

CONTROLE DA FERRUGEM DO FEJJOEIRO COM EXTRATOS E CÉLULAS FORMULADAS DE *Bacillus subtilis*

W. BETTIOL^{*}; M.S.B. BRANDÃO & M.L. SAITO

CNPDA/EMBRAPA, Caixa Postal 69, 13820 - Jaguariúna, SP, Brasil.

^{*}Bolsista do CNPq.

Projeto financiado pela FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Aceito para publicação em 15/02/1992.

RESUMO

Metabólitos de *Bacillus subtilis* (isolado AP-3), produzidos em diferentes condições de meio de cultura e tempo de fermentação foram obtidos através de precipitação, com sulfato de amônio ou acidificação até pH 2,0. Também duas formulações pó molhável contendo células de *B. subtilis* foram obtidas, sendo a AM-62 através da coprecipitação em acetona e lactose e a AM-66 utilizando diatomita como carregador. Na concentração de 1000 ppm, tanto os extratos como as formulações, inibiram totalmente a germinação dos uredíniosporos de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. Os extratos quando pulverizados, na concentração de 10.000 ppm, em folhas primárias de feijoeiro da variedade carioca, 24 horas antes da inoculação dos uredíniosporos de *U. appendiculatus* var. *appendiculatus* (1,6 x 10⁶/ml), apresentaram controle da ferrugem superior a 99%, quando avaliado através do número de pústulas por folha. Por outro lado, as formulações na concentração de 10.000 ppm controlaram a ferrugem em 74% (AM-66) e 33% (AM-62).

Estudos para avaliar a melhor concentração dos extratos, obtidos através de precipitação com sulfato de amônio, no controle da ferrugem, verificou-se controle de: 49% com 100 ppm; 84% com 1000 ppm e 99,5% com 10.000 ppm.

Palavras-chave: Controle biológico, *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*, antibióticos.

ABSTRACT

CONTROL OF BEAN RUST WITH EXTRACTS AND WETTABLE POWDER OF *Bacillus subtilis*

Metabolites from *Bacillus subtilis* (isolate AP-3) were produced under different conditions of culture and time of fermentation. The extracts were obtained by the precipitation of metabolites with ammonium sulphate or by acidification at pH 2.0. Two formulations of a wettable powder of *B. subtilis* cells were also obtained. The AM-62 formulation was obtained by co-precipitation in acetone and lactose. The AM-66 formulation was obtained using diatomite as the carrier. At a concentration of 1000 ppm both the extracts and the powdered formulations totally inhibited the germination of urediniospores of *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. The extracts when pulverized at a concentration of 10000 ppm into the "carioca" variety of primary bean leaves, 24 hours before the inoculation of urediniospores of *U. appendiculatus* var. *appendiculatus* (1,6 x 10⁶/ml), were shown to control rust by more than 99%. Percentage of rust was evaluated by counting the number of pustules formed per leaf. On the other hand, the powdered formulations at a concentration of 10000 ppm were shown to control by 74% (AM 66) and 33% (AM 62).

Evaluation of different concentrations of the extracts, obtained by precipitation with NH_4SO_4 , for rust control indicated 49%, 84% and 95,5% control at extract concentration of 100 ppm, 1000 ppm and 10.000 ppm, respectively.

Key words: Biological control, bean rust, *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*, antibiotics.

INTRODUÇÃO

A ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*) é de ocorrência generalizada nas regiões produtoras (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; ZAMBOLIM, et al., 1982) podendo causar consideráveis perdas na produção (NASSER et al., 1977). Nos períodos de pré florescimento e de florescimento, as perdas atingem em média, 45% (ZAMBOLIM et al., 1982), mas podem chegar a 100% (NASSER, 1976).

Rotação de culturas, eliminação de restos culturais, redução da densidade de semeadura, pulverização com fungicidas protetores e ou sistêmicos são medidas recomendadas para o controle da ferrugem do feijoeiro (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978; VARGAS, 1980; ZAMBOLIM et al., 1982; VIEIRA, 1983).

Como a aplicação prática dessas medidas de controle geralmente apresenta algum tipo de problema, alternativas através do controle biológico têm sido desenvolvidas. De acordo com BETTIOL (1991), as chances de sucesso são aumentadas para doenças que ocorrem em períodos definidos, como é o caso da ferrugem do feijoeiro.

Diversos autores têm demonstrado a capacidade de *Bacillus subtilis* controlar a ferrugem do feijoeiro (STAVELY, et al., 1981; BAKER et al., 1983/1985; CENTURION, 1991; MIZUBUTI, 1992). Esses autores utilizaram células da bactéria ou culturas livres de células, sem desenvolver formulações dessas células ou extrair os metabólitos produzidos por *B. subtilis* que é reconhecidamente produtor de antibióticos (KATZ & DEMAINE, 1974).

Assim, o presente trabalho tem por ob-

jetivos avaliar o efeito de células de *B. subtilis* na formulação pó molhável e dos extratos obtidos através de precipitação de meio líquido fermentado com a bactéria no controle da ferrugem do feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção de metabólitos produzidos por *B. subtilis*

Para eliminar as células, os caldos onde *B. subtilis* foi multiplicado foram previamente centrifugados em centrífuga tipo "Sharpless" a 23.000 rpm e vazão em torno de 55 ml por minuto. Nessa operação perdeu-se, aproximadamente, 8% do volume inicial. A precipitação foi realizada adicionando-se ao caldo, 40% de sulfato de amônio (A), aos poucos e sob agitação, até que se dissolvesse totalmente. Para facilitar a separação dos precipitados e dos filtrados por funil de vidro sinterizado, o caldo com o precipitado foi deixado em decantação. Outra técnica utilizada para precipitação foi a diminuição do pH com adição de HCl (D) até pH 2,0.

Os precipitados foram codificados utilizando-se as iniciais do meio de cultura (três primeiras letras), tipo de extração (quarta letra), tempo de fermentação (número entre parênteses) e sequência em que foram obtidos. Nesse trabalho foram testados os extratos: BDAA(11)6 [meio batata dextrose, precipitação A (com sulfato de amônio) e 11 dias de fermentação]; BDAA(14)9; BDAA(12)7; BDAA(4); BDAD(14)9 [D precipitação com HCl]; BDAD(4); BDAA(7); GPLA(5)8 [meio glucose 1%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,3%, KH_2PO_4 0,1% $MgSO_4$ 0,05%; com 5 dias de fermentação]; GPLD(5)8.

2. Obtenção de pó molhável de células de *B. subtilis* através de coprecipitação com acetona e lactose

Células de *B. subtilis* foram obtidas por fermentação em caldo batata-dextrose, sob agitação constante, escuro e temperatura entre 25°C a 28°C, por 5 dias. As células foram separadas em centrífuga de fluxo contínuo modelo "Sharpless" a 18.000 rpm com vazão de 58 ml/minuto. As células obtidas foram ressuspensas em uma solução aquosa contendo 5% de lactose e coprecipitadas com acetona. A coprecipitação ocorreu ao longo de 30 minutos de agitação. Decorrido esse tempo, deixou-se a suspensão em repouso por 10 minutos seguindo sua filtração por sucção. O precipitado foi seco durante 12 horas em estufa com circulação de ar a 50°C. Essa formulação recebeu o código AM-62.

3. Obtenção de pó molhável de *B. subtilis* utilizando diatomita como carregador

Foram misturados 450 g de diatomita e 450 ml de caldo de *B. subtilis* no quinto dia de fermentação e 1,5 l de solução aquosa de lignossulfonato desaçucarado de sódio (vixilex SD-0,96 g/100 ml). Foram transferidos 1,5 l de solução aquosa de copolímeros oxialquilados e sulfossuccinatos absorvidos em inerte (surfax 345 0,6 g/100 ml) para o interior de moinho coloidal e vertida a suspensão contendo umectante + argila + bactéria, deixando-se moer por 20 minutos. Posteriormente, a suspensão foi passada através de peneira de 200 malhas e submetida ao processo de secagem em "spray dryer". Essa formulação recebeu o código de AM-66.

4. Efeito de extratos e de células formuladas de *B. subtilis* na germinação de uredíniosporos de *U. appendiculatus* var. *appendiculatus*

Foram avaliados os extratos BDAA(4), BDAA(7), BDAD(4), BDAA(11) e BDAA(8) na concentração de 1000 ppm e as formulações pó molhável de código AM-62

(1000 ppm) e AM-66 (10.000 ppm) quanto a capacidade de inibir a germinação de uredíniosporos de *U. appendiculatus* var. *appendiculatus* coletados um dia antes.

Gotas contendo as concentrações indicadas dos extratos ou das formulações foram colocadas sobre lâminas de vidro, sendo a seguir adicionados os uredíniosporos. Após 10 horas de incubação em câmara úmida e escura, com temperatura de, aproximadamente, 16°C foi determinada a germinação dos uredíniosporos.

5. Efeito de diferentes concentrações do extrato GPLA(5)8 de *B. subtilis* no controle da ferrugem do feijoeiro

Em vasos de alumínio com capacidade de 2 litros, contendo solo obtido sob mata, foram semeadas 10 sementes de feijão carioca 80. Três dias após a emergência, procedeu-se o desbaste, deixando entre 2-4 plantas por vaso. Plantas com 9 dias de idade, contados a partir da emergência, foram utilizadas no experimento. O extrato GPLA(5)8 foi obtido da fermentação de *B. subtilis* em meio GPL, por 5 dias sob agitação constante e temperatura entre 25°C-27°C. A precipitação dos metabólitos foi feita com sulfato de amônio.

Foram testadas as concentrações de 0, 1, 10, 100, 1000 e 10.000 ppm do extrato GPLA(5)8 no controle da ferrugem. Para tanto, as soluções obtidas foram pulverizadas, com auxílio de pistola de pintura "Steulla" acoplada a um compressor (10 lb/pol²), na superfície adaxial das folhas primárias de feijoeiro, 24 horas antes da inoculação do patógeno. A inoculação foi realizada através da pulverização de uma suspensão de $1,3 \times 10^5$ uredíniosporos por ml, em solução de Tween 20 a 0,01%, com auxílio de pistola de pintura "Steulla" acoplada a um compressor a 10 lb/pol², na superfície adaxial. O atomizador foi mantido a, aproximadamente, 20 cm da folha por, aproximadamente, 4 segundos.

Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida e escura a 21°C por

24 horas, quando foram transferidas para as condições ambientes. A determinação do número de pústulas por folha foi feita 10 dias após a inoculação. Cada tratamento foi repetido 4 vezes (vaso) contendo entre 2-4 plantas com duas folhas primárias cada.

6. Efeito de extratos e de células formuladas de *B. subtilis* no controle da ferrugem do feijoeiro

Utilizando-se metodologia semelhante à descrita no item 5 foram realizados dois ensaios. No primeiro foram testados os seguintes extratos e formulações pó molhável de *B. subtilis* na concentração de 10.000 ppm: GPLA(5)8, GPLD(5)8, BDAA(11)6, AM-66 e AM-62 em comparação com a testemunha (água) no controle da ferrugem do feijoeiro. A inoculação foi com suspensão de $1,7 \times 10^5$ uredíniosporos/ml em 5 repetições.

No segundo ensaio foram testados na concentração de 10.000 ppm os extratos BDAA(14)9, BDAD(14)9, BDAA(12)7, BDAA(4) e BDAD(4) em comparação com a testemunha (água). A inoculação com suspensão de $1,2 \times 10^5$ uredíniosporos/ml, com 5 repetições.

RESULTADOS

1. Efeito dos extratos e de células formuladas de *B. subtilis* na germinação de uredíniosporos de *U. appendiculatus* var. *appendiculatus*

Com exceção do extrato BDAA(11) que apresentou porcentagem de inibição de 99,29%, os demais extratos ([BDAA(4), BDAA(7), BDAD(4), BDAA(8)] e as formulações (AM-62 e AM-66) inibiram totalmente a germinação dos uredíniosporos de *U. appendiculatus* var. *appendiculatus*.

2. Efeito de diferentes concentrações do extrato GPLA(5)8 de *B. subtilis* no controle da ferrugem do feijoeiro

O controle da ferrugem do feijoeiro foi

diretamente proporcional à concentração de extrato pulverizado nas folhas (Quadro 1). Na concentração de 10.000 ppm o controle foi, praticamente, total e não apresentou problemas aparentes de fitotoxicidade. Observa-se ainda que as concentrações de 1 e 10 ppm não diferem no número de pústulas por folha da testemunha e que as concentrações de 100, 1000 e 10.000 ppm diferem dos demais tratamentos e também entre si (Quadro 1).

Quadro 1. Número de pústulas de ferrugem em folhas primárias de feijoeiro tratadas com diferentes concentrações do extrato GPLA(5)8¹ de *Bacillus subtilis*.

Concentração do extrato GPLA(5)8(ppm)	Número de pústulas/folha	% de controle
0	225,76 a	-
1	230,07 a	- 1,91
10	225,14 a	0,27
100	115,50 b	48,84
1.000	35,87 c	84,11
10.000	1,23 d	99,46

¹ GLPA(5)8 - Extrato obtido de caldo fermentado de *B. subtilis* em meio de glucose 1%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,3%, KH₂PO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,05% por 5 dias e precipitação com sulfato de amônio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$.

3. Efeito de extratos e de células formuladas de *B. subtilis* no controle da ferrugem do feijoeiro

Os extratos GPLA(5)8, GPLD(5)8 e BDAA(11)6 na concentração de 10.000 ppm controlaram totalmente a ferrugem do feijoeiro quando pulverizados em suas folhas 24 horas antes da inoculação do patógeno

(Quadro 2). Por outro lado, a formulação pó molhável de células de *B. subtilis* AM-66 na concentração de 10.000 ppm apresentou controle da doença de 74%, enquanto a AM-62 de apenas 33% (Quadro 2).

Quadro 2. Efeito de extratos e de células formuladas de *Bacillus subtilis* no controle da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*).

Tratamento	Número de pústulas /folha	% de controle
Extrato GPLA(5) ⁸ ¹	0,00 d	100,00
Extrato GPLD(5) ⁸ ²	0,11 d	99,87
Extrato BDAA(11) ⁶ ³	0,02 d	99,97
Formulação AM-66 ⁴	20,85 c	74,01
Formulação AM-62 ⁴	53,61 b	33,17
Testemunha	80,22 a	-

¹ GPLA(5)⁸ - Extrato obtido de caldo fermentado de *B. subtilis* em meio glucose 1%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,3%, KH₂PO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,05% por 5 dias e precipitação com sulfato de amônio.

² GPLD(5)⁸ - Extração através de acidificação com HCl.

³ BDAA(11)⁶ Extrato obtido de caldo fermentado de *B. subtilis* em meio batata-dextrose por 11 dias e precipitação com sulfato de amônio.

⁴ Formulação AM-62 e AM-66 são células de *B. subtilis* na formulação pó molhável. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100 + 0,5}$. Todos os extratos foram testados na concentração de 10.000 ppm.

Em outro ensaio, os extratos BDAA(14)⁹, BDAD(14)⁹, BDAA(12)⁷ e BDAA(4)⁴ controlaram a ferrugem em torno de 99% (Quadro 3). O extrato BDAD(4)⁴ apresentou controle em torno de 91%, diferindo estatisticamente dos demais extratos (Quadro 3).

Quadro 3. Efeito de extratos de *Bacillus subtilis* no controle da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*).

Tratamento	Número de pústulas /folha	% de controle
Extrato BDAA(14) ⁹ ¹	2,28 c	99,63
Extrato BDAD(14) ⁹ ²	13,55 c	97,84
Extrato BDAA(12) ⁷ ³	0,75 c	99,88
Extrato BDAA(4) ⁴	3,19 c	99,49
Extrato BDAD(4) ⁴	53,18 b	91,54
Testemunha	628,94 a	-

¹ BDAA(14)⁹ extrato obtido de caldo fermentado de *B. subtilis* em meio batata-dextrose por 14 dias e precipitação através de sulfato de amônio.

² BDAD(14)⁹ precipitação através de acidificação com HCl.

³ BDAA(12)⁷ fermentação por 12 dias.

⁴ BDAA(4)⁴ e BDAD(4)⁴ fermentação por 4 dias. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100 + 0,5}$. Todos os extratos foram testados na concentração de 10.000 ppm.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A reconhecida capacidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* em inibir diversos fitopatógenos (McKEEN et al., 1986; PUSEY, 1989) foi comprovada nesse trabalho. A pulverização de extratos obtidos pela precipitação dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* fermentado em caldo GPL e BDA reduziu acentuadamente o número de pústulas de ferrugem por folha de feijoeiro (Quadros 1, 2 e 3) demonstrando a capacidade desses antibióticos controlarem a doença. Um dos possíveis modos de ação dos antibióticos é a inibição da germinação dos uredíniosporos, haja visto que em testes para

verificar o efeito dos extratos na sua germinação a inibição foi total.

As características de estabilidade na forma seca e termoequilíbrio dos metabólitos de *B. subtilis*, observadas por LANDY et al. (1948), DUNLEAVY (1955), SWINBURNE et al. (1975), BAKER et al. (1985) permitem sua industrialização.

Um dos aspectos apresentados por BETTIOL (1991) é a necessidade de estimular estudos com formulações de agentes de controle biológico para facilitar sua aplicação, colaborar para o estabelecimento do organismo, minimizar os problemas relacionados com umidade e radiação ultra violeta e permitir aumento no período de armazenamento do produto. Uma das características de *B. subtilis* é a produção de endosporos altamente resistentes em condições adversas (NORRIS et al., 1981), assim foram obtidas formulações pó molhável de células de *B. subtilis* e verificou-se que mesmo tendo um efeito inferior aos extratos da bactéria, a formulação obtida utilizando diatomita como carregador (AM-66) na concentração de 10.000 ppm apresentou controle de 74% da ferrugem do feijoeiro (Quadro 2). A formulação AM-62 obtida através da coprecipitação com acetona e lactose possivelmente tenha apresentado menor controle (33%) devido às características do produto, talvez mais sensível à luz ultra violeta.

Tendo sido demonstrada a eficiência dos extratos e das células formuladas de *B. subtilis* no controle da ferrugem do feijoeiro em folhas primárias (Quadro 1, 2, e 3), faz-se necessário estabelecer qual a frequência e a dosagem de aplicação em condições de campo e comparação com os fungicidas disponíveis no mercado.

LITERATURA CITADA

1. BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, St. Paul, 73:1148-1152, 1983.
2. BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Diseases*, St. Paul, 69:770-772, 1985.
3. BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do fio-plano. In: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1991. p.33-52.
4. CENTURION, M.A.P.C. Controle biológico da ferrugem (*Uromyces phaseoli*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1991. p.365-382.
5. MCKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fruticola*. *Phytopathology*, St. Paul, 76:136-139, 1986.
6. MIZUBUTI, E.S.G. Controle da ferrugem do feijoeiro com *Bacillus subtilis*. Viçosa, UFV, 1992. 87p. (Tese Mestrado).
7. NASSER, L.C.B. Efeito da ferrugem em diferentes estágios de desenvolvimento do feijoeiro e dispersão dos esporos de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. Viçosa, UFV, 1976. 79p. (Tese Mestrado).
8. NASSER, L.C.B.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L. Avaliação dos prejuízos causados por *Uromyces phaseoli typica* Arth. em diferentes estágios de desenvolvimento de duas variedades de feijão em função do número de aplicações de oxicarboxin. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 2:92, 1977.
9. NORRIS, J.R.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A.; O'DONELL, A.G. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STAN, M.P. coord. *The prokaryotes*. Berlin, Springer, Verlag, 1981. p.1711-1742.
10. PUSEY, P.L. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pesticide Science*, London, 27:133-140, 1989.
11. STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; BAKER,

- C.J.; MACFALL, J.C. Greenhouse control of bean rust (*Uromyces phaseoli*) with *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, St. Paul, 71:771, 1981.
12. VARGAS, L. La roya. In: SCHWARTZ, W.F. & GALVEZ, C.E. *Problemas de production del frijol*. Cali: CIAT, 1980. p.17-36.
13. VIEIRA, C. *Doenças do feijoeiro*. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1983. 231p.
14. ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Doenças do feijoeiro e seu controle. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 4:50-63, 1978.
15. ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M.; MARTINS, M.C.P. Aspectos das principais doenças do feijão no Estado de Minas Gerais. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 8:20-29, 1982.
16. ZAUMEYER, W.J. & THOMAS, H.R.A. Monographic study of bean diseases and methods for their control. Washington, USDA, 1957. 254p. (Technical Bulletin, 368).