

Avaliação *in Vitro* de Produtos Fitossanitários Alternativos sobre Esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

In Vitro Evaluation of Alternative Phytosanitary Products on Spores of Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*

MARTINELO, Leonardo. Unioeste, *Campus* de Cascavel, leonardomartine@gmail.com; SILVA, Everton Ricardi Lozano da. UEL, evertonloz@gmail.com; ALVES, Luis Francisco. Unioeste, *Campus* Cascavel, lfaalves@unioeste.br; FORMENTINI, Marina. Unioeste, *Campus* Cascavel, marinaformentini@gmail.com; THOMAZONI, Dhyego. Unioeste, *Campus* Cascavel, dhyego@yahoo.com.br; MARCHESE, Luiz Paulo. Unioeste, *Campus* Cascavel, lupacama@gmail.com; POTRICH, Michele. UTFPR, *Campus* Dois Vizinhos, michelepotrich@utfpr.edu.br

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito de produtos fitossanitários alternativos (PFA) sobre a germinação dos esporos Btk. Foram utilizados os produtos nas concentrações recomendadas (CR), metade ($\frac{1}{2}$ CR) e dobro desta (2CR). Estes foram misturados com água destilada esterilizada e ao caldo nutriente (CN) e inoculadas com Btk. As avaliações foram feitas quantificando-se as UFC entre 14 e 18 horas após inoculação. O produto Mattan Plus® foi o único que não afetou a germinação dos esporos, tanto na $\frac{1}{2}$ CR como na CR, quando misturado à água destilada, e nas três concentrações quando misturado com CN. O Stubble-Aid® quando misturado com água, e o Agro-Mos® quando misturado com caldo nutriente, provocaram a redução da germinação proporcional ao aumento da concentração.

Palavras-chave: Bactérias entomopatogênicas, controle alternativo, manejo integrado de pragas.

Abstract

The objective was to evaluate the effect of alternative phytosanitary products (APP) on the germination of spores Btk. Products were used in recommended concentration (RC), half ($\frac{1}{2}$ RC) and double this (2RC). These were mixed with sterile distilled water and nutrient broth (NB) and inoculated with Btk. The evaluations were quantified at the CFU between 14 and 18 hours after inoculation. The Mattan Plus® was the only one that did not affect the germination of spores in both the RC and $\frac{1}{2}$ RC, when mixed with distilled water and in all concentrations when mixed with NB. The Stubble-Aid® when mixed with water, and the Agro-Mos® when mixed with NB, caused the reduction of germination with concentration increase.

Keywords: Entomopathogenic bacteria, alternative control, integrated pest management.

Introdução

Os entomopatógenos ocorrem naturalmente no ambiente e são importantes fatores na regulação de populações de insetos-praga (LACEY et al, 2001), podendo ser aplicados na forma de bioinseticidas formulados, como *Bacillus thuringiensis* (Bt). Tais organismos podem ser utilizados isolados ou concomitantemente a diversas táticas de controle de pragas, como exemplo os produtos fitossanitários (PF) e produtos fitossanitários alternativos (PFA). Entretanto, a ação dos entomopatógenos pode ser estimulada, reprimida ou permanecer inalterada após contato com PF (SOZA-GÓMEZ e MOSCARDI, 2003).

Estudos realizados por Silva et al. (2008), mostram que vários fatores podem agir na interação Bt + PF, como grupo químico, o meio de cultura utilizado, concentração, tempo de contato e estágio de desenvolvimento do patógeno. Com relação aos PFA, Krischik et al. (1988) verificaram que nicotina e rutina tiveram efeito sobre Bt. Assim, estudos sobre o efeito de PFA sobre Bt são

necessários, uma vez que estas informações são escassas e desatualizadas e em sua maioria realizados com PF sintéticos. Diante do exposto, objetivou-se avaliar, *in vitro*, o efeito de PFA sobre esporos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Metodologia

A bactéria utilizada foi *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) obtida do produto comercial Dipel PM® e os produtos testados foram o Bovemax, Mattan Plus®, Pironim® e Dalneem® (inseticidas); Calda Bordalesa e Biogermex® (fungicidas/bactericidas); Agro-Mos® (indutor de resistência); Ecolife® (revigorante) e Stubble-Aid® (biofertilizante), nas concentrações recomendada (CR), metade (½CR) e dobro desta (2CR). Foram preparadas suspensões de Btk com $3,75 \times 10^4$ esporos/mL (1) e $2,5 \times 10^4$ esporos/mL (2). Destas, alíquotas de 300µL foram pipetadas e adicionadas em frascos erlenmeyer contendo 50mL de água destilada esterilizada (1) ou caldo nutriente (CN) (2) + os PFA nas concentrações estabelecidas. Para cada concentração testada foram 5 frascos. Para a testemunha inoculou-se nos meios (1) e (2), sem os PFA.

Após incubação em agitador horizontal em $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm por 2h e medida do pH pré e pós-incubação, de cada frasco foram inoculadas em 3 placas de Petri, 5 pontos de 5µL na superfície do meio de cultura ágar nutriente (AN). As placas foram incubadas em $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 14h à 18h e depois se quantificaram as unidades formadoras de colônia (UFC) por ponto. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tukey).

Resultados e discussões

PFA misturados com água destilada esterilizada (1)

Stubble-Aid® reduziu a germinação proporcionalmente ao aumento da concentração, ao passo que e Mattan Plus® apresentou redução significativa apenas no 2CR. Os demais reduziram a germinação que variou entre 12,8 e 100% em relação à testemunha (Tabela 1).

PFA misturados com caldo nutriente (2)

Mattan Plus® não apresentou efeito negativo sobre os esporos de Btk, independente da concentração testada. Por outro lado, para Agro-Mos®, a redução da germinação foi proporcional ao aumento da concentração, ao passo que para os demais produtos verificou-se redução significativa na germinação, com variação de 29,6 a 100% (Tabela 1).

Biogermex® e Ecolife® apresentaram pH ácido e neutro quando misturados com água, e CN, respectivamente, e em ambos os casos a germinação foi afetada, indicando haver, nesse caso, outro fator atuando. Tais produtos apresentam fitoalexinas e bioflavonóides, que aumentam a resistência das plantas à propagação de patógenos (VIVANCO et al., 2005). Assim, infere-se que o efeito sobre a germinação se deve a estas substâncias. Para Dalneem®, a inibição pode ter ocorrido devido a sua constituição, à base de neem (*Azadirachta indica*), com ação inseticida e antimicrobiana (MOSSINI e KEMMELMEIER, 2005).

O efeito negativo causado pelo Pironim® parece estar relacionado à sua composição: neem, rotenona, piretro, alamanda (*Allamanda nobilis*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e extrato pirolenhoso. Além da atividade antimicrobiana exercida pelo neem, a alquilamida piperidina presente na pimenta-do-reino também tem propriedade bactericida (VENKAT et al., 2004). Para Agro-Mos® também se verificou efeito negativo em pH ácido, em ambas misturas (água e CN) (Tabela 1). Este produto é um indutor de resistência e age diretamente nas plantas, deixando-as mais tolerantes ao ataque de pragas (CONCEIÇÃO e PAPA, 2005). Devido ao seu modo de ação, não há trabalhos relacionados ao seu efeito sobre patógenos. Stubble-Aid® possui metabólitos que agem como nutrientes vegetais e têm ação acaricida, fungistática e bacteriostática (GALLO et al., 2002), o que pode explicar o efeito negativo.

Resumos do VI CBA e II CLAA

TABELA 1. Média (\pm EP) de UFC/mL de Btk a partir de esporos do produto comercial, após incubação com água+PFA e CN+PFA em diferentes concentrações e pH inicial e final.

Trat ¹	Conc. ²	Água				CN			
		UFC/mL (x10 ⁵)	UFC R.T. (%) ³	pH		UFC/mL (x10 ⁵)	UFC R.T. (%) ³	pH	
				0h	2h			0h	2h
Test	-	265,1 \pm 17,41a	-	6.46	6.61	526,1 \pm 26,38a	0.0	7.54	7.47
AM	½CR	168 \pm 7,88b	-40.8	3.72	3.72	212,1 \pm 9,99b	-59.7	4.29	4.31
AM	CR	142,4 \pm 17,58b	-49.8	3.61	3.55	115,5 \pm 13,92c	-78.1	4.13	4.07
AM	2CR	47,2 \pm 10,84c	-83.4	3.48	3.40	18,7 \pm 9,13d	-96.5	3.97	3.72
		CV(%)= 20.21				CV(%)= 19.1			
Test	-	279,1 \pm 17,12a	-	6.46	6.61	565,6 \pm 23,31a	0.0	7.54	7.47
BG	½CR	13,5 \pm 3,34b	-95.2	4.08	4.02	0,0 \pm 0,00b	-100.0	7.19	7.18
BG	CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	3.76	3.67	0,0 \pm 0,00b	-100.0	7.16	7.16
BG	2CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	3.48	3.54	0,0 \pm 0,00b	-100.0	7.02	7.20
		CV(%)= 26.7				CV(%)= 18.4			
Test	-	338,7 \pm 12,23a	-	6.46	6.61	232,5 \pm 22,62a	0.0	7.54	7.47
BM	½CR	275,5 \pm 9,42b	-18.7	5.92	6.79	152,1 \pm 9,99b	-34.6	7.3	7.27
BM	CR	295,4 \pm 11,88b	-12.8	5.97	6.72	157,9 \pm 8,62b	-32.1	7.34	7.32
BM	2CR	282,7 \pm 6,5b	-16.5	5.99	6.55	163,7 \pm 9,86b	-42.2	7.34	7.43
		CV(%)= 7.7				CV(%)= 18.83			
Test	-	241,2 \pm 18,55a	-	6.46	6.61	446,1 \pm 21,29a	0.0	7.54	7.47
CB	½CR	31,7 \pm 6,75b	-86.8	12.50	12.10	39,5 \pm 11,67b	-91.2	11.9	11.70
CB	CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	12.60	12.30	0,3 \pm 0,27b	-99.9	12.3	11.80
CB	2CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	12.60	12.40	0,0 \pm 0,00b	-100.0	12.3	12.10
		CV(%)= 32.34				CV(%)= 22.4			
Test	-	333,6 \pm 21,6a	-	6.46	6.61	562,9 \pm 18,13a	0.0	7.54	7.47
EL	½CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	3.83	3.80	0,0 \pm 0,00b	-100.0	7.24	7.06
EL	CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	3.73	3.78	0,0 \pm 0,00b	-100.0	7.11	6.94
EL	2CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	3.42	3.36	0,0 \pm 0,00b	-100.0	6.77	6.70
		CV(%)= 28.96				CV(%)= 14.1			
Test	-	235,9 \pm 12,97a	-	6.46	6.61	312,5 \pm 26,38a	0.0	7.54	7.47
MP	½CR	190,0 \pm 15,97ab	-19.4	4.78	5.68	288,4 \pm 11,6a	-7.7	7.3	7.50
MP	CR	185,9 \pm 13,1ab	-21.2	5.02	5.53	340,9 \pm 11,7a	9.1	7.29	7.22
MP	2CR	124,9 \pm 20,49b	-47.1	5.18	5.41	281,8 \pm 16,47a	-9.8	7.24	7.14
		CV(%)= 24.0				CV(%)= 28.07			
Test	-	233,0 \pm 12,76a	-	6.46	6.61	432,7 \pm 33,83a	0.0	7.54	7.47
DN	½CR	2,3 \pm 1,29b	-98.7	4.94	4.89	0,4 \pm 0,40b	-99.9	4.94	4.89
DN	CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	4.77	4.84	0,0 \pm 0,00b	-100.0	4.77	4.84
DN	2CR	0,0 \pm 0,00b	-100.0	4.66	4.78	0,0 \pm 0,00b	-100.0	4.66	4.78
		CV(%)= 23.1				CV(%)= 34.9			
Test	-	262,1 \pm 21,55a	-	6.46	6.61	339,2 \pm 15,93a	0.0	7.54	7.47
PN	½CR	185,1 \pm 7,56b	-29.4	3.66	3.58	176,5 \pm 14,26b	-48.0	6.23	6.55
PN	CR	199,2 \pm 13,69b	-24.0	3.49	3.46	171,7 \pm 16,2b	-49.4	5.34	5.35
PN	2CR	185,1 \pm 7,56b	-29.4	3.31	3.30	147,5 \pm 6,95b	-56.5	4.83	4.76
		CV(%)= 14.89				CV(%)= 24.2			
Test	-	282,4 \pm 7,49a	-	6.46	6.61	471,3 \pm 8,67a	0.0	7.54	7.47
SA	½CR	223,9 \pm 8,95b	-20.7	3.56	3.61	72,8 \pm 7,60b	-84.6	4.77	4.68
SA	CR	151,2 \pm 14,29c	-46.5	3.47	3.40	43,8 \pm 2,94c	-90.7	4.22	4.34
SA	2CR	49,7 \pm 10,53d	-82.4	3.30	3.21	20,3 \pm 4,69c	-95.7	3.98	4.06
		CV(%)= 15.1				CV(%)= 9.4			

Resumos do VI CBA e II CLAA

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ¹Tratamentos: Test = Testemunha; AM = Agro-Mos[®]; BG = Biogermex[®]; BM = Bovemax; CB = Calda Bordalesa; EL = Ecolife[®]; MP = Mattan Plus[®]; DN = Dalneem[®]; PN = Pironim[®]; SA = Stubble-Aid[®]; ²Concentração do produto: $\frac{1}{2}$ CR = Metade da concentração recomendada; CR = Concentração recomendada; 2CR = Dobro da concentração recomendada. ³UFC em relação à testemunha. Fórmula: [(Média de UFC/mL do tratamento / Média de UFC/mL da testemunha \times 100) - 100], sendo os valores positivos para aumento de UFC e negativos para redução em relação à testemunha.

Para a Calda Bordalesa, o pH elevado e a presença de cal hidratada e sulfato de cobre podem ter inibido a germinação, concordando com estudos de Hassen et al. (1998). Bovemax, independente da concentração, apresentou efeito negativo sobre a germinação, em ambos os testes, que pode estar relacionado a presença de emulsificante em sua formulação. Morris (1975) verificou que dois emulsificantes afetaram a germinação.

Conclusões

No teste (1), somente Mattan Plus[®], na $\frac{1}{2}$ CR e CR, não afetou a germinação e no teste (2), todos os produtos reduziram a germinação, exceto Mattan Plus[®], em todas as concentrações. A concentração, composição e pH da calda afetaram a germinação.

Referências

CONCEIÇÃO, M.Z.; PAPA, G. Novas contribuições da indústria para o manejo de pragas do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. *Anais...* Salvador: ACOPAR/ABRAPA, 2005.

GALLO, D. et al. Métodos de Controle de Pragas. In: *Manual de Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002. cap. 10, p. 243-359.

HASSEN, A. et al. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, Essex, v. 64, n. 1, p. 7-15, 1998.

KRISCHIK, V.A.; BARBOSA, P.; REICHELDERFER, A.F. Three Trophic Level Interactions: Allelochemicals, *Manduca sexta* (L.), and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner. *Environmental Entomology*, College Park, v. 17, n. 3, p. 476-482, 1988.

LACEY, L.A. et al. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control*, Orlando, v. 21, p. 230-248, 2001.

MORRIS, O.N. Effect of some chemical insecticides on the germination and replication of commercial *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 26, n. 2, p.199-204, 1975.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica*. A. Juss.): múltiplos usos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005.

SILVA, E.R.L. et al. Técnicas para avaliação do efeito *in vitro* de herbicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.75, n. 1, p. 59-67, 2008.

SOSA-GOMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Importância das interações entre agroquímicos e entomopatógenos em programas de MIP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro. *Resumos...* São Pedro: Sociedade Entomológica do Brasil, p. 59, 2003.

VENKAT, R.S. et al. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, Jena, v. 11, n. 7-8, p. 697-700, 2004.

Resumos do VI CBA e II CLAA

VIVANCO, J.M. et al. Los mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*, Barcelona, v. 341, p. 68-75, 2005.