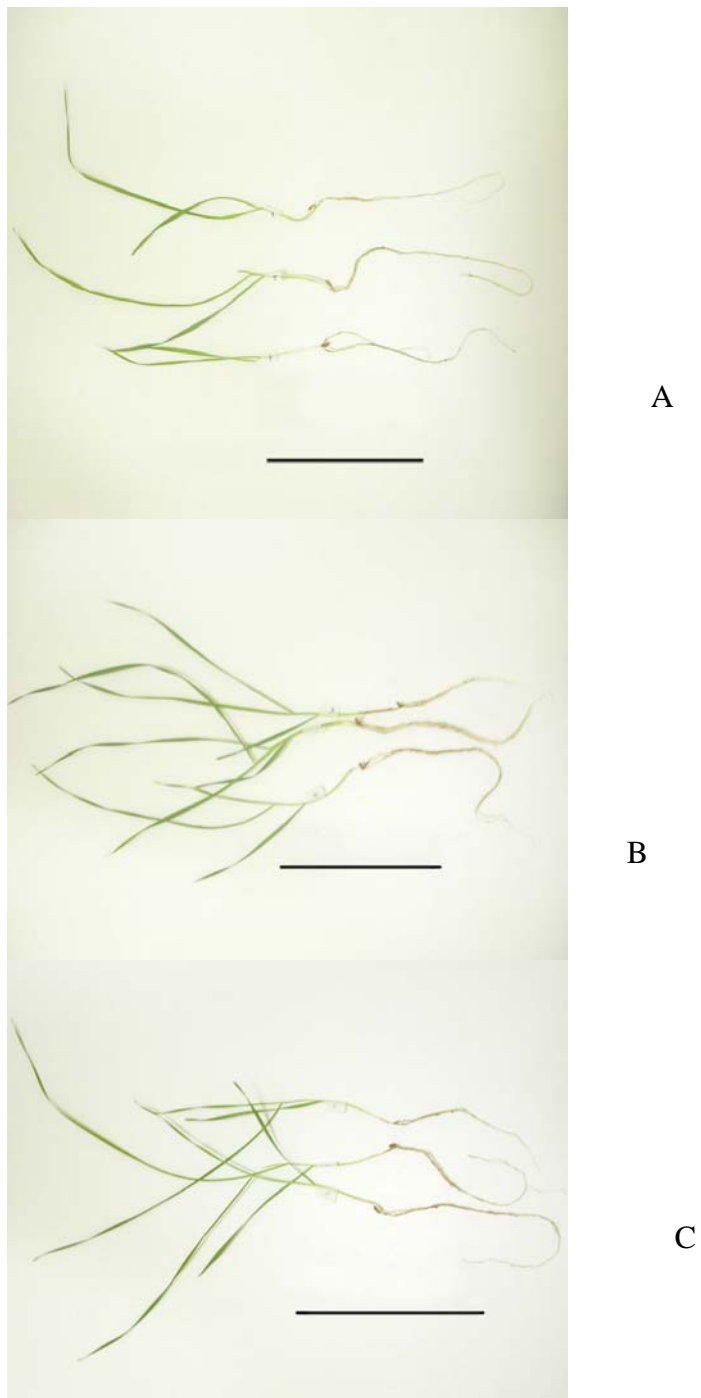


Figura 05: Exemplos de cultivar 209 de trigo após 21 dias de crescimento em germinador. A- indivíduos livres de contaminação plantados em substrato estéril; B- indivíduos contaminados com *B. sorokiniana* 98031 plantados em

substrato inoculado com o isolado *Bacillus* E164; C- indivíduos contaminados com *B. sorokiniana* 98031 plantados em substrato estéril. Barra = 13cm.

As plantas tratadas com a bactéria apresentaram raízes significativamente menores que aquelas sujeitas à infecção pelo fungo e as não contaminadas (Figura 06). O comprimento das folhas foi igual entre os três tratamentos. Dentre as 44 folhas analisadas em lupa, apenas três apresentaram lesão característica, sendo uma com 5mm² pertencendo a uma planta contaminada crescida em substrato contendo a bactéria e as outras duas com 2 e 5mm² respectivamente, pertencendo a plantas contaminadas e crescidas em substrato estéril.

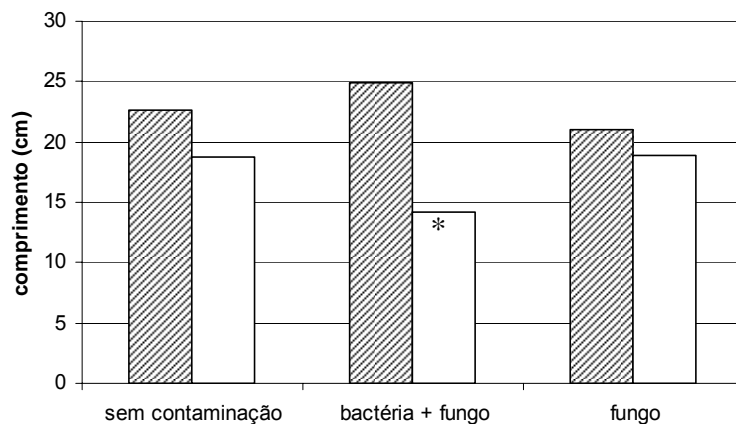


Figura 06: Comprimento de folhas e raízes de trigo sob diferentes tratamentos após 21 dias de crescimento em germinador. Colunas hachuradas correspondem ao comprimento médio das folhas; colunas em branco correspondem ao comprimento médio da raiz principal. * indica comprimento significativamente menor.

Quando observadas ao microscópio, todas as raízes apresentaram contaminação por fungos filamentosos, observada pela presença de hifas. Essa contaminação, no entanto, restringiu-se à epiderme, não atingindo tecidos internos das plantas. Nos tratamentos com *B. sorokiniana* tanto com quanto sem a presença da bactéria antagonista, foi observada a presença de esporos na superfície epidérmica. Em ambos os tratamentos foi observado um enegrecimento da bainha devido à infecção (Figura 07).



Figura 07: Aspecto da bainha e porção proximal das raízes de trigo infectado após 21 dias nos tratamentos com (em cima) e sem (embaixo) a presença da bactéria antagonista (destaque).

Na fase experimental *in vivo* foi considerada a capacidade da cepa *B. firmus* E164 de inibir a germinação ou multiplicação dos esporos de *B. sorokiniana* no solo, já que as sementes haviam sido contaminadas antes do plantio. Os resultados obtidos são similares a outros estudos, onde o uso de um isolado supressor não produziu um controle significativo. A falta de redução significativa na doença pode ser atribuída aos baixos níveis de doença observados mesmo nas plantas infectadas apenas com o fungo (Ryan & Kinkel, 1997).

Em trabalho realizado por Leifert et al. (1995), a produção do antibiótico estava relacionada à esporulação da bactéria, e métodos para induzir esse processo na superfície foliar poderiam levar a uma melhor atividade *in vivo*. Como não há metodologia para monitorar tais eventos, o ideal é proceder igual ao tratamento químico, onde há uma reaplicação em intervalos regulares. Segundo Kobayashi & El-Barrad (1996) não só a lise do micélio fúngico é importante no controle biológico: isolados capazes de causar inibição também foram capazes de colonizar a rizosfera em maior número.

Após inoculação e incubação das raízes em placas com ágar, diferentes populações de fungos foram observadas. Enquanto aquelas provenientes de sementes pré-contaminadas com *B. sorokiniana* mostraram o crescimento exclusivo desse fungo no ágar, mesmo em presença do antagonista, as populações de fungos foram variadas nas raízes derivadas de sementes livres de contaminação. Observaram-se associações entre *Alternaria* sp. e *Curvularia* sp.; *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp.; *Alternaria* sp. e *Penicillium*

sp.; *Fusarium* sp. e *Epicoccum* sp, e em alguns casos o crescimento isolado de *Alternaria* sp., *Curvularia* sp. e *Aspergillus* sp.

A presença de esporos nas raízes do tratamento com a bactéria antagonista, observadas ao microscópio, e o crescimento de *B. sorokiniana* sobre as raízes suplantando o antagonista e outros competidores em placa pode significar uma baixa capacidade inibitória do antagonista *in vivo*. No entanto, uma população bacteriana aumentada no solo levou a um maior desenvolvimento das plantas. Esse evento pode ser explicado pela liberação de metabólitos tais como fitormônios, responsáveis pelo desenvolvimento da planta.

A produção da auxina denominada de ácido indolacético (AIA), um composto derivado do triptofano e que promove o crescimento das raízes (Nultsch, 2000) foi observada por Kumar et al. (2005) em estudo com *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3. No presente estudo a produção desses compostos pelo isolado *Bacillus* E164 não foi investigada, pois o mesmo não é capaz de produzir indol através do metabolismo do triptofano.

Experimentos utilizando bactérias do gênero *Bacillus* como antagonistas ainda estão em fase de desenvolvimento e poucos são conclusivos quanto à eficácia deste microrganismo no campo. Kommedahl & Mew (1975) observaram que os tratamentos com *B. subtilis* ou *Chaetomonium globosum* apresentaram diferenças de um ano para outro devido a variações climáticas como temperatura do solo e densidade pluviométrica, concluindo que estes fatores são importantes para a efetividade dos agentes de controle biológico. Thirup et al. (2003) observaram que a comunidade microbiana

presente na rizosfera é resiliente frente à introdução de microrganismos exógenos e que a variação na comunidade está relacionada aos estágios fisiológicos e de maturidade das raízes. Em solos com baixa oxigenação, a presença de nitrato é de extrema importância para agentes de controle biológico capazes de fazer respiração anaeróbia, incluindo *B. subtilis* (Knox et al., 2000). Resultados similares foram obtidos por Schisler et al. (2002) utilizando isolados de *B. subtilis* em campo, atingindo uma redução de 78% na incidência de *F. graminearum* em *Triticum durum*, enquanto Perondi et al. (1996) observaram que, apesar de *B. subtilis* apresentar boa inibição *in vivo* contra *F. graminearum*, o efeito não correspondeu ao resultado *in vitro*.

O antagonismo entre *Bacillus* e *Bipolaris* foi relatado em alguns estudos (Perelló et al., 2002; Shirokov et al. 2002; Czaczyk et al., 2000), mas nenhum alude ao controle *in vivo*, dificultando a análise e comparação dos resultados aqui apresentados. Um dos primeiros estudos de controle *in vivo* de *B. sorokiniana* em pastagens é de Zhang & Yuen (1999), retratando a dificuldade em estabelecer um isolado que controle este fitopatógeno com sucesso. Vários sistemas de controle biológico para as doenças do trigo têm sido relatados, mas poucos foram eficientes sob condições de campo. O controle das doenças da parte aérea do trigo, no Brasil, tais como mancha-marrom e a mancha da gluma, também tem mostrado resultados inconsistentes (Perondi et al., 1996).

Um novo aspecto no controle biológico é a sua associação aos defensivos químicos, uma cooperação que aumenta a inibição de patógenos e diminui a quantidade de defensivos requerida, causando menor impacto

ambiental (Spadaro & Gullino, 2005). Em trabalho desenvolvido por Luz (2003) mesmo quando as doses do antagonista e do fungicida eram reduzidas à metade, o nível de controle foi superior aos observados onde o antagonista e o fungicida eram aplicados isoladamente nas doses normais.

4.6. Purificação parcial por ultrafiltração

A molécula inibitória ficou retida no processo de ultrafiltração, sendo, portanto, maior que 10kDa. Alguns trabalhos investigaram a atividade inibitória exercida por moléculas de baixo peso molecular como peptídeos (Bernal et al., 2002), análogos de ácidos nucléicos e sideróforos (Duffy & Défago, 1999). Essas moléculas são resistentes ao tratamento térmico, diferente de proteínas maiores que desnaturam frente ao aquecimento.

5. CONCLUSÕES

- Entre os três isolados bacterianos, a atividade antifúngica exercida sobre um maior número de isolados de *B. sorokiniana* foi a do *Bacillus* E164.
- A atividade inibitória *in vivo* não foi eficiente, mas a bactéria causou alterações morfológicas sobre as raízes das do trigo.
- O melhor meio para cultivo foi o caldo triptona de soja.
- O filtrado antifúngico apresentou atividade após o tratamento térmico sob diversas temperaturas, mas nenhuma delas aumentou a atividade do filtrado comparado à temperatura ambiente.
- O filtrado antifúngico apresentou atividade após o tratamento iônico, mas a correlação entre diminuição do crescimento e aumento do pH foi similar entre o tratamento e a testemunha.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, R.; TEWARI, A.K.; SRIVASTAVA, K.D.; SINGH, D.V. Role of antibiosis in the biological control of sopt blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomonium globosum*. **Mycopathologia**, Filadélfia, v. 157, p. 369-377, 2004.

ALMGREN, J.; GUSTAFSSON, M.; FÄLT, A.-S.; LINDGREN, H.; LILJEROTH, E. Interaction between root and leaf spot disease development in barley cultivars after inoculation with different isolates of *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 147, p. 331-337, 1999.

ALVES, S.B.; MEDEIROS, M.B.; TAMAI, M.A.; LOPES, R.B. Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 21, p. 16-21, 2001.

APOGA, D.; EK, B.; TUNLID, A. Analysis of proteins in the extracellular matrix of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* using 2-D gel electrophoresis and MS/MS. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 197, p. 145-150, 2001.

ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**. São Paulo: Blucher, 1968. p. 272-278.

BARBOSA, M.A.G.; REHN, K.G.; MENEZES, M. MARIANO, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 98-104, 2001.

BARNETT, H.L.; NUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Nova Yorque: Macmillan Publishing Company, 1987. p. 126-127.

BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; WEISS, L.C.B.; KOBESHNIKOV, A.; GOLDWAY, A.D.M.; WISNIEWSKY, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, Nova Yorque, v. 45, p. 140-148, 2004.

BERNAL, G.; ILLANES, A.; CIAMPI, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 12-20, 2002. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol5/issue1/full/4>>. Acesso em: jun. 2004.

BHUIYAN, S.A.; RYLEY, M.J.; GALEA, V.J.; TAY, D. Evaluation of potential biocontrol agents against *Claviceps africana* *in vitro* and *in vivo*. **Plant Pathology**, Londres, v. 52, p. 60-67, 2003.

BRIGGS, S.P.; JOHAL, G.S. Genetic patterns of plant host-parasite interactions. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 10, p. 12-16, 1994.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. **The Fungi**. Nova Yorque: Academic Press Limited, 1996. p. 77-151.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M. *In vitro* influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticilloides* growth and fumonisin B₁ production: effect of seeds treatment on maize root colonization. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, p. 390-396, 2005.

CHANG, W.T.; CHEN, C.S.; WANG, S.L. And antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. **Current Microbiology**, Nova Yorque, v. 47, p. 102-108, 2003

COOMBS, J.T.; MICHELSEN, P.P.; FRANCO, C.M.M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 359-366, 2004.

CORSINI, E.; BIRINDELLI, S.; FUSTINONI, S.; DE PASCHALE, G.; MAMMONE, T.; VISENTIN, S.; GALLI, C.L.; MARINOVICH, M.; COLOSIO, C. Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v. 208, p. 178-185, 2005.

CZACZYK, K.; STACHOWIAK, K.; TROJANOWSKA, K.; GULEWICZ, K. Antifungal activity of *Bacillus* sp. isolated from compost. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 45, p. 473-580, 2000.

DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **BMC Biochemistry**, 2002. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/3/3>>. Acesso em: 19 fev. 2006.

DE MARCO, J.L.; VALADARES-INGLIS, M.C.; FELIX, C.R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 33-38, 2003.

DUCZEK, K.L.J.; JONES-FLORY, L.L.; REED, S.L.; BAILEY, K.L.; LAFOND, G.P. Sporulation of *Bipolaris sorokiniana* on the crowns of crop plants in Saskatchewan. **Canadian Journal of Plant Science**. Ottawa, v. 76, p. 861-867, 1996.

DUFFY, B.K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulation antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova Orleans, v. 65, p. 2429-2438, 1999.

DUVEILLER, E.; ALTAMIRANO, G. Pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico. **Plant Pathology**, Londres, v. 49, p. 235-242, 2000.

EL-TARABILY, K.A.; SOLIMAN, M.H.; NASSAR, A.H.; AL-HASSANI, H.A.; SIVASITHAMPARAM, K.; MCKENNA, F.; St. J. HARDY, E.G. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, Londres, v. 49, p. 573-583, 2000.

EMMERT, E.A.B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 171, p. 1-9, 1999.

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 22, p. 18-21, 2001.

FIDDAMAN, P.J.; ROSSAL, S. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, p. 395-405, 1994.

FÖLDES, T.; BÁNHEGYI, I.; HERPAI, Z.; VARGA, L.; SZIGETI, J. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne and spoilage micro-

organisms. **Journal of Applied Microbiology**, Londres, v. 89, p. 840-846, 2000.

GABRIEL, D.W.; ROLFE, B.G. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 365-391, 1990.

GEIMBA, M.P.; CORBELLINI, V.A.; SCROFERNEKER, M.L. Chemical and immunological differentiation of exoantigens from four *Bipolaris sorokiniana* strains. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 2051-2057, 2005.

GIRAUDO, M.S. **Avaliação da atividade de antibiose *in vitro* de bactérias isoladas de sementes de trigo contra *Bipolaris sorokiniana***. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 101f, 2001.

GOEL, A.; McCONNEL, L.L.; TORRENTS, A. Wet deposition of current use pesticides at a rural location on the Delmarva Peninsula: impact of rainfall patterns and agricultural activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 7915-7924, 2005.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 117-153, 2003.

HALVERSON, L.J.; STACEY, G. Signal exchange in plant-microbe interactions. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 50, p. 193-225, 1986.

HANDELSMAN, J.; STAB, E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

HARDING, H. Effect of pH and sucrose concentration on conidium size and septation in four *Bipolaris* species. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, p. 1457-1464, 1975.

HAUGAARS, H. JØRGENSEN, H.J.L.; LYNGKJÆR, M.F.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; COLLINGE, D.B. Control of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* by treatment with mycelial extracts from cultured fungi. **Plant Pathology**, Londres, v. 50, p. 552-560, 2001.

HELISTÖ, P.; AKTUGANOV, G.; GALIMZIANOVA, N.; MELENTJEV, A.; KOPELA, T. Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: isolation and purification of components. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 758, p. 197-205, 2001.

HEWITT, M.J.; MUTCH, P.; PRATTEN, M.K. Potential teratogenic effects of benomyl in rat embryos cultured *in vitro*. **Reproductive Toxicology**, Amsterdam, v. 20, p. 273-282, 2005.

JACQUES, P.; HBID, C.; DESTAIN, J.; RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; DE PAUW, E.; THONRAT, P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 77-79, p. 223-233, 1999.

KILIC-EKICI, O.; YUEN, G.Y. Comparison of strains of *Lysobacter enzymogenes* and PGPR for induction of resistance against *Bipolaris sorokiniana* in tall fescue. **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 446-455, 2004.

KNOX, O.G.; KILLHAM, K.; LEIFERT, C. Effects of increased nitrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 227-231, 2000.

KOBAYASHI, D.Y.; EL-BARRAD, N.E.H. Selection of bacterial antagonists using cultures for the control of summer patch disease in Kentucky bluegrass. **Current Microbiology**, Nova York, v. 32, p. 106-111, 1996.

KOMMEDAHL, T.; MEW, I.C. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 296-300, 1975.

KONDOH, M.; HIRAI, M.; SHODA, M. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v. 91, p. 173-177, 2001.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova Orleans, v. 53, p. 211-213, 1987.

KUMAR, J. SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; LANGEN, G.; BALTUSCHAT, H.; STEIN, E.; SUBRAMANIAN, N.; KOGEL, K.H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. **Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 3, p. 185-195, 2002.

KUMAR, R.S.; AYYADURAI, N.; PANDIARAJA, P.; REDDY, A.V.; VENKATESWARLU, Y.; PRAKASH, O.; SAKTHIVEL, N. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. **Journal of Applied Microbiology**, Londres, v. 98, p. 145-154, 2005.

LASCA, C.C.; KRUPPA, P.C.; BARROS, B.C.; SHIMIDT, J.R.; CHIBA, S. Controle de *Pyricularia grisea* e *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo mediante tratamento com fungicidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, p. 55-63, 2001.

LEIFERT, C.; LI, H.; CHIDBUREE, S.; HAMPSON, S.; WORKMAN, S.; SIGEE, D.; EPTON, H.A.S.; HARBOUR, A. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumillus* CL45. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, p. 97-108, 1995.

LENINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1986. 725p.

LINHARES, A.I.; MATSUMURA, A.T.S.; LUZ, V.C. Avaliação da amplitude de ação antagonística de microrganismos epífitas do trigo sobre o crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 1, p. 119-126, 1995.

LORITO, M.; HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; BROADWAY, R.M.; TRONSMO, A.; WOO, S.L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 302-307, 1993.

LUZ, W.C. Avaliação dos tratamentos biológico e químico na redução de patógenos em semente de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 93-95, 2003.

MA, Z.; MICHAILIDES, T.J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 24, p. 853-863, 2005.

MARDER, L.; CORBELLINI, V.A.; FERRÃO, M.F.; SCROFERNEKER, M.L.; SCHNEIDER, R.C.S. Quantitative analysis of total mycotoxins in metabolic extracts of four strains of *Bipolaris sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*). **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 177-180, 2006.

MARTEN, P.; SMALLA, K.; BERG, G. Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Microbiology**, Londres, v. 89, p. 463-471, 2000.

McFADDIN, J. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.

MCKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.I. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilia fructicola* from *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 136-139, 1986.

METHA, Y.R. Produção de conídios, período de esporulação e extensão da lesão por *Helminthosporium sativum* nas folhas-bandeira de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 77-99, 1981.

MILNER, J.L.; SILO-SUH, L.; LEE, J.C.; HE, H.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova Orleans, v. 62, p. 3061-3065, 1996.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W. **Microbial Physiology**. 3th. ed. Nova Yorque: Wiley- Liss, 1995. 580p.

MÜLLER, M.V.G.; GERMANI, J.C.; VAN DER SAND, S.T. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 642-652, 2005. Disponível em: <<http://www.funpecrp.com.br/gmr/index.htm>>. Acesso em: jan. 2006.

NAKAJIMA, H.; TORATSU, Y.; FUJII, Y.; ICHINOE, M.; HAMASAKI, T. Biosynthesis of sorokinianin a phytotoxin of *Bipolaris sorokiniana*: evidence of mixed origin from the sesquiterpene and TCA pathway. **Tetrahedron Letter**, Amsterdam, v. 39, p. 1013-1016, 1998.

NELSON, R.R.; KLINE, D.M. Intraespecific variation in patogenicity in the genus *Helminthosporium* to gramineous species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 52, p. 1045-1049, 1962.

NIELSEN, P.; SØRENSEN, J. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 183-192, 1997.

NIELSEN, T.H.; CHRISTOPHENSEN, C.; ANTHONI, U.; SØRENSEN, J. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. **Journal of Applied Microbiology**, Londres, v. 86, p. 80-90, 1999.

NULTSCH, W. **Botânica Geral**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 489p.

OLIVEIRA, A.M.R.; MATSUMURA, A.T.S; PRESTES, A.M.; VAN DER SAND, S.T. Intraespecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random-amplified polymorphic DNA (RAPD). **Genetics and Molecular Research**, v.1, p. 350-358, 2002. Disponível em: <<http://funpecrp.com.br/gmr/index.htm>>. Acesso em: mar. 2006.

PANDEY, S.P.; KUMAR, S.; KUMAR, U.; CHAND, R.; JOSHI, A.K. Sources of inoculum and reappearance of spot blotch of wheat in rice-wheat cropping systems in eastern India. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 111, p. 47-55, 2005.

PERELLÓ, A.; SIMON, M.R.; ARAMBARRI, A.M. Interaction between foliar pathogens and the saprophytic microflora of the wheat (*Triticum aestivum* L.) phylloplane. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 150, p. 232-243, 2002.

PERONDI, N.L.; LUZ, W.C.; THOMAS, R. Controle microbiológico da giberela do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 243-249, 1995.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, O.S. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycology Society**, Cambridge, v. 55, p. 158-161, 1970.

PRATES, L.G.; FERNANDES, J.M.C. Avaliando a taxa de expansão de lesões de *Bipolaris sorokiniana* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 185-191, 2001.

RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, Berlim, v. 81, p. 573-547, 2002.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 36., 2004, Passo Fundo. Disponível em: <<http://www.cntp.embrapa.br/rcsbpt04/>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

RYAN, A.D.; KINKEL, L.L. Inoculum density and population dynamics of suppressive and pathogenic *Streptomyces* strains and their relationship to biological control of potato scab. **Biological Control**, Orlando, v. 10, p. 180-186, 1997.

SABARATNAM, S.; TRAQUAIR, J.A. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. **Biological Control**, Orlando, v. 23, p. 245-253, 2002.

SCHISLER, D.A.; KHAN, N.I.; BOEHM, M.J.; SLININGER, P.J. Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1350-1356, 2002.

SHARMA, R.C.; DUBIN, H.J. Effect of wheat cultivar mixtures on spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) and grain yield. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 48, p. 95-101, 1996.

SHIROKOV, A.V.; LOGINOV, O.N.; MELENT'EV, A.I.; AKTUGANOV, G.E. Protein and peptide factors from *Bacillus* sp. 739 inhibit the growth of phytopathogenic fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Berlim, v. 38, p. 139-143, 2002.

SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S. Liquid culture carbon, nitrogen and inorganic phosphate source regulate nematicidal activity by fluorescent pseudomonads in vitro. **Lettes in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, p. 185-190, 2004.

SINGH, P.P.; SHIN, Y.C.; PARK, C.S.; CHUNG, Y.R. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 92-99, 1999.

SLININGER, P.J.; VAN CAUWENBERGE, J.E.; BOTHAST, R.J.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S.; COOK, R.J. Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Secaucus, v. 45, p. 391-398, 1996.

SMITH, K.P.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 96, p. 4786-4790, 1999.

SENEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Wiliam & Wilkins, 1986, v. 2. 1599p.

SPADARO, D.; GULLINO, M.L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 24, p. 601-613, 2005.

STACEY, G.; KEEN, N.T. **Plant-microbe interactions**. Nova Yorque: Chapman & Hall, 1996. 316p.

THIRUP, L.; JOHANSEN, A.; WINDING, A. Microbial succession in the rhizosphere of live and decomposing barley roots as affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54-BN14 or the fungicide imazalil. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 383-392, 2003.

THOMASHOW, L.S. Biological control of plant root pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 7, p. 343-347, 1996.

TINLINE, K.D. *Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range. **Advances in Plant Pathology**, Londres, v. 6, p. 113-122, 1988.

TOURÉ, Y.; ONGENA, M.; JACQUES, 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**, Londres, v. 96, p. 1151-1160, 2004.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Major world crop areas and climatic profiles**. Washington D.C.: World Agricultural Outlook Board, 1994. 279p. (Agricultural Handbook, 664).

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, Berlim, v. 81, p. 549-556, 2002.

WANG, H.; NG, T.B. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Peptides**, Amsterdam, v. 25, p. 1-5, 2004.

YAZGAN, A.; ÖZCENGİZ, G.; ÖZCENGİZ, E.; KILINÇ, K. MARAHIEL, M.A.; ALAEDDINOGLU, N.G. Bacilysin biosynthesis by a partially-purified enzyme fraction from *Bacillus subtilis*. **Enzymes and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 29, p. 400-406, 2001.

ZHANG, X.; ZHANG, B.; ZHANG, Z.; SHEN, W.; YANG, C.; YU, J.; ZHAO, Y. Survival of the biocontrol agents *Brevibacillus brevis* ZJY-1 and *Bacillus subtilis* ZJY-116 on the spikes of barley in the fields. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 6B, p. 770-777, 2005.

ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. Biological control of *Bipolaris sorokiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 817-822, 1999.

ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. Effects of culture fluid and preinduction of chitinase production on biocontrol of *Bipolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. **Biological Control**, Orlando, v. 18, p. 277-286, 2000a.

ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 384-389, 2000b.

