

Bacillus subtilis ANTAGÔNICOS AOS PRINCIPAIS PATÓGENOS ASSOCIADOS A SEMENTES DE FEIJÃO E TRIGO

Eduardo Lazzaretti¹, José O.M. Menten² e Wagner Bettiol¹

¹ EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, C.P.69, 13280-000, Jaguariúna-SP, Brasil. ² Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", C.P. 9, 13418-000, Piracicaba-SP, Brasil.

O primeiro autor é bolsista da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e o segundo e terceiro autores são bolsistas do CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento).

Parte de uma tese apresentada pelo primeiro autor para obtenção do título de Mestre em Agronomia na Universidade de São Paulo.

Recibido: 18 de Marzo de 1994

RESUMO

Lazzaretti, E., Menten, J.O.M., e Bettiol, W. 1994. *Bacillus subtilis* antagonísticos aos principais patógenos associados a sementes de feijão e trigo. Fitopatol. Venez. 7:42-46.

Foram testados, *in vitro*, 4 isolados de *Bacillus subtilis*, quanto à capacidade de seus metabólitos inibir o crescimento micelial de fungos associados às sementes de feijão e de trigo e presentes no solo. Os isolados de *B. subtilis*, AP-03, AP-12, AP-51 e AP-114, inibiram totalmente o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bipolaris sorokiniana* e *Pyricularia oryzae*. Para *Alternaria tenuis*, *Macrophomina phaseolina*, *Septoria nodorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* e *Fusarium graminearum* os isolados do antagonista apresentaram porcentagem de inibição superior a 83%, exceção ao isolado AP-12 que inibiu em 58% o crescimento micelial de *F. graminearum*. Para os fungos de armazenamento dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., os metabólitos de *B. subtilis* retardaram os seus desenvolvimentos e diminuíram o diâmetro das colônias. Pelos resultados, verifica-se a alta capacidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* inibir os fungos patogênicos associados às sementes de feijão e trigo.

Palavras chave adicionais: Controle Biológico, *Phaseolus vulgaris*, *Triticum aestivum*.

RESUMEN

Lazzaretti, E., Menten, J.O.M. y Bettiol, W. 1994. *Bacillus subtilis* antagonístico a los principales patógenos asociados a semillas de frijol y trigo. Fitopatol. Venez. 7:42-46.

Fueron realizados ensayos, *in vitro*, con 4 aislamientos de *Bacillus subtilis* con relación a la capacidad de sus metabolitos de inhibir el crecimiento micelial de hongos asociados a semillas de frijol (caraota) y trigo, y presentes en el suelo. Los aislamientos de *B. subtilis*, AP-3, AP-12, AP-51 e AP-114, inhibieron totalmente el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Pyricularia oryzae*. Para *Alternaria tenuis*, *Macrophomina phaseolina*, *Septoria nodorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* y *Fusarium*

graminearum, los metabolitos producidos por los aislamientos del antagonista presentaron porcentajes de inhibición superior a 83%, con excepción del aislamiento AP-12 que inhibió en 58% el crecimiento micelial de *F. graminearum*. Para los hongos de almacenaje de los géneros *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., los metabolitos de *B. subtilis*, retardaron su desarrollo, además de disminuir el diámetro de sus colonias. Por los resultados obtenidos, se verifica la alta capacidad de los metabolitos producidos por *B. subtilis* para inhibir los hongos patogénicos asociados a las semillas de frijol y trigo.

Palabras clave adicionales: Control biológico, *Phaseolus vulgaris*, *Triticum aestivum*

ABSTRACT

Lazzaretti, E., Menten, J.O.M. and Bettiol, W. 1994. *Bacillus subtilis* antagonistic to the principal pathogens associated with bean and wheat seeds. Fitopatol. Venez. 7:42-46.

Under *in vitro* conditions, 4 strains of *Bacillus subtilis* were tested for the capacity of their metabolites to inhibit mycelial growth of fungi associated with bean and wheat seeds and soilborne fungi. Growth of *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bipolaris sorokiniana* and *Pyricularia oryzae* was totally inhibited by the metabolites produced by strains AP-3, AP-12, AP-51 and AP-114. For *Alternaria tenuis*, *Macrophomina phaseolina*, *Septoria nodorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *F. graminearum* and *Colletotrichum lindemuthianum*, the antagonist strains inhibited the mycelial growth more than 83%, except AP-12 that inhibited 58% of the growth of *F. graminearum*. In the case of storage fungi (*Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.), the metabolites of *B. subtilis*, retarded their development and reduced the diameter of their colonies. The results obtained show the high capacity of *B. subtilis* metabolites to inhibit the pathogenic fungi associated with bean and wheat seeds.

Additional key words: Biological control, *Phaseolus vulgaris*, *Triticum aestivum*.

INTRODUÇÃO

Entre os microrganismos antagonísticos a fitopatógenos, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, vem sendo estudado por diversos autores (1,2,3,4,7,8,9,13,14) sempre mostrando-se altamente promissor.

Uma das possíveis formas de utilização de *B. subtilis* como agente de biocontrole, é através do tratamento de sementes sendo que Venkatasubbaiah (16); Li e Alexander (10); Gai e Gauer (5); Turner e Backman (15); Rossal e

Mcknight (12); Lazzaretti (9) e Luz (11) obtiveram resultados satisfatórios.

O efeito benéfico de *B. subtilis*, quando aplicado junto as sementes ou ao solo, não é exclusivamente devido ao antagonismo proporcionado aos patógenos. A bactéria influi positivamente na germinação, desenvolvimento e rendimento da cultura devido, também, a produção de substâncias promotoras de crescimento e a melhoria na nutrição das plantas, através da solubilização de fósforo como foi demonstrado por Gai e Gauer (5).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo, avaliar *in vitro* o efeito de metabólitos de *B. subtilis* no controle de patógenos associados às sementes de feijão e de trigo e presentes no solo, visando sua posterior utilização em tratamento de sementes ou solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro isolados de *B. subtilis* [AP-03, AP-12, AP-51 e AP-114, originários de folhas de *Eucalyptus*, sementes de feijão e os dois últimos de folhas de arroz, respectivamente (Bettiol e Kimati (3)), previamente selecionados por Lazzaretti (9) quanto a capacidade de inibir fungos associados às sementes de trigo e feijão, foram transferidos para 300 ml de meio líquido BD (60g de caldo de batata e 6 g de dextrose) e incubados no escuro, sob agitação constante a 150 rpm a $\pm 30^{\circ}\text{C}$. Transcorridos 7 d foi adicionado 6g de ágar, autoclavado a 121°C por 20 min e vertidos em placas de Petri. Durante essas fases amostras (15ml) eram retiradas e medido o pH. Após solidificação do meio foram colocados no centro das placas discos de 0,7 cm de diam contendo *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria tenuis*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Septoria nodorum*, *F. graminearum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pyricularia oryzae* em pleno desenvolvimento. Placas contendo BDA (batata-dextrose-ágar) foram utilizadas como testemunhas. Após repicagem a incubação foi a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O crescimento micelial dos fungos foi medido diariamente e as avaliações foram feitas por períodos nunca inferiores a 30 d. A porcentagem de inibição foi calculada quando o crescimento micelial dos fungos, no tratamento testemunha, tomava toda a superfície das placas de Petri. Para cada isolado de *B. subtilis* e dos patógenos foram utilizadas 5 repetições.

Para os fungos de armazenamento do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. após solidificação do meio produzidos como descrito anteriormente, foram transferidos 0,2 ml de uma suspensão contendo 22,8 conídios/ml de *Penicillium* sp. e 90 conídios/ml de *Aspergillus* sp. por placa. A suspensão foi espalhada sobre o meio com auxílio de uma alça de Drigalsky e a incubação foi a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Foram feitas 5 repetições por tratamento e as avaliações foram diárias, anotando-se o dia após a repicagem que surgiam as primeiras colônias. Após cinco dias de incubação, as colônias formadas foram avaliadas quanto ao número e ao diâmetro. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste Tukey.

Para verificar a quantidade mínima de caldo necessário para ocorrer inibição dos fungos, foi feito um ensaio com diferentes diluições do isolado AP-51. Tomando-se porções do caldo (BD + *B. subtilis*) com 7 d de incubação, foram feitas diluições (100, 75, 50, 25, 10, 5 e 0 %) onde 100% foi caldo puro onde *B. subtilis* foi multiplicado e zero(0) foi batata-dextrose (BD). Aos 200 ml feitos para cada diluição, adicionou-se 4 g de ágar, posteriormente autoclavados (121°C por 20 min) e vertidos em placas de Petri. Nas placas, com meio solidificado, foi adicionado, com auxílio de uma micropipeta, 200 μL de uma suspensão contendo $7,12 \times 10^3$ e $2,75 \times 10^3$ conídios/ml de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., respectivamente. O inóculo foi espalhado sobre o meio com auxílio de uma alça de Drigalsky previamente flambada. A incubação foi a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram feitas 5 repetições para cada fungo nas 7 concentrações. As avaliações foram diárias, anotando-se o tempo (em dias), após inoculação, necessário para o aparecimento das primeiras colônias. Após 8 d da

repicagem as colônias foram contadas e procedeu-se a contagem do número de conídios em hemocitômetro.

Para proceder a contagem de conídios foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada por placa, sendo as colônias raspadas e homogeneizadas e, em seguida, retirada uma alíquota de 1 ml, a qual foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 ml de água destilada esterilizada. Os tubos foram agitados mecanicamente por 30 seg e, em seguida, procedeu-se a contagem em hemocitômetro.

RESULTADOS

Os metabólitos de *B. subtilis* permaneceram ativos, inibindo ou retardando o crescimento micelial de *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *S. nodorum*, *B. sorokiniana*, *A. tenuis*, *M. phaseolina*, *F. solani*, *F. graminearum*, *C. lindemuthianum* e *P. oryzae* por no mínimo 30 d (Tabela 1), sendo que os isolados AP-3 e AP-51 inibiram totalmente o crescimento micelial de *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *B. sorokiniana* e *P. oryzae* (Tabela 2).

Para os fungos de armazenamento, os quatro isolados de *B. subtilis* retardaram em 3 e 2 d o surgimento das primeiras colônias de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. Em relação ao diâmetro das colônias os isolados AP-3 e AP-51 mostraram-se mais efetivos, diferindo estatisticamente dos isolados AP-12 e AP-114 (Fig. 1); o mesmo não ocorrendo com o número de colônias (Fig. 2).

Quando avaliado o número de colônias de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em meios contendo concentrações crescentes (0 a 100%) de caldo onde o isolado de AP-51 de *B. subtilis* foi multiplicado não foi verificada diferença estatisticamente significativa (Tabela 3). Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de conídios produzidos por *Penicillium* sp. que foi acentuadamente reduzido com o aumento na concentração do caldo onde *B. subtilis* (AP-51) foi multiplicado. Por outro lado, o mesmo não ocorreu em relação ao *Aspergillus* (Tabela 3).

Nos dois ensaios com *Penicillium* e *Aspergillus* foram verificados que, invariavelmente, na presença de metabólitos dos 4 isolados de *B. subtilis* a coloração dos dois fungos sofriam alterações, permanecendo esbranquiçadas.

A variação do pH medido antes e após crescimento da bactéria e antes e após a autoclavagem do meio, não foram alterados em mais de 0,1 unidade para os 4 isolados.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram a alta sensibilidade dos fungos testados aos metabólitos de *B. subtilis* principalmente *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *B. sorokiniana* e *P. oryzae* que tiveram o seu crescimento micelial inibido em 100% (Tabelas 1 e 2).

Diversos fatores, podem ser atribuídos ao crescimento micelial dos fungos na presença de metabólitos de *B. subtilis* tais como: 1) a quantidade de metabólitos produzidos não foi suficiente para inibir o crescimento micelial; 2) os fungos que apresentaram crescimento são menos sensíveis aos metabólitos produzidos; 3) pode ocorrer uma adaptação ou resistência do fungo aos metabólitos; 4) os metabólitos podem ser degradados por enzimas dos fungos (6); 5) os metabólitos podem degradar e/ou volatilizar, perdendo suas características antagônicas; e 6) os metabólitos produzidos podem ser constituídos por substâncias químicas diferentes, sendo que cada uma apresenta características distintas

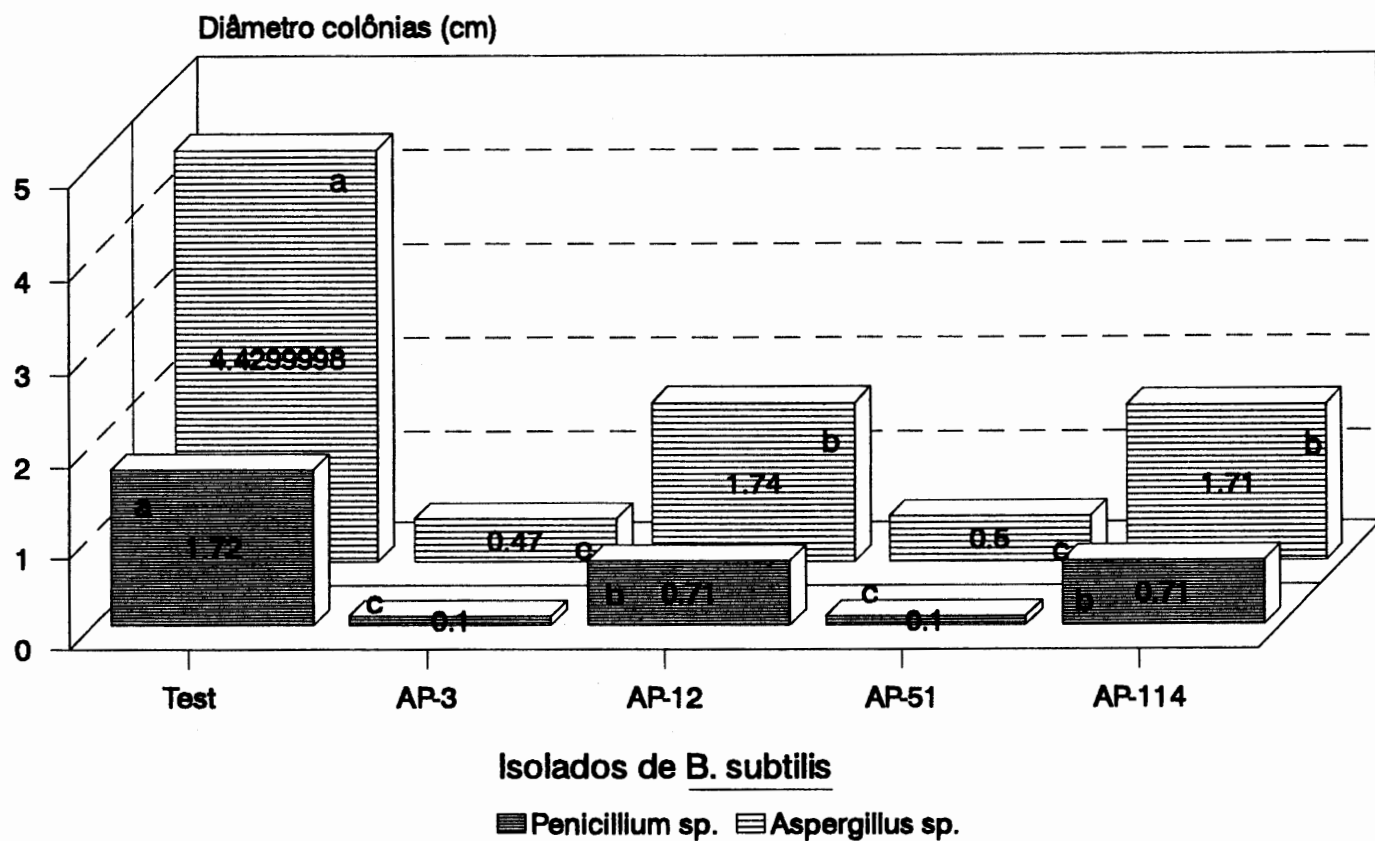
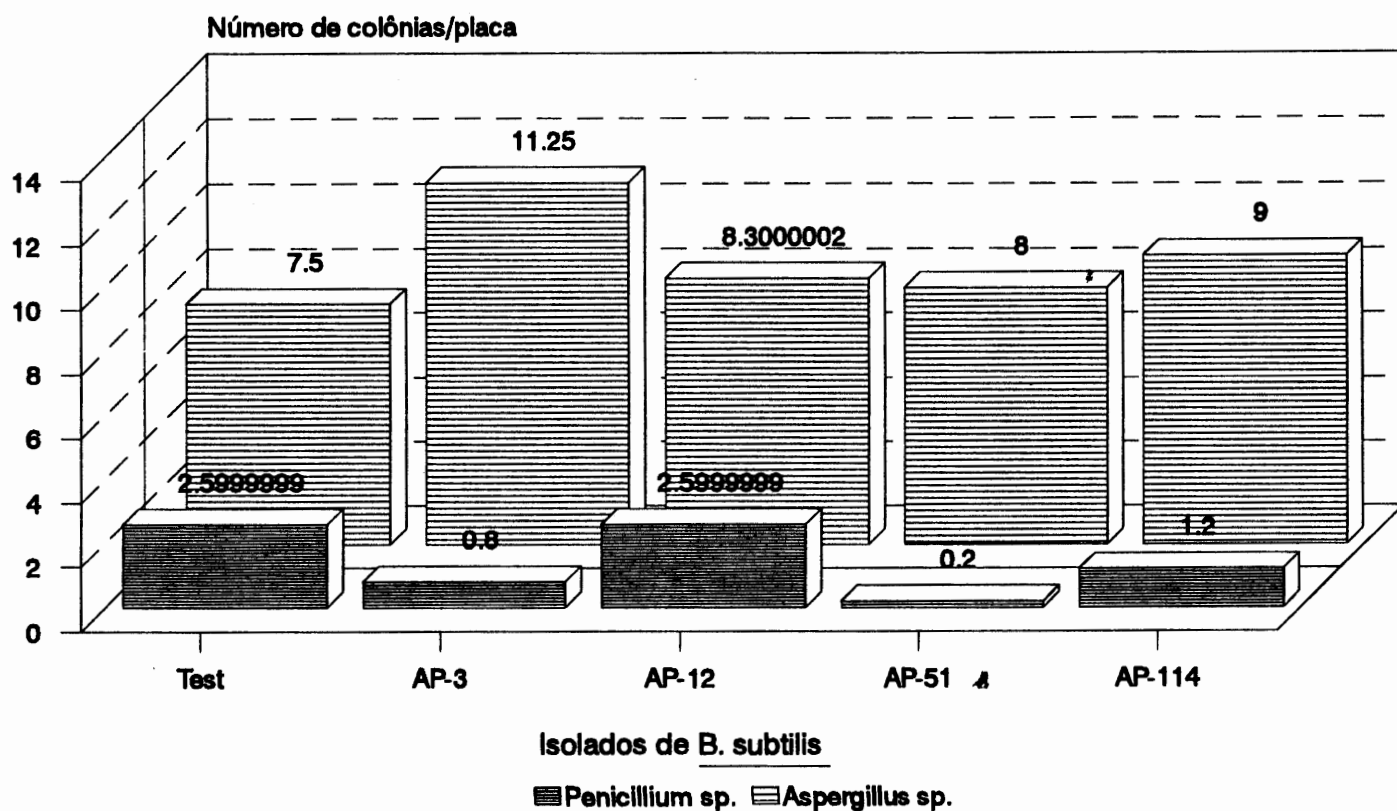


Fig 1. Efeito dos metabólitos de 4 isolados de *Bacillus subtilis* no diâmetro das colônias de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. incubadas a 25°C durante 5 d.



Medias não diferiram entre si (Tukey 5%)

Fig 2. Efeito dos metabólitos de 4 isolados de *Bacillus subtilis* no número de colônias de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. incubadas a 25°C durante 5 d.

Tabela 1. Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de *Bacillus subtilis* isolados Ap-03, Ap-12, Ap-51 e Ap-114.

Fungos	Presença metabólitos	Isolados							
		Ap-03		Ap-12		Ap-51		Ap-114	
		Dias após incubação	Diâmetro colônias (cm)	Dias após incubação	Diâmetro colônias (cm)	Dias após incubação	Diâmetro colônias (cm)	Dias após incubação	Diâmetro colônias (cm)
			(1)						
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	-	11	8,3	07	8,3	15	8,3	07	8,3
	+	42	0,0	30	0,3	30	0,0	30	0,1
<i>Alternaria tenuis</i>	-	15	8,3	11	8,3	15	8,3	11	8,3
	+	42	2,4	30	2,4	30	1,1	30	3,0
<i>Septoria nodorum</i>	-	18	8,2	14	8,3	25	8,3	14	8,3
	+	42	0,7	30	0,4	30	0,4	30	1,3
<i>Fusarium graminearum</i>	-	11	8,3	07	8,3	07	8,3	07	8,3
	+	42	4,8	30	8,2	30	2,8	30	6,2
<i>Pyricularia oryzae</i>	-	16	8,3	11	8,3	16	8,3	11	8,3
	+	42	0,0	30	0,0	30	0,0	30	0,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	03	8,3	03	8,3	03	8,3	03	8,3
	+	42	0,0	30	0,0	30	0,0	30	0,0
<i>Sclerotium rolfsii</i>	-	04	8,3	04	8,3	04	8,3	04	8,3
	+	42	0,0	30	1,8	30	0,0	30	1,3
<i>Macrophomina phaseolina</i>	-	13	8,3	07	8,3	14	8,3	07	8,3
	+	42	0,8	30	5,4	30	0,1	30	3,6
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	04	8,3	-	-	04	8,3	-	-
	+	42	0,0	-	-	30	0,0	-	-
<i>Fusarium solani</i>	-	11	8,3	-	-	10	8,3	07	8,3
	+	42	4,1	-	-	30	3,4	30	0,0
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	-	21	8,3	-	-	30	8,1	-	-
	+	42	0,4	-	-	30	0,0	-	-

(1) média de 5 repetições

- não foram feitas as avaliações

Tabela 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos diferentes fungos associados a sementes de trigo e feijão na presença de metabólitos de 4 isolados de *Bacillus subtilis*.

Fungos	Isolados de <i>Bacillus subtilis</i>			
	AP-03	AP-12	AP-51	AP-114
<i>Rhizoctonia solani</i>	100,00 ⁽¹⁾	100,00	100,00	100,00
<i>Sclerotium rolfsii</i>	100,00	91,56	100,00	96,07
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100,00	-	100,00	-
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Pyricularia oryzae</i>	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Alternaria tenuis</i>	83,13	84,34	87,95	85,54
<i>Septoria nodorum</i>	93,97	95,18	93,38	91,57
<i>Fusarium graminearum</i>	89,15	57,83	93,97	85,54
<i>Fusarium solani</i>	89,15	-	92,68	100,00
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	95,18	-	100,00	-
<i>Macrophomina phaseolina</i>	99,04	94,94	98,19	89,76

(1) média de 5 repetições

- não foi feita avaliação

Tabela 3. Número de colônias e de conídios de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em meios contendo diferentes concentrações de caldo onde *Bacillus subtilis*, AP-51, foi multiplicado.

Concentração do caldo	Número de colônias		Número de conídios x 10 ⁶	
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
100%	216,25 ⁽¹⁾ a ⁽²⁾	915,50 ⁽¹⁾ a	11,57 ⁽¹⁾ a ⁽²⁾	1,84 ⁽¹⁾ a
75%	210,00a	996,50a	40,50ab	3,50a
50%	242,50a	940,50a	39,67ab	4,72ab
25%	242,50a	1070,50a	48,87ab	7,58bc
10%	237,00a	937,25a	38,02ab	10,13cd
5%	248,50a	1117,50a	85,00b	12,05d
0%	224,25a	1045,75a	52,62ab	15,31d

(1) média de 5 repetições. Dados obtidos 8 dias após repicagem

(2) médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si (Tukey 5%)

quanto à termoestabilidade, degradação, volatilização entre outros. Como cada fungo pode apresentar sensibilidade a diferentes compostos químicos produzidos pelas bactérias, pode-se atribuir a algumas destas hipóteses a inibição em diferentes graus observadas.

F. graminearum foi o menos sensível aos metabólitos, iniciando o crescimento logo nos primeiros dias de incubação para todos os isolados de *B. subtilis*. Estes resultados sugerem que, embora em testes de cultura pareada ocorra a formação de halo de inibição (dados não publicados), os metabólitos autoclavados não são efetivos, ou o fungo é influenciado, positivamente, por nutrientes celulares. Este efeito foi observado por Grant *et al.* (7), quando relataram que alguns fungos, entre eles espécies do gênero *Fusarium*, podiam utilizar componentes celulares de bactérias mortas pelo calor como fonte suplementar de C, N e P entre outros compostos, e que este processo, denominado citólise, no caso de *F. oxysporum*, se restringe ao ataque somente de células mortas pelo calor.

As modificações ocorridas na coloração das colônias de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., podem ser atribuídas ao menor número de conídios presentes nas colônias quando colocadas na presença dos metabólitos, mostrando seu efeito sobre a esporulação dos fungos, principalmente nas concentrações mais elevadas (Tabela 3).

Fatores com a alteração do pH ou exaustão dos nutrientes do meio de cultura que poderiam retardar o desenvolvimento dos fungos, foram descartados quando observou-se que os valores de pH, antes e após o crescimento da bactéria, e antes ou após a autoclavagem, não foram alterados em mais de 0,1 unidade. Quanto à exaustão dos nutrientes do meio, ensaios de diluição (dados não publicados) sugeriu que a inibição não foi devida a fatores nutricionais, como já havia sido observado por Bettiol e Kimati (4) em trabalhos com *P. oryzae*.

Os resultados obtidos mostram a possibilidade da utilização de *B. subtilis* em tratamento de sementes visando o controle de patógenos à elas associados ou presentes no solo.

LITERATURA CITADA

- Baker, C.J., Stavely, J.R., Thomas, C.A., Saser, M., and MacFall, J.S. 1993. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, 73:1148-1152.
- Baker C.J., Stavely, J.R. and Mock, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Disease* 69: 770-772.
- Bettiol, W. e Kimati, H. 1989. Seleção de microrganismos antagonísticos a *Pyricularia oryzae* para o controle da Brusone do arroz. *Summa Phytopathologica*, 15:257-266.
- Bettiol, W. e Kimati, H. 1990. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 25:1165-1174.
- Gaind, S. and Gauer, A.C. 1991. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mungbean. *Plant and Soil*, 133: 141-149.
- Grant, W.D., Rhodes, L.L., Prosser, B.A. and Asher, R.A. 1986. Production of bacteriolytic enzymes and degradation of bacteria by filamentous fungi. *Journal of General Microbiology*, 132:2353-2358.
- Grant, W.D., Prosser, B.A., and Wakefield, J. 1991. Cytolysis of *Bacillus subtilis* by *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Microbiology*, 137: 287-291.
- Jindal, K.K. and Thind, B.S. 1990. Microflora of cowpea seeds and its significance in the biological control of seedborne infection of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. *Seed Science and Technology* 18: 393-403.
- Lazzaretti, E. 1993. Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis*. Tesis Mag.Sc. Piracicaba-SP, Brasil, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz/USP". 112 p.
- Li, D.M. and Alexandrer, M. 1988. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant and Soil* 108: 211-210.
- Luz, W.C. 1993. Controle microbiológico do mal do pé do trigo pelo tratamento de sementes. *Fitopatologia Brasileira*, 18(1): 82- 85.
- Rossall, S. and Mcknight, S.E. 1991. Some effects of *Bacillus subtilis* (MBI 600) on the development of cotton and peanut. *Bulletin-SROP*, 14(8): 88-92, 1991. APUD Review of Plant Pathology, 71:880, 1992.
- Singh, V. and Deverall, B.J. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of the British Mycological Society*, 83: 487-490.
- Stavely, J.R., Thomas, C.A., Baker, C.J. and Macfall, J.S. 1981. Greenhouse control of bean rust with *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 71(7).
- Turner, J.T. and Backman, P.A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 75: 347-353.
- Venkatasubbaiah, P. 1985. Efficacy of *Bacillus subtilis* as a biocontrol for rot of coffee pathogen. *Geobios* 12(3/4): 101-104.