

UNIOESTE  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
NÍVEL MESTRADO

EVERTON RICARDI LOZANO DA SILVA

**TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE  
PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS EM *Bacillus thuringiensis* var.  
*kurstaki***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
MARÇO/2006

**EVERTON RICARDI LOZANO DA SILVA**

**TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE PRODUTOS  
FITOSSANITÁRIOS EM *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná, como parte das exigências  
do Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia - Nível Mestrado, para  
obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS  
FRANCISCO ANGELI ALVES

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

MARÇO/2006

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu a benção da vida e força durante toda minha caminhada.

Ao Prof. Doutor Luis Francisco Angeli Alves, pela amizade, orientação, paciência e dedicação e por toda participação no meu processo de formação.

À Prof<sup>a</sup> Luciane Sene, pela co-orientação, apoio e dedicação.

Aos Centros de Ciências Biológicas e da Saúde e Ciências Médicas e Farmacêuticas, pelas instalações e equipamentos disponibilizados.

À Cooperativa Agropecuária de Cascavel (Coopavel), pelo fornecimento dos produtos fitossanitários.

Aos Professores do curso de Pós-graduação em Agronomia da Unioeste, pelos ensinamentos recebidos, especialmente ao Prof. Robinson Luiz Contiero, pela colaboração.

Aos meus pais Itamar e Ivanda e aos meus irmãos Wellington e Danielly, pelo apoio, incentivo e compreensão.

À Fernanda Ledo Marciniuck, uma pessoa mais que especial que há muito tempo faz parte da minha vida, e que do seu jeitinho, sempre me apoiou e incentivou.

À amiga do curso de Pós-graduação em Agronomia, Michele Potrich por todos os momentos de estudo e trabalho compartilhados e pela convivência.

Aos companheiros do laboratório de Zoologia, Daian, Luis Paulo, Natália, Diego e Cristiane, especialmente a Juliana, Angelina e Danieli, pela amizade, companheirismo e auxílio na condução dos experimentos.

À Bióloga Andréia Bonini, pelo auxílio na condução dos experimentos e pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos diretores do Colégio Marista de Cascavel, Sérgio Ladário e Valentin Fernandes por todo apoio e incentivo.

Aos professores e companheiros da Área de Ciências do Colégio Marista de Cascavel, Sandra, Patrícia, Fabiano, Suzi, Cristina, Aloísio e Evandro, pela amizade, incentivo e consideração.

Ao Prof. Altevir Carneiro Rossi do Colégio Marista de Cascavel, pela colaboração nos cálculos matemáticos e pela amizade e companheirismo.

À Bióloga Jucelaine Has, pela amizade, incentivo e colaboração na produção do abstract.

À Fernanda Zimmermam e a Júlia Maria, do Colégio Unipan, pela amizade, apoio e incentivo.

A todas demais pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação, especialmente a Letícia de Cássia, Cleverson Rodrigues, Eliane Silva e Fabiana Pinto.

Dedico este trabalho aos meus pais Ivanda e Itamar, por toda atenção, dedicação, incentivo e compreensão, imprescindíveis para minha formação.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe, reside a ignorância”.

Hipócrates

## **TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS EM *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***

### **RESUMO**

Objetivou-se comparar técnicas para a avaliação “in vitro” do efeito de fungicidas e herbicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). Foram testados cinco fungicidas: epoxiconazole, fentin hidróxido, azoxystrobin, tebuconazole e carbendazin, e cinco herbicidas: sulfentrazone, lactofen, imazethapyr, fenoxaprop e metribuzin, em duas concentrações, sobre células e esporos, em ágar nutriente (AN) - sólido (MS) e caldo nutriente (CN) - líquido (ML), além da metabolização (MT) destes por Btk. Para células, em AN os fungicidas foram testados incorporados ao meio e em discos de papel-filtro impregnados nos produtos. Avaliou-se, respectivamente, as UFC/mL e a formação de halo de inibição. Para células, a mistura Bt+produtos+CN foi incubada em erlemmeyers ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 150rpm, 24h), e em seguida, o meio CN foi diluído e inoculado em AN, avaliando-se o número de UFC/mL. Os testes de MT e esporos foram realizados em líquido (água para MT e CN para esporos). O efeito dos produtos variou conforme a categoria destes (fungicida e herbicida), concentrações, técnica, tempo de contato e fase/estágio do desenvolvimento do patógeno. O teste ML é o mais indicado para a avaliação do efeito em células, sendo observado que a maioria dos fungicidas mostrou-se compatível às mesmas, e apenas epoxiconazole e azoxystrobin foram metabolizados. Os herbicidas, independentes das concentrações, foram incompatíveis com as células, e somente sulfentrazone e imazethapyr foram metabolizados. Fentin hidróxido foi o único produto incompatível com esporos.

Palavras-chave: bactérias entomopatogênicas, seletividade, compatibilidade,

## **TECHNIQUES FOR EVALUATION *IN VITRO* OF THE EFFECT OF PHYTOSANITARY PRODUCTS ON *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***

### **ABSTRACT**

The objective of this research was evaluation "in vitro" the effect of fungicides and herbicides on *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). The five fungicides: epoxiconazole, fentin hydroxide, azoxystrobin, tebuconazole and carbendazim, and five herbicides: sulfentrazone, lactofen, imazethapyr, fenoxaprop and metribuzin were tested at two concentrations, on cells and spores, in nutrient agar (NA) - solid medium (SM), and in nutrient broth (NB) - liquid medium (LM), in addition to their metabolization (MT) by Btk. For cells, the phytosanitary products in NA were tested incorporated into the medium and on filter paper disks impregnated with the products. The evaluation consisted, respectively, of the number of CFU/mL and of the formation of an inhibition halo. For cells, the Bt+products+NB mixture was incubated in Erlenmeyer flasks (30± 2°C, 150rpm, 24h) and then the NB was diluted and inoculated onto NA; the number of CFU/mL was evaluated. The MT and spore tests were performed in liquid medium (water for MT and NB for spores). The effects of the products varied with the category (fungicide and herbicide), their concentrations, technique used, contact time, and developmental stage of the pathogen. The LM test is the most indicated to evaluate the effect of the products on cells. It was observed that most fungicides were compatible with cells, and only epoxiconazole and azoxystrobin were metabolized. The herbicides, independent of the concentrations, were incompatible with cells, and only sulfentrazone and imazethapyr were metabolized. Fentin hydroxide was the only product incompatible with spores.

Key words: entomopathogenic bacteria, selectivity, compatibility

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) .....	16
2.1.1 Histórico.....	16
2.1.2 Toxicidade e modo de ação do <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
2.1.3 A importância no controle biológico de pragas agrícolas .....	22
2.2 Controle químico e o manejo integrado de pragas .....	26
2.3 Efeito dos produtos fitossanitários sobre entomopatógenos e as técnicas de avaliação.....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
3.1 OBTENÇÃO DO ISOLADO.....	54
3.2 ARMAZENAGEM DO ISOLADO.....	55
3.2.1 Tubos de cultura.....	55
3.2.2 Fitas de papel-filtro .....	55
3.3 QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO .....	55
3.3.1 Estabelecimento da curva padrão.....	55
3.4 EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE CÉLULA DE BTK.....	57
3.4.1 Avaliação em meio sólido.....	57
3.4.1.1 Produtos fitossanitários misturados ao meio ágar nutriente .....	58
3.4.1.2 Produtos fitossanitários impregnados em discos de papel-filtro .....	59
3.4.2 Avaliação em meio líquido .....	60
3.4.2.1 Produtos fitossanitários misturados ao meio líquido.....	60
3.5 METABOLIZAÇÃO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS POR BTK.....	60
3.6 EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE ESPOROS DE BTK.....	61
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
3.8 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	62
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	64
4.1 EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE CÉLULA DE BTK.....	64
4.1.1 Avaliação em meio sólido.....	64
4.1.1.1 Produtos fitossanitários misturados ao meio ágar nutriente .....	64
4.1.1.2 Produtos fitossanitários impregnados em discos de papel-filtro.....	69
4.1.2 Avaliação em meio líquido .....	74

4.1.2.1 Produtos fitossanitários misturados ao meio líquido.....	74
4.2 METABOLIZAÇÃO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS POR BTK.....	80
4.3 EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE ESPOROS DE BTK.....	87
4.4 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO .....	93
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE CÉLULA DE BTK E AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE ESPOROS DE BTK .....	97
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Células de *B. thuringiensis* em microscopia de contraste mostrando em coloração mais clara o esporo (A) e em coloração mais escura o cristal (B). Fonte: [helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm](http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm) ..... 18
- FIGURA 2 Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio de cultura ao redor de discos de papel-filtro impregnados com água destilada, após incubação (30°C±2, 24h).....71
- FIGURA 3 Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio de cultura ao redor de discos de papel-filtro impregnados com epoxiconazole, na concentração recomendada, após incubação (30°C±2, 24h).....71
- FIGURA 4 Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio de cultura contendo halos de inibição formados pelo fungicida fentin hidróxido, na concentração recomenda, após incubação (30°C±2, 24h).....71
- FIGURA 5 Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio de cultura contendo halos de inibição formados pelo fungicida fentin hidróxido, na metade da concentração recomendada, após incubação (30°C±2, 24h).....71
- FIGURA 6 Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstak* em meio de cultura contendo o halo de inibição formado pelo herbicida sulfentrazone, na concentração recomendada, após incubação (30°C±2, 24h).....72
- FIGURA 7 UFC/5µL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubados em ágar nutriente (30°C±2, 24h), após incubação (30°C±2 e 150 rpm, 24h) em caldo nutriente .....76
- FIGURA 8 UFC/5µL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubados em ágar nutriente (30°C±2, 24h), após incubação (30°C±2 e 150 rpm, 24h) em meio caldo nutriente adicionado de epoxiconazole, na concentração recomendada.....76
- FIGURA 9 UFC/5µL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubados em meio de cultura (30°C±2, 24h), após incubação (30°C±2 e 150 rpm, 24h) em água destilada. ....83
- FIGURA 10 UFC/5µL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubados em meio de cultura (30°C±2, 24h), após incubação (30°C±2 e 150 rpm, 24h) em água destilada com carbendazin, na concentração recomendada.....83
- FIGURA 11 Curva de crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio caldo nutriente, incubado (30°C±2 e 150 rpm, 24h) e equação da reta obtida na fase exponencial de crescimento .....94
- FIGURA 12 Curva de crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio caldo nutriente com azoxystrobin, na concentração recomendada, incubado (30°C±2 e 150 rpm, 24h) e equação da reta obtida na fase exponencial de crescimento.....94
- FIGURA 13 Curva de crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em caldo nutriente com epoxiconazole, na concentração recomendada, incubado (30°C±2 e 150 rpm, 24h) .96

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Classificação genética dos quatro principais grupos de genes proposta por Höfte & Whiteley citados por Habib & Andrade (1998) & Crickmore et al. (1998).....	19
TABELA 2 Espécies de insetos suscetíveis ao <i>Bacillus thuringiensis</i> conforme Glare & O'Callaghan, citados por (Polanczyk 2004). .....	23
TABELA 3 Comercialização de produtos fitossanitários no Brasil, referentes aos anos de 2001 e 2002.....	28
TABELA 4 Consumo de produtos fitossanitários por culturas. ....	29
TABELA 5 Produtos fitossanitários utilizados nos experimentos. ....	54
TABELA 6 Média de UFC/mL ( $\pm$ EP) a partir de células <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> incubado em caldo nutriente ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150 rpm, por 24h) e inoculado em ágar nutriente misturado com diferentes concentrações de fungicidas .....	66
TABELA 7 Média de UFC/mL ( $\pm$ EP) a partir de células de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> incubado em caldo nutriente ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150 rpm, por 24h) e inoculado em ágar nutriente misturado com diferentes concentrações de herbicidas. ....	68
TABELA 8 Efeito de fungicidas e herbicidas em diferentes concentrações em <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> após 24 horas de incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ ). ....	70
TABELA 9 Média de UFC/mL ( $\pm$ EP) a partir de células de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> após incubação em caldo nutriente ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150 rpm, 24h) com fungicidas em diferentes concentrações. ....	77
TABELA 10 Média de UFC/mL ( $\pm$ EP) a partir de células de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> após incubação em caldo nutriente ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150 rpm, 24h) com herbicidas em diferentes concentrações.. ....	79
TABELA 11 Média de UFC/mL ( $\pm$ EP) a partir de células de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> após incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150 rpm, 24h) com água e fungicidas em diferentes concentrações e pH inicial e final.....	82
TABELA 12 Médias de UFC/mL ( $\pm$ EP) a partir de células de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> após incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150 rpm, 24h) com água e herbicidas em diferentes concentrações e pH inicial e final.....	85
TABELA 13 Média de UFC/mL ( $\pm$ EP) a partir de esporos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> com 1 e 2 horas de incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150 rpm) com água e fungicidas em diferentes concentrações.. ....	89
TABELA 14 Média de UFC/mL ( $\pm$ DP) a partir de esporos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> com 1 e 2 horas de incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150 rpm) com água e herbicidas em diferentes concentrações.. ....	92

## 1 INTRODUÇÃO

O atual modelo de produção agrícola desenvolveu-se amplamente a partir da década de 1950, ficando conhecido como “revolução verde”. A partir de então, a demanda pela produção de alimentos tornou-se crescente, e paralelamente tem-se o uso intensivo de insumos durante todo o processo produtivo. Tal uso de insumos visa o aumento da lucratividade e ou minimização de perdas, sejam estas de origem biótica ou abiótica. Dentre os insumos, destacam-se os produtos fitossanitários, os quais embora sejam responsáveis por uma série de danos diretos e indiretos ao meio ambiente, ainda são indispensáveis, na atual situação do modelo agrícola.

Diante do problema, na década de 1970 surgiu o “Manejo Integrado de Pragas” (MIP) como um novo conceito de controle de pragas, visando minimizar os problemas causados pelo uso indiscriminado de produtos fitossanitários.

Dentre as várias estratégias utilizadas no MIP, como tratamentos culturais, uso de defensivos químicos, levantamento populacional de pragas e o controle biológico, este último apresenta-se como base fundamental, com destaque ao controle microbiano. De forma geral, os entomopatógenos se mostram cada vez mais eficientes no controle de pragas, sendo que, atualmente a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) é responsável pela maior comercialização e lucratividade do mercado de bioinseticidas.

Assim, na premissa de uma agricultura economicamente viável e ecologicamente sustentável, uma das estratégias recomendadas seria a utilização

de produtos seletivos, os quais além de conservar as populações de inimigos naturais, permitem a sua utilização de forma associada e ou integrada ao controle biológico.

Além da eficiência já comprovada de vários entomopatógenos contra diversas pragas urbanas e agrícolas, tem-se observado que o comportamento dos entomopatógenos pode variar na presença de produtos fitossanitários. Isto se deve a uma série de fatores como grupo químico, concentração e formulação utilizada, de forma que a sua ação pode ser estimulada, inibida ou inalterada quando em contato com estes produtos.

Assim, estudos sobre os efeitos de produtos fitossanitários em microrganismos são necessários, em especial com Bt, uma vez que, além de ser o bioinseticida mais comercializado mundialmente, tais estudos são escassos e sem uma padronização na metodologia. Além disso, estes estudos enquadram-se nas perspectivas do MIP, podendo possibilitar a potencialização de duas estratégias de controle, com conseqüente redução na utilização de produtos fitossanitários, custos ao produtor e contaminação do ambiente, bem como preencherem uma lacuna de informações existente sobre o assunto. Ressalta-se ainda a importância da elaboração de um protocolo de avaliação de compatibilidade, como o já existente para fungos.

Nesse sentido, esse trabalho tem por objetivo avaliar *in vitro* o efeito de cinco herbicidas e cinco fungicidas, em duas concentrações, utilizados na cultura da soja sobre células e esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) por meio de diferentes técnicas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

#### 2.1.1 Histórico

O *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915) (Bt) foi isolado a partir do bicho-da-seda, sendo apontado como o agente causal da “sotto-disease” (Lüthy et al.,1982; Lambert & Peferoen, 1992), o que acabou por inspirar o nome dado inicialmente ao patógeno, *Bacillus sotto* (Lüthy et al.,1982). O Bt foi descrito por Berliner, em 1915 (Lüthy et al., 1982), e em homenagem a cidade de Thuringia, o patógeno foi nomeado como *Bacillus thuringiensis* (Lüthy et al., 1982; Lambert & Peferoen, 1992). Foi Berliner também quem mencionou a presença da inclusão parasporal, porém sem relacioná-la à propriedade inseticida, e mesmo sem o conhecimento do real modo de ação da bactéria, ele sugeriu o controle de *Anagasta kuehniella* utilizando-se Bt (Lüthy et al.,1982).

Embora tenha sido aplicada em campo entre os anos de 1920 e 1950, somente em 1956 é que Angus provou a atividade inseticida dos cristais, quando, em experimento, separou estes dos esporos (Lüthy et al.,1982).

Comercialmente a utilização do bioinseticida à base de Bt iniciou-se em 1938, na França, com o produto de nome Sporeine. Desde então, várias formulações foram lançadas no mercado para aplicação na agricultura e controle de vetores de doenças. Atualmente, o Bt destaca-se como ingrediente ativo mais

utilizado comercialmente nos bioinseticidas, representando 1% deste mercado, com grande crescimento na década de 1990 (Moraes et al., 1998).

### 2.1.2 Toxicidade e modo de ação do *Bacillus thuringiensis*

Centenas de espécies de bactérias associadas a insetos são conhecidas atualmente, porém, são poucas as que apresentam capacidade de multiplicação na luz intestinal ou invasão da parede. Entretanto, várias espécies são capazes de se multiplicar na hemolinfa e causar septicemia, sendo, portanto consideradas agentes potenciais para a utilização no controle microbiano (Habib & Andrade, 1998). Ainda, de acordo com os autores, o gênero *Bacillus* é constituído por espécies com células em forma de bastonete, sendo que a maioria tem a capacidade de esporulação, pré-requisito para produção em escala comercial. Além disso, produzem toxinas e possuem um complexo enzimático, o qual possibilita o ataque a vários substratos. Tais características, com destaque para a produção de esporos, fazem dos indivíduos pertencentes a esse gênero agentes eficientes no controle biológico de pragas.

Naturalmente encontrada no solo, Bt é uma bactéria esporulante, gram-positiva, aeróbia ou facultativamente anaeróbia (Habib & Andrade, 1998; Bobrowski et al., 2003), crescendo na faixa de 10 e 45°C, com temperatura ideal de 30°C (Habib & Andrade, 1998). É uma bactéria quimioheterotrófica, que em condições específicas, geralmente desfavoráveis, desenvolve um esporo de resistência de formato elipsoidal localizado na região central ou paracentral da célula (Arantes et al., 2002) (Figura 1).

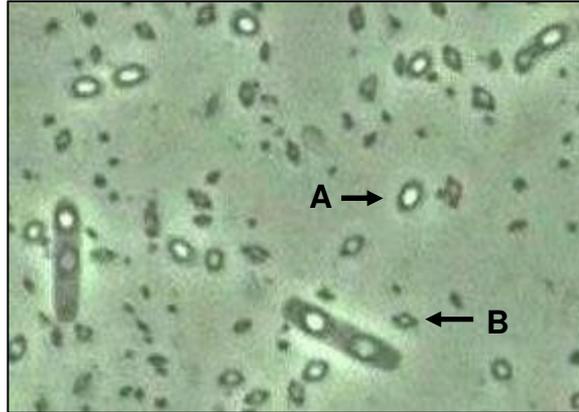


Figura 1. Células de *B. thuringiensis* em microscopia de contraste mostrando em coloração mais clara o esporo (A) e em coloração mais escura o cristal (B). Fonte: [helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm](http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm)s

Ainda de acordo com Arantes et al. (2002), é característico de Bt durante o processo de esporulação, a produção de uma inclusão protéica formada por polipeptídeos denominada  $\delta$ -endotoxinas, ou proteínas Cry, que são liberadas juntamente com os esporos no momento da lise celular (Figura 1). Ao final do ciclo vital, essa inclusão protéica corresponde à cerca de 20% a 30% do peso seco da célula (Lambert & Peferoen, 1992; Arantes et al., 2002).

As  $\delta$ -endotoxinas são codificadas por genes *cry* extracromossômicos. Segundo Crickmore et al. (1998), os primeiros sistemas a organizarem a nomenclatura genética do Bt conforme atividade inseticida das proteínas do cristal foram Höfte & Whiteley em 1989. Assim, segundo Höfte & Whiteley citados por Habib & Andrade (1998), são treze genes *cry*, que são separados em quatro grupos de acordo com a similaridade estrutural e o espectro de ação das toxinas que codificam (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação genética dos quatro principais grupos de genes proposta por Höfte & Whiteley citados por Habib & Andrade (1998) & Crickmore et al. (1998).

Genes	Famílias de Insetos suscetíveis
<i>cry I</i>	Lepidoptera
<i>cry II</i>	Lepidoptera e Diptera
<i>cry III</i>	Coleoptera
<i>cry IV</i>	Diptera

Contudo, a classificação apresentou falha, uma vez que tentou relacionar seqüências de aminoácidos semelhantes, com toxinas de diferentes atividades inseticidas. Nesse sentido, Crickmore et al. (1998) propuseram uma outra forma de classificação, considerando apenas a seqüência de aminoácidos, propiciando maior relação entre as toxinas.

Com relação à estrutura da toxina do Bt, esta é classificada em primária e terciária, sendo que ambas podem variar. A estrutura primária varia de acordo com o gene que codifica a proteína, enquanto a terciária, que são as  $\delta$ -endotoxinas empacotadas em inclusões parasporais, varia de acordo com a subespécie e até mesmo de acordo com as condições do meio de cultura utilizado para o microorganismo (Gill et al., 1992).

Além das  $\delta$ -endotoxinas, ou toxinas do cristal, os vários serótipos de Bt produzem outras toxinas como: a  $\alpha$ -exotoxina e a  $\hat{u}$ -endotoxina A e B; a  $\beta$ -exotoxina ou thurigiensina, toxina termoestável utilizada no controle de dípteros, porém banida do mercado devido aos seus efeitos mutagênicos em mamíferos (Habib & Andrade, 1998).

Ainda há as proteínas citolíticas (Cyt) e as proteínas vegetativas (VIPs), porém, ressalta-se que estas não são codificadas por genes *cry*. Segundo Habib & Andrade (1998), a toxina citolítica age contra dípteros. Por sua vez, as proteínas VIP foram primeiramente descritas para *B. cereus* e embora não apresentem similaridade estrutural, o modo de ação é semelhante para *Bacillus thuringiensis* (Arantes et al., 2002).

No caso de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk) ocorre a produção somente das  $\delta$ -endotoxinas. Estas, em conjunto, formam o cristal protéico com peso molecular de cerca de 230Kd, o qual pode variar em tamanho, forma e número, de acordo com o serótipo (Habib & Andrade, 1998). No serótipo HD-1, o corpo de inclusão é constituído por cinco tipos de polipeptídeos diferentes, sendo que três são codificados por genes *cry* I e dois por genes *cry* II (Gill, 1992).

A patogenicidade do Bt deve-se principalmente às  $\delta$ -endotoxinas, formadoras do corpo de inclusão parasporal. Contudo, para que as toxinas possam agir há a necessidade de condições específicas no interior do corpo do inseto, dependentes de alguns fatores como o pH e ação enzimática no mesêntero. Após ingestão do cristal, o processo se inicia com a sua solubilização em meio alcalino, liberando as  $\delta$ -endotoxinas ou pró-toxinas, as quais são ativadas por meio das proteases intestinais. Após ativação, as toxinas atravessam a membrana peritrófica e se ligam aos receptores específicos presentes nas microvilosidades das células epiteliais do mesêntero, onde ocorre a formação de poros na membrana celular com conseqüente desequilíbrio iônico entre o citoplasma e o meio externo à célula, lise celular; paralisia e morte do inseto (Gill et al., 1992; Gill, 1995; Habib & Andrade, 1998; Fiuza, 2003).

Ainda com relação à patogenicidade, cabe ressaltar que o esporo também apresenta determinada toxicidade. Porém, segundo Habib & Andrade (1998), a atividade das proteínas do esporo acaba sendo mascarada, pois tais proteínas são encontradas em uma quantidade menor quando comparadas às do cristal.

Para o completo ciclo no hospedeiro é necessário que os esporos germinem, dando origem a células que se multiplicarão e posteriormente originarão novos esporos e novas toxinas. Porém, ressalta-se que a germinação do esporo só ocorre com a mistura da hemolinfa ao conteúdo intestinal, quando se dá a redução do pH do meio em que os esporos se encontram e a oferta de nutrientes é maior (no caso, a hemolinfa) Habib & Andrade (1998).

Desta forma, em virtude da potencial patogenicidade dos esporos e visando aumentar a atividade tóxica da bactéria, a maioria dos bioinseticidas comercializados à base de Bt é constituída por esporos e toxinas.

Como a patogenicidade está diretamente relacionada a determinadas características do hospedeiro, a exemplos: o pH intestinal, complexo enzimático, receptores moleculares e também com características da própria bactéria, como o isolado, verificam-se diferenças na suscetibilidade dos insetos em relação ao patógeno.

Assim, vários trabalhos reportam a avaliação da toxicidade de Bt sobre determinadas espécies de insetos. Dentre estes, pode-se citar o desenvolvido por Praça et al. (2004), que selecionaram duas entre trezentas estirpes de *B. thuringiensis* com potencial inseticida sobre insetos das ordens Diptera, Lepidoptera e Coleoptera.

Silva & Carvalho (2004) estudaram a patogenicidade de Btk sobre lagartas de *Urbanus acawoios*, potencial invasora da cultura da soja, e atual praga de *Clitoria*

*fairchildiara*, utilizada em arborização urbana e de estradas. Além desses trabalhos, há outros como os desenvolvidos por Rogoff et al. (1969), Fast & Morrison (1972), Habib & Andrade (1984), McGuire et al. (1990), Miller (1990), Polanczyk et al. (2003), Khalique & Ahmed (2003) e Brighenti et al. (2005), que tratam de estudos de patogenicidade de Bt para diferentes espécies de insetos.

Na Tabela 2 pode ser verificada uma quantidade aproximada de espécies de insetos que são suscetíveis ao Bt.

### 2.1.3 A importância no controle biológico de pragas agrícolas

Os entomopatógenos ocorrem naturalmente no ambiente e são importantes fatores na regulação de populações de pragas. Muitas espécies são aplicadas como agentes de controle biológico em campo e estufas, em pomares, cultivo de plantas ornamentais, pastagens, produtos armazenados, florestas e ainda no controle de vetores de importância médica e veterinária (Lacey et al. 2001).

Os entomopatógenos de forma geral mostram-se vantajosos para o controle de pragas, uma vez que possuem ação específica com baixa ou nenhuma toxicidade aos vertebrados e insetos benéficos, diminuem a quantidade de resíduos tóxicos nos alimentos, além de possibilitarem o aumento da biodiversidade nos agroecossistemas.

Dentre os entomopatógenos, o Bt tem sido utilizado há mais de 50 anos para o controle de pragas agrícolas e insetos vetores de doenças. Assim, destaca-se como ingrediente ativo mais utilizado comercialmente nos bioinseticidas, com um crescimento significativo em torno de 10 a 25% ao ano Newton et al., citados por

Nardo & Capalbo (1998), com um mercado atual variando de 80% (Moraes et al., 1998) até 90 a 95% (Valadares-Ingliš et al.,1998) do mercado mundial de bioinseticidas, no final da década de 1990.

Sosa-Gómez & Moscardi (2003) ressaltam as bactérias entomopatogênicas como potenciais agentes reguladores de populações de pragas nas principais culturas de importância agrícola, tais como: algodão, citros, mandioca, soja, trigo, milho etc.. Fiuza (2003) ainda salienta que vários insetos-praga mostram-se suscetíveis ao Bt, sendo estes pertencentes a várias ordens como: Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, dentre outros (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de insetos suscetíveis ao *Bacillus thuringiensis* conforme Glare & O'Callaghan, citados por (Polanczyk 2004).

Ordem	Número de espécies
Diptera	266
Hemíptera	48
Hymenoptera	62
Isoptera	5
Coleoptera	106
Lepidóptera	572
Neuroptera	4
Orthoptera	6
Siphonaptera	7
Thysanoptera	3
Total	1079

O continente americano lidera o mercado mundial de bioinseticida à base de Bt, com 50% do montante em circulação (Cannon, 1993), sendo que deste total, a

América Latina é responsável por cerca de 8 a 10% Tamez-Guerra et al., citados por Polanczyk (2004). Ainda conforme salientam Arantes et al. (2002), a comercialização do Bt nos Estados Unidos chega a superar a dos inseticidas químicos.

Dentre os vários produtos comerciais à base de Bt, o produto Dipel (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1) é o mais comercializado mundialmente, sendo muito eficaz contra 170 espécies de insetos-praga da ordem Lepidoptera e pouco tóxico para coleópteros, ácaros, dípteros e hemípteros (Glare & O'Callaghan, citados por Polanczyk, 2004).

Na América do Norte, com exceção do México, o Btk é largamente utilizado no controle de lagartas desfolhadoras de florestas (Cannon, 1993), sendo que nos Estado Unidos entre 1980 e 1995, cerca de dois milhões de ha de florestas foram tratados para o controle *Lymantria dispar*, com erradicação da praga em alguns casos (Glare & O'Callaghan citados por Polanczyk , 2004).

Na Austrália, Btk é empregado no controle de pragas em culturas como: algodão, frutíferas, fumo, ornamentais entre outras Glare & O'Callaghan e van Frankenhuyzen, citados por (Polanczyk, 2004), enquanto que na China é aplicado em cerca de um milhão de ha para o controle de pragas de hortaliças, grandes culturas e florestas Salama & Morris, citados por (Polanczyk 2004), com destaque ao controle da traça do repolho *Plutella xylostella* (Cannon, 1993).

Em Cuba e no México, a utilização de Btk é feita nas culturas de banana, fumo, citros, hortaliças, milho, algodão e pastagens, e por serem os únicos países da América Latina que possuem produto formulado próprio, apresentam vantagem competitiva em relação aos produtos químicos (Polanczyk, 2004). Ainda de acordo com o autor, no Brasil, embora Btk seja utilizado em cerca de 150.000 ha para o

controle de aproximadamente de 30 pragas, a área tratada corresponde somente à terça parte da área tratada no México.

O sucesso do Bt no controle de pragas pode ser atribuído a uma série de fatores que conferem vantagens como: seletividade tanto dos esporos quanto das proteínas do cristal, não sendo tóxicos para mamíferos nem prejudiciais para predadores e insetos-não-alvo (Lüthy et al., 1982; Arantes et al., 2002). Também não apresentam fitotoxicidade, permitindo a sua utilização em qualquer época, inclusive próximo às colheitas, o que é importante no caso das hortaliças (Lüthy et al., 1982). Além disso, Arantes et al. (2002) ressaltam como vantagem, as técnicas de produção em fermentadores, baixo custo de produção, utilização dos mesmos equipamentos utilizados para a aplicação de produtos químicos e reduzida seleção de insetos resistentes.

Entretanto, também é importante ressaltar que Bt apresenta uma série de desvantagens. A mesma especificidade que lhe confere vantagem, acaba sendo fator limitante, pois uma série de pragas ocorre ao mesmo tempo nos agroecossistemas. Além disso, a sua aplicação requer maiores cuidados por parte dos produtores, quando comparado com os produtos químicos. Isso se deve à dependência de alguns fatores abióticos e bióticos como: temperatura, umidade, luz e idade das larvas, respectivamente (Lüthy et al., 1982). Os autores também mencionam que a necessidade de patentes desestimula o investimento em programas de pesquisa. Arantes et al. (2002) ainda apontam como desvantagens a baixa persistência do cristal no meio ambiente, bem como o acesso limitado a determinadas partes da planta e a necessidade de sucessivas aplicações.

Embora tenha sido dado um maior enfoque ao Btk, cabe ressaltar que existem no mercado produtos formulados com outras variedades de Bt, com ação

mais específica, como Novodor® com *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e Vectobac® com *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* recomendados, respectivamente para o controle de coleópteros e dípteros.

## 2.2 Controle químico e o manejo integrado de pragas

Os registros da utilização de substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas na agricultura são referidos desde a Antiguidade Clássica. Manuscritos gregos e romanos descreviam a utilização de produtos como o arsênico e enxofre para o controle de insetos. Entre o século XVI até o final do século XIX, nos Estados Unidos e Europa houve uma grande demanda sobre as substâncias orgânicas como a nicotina e o piretro, respectivamente extraídas do fumo e crisântemo, (Gasparin, 2005).

Desde o início do século XX, até os dias atuais, muito se avançou no setor de produção e comercialização dos produtos fitossanitários em todo o mundo, principalmente após a 2ª Guerra Mundial, pois parte da tecnologia desenvolvida para a guerra foi aplicada em outras áreas como a agricultura.

Assim, com início na década de 1950, o atual modelo de produção agrícola se disseminou por todo o mundo, apoiado no “tripé” formado por máquinas, substâncias químicas e sementes selecionadas, ficando conhecido como “revolução verde”. Contudo, esse “tripé” é frágil e apresenta sérios inconvenientes como erosão e compactação do solo; favorecimento a ação de fitopatógenos, insetos e plantas competindo ou se beneficiando das culturas (Furtado, 2003).

Concomitantemente a essa “revolução” e na tentativa de minimizar ou eliminar os prejuízos causados por pragas e doenças, o uso de produtos fitossanitários intensificou-se. Assim, como conseqüências diretas, verificam-se as seleções de espécies de pragas resistentes, surgimento de pragas que até então eram consideradas secundárias, eliminação de inimigos naturais, contaminação de alimentos, do solo e da água, intoxicação direta do homem, dentre outros. Além disso, Foerster (2002) ressalta que o sucesso dos produtos sintéticos após a 2ª Guerra Mundial acabou deixando em plano secundário as pesquisas com inimigos naturais, e também levou a uma separação dos entomologistas em dois grupos: um defensor dos métodos químicos e os defensores dos inimigos naturais.

Paralelamente à intensificação no uso dos produtos fitossanitários, tem-se o aquecimento do mercado, que somente no Brasil, movimenta atualmente bilhões de dólares. Entretanto, sabe-se que hoje, a eficiência de tais métodos não é proporcional às cifras movimentadas, de forma que as perdas de produção permanecem altas.

Segundo Gallo et al. (2002), as pragas, doenças e plantas daninhas causam um prejuízo de cerca de 38% nas culturas e de acordo com Silva-Filho & Falco, (2000), cerca de 13% se atribui somente aos insetos.

O Brasil é atualmente um dos maiores consumidores de produtos fitossanitários do mundo, tanto os agrícolas como os utilizados em campanhas de saúde pública. De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola – SINDAG (2003), o mercado de produtos fitossanitários gera em torno de sete mil e trinta mil empregos diretos e indiretos respectivamente, o que correspondeu a um faturamento de cerca de US\$ 1,95 bilhão no ano de 2002.

Ainda de acordo com Brasil /2003?/, dentre os produtos fitossanitários comercializados, destacam-se os herbicidas com cerca de 51% do mercado, seguidos pelos inseticidas, fungicidas e acaricidas com 24%, 18% e 4%, respectivamente. Os fitorreguladores, óleos minerais/vegetais e espalhantes adesivos também são considerados, perfazendo um total de 3% dos produtos comercializados (Tabela 3).

Além disso, ao se fazer uma análise isolada por cultura, quanto ao consumo de produtos fitossanitários, tem-se uma grande variação entre as mesmas, com liderança expressiva da cultura da soja (Tabela 4).

Tabela 3. Comercialização de produtos fitossanitários no Brasil, referentes aos anos de 2001 e 2002.

Vendas por Classe de Produto	US\$ (2001)	US\$ (2002)
Herbicidas	1,143	0,988
Fungicidas	0,363	0,360
Inseticidas	0,631	0,468
Acaricidas	0,066	0,072
Outros (fitorreguladores e adjuvantes)	0,085	0,064
<b>TOTAL</b>	<b>2,288</b>	<b>1,952</b>

Brasil /2003?/.

Tabela 4. Consumo de produtos fitossanitários por culturas.

Cultura	Porcentagem
Soja	38,9
Cana-de-açúcar	11,5
Algodão	9,3
Milho	8,6
Citros	5,9
Feijão	3,7
Trigo	3,7
Arroz	2,7
Batata	2,5
Café	2,4
Tomate	1,6
Horticultura	1,4
Pastagem	1,4
Fumo	1,3
Maçã	0,9
Reflorestamento	0,9
Fruticultura	0,7
Demais culturas	2,6

Adaptado de Brasil/2003?/

Embora os dados referentes à comercialização dos produtos fitossanitários sejam alarmantes, o crescimento desse mercado é lento, comparado ao dos produtos biológicos. Principalmente pela série de problemas que estes produtos começaram a apresentar a partir da década de 1950, com agravantes na década de 1960, chamado de “período negro” do controle de pragas.

A partir de então, diante de toda a problemática, e juntamente com os altos custos dos produtos fitossanitários e as campanhas realizadas por diversas entidades governamentais e não governamentais, houve um aumento gradativo na busca de novas estratégias de controle, como a integração entre os métodos de controle.

Assim, na década de 1970 surgiu o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que consiste numa tecnologia que opera em harmonia com o agroecossistema, cujas práticas economicamente compatíveis, têm por objetivo a regulação das populações de pragas, preservando e aumentando os inimigos naturais (Gravena et al., 2000; Gallo et al., 2002).

Além disso, conforme salientam Silva-Filho & Falco (2000), há uma crescente demanda pelo desenvolvimento de uma agricultura “limpa”, com a utilização de menos recursos energéticos, produtos fitossanitários e conseqüentemente, redução das agressões ambientais.

Nesse cenário, dentre as práticas utilizadas no MIP, destacam-se o controle biológico e o desenvolvimento de plantas resistentes. Conforme van den Bosch et al. (1982), o controle biológico é um processo dinâmico, que varia de acordo com aspectos dependentes e independentes da densidade. Corrêa-Ferreira (2003), ainda salienta que o controle biológico constitui-se como uma das estratégias

fundamentais dos programas de MIP, encontrando nesses programas suas melhores chances de ser bem sucedido, com destaque para o controle microbiano.

Além de fundamental em qualquer programa de MIP, o controle biológico pode ser integrado com uma série de outros métodos de controle como: físico, cultural, resistência de plantas, os comportamentais e métodos químicos (Parra et al., 2002).

Ainda, de acordo com Arantes et al. (2002), apesar dos entomopatógenos representarem apenas 5% do mercado total mundial de produtos para a proteção de plantas, a utilização de bioinseticidas vem apresentando um crescimento anual dez vezes maior, quando comparado a produtos químicos.

Porém, salienta-se a predominância da utilização de produtos químicos nos programas de MIP (Silva-Filho & Falco, 2000; Arantes et al., 2002; Gallo et al., 2002). Assim, tal integração se faz importante, uma vez que a completa ausência do uso de produtos químicos, nas condições em que se conduz à agricultura moderna, parece ser inviável.

Dessa forma, é importante ressaltar que desde o período no qual os produtos fitossanitários começaram a ganhar o título de “vilões” e a demanda por uma agricultura “limpa” e sustentável aumentou, as pesquisas em entomologia voltaram-se para uma nova linha de pesquisa. Tal linha buscava, e ainda busca, a integração dos produtos fitossanitários juntamente com outras estratégias de controle, com destaque ao biológico, visando a um controle de pragas mais limpo e eficiente, bem como à redução de custos dos produtores e menores danos ambientais.

### 2.3 Efeito dos produtos fitossanitários sobre entomopatógenos e as técnicas de avaliação

Atualmente, muitos agricultores utilizam estratégias como o controle biológico, as práticas culturais e a utilização de plantas resistentes, dentre outras, para o controle de pragas, nos programas de MIP. Contudo, ressalta-se que a maioria dessas estratégias é de caráter preventivo, de forma que quando há uma explosão populacional de determinada praga, recorre-se a medidas terapêuticas eficientes, como a utilização de produtos fitossanitários, que é a prática mais usual e difundida.

Os produtos fitossanitários apresentam uma série de vantagens em sua utilização como a sua facilidade de aplicação, disponibilidade de equipamentos, eficiência quanto à rapidez no modo de ação e prestação de serviços no mercado.

Assim, em virtude da promissora capacidade de controle biológico aliada a outras técnicas empregadas no MIP e a as vantagens do controle químico, muitos estudos visando à integração e ou uso simultâneo dessas duas estratégias de controle foram e vêm sendo desenvolvidos. Contudo, para que essas estratégias possam ser utilizadas em conjunto, é necessária a utilização de produtos seletivos aos diversos agentes de controle biológico.

Dentre as estratégias de utilização de entomopatógenos, a mais viável economicamente é aquela que visa à conservação destes em campo. Essa conservação pode ser realizada por meio de técnicas como: espaçamento adequado, escolha de variedades com porte e resistência favoráveis, bem como a aplicação de produtos fitossanitários seletivos aos entomopatógenos (Alves et al., 1998).

Infelizmente, ainda não se tem uma lei que obrigue as empresas que fabricam os produtos fitossanitários a produzirem moléculas seletivas aos agentes microbianos. Conforme Alves et al. (1998), os testes de toxicidade limitam-se a grupos de vertebrados e em alguns casos, a grupos de parasitóides e predadores. Assim, potenciais agentes de controle, como: fungos, vírus e bactérias, que se encontram naturalmente nos agroecossistemas e ou que podem ser aplicados, são ignorados em tais testes de toxicidade.

Picanço et al. (2003) e Foerster (2002) chamam a atenção para os tipos de seletividade que podem ser estudadas, sendo estas a ecológica e a fisiológica. A primeira procura minimizar a exposição do inimigo natural ao produto fitossanitário, enquanto a segunda visa à aplicação de produtos fitossanitários que sejam mais tóxicos às pragas do que aos inimigos naturais.

A utilização de produtos fitossanitários seletivos é necessária, principalmente nas culturas onde a utilização de tais produtos seja indispensável, como: as frutíferas de clima temperado, citros, café, algodão, soja, dentre outras, nas quais os danos causados pelos insetos sejam considerados pontos-chave no seu desenvolvimento. Além disso, tal seletividade diminui o impacto sobre os agentes de controle biológico natural (Alves et al., 1998).

Alves & Pinto (2003), ainda chamam a atenção para a importância da integração de agroquímicos com entomopatógenos nos casos em que ocorrem simultaneamente as presenças de insetos suscetíveis e não suscetíveis, espécies ou estágios de desenvolvimento diferentes, onde se faz necessária a utilização dos dois métodos de controle. Contudo, também salientam a importância de se considerar uma série de interações, positivas ou negativas, que possam existir em tal associação.

Além disso, Sosa-Gómez & Moscardi (2003) salientam que a ação dos agentes de controle microbiano pode ser estimulada, reprimida ou permanecer inalterada mediante aplicação de produtos fitossanitários. Ainda de acordo com Alves et al. (1998), tais produtos podem atuar inibindo o crescimento vegetativo e a esporulação dos microrganismos, além de causar mutações genéticas, as quais podem levar a diminuição da virulência à determinada praga.

Assim, dentre os vários estudos sobre o efeito de produtos fitossanitários em agentes de controle biológico, que em sua maioria estão relacionados à seletividade fisiológica, tem-se encontrado tanto interações negativas quanto positivas. Nesse espectro, pode-se listar vários autores que realizaram tais estudos.

No caso de estudos com bactérias entomopatogênicas, citam-se os trabalhos desenvolvidos por Sutter et al. (1971), Dougherty (1971), Chen et al. (1974), Morris (1975), Al-Zubadi et al. (1988), Jimenez et al. (1989), Hardman & Gaul (1990), Mohamed & Ahmed (1990), Saleh et al. (1990), Pawinska (1992), Smit et al. (1994), Bhattacharya et al. (1998), Seleena et al. (1999), Stewart et al. (1991), Kizilkaya & Aksoy (1999), Chung et al. (2001), Batista Filho et al. (2001), Bhattacharya et al. (2004) e Accinelli, (2004). Além desses, citam-se Schuster (1979), Hafez et al. (1987) que estudaram o efeito de adjuvantes. Ainda, Bueno et al. (2003) estudaram *in vitro* e em campo o efeito de fungicidas sobre a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* e a nodulação da soja.

Com relação à seletividade de produtos fitossanitários aos artrópodes, Carvalho et al. (2001), Periotto et al. (2002), Lara et al. (2002) e Giolo et al. (2005), avaliaram os efeitos de produtos fitossanitários sobre parasitóides, enquanto Papaioannou et al. (1998), Amalin et al. (2000), Bacci et al. (2001), Fragoso et al.

(2001), Torres et al. (2002) e Picanço et al. (2003) estudaram tal efeito sobre predadores.

Negrison Junior (2005) avaliou o efeito de produtos fitossanitários sobre nematóides entomopatogênicos em condições de laboratório por meio de diferentes técnicas.

Por sua vez, Moscardi et al. (1985, 1987, 1988), Silva (1995) e Gomez & Rumiatto citados por Negrison Júnior (2005), avaliaram os efeitos de vários produtos fitossanitários com o vírus da poliedrose nuclear contra a lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis*.

Entretanto, além de mais recentes, a maioria dos trabalhos sobre os efeitos de produtos fitossanitários em entomopatogênicos para a agricultura refere-se aos fungos entomopatogênicos, como os desenvolvidos por Neves et al. (2001), Batista Filho et al. (2001), Loureiro et al. (2002), Tamai et al. (2002), Cavalcanti et al. (2002), Tanzini et al. (2002), Mello et al. (2003), Mourão et al. (2003), Batista Filho et al. (2003), Almeida et al. (2003), Oliveira et al. (2003), Andaló et al. (2004), Mendes et al. 2004 e Silva & Neves (2005).

Embora se apresente como uma estratégia viável salienta-se que a ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatogênicos pode variar de acordo com os fatores como: a espécie e linhagem dos patógenos, a natureza química dos produtos fitossanitários, bem como as concentrações dos produtos (Alves et al., 1998).

Neste sentido, também se deve levar em consideração o tipo de formulação, uma vez que produtos com a mesma molécula inseticida, porém com formulações diferenciadas, concentrado emulsionável e suspensão concentrada, foram classificados como tóxico e compatível respectivamente, com relação ao fungo *Beauveria bassiana* (Tamai et al., 2002).

Embora a utilização do controle associado entre produtos químicos e biológicos possa se configurar como uma estratégia economicamente viável e ecologicamente segura é escassa a literatura sobre a compatibilidade entre ambos. Além disso, a maioria dos testes é realizada *in vitro* e reportada aos fungos entomopatogênicos. Um outro fator que acaba sendo um entrave nos testes sobre os efeitos de produtos fitossanitários em agentes de controle biológico, é a falta de padronização na metodologia destes. Alves et al. (1998) chamam a atenção para essa falta de padronização dos testes realizados para os entomopatógenos de forma geral, pois a maioria dos trabalhos não indica uma classificação precisa, que considere o crescimento vegetativo, esporulação, ou quaisquer outras características passíveis de modificações na realização de tais testes. Isso compromete a interpretação dos dados obtidos em cada trabalho, bem como a comparação entre estes.

Assim, diferentemente dos trabalhos publicados para outros entomopatógenos, os estudos de compatibilidade realizados entre vírus e produtos fitossanitários, em sua maioria, foram desenvolvidos em condições de semi-campo e campo. Tal fato se justifica pela característica do patógeno, que é parasita intracelular obrigatório, o que dificulta a sua manutenção em laboratório.

Testes *in vitro* foram feitos para avaliar a eficiência de inseticidas e o vírus da poliedrose nuclear múltipla (AgMNPV), isoladamente, e mistura de ambos contra *Anticarsia gemmatalis*. A mistura causou mortalidade larval superior a 90%, sendo que a combinação da menor concentração de profenofós e AgMNPV apresentou maior equilíbrio quanto à mortalidade por vírus e inseticida. Resultados semelhantes foram obtidos em campo, porém constatou-se que a produção de vírus por lagarta

morta decresceu à medida que as concentrações dos produtos aumentaram Moscardi et al. (1985).

Também em condições de campo, Moscardi et al. (1987) testaram os inseticidas carbaril, endosulfan, triclorfom, *B. thuringiensis*, diflubenzurom, clorpirifós e profenofós com o AgMNPV, sendo todos a ¼ da concentração recomendada. Observaram inicialmente, maior mortalidade nos tratamentos com inseticidas isoladamente. Porém, ao longo do tempo, a combinação carbaril e AgMNPV mostrou-se eficiente na redução de lagartas com 94,6% e 53,3% de mortalidade, comparado com 72,2% e 41,9% nos tratamentos com o carbaril isoladamente aos 11 e 18 dias após a aplicação, respectivamente. De forma geral, os inseticidas carbaril, *B. thuringiensis*, profenofós e endosulfan mostraram-se adequados para a mistura com o vírus. Além disso, as parcelas tratadas com os inseticidas carbaril, triclorfon e profenofós combinados com AgMNPV, apresentaram menor desfolha e conseqüentemente, maior produtividade.

Outro trabalho desenvolvido por Moscardi et al. (1988), atesta a possibilidade de combinação entre vírus e inseticidas como triclorfon e tiodicarbe, uma vez que estas combinações persistiram por mais tempo no ambiente.

Da mesma forma, Gomez & Rumiatto, citados por Negrisoni Júnior (2005) em avaliação da integração de herbicidas pós-emergentes com AgMNPV, não verificaram interferência dos produtos fitossanitários na ação dos vírus sobre a lagarta da soja. De forma geral, os resultados de Silva (1995) corroboram os dados de compatibilidade de Moscardi et al. (1985, 1986, 1987).

Ainda conforme Santos<sup>1</sup>, atualmente é prática usual a utilização de mistura de produtos fitossanitários e o AgMNPV para o controle de *Anticarsia gemmatalis* na cultura da soja.

Existe uma ampla literatura que trata da compatibilidade de nematóides entomopatogênicos, parasitóides e predadores com produtos fitossanitários. Contudo, mesmo que sejam considerados entomopatógenos para fins práticos, os nematóides, assim como os artrópodes, são animais pluricelulares com estrutura mais complexa e desenvolvida do que os microrganismos entomopatogênicos, aos quais foi dada maior ênfase nessa revisão. Uma revisão mais ampla e atual com referência aos nematóides entomopatogênicos pode ser encontrada em um trabalho desenvolvido por Negrisoni Júnior (2005).

Assim, em linhas gerais, verifica-se que, da mesma forma que para os entomopatógenos, as metodologias dos testes com nematóides, bem como as respostas à interação com produtos fitossanitários, variam conforme espécie, idade e estágio de desenvolvimento do organismo. Salienta-se ainda que para nematóides os experimentos são desenvolvidos *in vitro*, ao passo que a maioria dos estudos com parasitóides e predadores são realizados em campo.

Além disso, a extinta empresa americana Biosys disponibiliza na internet uma tabela de compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários. Tal tabela é constituída por cinco bioinseticidas, quatro reguladores de crescimento de insetos, quinze inseticidas, um acaricida, doze fungicidas e três herbicidas, os quais são considerados como compatíveis, podendo ser utilizados na

---

<sup>1</sup> Bráulio Santos – Prof. Dr., Universidade Federal do Paraná, Departamento de Entomologia e pesquisador responsável pelo setor de pesquisa e produção de inseticida biológico da Cooperativa Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico – COODETEC, Cascavel – PR – comunicação pessoal, 2005.

mistura de tanque com *Steinernema carpocapsae* e *S. riobravis* (Negrisoni Júnior, 2005).

Com relação aos fungos entomopatogênicos, Alves et al. (1998), padronizaram um método, o qual, por meio de uma fórmula, calcula o grau de toxicidade de produtos fitossanitários para esses patógenos. Tal técnica é realizada *in vitro*, utilizando-se meio sólido e baseia-se na porcentagem média da esporulação e no crescimento vegetativo micelial com relação à testemunha (100%), como segue:  $T = 20[CV] + 80 [ESP] / 100$ , onde: T: valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para classificação da toxicidade do produto; CV: porcentagem de crescimento vegetativo com relação à testemunha; ESP: porcentagem de esporulação com relação à testemunha. Os valores de T definem a toxicidade nos intervalos que seguem: 0-30= muito tóxico; 31-45= tóxico; 46-60= moderadamente tóxico e acima de 60 compatível.

Embora seja uma padronização muito utilizada nos trabalhos de compatibilidade do referido entomopatógeno, ainda verificam-se algumas discrepâncias.

Silva & Neves (2005) estudaram os efeitos de dois fungicidas e um inseticida em três concentrações diferentes, sobre o fungo *Beauveria bassiana* por meio de quatro diferentes técnicas, tendo como critérios de avaliação, a germinação, unidades formadoras de colônias, crescimento vegetativo e esporulação. As técnicas constaram de pulverização do produto antes e depois da inoculação do entomopatógeno, mistura do produto ao meio de cultura e mistura dos conídios com os produtos e posterior inoculação em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA). Para o critério germinação, com o produto endossulfan, na concentração recomendada, verificaram diferença entre as técnicas, sendo que na pulverização

antes e após a inoculação do fungo houve maior incompatibilidade. Por outro lado, nas técnicas em que misturaram o produto ao meio de cultura e/ou os conídios ao produto, verificaram maior compatibilidade, sendo estas significativamente iguais entre si e significativamente diferentes das anteriores.

Por outro lado, com o fungicida iprodione, na concentração recomendada, Silva & Neves (2005) não verificaram diferença significativa entre as técnicas testadas. Já com o dobro da concentração recomendada, o maior grau de incompatibilidade foi observado quando o produto foi misturado ao meio de cultura, resultado contrário ao endossulfan. Ainda com relação à germinação, com o fungicida azoxystrobin, na concentração recomendada, os autores não encontraram diferença significativa entre as técnicas, sendo que o maior grau de incompatibilidade, independente da concentração do produto, foi encontrado na técnica proposta por Alves et al. (1998). Por sua vez, com a metade da concentração, nas técnicas com pulverizações antes e depois da inoculação do fungo, observaram altos índices de germinação. Resultados diferentes entre as técnicas também foram verificados com o dobro da concentração recomendada.

Nos demais critérios avaliados, de forma geral, Silva & Neves (2005) também encontraram variação entre as técnicas, concentrações e produtos utilizados, o que reforça a idéia de estudos mais aprofundados para a elaboração de um protocolo mais confiável.

Em trabalho sobre os efeitos de produtos fitossanitários sobre *B. bassiana* com produtos químicos, Mourão et al. (2003) verificaram que endossulfan apresentou compatibilidade moderada em relação aos demais produtos estudados quando misturado ao meio de cultura BDA, corroborando Alves (1998), sendo resultado

semelhante ao obtido por Silva & Neves (2005), considerando-se o critério germinação.

Por outro lado, há discrepância entre os trabalhos de Mourão et al. (2003) e Silva & Neves (2005), quando se considera o critério diâmetro de colônia, na técnica em que misturaram endosulfan ao meio de cultura. Para Mourão et al. (2003), o inseticida é moderadamente compatível, enquanto que para Silva & Neves (2005) apresentou a maior compatibilidade quando comparado com as outras técnicas testadas. Mourão et al. (2003), ainda verificaram que etion, triadimezol apresentaram seletividade moderada, enquanto dissulfoton foi o mais seletivo, não inibindo o crescimento micelial.

Da mesma forma, utilizando-se da técnica proposta por Alves et al. (1998), Tanzini et al. (2002), testaram o efeito de seis inseticidas sobre oito fungos diferentes e verificaram que este variou de acordo com a espécie. Além disso, encontraram diferenças entre os isolados de *Metarhizium anisopliae*, sendo que o isolado Esalq 1144 se mostrou totalmente suscetível aos inseticidas testados, ao passo que para o isolado Esalq 1189, o grau de toxicidade variou de compatível, moderadamente tóxico a tóxico. Ainda de acordo com os autores, alguns produtos fitossanitários propiciaram crescimento micelial significativamente igual ao da testemunha, porém foram considerados incompatíveis, uma vez que a produção de conídios foi muito baixa. Isso porque no cálculo para o grau de toxicidade proposto por Alves et al. (1998), a esporulação tem um peso maior.

Tamai et al. (2002), também realizaram estudo sobre o efeito de produtos fitossanitários em fungos entomopatogênicos e observaram variação no grau de toxicidade conforme a categoria do produto. Assim, testaram o isolado PL 43 de *B. bassiana* com produtos fitossanitários e classificaram noventa e três produtos por

meio da fórmula proposta por Alves et al. (1998). Do total pesquisado, 23,6% dos produtos foram compatíveis, 5,4% moderadamente tóxicos, 6,5% tóxicos e 64,5% muito tóxicos. Quando analisados por categoria, foi verificada maior incompatibilidade para os fungicidas, uma vez que dos trinta e seis fungicidas testados, 92% foram classificados como tóxicos contra 56% dos inseticidas e/ou acaricidas. Além disso, uma maior produção de conídios foi verificada em alguns tratamentos que não diferiram estatisticamente da testemunha quanto ao grau de toxicidade.

O produto fenproprina, segundo Tamai et al. (2002), foi classificado como compatível, porém, resultados divergentes foram obtidos por Cavalcanti et al. (2002) sobre o isolado UFLA-4 de *B. bassiana*, classificando fenproprina como tóxico para este isolado.

Entretanto, Cavalcanti et al. (2002) verificaram que a viabilidade dos esporos não foi afetada, tanto no tratamento com fenproprina como nos tratamentos com tiametoxan, imidaclopride, e iprodione. Batista Filho et al. (2003), também chamam a atenção para o critério viabilidade dos esporos, pois identificaram produtos que segundo a fórmula proposta por Alves et al. (1998) são compatíveis, porém, os conídios apresentam baixa viabilidade, o que comprometeria todo o processo do modo de ação do fungo. Cavalcanti et al. (2002) ainda avaliaram o critério patogenicidade, e verificaram que mesmo com redução do crescimento vegetativo e esporulação, não houve diferença significativa na mortalidade de lagartas entre a testemunha e os fungos que esporularam nos tratamentos com tiametoxan, imidaclopride e fenproprina.

Ainda com relação ao produto fenproprina, a mesma técnica utilizada por Tamai et al. (2002) e Cavalcanti et al. (2002) foi aplicada por Loureiro et al. (2002)

para avaliar o efeito em fungos entomopatogênicos. Entretanto, os resultados obtidos corroboraram somente com Cavalcanti et al. (2002), sendo que o produto foi classificado de tóxico a muito tóxico para *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Verticillium lecanii*. Além disso, outros produtos foram testados por Loureiro et al. (2002) sendo que os resultados variaram de acordo com o produto e/ou o entomopatógeno utilizado, identificando-se produtos compatíveis a ambos critérios avaliados, crescimento micelial e esporulação, ou apenas a um dos dois, ou ainda totalmente incompatíveis aos dois critérios.

No caso de *B. bassiana*, por exemplo, os produtos tiametoxan, imidaclopride e ciromazina não apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento micelial. Resultados semelhantes já tinham sido verificados por Neves et al. (2001), com relação ao efeito de tiametoxan e imidaclopride sobre *B. bassiana*, embora as médias tenham sido menores do que as da testemunha.

Ainda de acordo com Loureiro et al. (2002), alterações morfológicas foram verificadas em colônias de *M. anisopliae* na presença de alguns produtos. Além disso, mesmo causando redução significativa na produção de conídios, os produtos tiametoxan, imidaclopride, bifentrina e acefato não afetaram o crescimento micelial. Para tiametoxan, os resultados corroboram com os encontrados por Neves et al. (2001), na menor concentração utilizada do produto.

Com relação ao fungo *V. lecanii*, Loureiro et al. (2002) observaram que os produtos tiametoxan, ciromazina, bifentrina e imidaclopride, não afetaram seu crescimento vegetativo, porém, com exceção de imidaclopride, para *P. fumosoroseus* houve redução na produção de conídios. Entretanto, esses resultados discordam das observações feitas por Neves et al. (2001), nas quais identificaram um aumento na produção de conídios nas maiores concentrações utilizadas de

tiametoxan para *Paecilomyces sp.* Batista Filho et al. (2001) já tinham verificado resultados semelhantes, sendo que dez microrganismos testados foram compatíveis para tiametoxan.

Da mesma forma, Oliveira et al. (2003), com o isolado CG 425 e Andaló et al. (2004), com o isolado UEL 114, ambos, *B. bassiana*, verificaram compatibilidade para tiametoxan. Contudo, salienta-se que os critérios avaliados foram diferentes, sendo germinação, crescimento micelial e esporulação para Oliveira et al. (2003) e crescimento micelial e produção de conídios para Andaló et al. (2004).

No mesmo sentido, trabalhos com enfoques diferentes dos abordados até então, porém com metodologias semelhantes, foram desenvolvidos por Mello et al. (2003) e Mendes et al. (2004). Os primeiros estudaram a compatibilidade de *Cercospora caricis*, utilizado para o controle de *Cyperus rotundus* e produtos fitossanitários, enquanto Mendes et al. (2004) avaliaram a compatibilidade de *Fusarium sp.* (isolado FCAV#940) com cinco herbicidas utilizados para o controle de macrófitas aquáticas, em diferentes concentrações.

Mello et al. (2003) observaram variação na inibição do crescimento micelial de acordo com os produtos e concentrações utilizadas. Para o produto oxicloreto de cobre não foi verificada inibição em nenhuma das concentrações utilizadas. Por outro lado, Mendes et al. (2004) observaram que em todas as concentrações estudadas, nenhum herbicida apresentou efeito inibitório no crescimento micelial do *Fusarium sp.* Além disso, embora não tenham sido evidenciadas quaisquer alterações morfológicas nos conídios dos fungos que cresceram nos diferentes tratamentos, diferenças significativas foram observadas para germinação e esporulação entre os tratamentos.

Contudo, Mendes et al. (2004) ressaltam que embora não haja diferença significativa, no caso do herbicida glifosato, em todas as concentrações testadas a média da porcentagem de germinação foi maior do que a testemunha, o que evidencia a capacidade do fungo de utilizar as substâncias dos produtos ao seu favor.

Em linhas gerais, ainda verifica-se que os resultados obtidos nos diferentes trabalhos desenvolvidos com fungos denotam uma série de diferenças que variaram conforme as técnicas e os critérios de avaliação adotados, sugerindo um estudo mais aprofundado sobre o assunto para que possa ser atestada a toxicidade dos produtos fitossanitários aos microrganismos, ou para que se possa adequá-los à estratégia pretendida.

Com referência às bactérias entomopatogênicas, os testes de compatibilidade são ainda mais restritos e a maioria dos estudos realizados são relativamente desatualizados, uma vez que muitas moléculas testadas para bactérias nas décadas de 1960, 1970, 1980 e 1990 não estão mais disponíveis no mercado. Além disso, é importante salientar que a maioria dos trabalhos referentes aos efeitos de produtos fitossanitários em bactérias, assim como ocorre para outros entomopatógenos, foram realizados focando-se os inseticidas. Dessa forma, além dessa escassez de informação, um outro fator observado e talvez o mais agravante, como já mencionado, é a falta de uma padronização para atestar os efeitos dos produtos fitossanitários. Isto acaba por comprometer e dificultar ainda mais a interpretação dos resultados e conseqüentemente a adaptação ou desenvolvimento de uma estratégia de controle.

Nesse sentido, Dougherty et al. (1971) e Jimenez et al. (1989) avaliaram os efeitos de diversos produtos fitossanitários sobre esporos de *B. thuringiensis* var.

*thuringiensis*, através da técnica de discos de papel impregnados com as concentrações dos produtos. Para ambos os autores, o critério avaliado foi a presença e ausência do halo de inibição, sendo que Dougherty et al. (1971), verificaram compatibilidade total, parcial e incompatibilidade entre os inseticidas e herbicidas testados. Além disso, também observaram que a compatibilidade variou de acordo com o solvente utilizado. Da mesma forma, os resultados obtidos por Jimenez et al. (1989), variaram conforme o produto, verificando-se produtos compatíveis e incompatíveis, com diferenças nos halos de inibição.

Diferentemente dos resultados obtidos por Jimenez et al. (1989) para endosulfan, Bhattacharya et al. (2004) observaram que o halo de inibição aumentou conforme o aumento da concentração do produto. Resultados semelhantes também foram verificados com outros produtos, sendo que carbaryl e imidacloprid, em altas concentrações, inibiram o crescimento bacteriano, o que não foi observado quando utilizaram a concentração recomendada e a metade desta.

Por outro lado, Sutter et al. (1971) estudaram os efeitos de inseticidas sobre células de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* em meio líquido. O comportamento da bactéria variou conforme o inseticida e as concentrações destes. Além disso, observaram inibição da multiplicação bacteriana por alguns inseticidas e a compatibilidade, sem inibição, com outros. Além disso, verificaram a capacidade da bactéria em metabolizar organofosforados e aumentando o número de células.

Também utilizando a técnica de crescimento em meio líquido, Morris (1975) avaliou o efeito de várias concentrações de inseticidas sobre *B. thuringiensis*. Entretanto, os critérios avaliados foram o crescimento bacteriano mensurado por espectrofotometria ao longo de seis horas, e a germinação dos esporos. O crescimento variou conforme a concentração utilizada e o tempo de exposição,

sendo que o produto fenitrothion, nas mais baixas concentrações não inibiu o crescimento durante as seis horas de avaliação. Contudo, a partir da concentração de 4 ppm e 10 ppm, foi verificada inibição, ao passo que na concentração de 100 ppm, ocorreu uma reação inversa, com estímulo de crescimento significativamente acima da testemunha até as duas horas de incubação.

No caso de germinação dos esporos Morris (1975), também verificou variação conforme as concentrações e o produto utilizado. Além disso, o autor chama a atenção para o efeito das substâncias emulsificantes, pois verificou inibição da germinação por parte de tais substâncias, isoladamente.

Uma outra técnica de avaliação utilizada é a de misturar os esporos aos produtos fitossanitários. Assim, Chen et al. (1974) testaram duas formulações de *Bacillus thuringiensis* e diferentes concentrações de inseticidas organofosforados e carbamatos. Após agitação e filtração, os esporos foram inoculados em meio de cultura e avaliados em diferentes tempos de incubação. Um decréscimo da viabilidade dos esporos ao longo do tempo foi observado em todos os tratamentos, porém, com diferença significativa apenas para os produtos stirophos e propoxur (*in sic*), com uma das formulações do inseticida biológico. De maneira geral, a maioria dos inseticidas testados foram compatíveis com as duas formulações do Bt.

Entretanto, ainda de acordo com Chen et al. (1974), a maioria das misturas de produtos químicos e biológicos testadas contra larvas de *Heliothis virescens* em laboratório não apresentou os efeitos sinérgicos e antagônicos, como verificado para alguns produtos em testes isolados *in vitro*, considerando-se o critério germinação. Além disso, maiores porcentagens de mortalidade larval foram observadas nos tratamentos com inseticida sintético e biológico isoladamente do que misturados. Por outro lado, o produto carbaryl (*in sic*), que foi significativamente deletério na

germinação, apresentou um efeito sinérgico em combinação com uma das formulações de Bt contra as larvas.

Alguns trabalhos em condições de campo e semi-campo também foram desenvolvidos. De acordo com Jimenez et al. (1989), em campo, a mistura da concentração subletal de endosulfan de 0,12 kg de i.a /ha com *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* não aumentou a efetividade de cada tratamento sobre *H. virescens*. Porém, quando a concentração misturada foi de 0,24 kg de i.a/ha, tanto com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* como com *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* foram observados resultados satisfatórios na redução dos danos de lagartas em plantações de tabaco.

Da mesma forma, Hardman & Gaul (1990) realizaram experimentos para avaliação de misturas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e piretróides, bem como a eficiência individual dos produtos para o controle da traça de inverno (Lepidoptera: Geometridae), em pomares de maçã. Nos tratamentos com as misturas, verificaram uma diminuição das injúrias causadas pela referida praga nos frutos colhidos, bem como a diminuição dos danos causados por outros lepidópteros pragas. Além disso, os níveis populacionais de alguns inimigos naturais foram maiores em tratamentos com a mistura dos produtos do que nos tratamentos isoladamente na concentração recomendada e na metade desta.

Resultados satisfatórios também foram verificados por Smit et al. (1994), com a aplicação da combinação do fungicida ridomil-Z, com ou sem a adição de surfactante, e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* em plantações de batata.

Em estudos realizados em casa de vegetação com a mistura de *B. thuringiensis* var. *san diego* e os fungicidas chlorothalonil e mancozeb, Stewart et al.

(1991) não verificaram alteração da eficácia do inseticida biológico contra larvas do besouro *Leptinotarsa decemlineata*.

Porém, Salerno et al. (1999), também avaliaram o efeito dos produtos fitossanitários em diferentes concentrações sobre duas cepas de *B. thuringiensis* em casa de vegetação e verificaram diferenças de compatibilidade com relação às concentrações e à categoria dos produtos. As misturas foram aplicadas sobre plantas de soja, e as coletas de folhas foram feitas 72 horas, 10 e 20 dias após a aplicação. As folhas coletadas foram colocadas em agitação em frascos com água destilada por 8 horas e posterior inoculação de diluições decimais. Observaram que no grupo dos herbicidas, o produto Scepter, na concentração recomendada, foi o mais compatível com a maior média para as duas cepas, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, inclusive os de concentrações abaixo das recomendadas pelo fabricante. O fungicida e o inseticida, benlate e endosulfan, respectivamente, apresentaram os efeitos mais inibitórios.

Além das técnicas de avaliação já descritas, Salerno et al. (1999) avaliaram a compatibilidade de 16 cepas de *B. thuringiensis* com herbicidas, fungicidas e inseticidas, na concentração recomendada e sete subconcentrações, misturando-as em meio de cultura, ágar nutriente (AN) fundido a 50°C. Após solidificação do meio de cultura inocularam células previamente incubadas por 72 horas em agitador horizontal. Os produtos Basagran, Scepter, Fungoxan, Benlate e Decis foram compatíveis com as cepas na concentração recomendada. Porém, para outros produtos como Agil, Select e Isomero, o crescimento das colônias só foi possível na concentração mínima estudada de 1,6%. Por sua vez, a compatibilidade do fungicida camaril-zeb e o inseticida endosulfan foi verificada em concentrações baixas, de

6,25% e 12,5% respectivamente. Além disso, em alguns tratamentos, foram verificadas alterações morfológicas nas colônias.

Da mesma forma que Salerno et al. (1999), Kizilkaya & Aksoy (1999), testaram o efeito de um fungicida, um herbicida e um inseticida em várias concentrações, sobre o crescimento de diferentes *Bacillus spp.* em laboratório. Verificaram que os efeitos dos produtos variaram de acordo com a concentração utilizada, sendo que o fungicida e o inseticida aumentaram o crescimento de *B. cereus var. mycoides* e *B. pumilus*, ao passo que o herbicida diminuiu o crescimento de ambos. Já os isolados 2362 e 1593 de *B. sphaericus*, mostraram aumento no crescimento, quando expostos ao inseticida, e decréscimo em exposição ao fungicida e herbicida. Por sua vez, o herbicida e o inseticida tiveram efeito positivo sobre o crescimento de *B. thuringiensis var. israelensis*.

Ainda com referência à técnica de mistura dos produtos fitossanitários ao meio de cultura, Batista Filho et al. (2001) avaliaram fungos, vírus e Bt com vários inseticidas, nas concentrações máxima e mínima recomendadas. Para Bt, avaliou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC), e como já verificado por outros autores, a compatibilidade variou de acordo com o produto e concentração utilizada, sendo que diafentiuron na concentração mínima estimulou a germinação diferindo estatisticamente da testemunha. Por outro lado, com o produto imidacloprid a média de UFC foi maior no tratamento com a maior concentração do produto. Além disso, o autor também verificou inibição total com os produtos monocotófitos e deltamethrin, ambos na concentração máxima recomendada.

Todos os testes descritos até então, estão relacionados à germinação, ao crescimento e à patogenicidade de Bt, quando misturado com produtos fitossanitários. Porém, é importante salientar que embora alguns produtos

apresentem-se compatíveis, conforme tais critérios, há a necessidade de selecionar produtos que não comprometam a ação das endotoxinas das bactérias, uma vez que a ação inseticida do microrganismo depende dessas endotoxinas.

Nesse sentido, Accinelli et al. (2004) estudaram a influência da toxina de Btk na degradação de herbicidas em dois tipos de solo. Foi constatado que a adição de toxinas no solo aumentou a meia vida de ambos os herbicidas testados. Por outro lado, verificaram que a atividade da toxina de Btk decresceu ao longo do período de incubação de vinte e oito dias, avaliando-se a mortalidade de lagartas para as quais foram servidas dietas contendo amostra de solo dos tratamentos. De acordo com o estudo realizado, há a possibilidade de que as toxinas do Btk tenham efeito sobre algumas propriedades do solo ou em mecanismos que influenciam a degradação do herbicida.

A preocupação no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de pragas, não se remete apenas à agricultura, mas também à saúde pública. Dessa forma, alguns trabalhos mais recentes vêm sendo desenvolvidos, visando à integração entre inseticidas sintéticos e biológicos para o controle de culicídeos vetores de doenças, como *Aedes* sp..

Assim, Seleena et al. (1999) avaliaram formulações comerciais de *B. thuringiensis* var. *israelensis* e alguns inseticidas químicos em larvas e adultos de *Aedes* sp.. Os tratamentos constaram de produtos químicos e produto biológico isoladamente e a mistura de ambos. No caso da mistura, esta foi feita e logo em seguida pulverizada contra fêmeas adultas e larvas do mosquito. A mortalidade larval máxima provocada pelos produtos químicos, isoladamente, se deu até cerca de uma hora após aplicação, enquanto que a atividade do produto biológico, isoladamente, causou mortalidade por sete dias após aplicação. Com referência à

mistura, não verificaram diferença significativa em relação ao inseticida químico e Bt isoladamente, após uma hora da aplicação. Além disso, a atividade larvicida da mistura foi maior do que somente a do produto químico nos sete dias, com exceção de um produto. Para os adultos não verificaram nenhuma diferença entre a mistura e os produtos isoladamente.

Dentro da mesma linha de estudo Chung et al. (2001) avaliaram a mistura do adulticida pirimiphos-methyl e do larvicida a base de *B. thuringiensis var. israelensis* para o controle de *Aedes aegypti*, com a aplicação por meio de termonebulizador. Os testes foram realizados com fêmeas adultas e com larvas, sendo que a mistura foi realizada momentos antes da aplicação, avaliando-se a mortalidade de larvas e adultos, a altura e a distância ideal de aplicação.

Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, uma vez que nenhum dos produtos interferiu na eficácia do outro. Além da mortalidade imediata de adultos, a mortalidade das larvas permaneceu alta pelo período de vinte e oito dias, nos tratamentos com distância de aplicação de três metros. Entretanto, verificaram que à medida que se aumentou a distância entre o alvo e o aplicador, ao longo dos dias, a mortalidade larval caiu gradativamente, chegando a zero aos vinte e um dias na distância de doze metros.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Zoologia de Invertebrados do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e nos Laboratórios de Bioquímica e Controle Microbiológico de Água, Alimentos e Medicamentos do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* de Cascavel.

A bactéria utilizada foi *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) obtida do isolamento do produto comercial Dipel PM<sup>®</sup> e as amostras comerciais dos produtos fitossanitários, fungicidas e herbicidas, foram obtidas junto à Cooperativa Agropecuária de Cascavel (Coopavel), cujas informações referentes à formulação, concentrações recomendadas, grupos químicos e nomes técnicos, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Produtos fitossanitários utilizados nos experimentos.

Nome		Form. <sup>1</sup>	Uso <sup>2</sup>	Grupo Químico	Conc. L/ha <sup>3</sup>
Técnico	Comercial				
Sulfentrazone	Boral	SC	H	Aril triazolinonas	1,2
Fentin Hidróxido	Brestanid	SC	F	Organoestânico	0,5
Lactofen	Cobra	CE	H	Difenil éter	0,5
Carbendazin	Derosal	SC	F	Benzimidazólico	0,5
Tebuconazole	Folicur	CE	F	Triazol	0,5
Epoxiconazole	Opera	EC	F	Estrobilurinas e triazol	0,5
Imazethapyr	Pivot	SL	H	Imidazolinona	1,0
Fenoxaprop	Podium	EC	H	Ácido Fenoxicarboxílico	1,0
Azoxystrobin	Priori	SC	F	Estrobilurinas	0,4
Metribuzin	Sencor	SC	H	Triazinonas	1,0

<sup>1</sup> Formulação

<sup>2</sup> H= herbicida; F= fungicida

<sup>3</sup> Concentração recomendada pelo fabricante por hectare

### 3.1 OBTENÇÃO DO ISOLADO

Para isolamento do Btk foi diluído 1g do produto comercial Dipel PM<sup>®</sup> em 50 mL de água destilada esterilizada. Após agitação com bastão de vidro, foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL, sendo estas inoculadas e distribuídas com alça de Drigalsky na superfície do meio de cultura ágar nutriente (AN) em placas-de-petri, as quais foram incubadas a 30±2°C. Para isolamento de colônias puras, por meio de uma alça de platina, foram retiradas amostras das placas incubadas anteriormente, sendo estas novamente inoculadas em placas-de-petri com meio AN pelo método de esgotamento e incubadas nas mesmas condições já descritas. A partir das colônias isoladas obtidas pelo método de esgotamento, foram feitas repicagens em placas-de-petri com meio AN e espalhadas com alça de Drigalsky pelo método de placa cheia. As mesmas condições de incubação já descritas foram adotadas nessa etapa.

## 3.2 ARMAZENAGEM DO ISOLADO

### 3.2.1 Tubos de cultura

A partir do isolado puro, amostras foram coletadas e inoculadas em tubos de cultura com meio AN inclinado. Foram preparados 12 tubos, sendo estes incubados ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 96h), sendo em seguida, os meios cobertos com óleo mineral Nujol<sup>®</sup> esterilizado e os tubos lacrados e armazenados em geladeira ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2.2 Fitas de papel-filtro

Além do armazenamento em meio de cultura, o isolado puro foi armazenado em freezer. Para tal, pequenas fitas de papel-filtro devidamente esterilizadas foram esfregadas sobre a massa bacteriana pura, e acondicionadas em tubos ependorff, os quais foram armazenados em freezer a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

## 3.3 QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO

### 3.3.1 Estabelecimento da curva padrão

Para a quantificação do inóculo de forma rápida e prática, foi estabelecida uma curva padrão, correlacionando-se a concentração celular (UFC/mL) e a densidade óptica. Assim, a partir do patógeno armazenado, foram inoculadas placas-de-petri com meio AN, sendo incubadas ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 24h) para a ativação da

bactéria. Em seguida, por meio de uma alça de platina foram retiradas amostras das placas com o patógeno ativado e inoculadas em três frascos erlenmeyer contendo 50 mL de meio caldo nutriente (CN) cada. Os frascos foram incubados em agitador horizontal (shaker) ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm, 24h). Um frasco foi mantido somente com CN para o controle experimental de contaminantes.

Após período de incubação e verificação da ausência de contaminantes, o conteúdo dos erlenmeyer foi misturado em um único frasco, do qual foi retirada uma amostra de 1 mL, seguindo-se o método de diluições seriadas até  $10^{-6}$ . Posteriormente, foi feita a leitura da densidade óptica das diluições em espectrofotômetro a 600 nm. De cada diluição foram feitas três leituras, das quais se obteve uma média, que foi registrada.

Em seguida, cada diluição foi agitada por 30 segundos em agitador do tipo vórtex e inoculada por meio de um micropipetador em cinco pontos na superfície do meio AN em placas-de-petri, de acordo com a técnica desenvolvida por E.M. Rios (UFPE/Recife, Departamento de Antibióticos), relatada por Alves & Moraes (1998). Foi utilizado um volume de  $5\mu\text{L}$ /ponto e três placas para cada diluição. As placas foram deixadas abertas na câmara de fluxo laminar durante cinco minutos para a evaporação do excesso de água dos pontos inoculados e em seguida foram incubadas ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 18 a 24h), conforme adaptação proposta por Moraes, citada por Alves & Moraes (1998). Após tal período, realizou-se a contagem do número de colônias em cada ponto, cuja média foi correlacionada com a D.O. correspondente e estabelecida uma curva padrão de quantificação.

### 3.4 EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE CÉLULA DE BTK

Para tais testes foram utilizadas duas técnicas de avaliação, ou seja, em meio sólido e meio líquido, sendo que cada uma foi considerada um experimento no qual foram testados os fungicidas e herbicidas.

Assim, previamente à execução dos bioensaios de compatibilidade, uma amostra da cultura estoque dos isolados foi retirada e inoculada em placas-de-petri em meio AN e incubadas ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 24h) para ativação da bactéria. Em seguida, amostras dessas placas foram coletadas com alça de platina e inoculadas em frascos erlenmeyer contendo 50 mL de CN, os quais foram incubados em agitador horizontal (shaker) ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm, 24h). A partir desse pré-cultivo, uma amostra de 1 mL foi pipetada e diluída em tubo de ensaio na proporção 1:10 procedendo-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. O valor obtido foi lançado na curva padrão, a qual possibilitou a estimativa da quantidade de inóculo utilizada em cada bioensaio.

Para o cálculo da concentração dos produtos fitossanitários utilizados nos experimentos, adotou-se como padronização a diluição em 200 L  $\text{H}_2\text{O}/\text{ha}^2$  (Tabela 5).

#### 3.4.1. Avaliação em meio sólido

A avaliação em meio sólido foi feita através de duas técnicas diferentes: uma que emprega os produtos fitossanitários em concentrações pré-estabelecidas

---

<sup>2</sup> Prof. Dr. Robinson Luiz Contiero – professor da disciplina de Controle Químico, Graduação e pós-graduação em Agronomia da Unioeste, *Campus* Marechal Cândido Rondon – comunicação pessoal, 2004.

misturadas ao meio de cultura e uma que emprega os produtos fitossanitários impregnados em disco de papel filtro.

#### 3.4.1.1 Produtos fitossanitários misturados ao meio ágar nutriente

Foram preparados frascos erlenmeyer contendo 90 mL de meio AN fundido, e antes destes solidificarem (45-50°C), foram adicionados os diferentes produtos fitossanitários nas concentrações equivalentes às recomendadas pelo fabricante e à metade destas. Em seguida, alíquotas de 10 mL da mistura foram vertidas em placas-de-petri e após a solidificação foi realizada a inoculação do meio com suspensões de células nas concentrações de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , sendo estas  $1,7 \times 10^4$ ,  $1,7 \times 10^3$  e  $1,7 \times 10^2$  UFC/mL, respectivamente. Para cada suspensão foram inoculadas duas placas, sendo que cada uma recebeu cinco pontos na superfície do meio, no volume de 5µL/ponto, conforme já descrito. No tratamento testemunha a bactéria foi inoculada em meio de cultura, sem a adição dos fitossanitários.

As placas foram mantidas abertas na câmara de fluxo para a evaporação do excesso de água dos pontos inoculados. Em seguida, as placas foram incubadas ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 18 a 24h). Foi avaliado o efeito dos produtos fitossanitários sobre o crescimento vegetativo da bactéria, quantificando-se as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em cada ponto, na suspensão que possibilitou melhor contagem ( $10^4$ ). Para a análise estatística, foram consideradas somente os pontos mais uniformes quanto ao número de UFC/mL.

#### 3.4.1.2 Produtos fitossanitários impregnados em discos de papel-filtro

Como já descrito no item anterior, após preparação do pré-cultivo na concentração de  $1,2 \times 10^7$  UFC/mL foram retiradas alíquotas de 0,1 mL ( $1,2 \times 10^6$ ) e inoculadas em placas-de-petri, com meio AN e espalhadas com alça de Drigalsky.

A preparação das soluções dos produtos fitossanitários foi feita como no item anterior, porém estas foram preparadas em frascos contendo 50 mL de água destilada estéril. Em seguida, discos de papel-filtro de 1 cm de diâmetro foram mergulhados nas soluções com as concentrações pré-estabelecidas e colocados em contato com a superfície do meio de cultura já inoculado com Btk. Em cada tratamento foram utilizadas duas placas com cinco discos cada.

As placas foram mantidas abertas na câmara de fluxo por cinco minutos para a evaporação do excesso de água dos discos de papel. Após incubação ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 24h) procedeu-se a avaliação. Como parâmetro, foi considerado a presença ou não do halo de inibição no crescimento das colônias ao redor dos discos impregnados. Cada disco foi avaliado individualmente, sendo o disco com a formação de halo considerado incompatível representado por (--); halo com UFC, parcialmente compatível e ou parcialmente incompatível e representado por (+-) e a não formação de halo, compatibilidade e representado por (++)).

### 3.4.2 Avaliação em meio líquido

#### 3.4.2.1 Produtos fitossanitários misturados ao meio líquido

Os testes foram realizados em frascos erlenmeyer contendo 50 mL de CN, adicionados dos diferentes produtos fitossanitários nas concentrações equivalentes à recomendada pelo fabricante e à metade desta. Em seguida, cada frasco recebeu uma alíquota de 0,5 mL ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) do pré-cultivo, sendo em seguida incubados em agitador horizontal (shaker) ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 150 rpm, 24h). Posteriormente foi retirada de cada frasco uma amostra de 1 mL e submetidas ao método de diluições decimais até as concentrações de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ . Para cada diluição foram inoculadas duas placas, sendo que cada uma recebeu cinco pontos no volume de  $5 \mu\text{L}$ /ponto na superfície do meio de cultura. No tratamento testemunha, a bactéria inoculada foi incubada apenas em meio de cultura.

Após evaporação do excesso de água pelo método descrito anteriormente, as placas foram incubadas ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 18 a 24h). Foi avaliado o efeito dos produtos sobre crescimento vegetativo, quantificando-se o número das UFC/mL em cada ponto, na suspensão que possibilitou a melhor contagem ( $10^{-4}$ ). Para a análise estatística, foram consideradas somente os pontos mais uniformes quanto ao número de UFC/mL.

### 3.5 METABOLIZAÇÃO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS POR BTK

Para verificação da capacidade de metabolização dos produtos fitossanitários pelo Btk, da mesma forma como descrito no item 3.4.1.1, os produtos

fitossanitários foram adicionados proporcionalmente a 50 mL de água destilada esterilizada, para a obtenção das concentrações equivalentes à recomendada, e à metade desta. Em seguida o meio foi inoculado com 0,5 mL ( $7 \times 10^6$  UFC/mL) do pré-cultivo. O processo de incubação em agitador horizontal foi o mesmo adotado no item anterior.

Posteriormente, alíquotas de 1mL foram pipetadas e depois de feitas as diluições decimais, foram inoculadas as suspensões de células nas concentrações de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em placas-de-petri com meio AN, sendo duas placas para cada suspensão. Todos os procedimentos e condições para a inoculação, incubação, avaliação e análise estatística foram os mesmos utilizados no item 3.4.2.

Previamente à incubação do Btk + produtos fitossanitários em agitador horizontal, e ao final do período de 24 horas, mediu-se o pH de cada suspensão avaliada.

### 3.6 EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE ESPOROS DE BTK

As caldas foram preparadas em frascos erlenmeyer contendo 50 mL de água estéril, conforme descrito no item 3.4.1.1. Utilizando-se o produto comercial Dipel PM<sup>®</sup>, foi preparada uma suspensão de  $10^6$  UFC/mL ajustada a partir da diluição de 5g do produto em 20 mL de água destilada, a qual foi inoculada em cada frasco contendo a calda com os produtos fitossanitários nas concentrações pré-estabelecidas. No tratamento testemunha, os esporos foram inoculados apenas em água estéril. Os frascos foram incubados em agitador horizontal (shaker) ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 150 rpm, 2h). Foi pipetado uma amostra de 1 mL de cada frasco, nos tempos de

uma e duas horas respectivamente, a partir das quais procedeu-se uma diluição decimal e inoculação em duas placas-de-petri com meio AN.

Todos os procedimentos e condições para a inoculação, incubação, avaliação e análise estatística foram os mesmos utilizados no item 3.4.2.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Exceto para técnica dos discos impregnados, os experimentos foram realizados segundo delineamento experimental inteiramente casualizado, considerando cada ponto inoculado nas placas como repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e às médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ambos com 5% de significância. Para o teste com esporos foi utilizada a análise de parcelas subdivididas no tempo (Split Plot), sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Quando necessário, os dados foram previamente transformados em  $\sqrt{x+1}$ . Para todas as análises utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2005).

### 3.8 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO

Após realização dos testes e verificação do efeito dos produtos fitossanitários sobre a bactéria, em meio líquido, e a capacidade desta de metabolizar os mesmos, foi selecionado os dois produtos fitossanitários mais compatíveis, para estudo do comportamento durante o período de incubação. Dessa forma, foi estabelecida a curva de crescimento do Btk, quando incubado com os fungicidas epoxiconazole e o azoxystrobin, ambos na metade da concentração

recomendada pelo fabricante. Para tal, foram preparados frascos erlenmeyer com 100mL de CN, aos quais foram adicionados os produtos nas concentrações pré-estabelecidas, sendo a testemunha apenas CN.

Cada frasco recebeu inóculo a partir de um pré-cultivo, até se atingir a absorbância de 0,05 a 600 nm, sendo em seguida, incubados em agitador horizontal (shaker) ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm, 24h). A cada trinta minutos foi coletada uma amostra de 1 mL de cada frasco (tratamento) para a leitura da absorbância. Para a calibragem do espectrofotômetro, foi utilizado como “branco” uma calda do produto na concentração estudada, sem a presença da bactéria. No tratamento testemunha, a bactéria foi inoculada em CN, sendo o “branco” apenas o CN. Quando necessário, as amostras foram diluídas em água destilada para a leitura no espectrofotômetro. Os valores foram registrados e plotados para a construção dos gráficos da curva de crescimento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE CÉLULA DE BTK

#### 4.1.1 Avaliação em meio sólido

##### 4.1.1.1 Produtos fitossanitários misturados ao meio ágar nutriente

Dentre as técnicas testadas para a avaliação do efeito dos fungicidas, esta foi a que apresentou o maior número de produtos fitossanitários considerados incompatíveis ao Btk, sendo que os fungicidas epoxiconazole, tebuconazole, azoxystrobin e fentin hidróxido, independentemente da concentração utilizada, não permitiram o crescimento da bactéria. Apenas carbendazin, na metade da concentração recomendada, permitiu a formação de UFC/mL, significativamente semelhante à testemunha, sendo que na concentração recomendada a média de UFC/mL foi significativamente menor que em ambos tratamentos. Estes resultados discordam dos obtidos por Salerno et al. (1999), que na concentração recomendada verificaram o desenvolvimento das 16 variedades de Bt testadas. A diferença entre os dois resultados está na formulação do produto utilizada, que foi pó molhável para Salerno et al. (1999) e suspensão concentrada neste trabalho.

Entretanto, mesmo que significativamente à testemunha, para carbendazin, na metade da concentração, houve redução de 10,3%, ao passo que para a

concentração recomendada à redução foi de 44,8% , (Tabela 6). Além disso, em todos os tratamentos houve redução da concentração do patógeno inoculado inicialmente nos frascos erlemmeyer em relação à média de UFC/mL obtida após 24 horas de incubação, sendo esta redução de  $5,4 \times 10^6$ ,  $6,6 \times 10^6$  e  $10,6 \times 10^6$ , para testemunha, carbendazin na metade da concentração e carbendazin na concentração recomendada, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Média de UFC/mL ( $\pm$  EP) a partir de células de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubado em caldo nutriente ( $30\pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm, por 24h) e inoculado em ágar nutriente misturado com diferentes concentrações de fungicidas.

Tratamentos	Conc. <sup>1</sup>	Média UFC/mL ( $\times 10^6$ )	% Relação Testemunha <sup>2</sup>	Dif.Inóc.Inic. <sup>4</sup> ( $\times 10^6$ ) UFC/ mL
Testemunha	—	11,6 $\pm$ 0,57 a	—	- 5,4
Carbendazin	½ R	10,4 $\pm$ 0,99 a	- 10,3	- 6,6
Carbendazin	R	6,4 $\pm$ 0,49 b	- 44,8	- 10,6
Epoxiconazole	R	0,0 c	— <sup>3</sup>	—
Epoxiconazole	½ R	0,0 c	—	—
Tebuconazole	R	0,0 c	—	—
Tebuconazole	½ R	0,0 c	—	—
Azoxystrobin	R	0,0 c	—	—
Azoxystrobin	½ R	0,0 c	—	—
Fentin Hidróxido	R	0,0 c	—	—
Fentin Hidróxido	½ R	0,0 c	—	—
CV (%)		17,37		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ )

<sup>1</sup> Concentração dos produtos: R= recomendada, ½ R= metade da recomendada

<sup>2</sup> 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 a redução em relação à testemunha

<sup>3</sup> Cálculo não realizado por não haver formação de UFC/mL

<sup>4</sup> Diferença com relação ao inóculo inicial = [(Concentração inicial de inóculo (UFC/mL) nos frascos erlenmeyer) – (Concentração celular (UFC/mL) após 24h)], sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução.

A redução observada com relação à concentração do inóculo adicionada inicialmente aos frascos erlenmeyer, pode ser justificada pelo método de quantificação inicial da concentração, que foi por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro e a correlação com curva padrão. Nesse método pode ocorrer a interferência de partículas e substâncias, como células mortas íntegras e lisadas, e metabólitos, respectivamente. Esses fatores, assim como as células a serem mensuradas, absorvem luz e elevam os valores de absorbância, resultando, na correlação, um maior número de UFC/mL.

Entretanto, ressalta-se que tal forma de quantificação foi empregada em alguns trabalhos semelhantes, como o desenvolvido por Sutter et al. (1971), que avaliaram a compatibilidade de diferentes concentrações de inseticidas e *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* em meio líquido, mensurando o crescimento bacteriano por meio da leitura da transmitância em espectrofotômetro. Além disso, os autores realizaram a contagem das células por meio da inoculação de diluições seriadas em meio sólido e também com câmara de Petroff-Hausser, sendo que os dados foram semelhantes nos três métodos de quantificação. Morris (1975) também quantificou Bt através correlação de uma curva padrão.

Assim, mesmo com os riscos inerentes à tal técnica de quantificação indireta, os resultados obtidos por Sutter et al. (1971) justificam a utilização da quantificação indireta por correlação adotada neste trabalho.

No caso dos herbicidas, em ambas as concentrações, os efeitos dos produtos fitossanitários sobre Btk foram ainda mais extremos, uma vez que independente da concentração utilizada, nenhum dos produtos fitossanitários possibilitou crescimento bacteriano, sendo, portanto, classificados, segundo tal técnica, como incompatíveis (Tabela 7).

Tabela 7. Média de UFC/mL ( $\pm$  EP) a partir de células de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubado em caldo nutriente ( $30\pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm, por 24h) e inoculado em ágar nutriente misturado com diferentes concentrações de herbicidas.

Tratamentos	Conc. <sup>1</sup>	Média UFC/mL ( $\times 10^6$ )	% Relação Testemunha	Dif.Inóc.Inic. <sup>4</sup> ( $\times 10^6$ ) UFC/ mL
Testemunha	—	11,6 $\pm$ 0,57 a	—	- 5,4
Sulfentrazone	1/2 R	0,0 b	— <sup>2</sup>	—
Sulfentrazone	R	0,0 b	—	—
Fenoxaprop	R	0,0 b	—	—
Fenoxaprop	1/2 R	0,0 b	—	—
Lactofen	R	0,0 b	—	—
Lactofen	1/2 R	0,0 b	—	—
Imazethapyr	R	0,0 b	—	—
Imazethapyr	1/2 R	0,0 b	—	—
Metribuzin	R	0,0 b	—	—
Metribuzin	1/2 R	0,0 b	—	—
CV (%)		9,35		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ )

<sup>1</sup> Concentração dos produtos: R= recomendada, 1/2 R= metade da recomendada

<sup>2</sup> Cálculo não realizado por não haver formação de UFC

<sup>3</sup> Diferença com relação ao inóculo inicial = [(Concentração inicial de inóculo (UFC/mL) nos frascos erlenmeyer) – (Concentração celular (UFC/mL) após 24h)], sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução.

#### 4.1.1.2 Produtos fitossanitários impregnados em discos de papel-filtro

De acordo com essa técnica, a maioria dos produtos fitossanitários foi compatível ao Btk. Com relação aos fungicidas, não houve efeito negativo dos produtos epoxiconazole e azoxystrobin, sendo que independente da concentração utilizada, estes foram classificados como compatíveis ao Btk, pois não houve formação de halo de inibição em nenhum dos discos (Figuras 2 e 3). O mesmo foi observado para o produto carbendazin, porém, somente na metade da concentração recomendada. Por sua vez, carbendazin, na concentração recomendada, apresentou três discos com a formação de halo com algumas UFC, o que possibilita classificá-lo, segundo tal técnica, como compatível ao Btk (Tabela 8).

Por outro lado, o produto tebuconazole, em ambas as concentrações, em todos os discos apresentaram halo de inibição, porém com algumas UFC, sendo coerente classificá-lo como parcialmente compatível ou parcialmente incompatível ao Btk (Tabela 8).

O único produto que apresentou halo de inibição sem a presença de UFC, independentemente da concentração utilizada, foi o fungicida fentin hidróxido, sendo, portanto, classificado como incompatível ao Btk (Figuras 4 e 5).

Tabela 8. Efeito de fungicidas e herbicidas em diferentes concentrações em *B. thuringiensis* var. *kurstaki* após 24 horas de incubação (30±2°C)

Tratamentos	Concentração	Discos									
<b>Fungicidas</b>		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Epoxiconazole	R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Epoxiconazole	½ R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Azoxystrobin	R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Azoxystrobin	½ R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Carbendazin	R	++	++	++	++	+-	++	++	++	+-	+-
Carbendazin	½ R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Tebuconazole	R	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-
Tebuconazole	½ R	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-
Fentin Hidróxido	R	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fentin Hidróxido	½ R	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<b>Herbicidas</b>											
Sulfentrazone	R	+-	+-	+-	++	++	+-	+-	+-	++	++
Sulfentrazone	½ R	++	+-	+-	+-	+-	++	++	++	++	++
Fenoxaprop	R	+-	+-	++	++	++	++	++	++	+-	+-
Fenoxaprop	½ R	++	++	++	++	++	++	++	++	+-	+-
Metribuzin	R	+-	+-	++	++	++	+-	++	++	++	++
Metribuzin	½ R	+-	+-	+-	+-	++	+-	++	++	++	++
Imazethapyr	R	+-	+-	+-	++	++	+-	+-	+-	++	++
Imazethapyr	½ R	+-	+-	+-	+-	++	+-	++	++	++	++
Lactofen	R	++	++	++	+-	+-	+-	+-	+-	++	++
Lactofen	½ R	++	+-	+-	+-	+-	++	++	++	++	++
Testemunha	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ = compatível

+- = parcialmente compatível (presença de halo de inibição com algumas colônias)

-- = incompatível

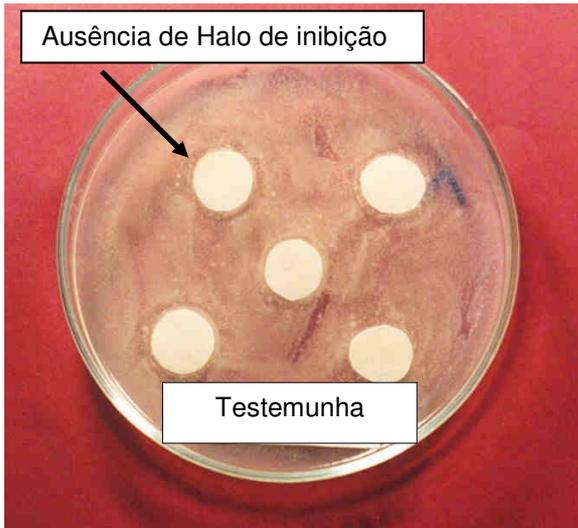


Figura 2. Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio de cultura ao redor de discos de papel-filtro impregnados com água destilada, após incubação ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ , 24h)

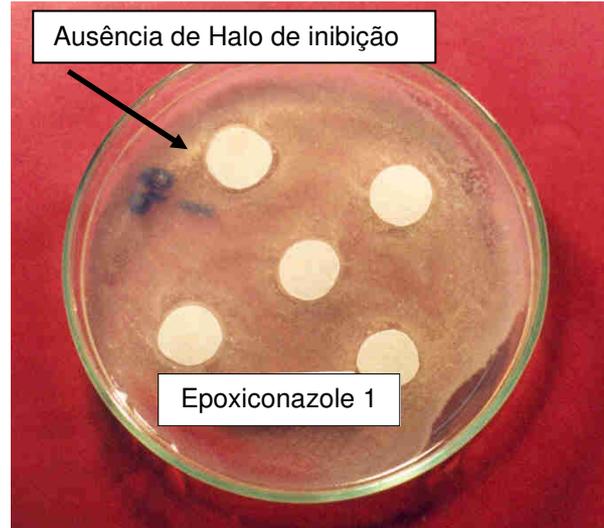


Figura 3. Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio de cultura ao redor de discos de papel – filtro impregnados com epoxiconazole, na concentração recomendada, após incubação ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ , 24h).

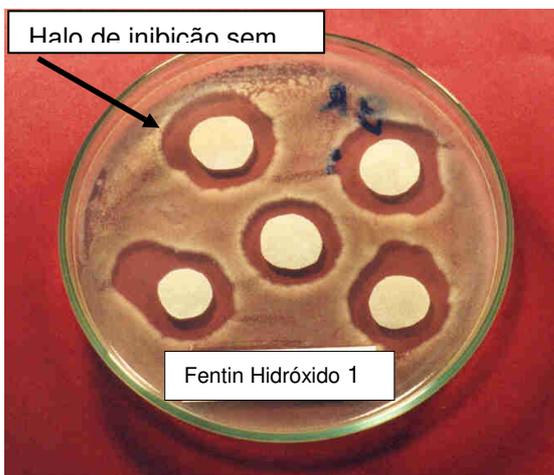


Figura 4. Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio de cultura contendo halos de inibição formados pelo fungicida fentin hidróxido, na concentração recomenda, após incubação ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ , 24h).

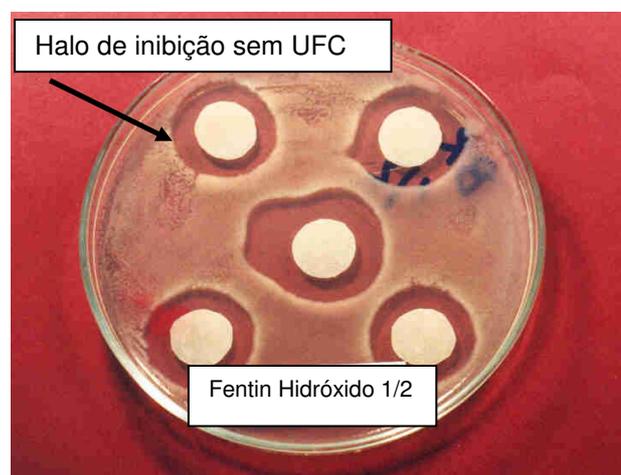


Figura 5. Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio de cultura contendo halos de inibição formados pelo fungicida fentin hidróxido, na metade da concentração recomendada, após incubação ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ , 24h).

Com relação aos herbicidas, nessa técnica, nenhum apresentou total incompatibilidade com Btk, sendo que sulfentrazone e imazethapyr, na concentração recomendada, apresentaram a maioria dos discos com a formação de halos com a presença de UFC (Tabela 8, Figura 6).

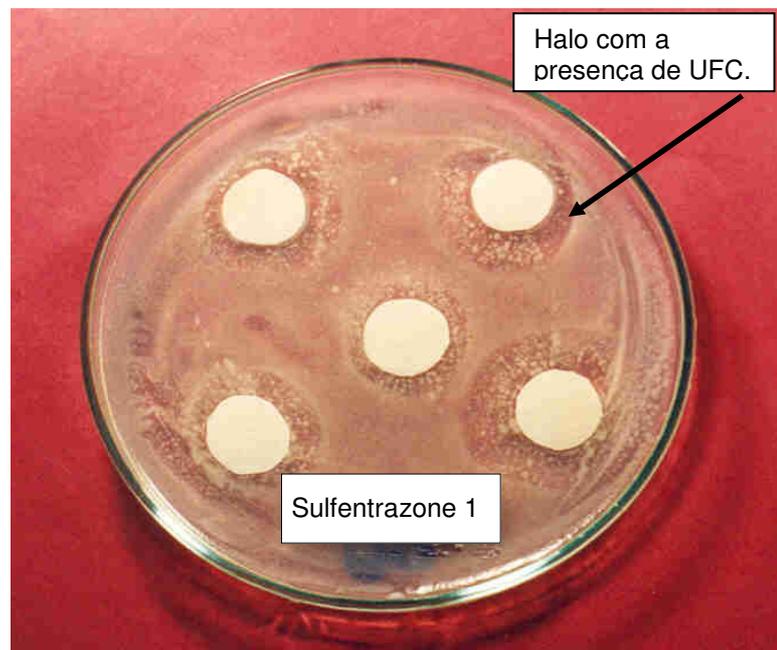


Figura 6. Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstak* em meio de cultura contendo o halo de inibição formado pelo herbicida sulfentrazone, na concentração recomendada, após incubação ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ , 24h).

Nos tratamentos com metribuzin e imazethapyr, na metade das concentrações recomendadas, e lactofen, na concentração recomendada, cinco discos não apresentaram halos de inibição, enquanto que os outros cinco apresentaram, contudo com a presença de algumas UFC.

Sulfentrazone e lactofen, na metade da concentração recomendada, e fenoxaprop, na concentração recomendada, embora possam ser classificados como

compatíveis com Btk, todos apresentaram quatro discos com a formação de halos com a presença de algumas UFC (Tabela 8).

Por sua vez, fenoxaprop, na metade da concentração recomendada, e metribuzin, na concentração recomendada, foram os herbicidas mais compatíveis com Btk, pois foram os tratamentos que mais se assemelharam à testemunha, com apenas dois e três discos apresentando halo com UFC, respectivamente (Tabela 8).

Os resultados obtidos com os herbicidas, através da técnica de discos impregnados, indicam que a concentração utilizada influencia na compatibilidade, pois com todos os produtos, exceto o metribuzin, os tratamentos com metade da concentração recomendada apresentaram mais discos compatíveis do que os tratamentos nas concentrações recomendadas (Tabela 8).

Em trabalho de compatibilidade entre Bt e produtos fitossanitários, utilizando-se de técnica semelhante, Dougherty et al. (1971) verificaram variação de compatibilidade com referência à categoria do produto fitossanitário (fungicida e herbicida), sendo que os inseticidas foram, na maioria, classificados como compatíveis e os herbicidas como incompatíveis.

Da mesma forma, Jimenez et al. (1989), em testes de compatibilidade com inseticidas, e utilizando-se da mesma técnica, verificaram variação quanto à concentração de inseticida testada, sendo que os tratamentos com a metade da concentração foram classificados como compatíveis ao Bt.

Em razão dos resultados obtidos, e da característica da técnica de avaliação, ressalta-se que uma discussão mais aprofundada sobre os efeitos dos produtos fitossanitários indicados por meio de tal técnica será realizada mais adiante, no item referente à comparação entre as técnicas de avaliação.

#### 4.1.2 Avaliação em meio líquido

##### 4.1.2.1 Produtos fitossanitários misturados ao meio líquido

De maneira geral, a maioria dos fungicidas foi compatível ao Btk, sendo que em alguns casos houve estímulo para o crescimento da bactéria. O produto epoxiconazole, na metade da concentração recomendada, apresentou média de UFC/mL significativamente superior aos demais tratamentos, com crescimento de 333,8%, em relação à testemunha (Figuras 7 e 8, Tabela 9).

Por sua vez, azoxystrobin, na metade da concentração recomendada, e epoxiconazole na concentração recomendada, também apresentaram médias de UFC/mL significativamente iguais entre si, porém, com crescimento de 143,4% e 107,3% respectivamente, em relação à testemunha (Tabela 9).

Por outro lado, carbendazin, em ambas as concentrações, e azoxystrobin, na concentração recomendada, apresentaram média de UFC/mL significativamente abaixo à da testemunha, com redução variando entre 54,8% e 87,5% em relação à testemunha. Porém, quando tais médias são comparadas à concentração do inóculo adicionada nos frascos erlenmeyer antes da incubação, verifica-se que houve crescimento bacteriano. Tal fato evidencia, assim como no experimento de discos impregnados com produtos fitossanitários, uma possível seleção de populações resistentes de bactérias, pois a população inoculada se manteve e cresceu, porém não como no tratamento testemunha (Tabela 9). Tal resistência pode se atribuir à capacidade de metabolizar o produto ou algum de seus componentes, apresentada por indivíduos da população.

Somente os produtos tebuconazole e fentin hidróxido, em ambas as concentrações, foram classificados como totalmente incompatíveis, sem a presença de UFC/mL (Tabela 9).

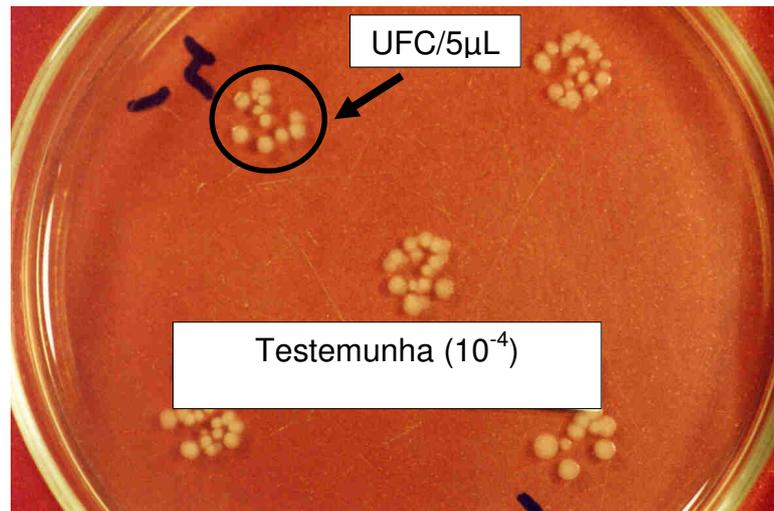


Figura 7. UFC/5µL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubados em ágar nutriente ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ , 24h), após incubação ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$  e 150 rpm, 24h) em caldo nutriente.

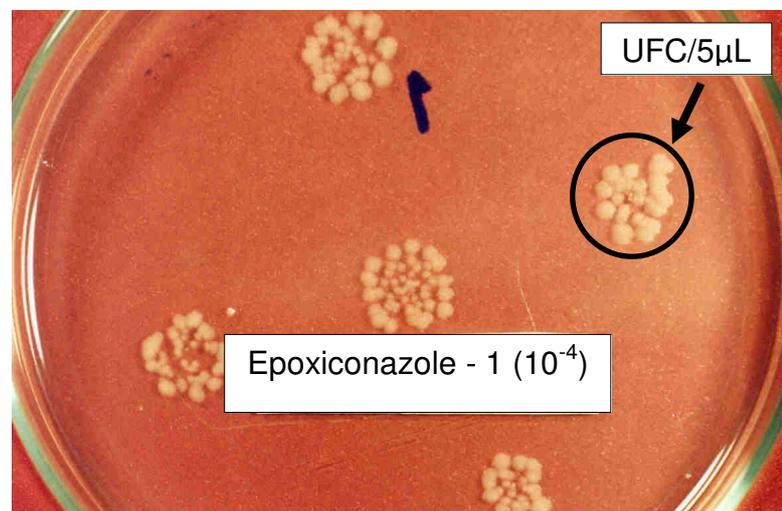


Figura 8. UFC/5µL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubados em ágar nutriente ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ , 24h), após incubação ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$  e 150 rpm, 24h) em meio caldo nutriente adicionado de epoxiconazole, na concentração recomendada.

Tabela 9. Média de UFC/mL ( $\pm$  EP) a partir de células *B. thuringiensis* var. *kurstaki* após incubação em caldo nutriente ( $30\pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm, 24h) com fungicidas em diferentes concentrações.

Tratamentos	Conc. <sup>1</sup>	Média UFC/mL ( $\times 10^5$ )	% Relação Testemunha <sup>2</sup>	Dif.Inóc.Inic. <sup>4</sup> ( $\times 10^5$ ) UFC/ mL
Epoxiconazole	½ R	1180 $\pm$ 2,32 a	+333,8	+ 1178
Azoxystrobin	½ R	662 $\pm$ 1,39 b	+143,4	+ 660
Epoxiconazole	R	564 $\pm$ 2,24 b	+107,3	+ 562
Testemunha	--	272 $\pm$ 1,25 c	—	+ 270
Carbendazin	½ R	123 $\pm$ 0,59 d	- 54,8	+ 121
Carbendazin	R	63 $\pm$ 0,34 e	- 76,9	+ 61
Azoxystrobin	R	34 $\pm$ 0,18 e	- 87,5	+ 32
Tebuconazole	R	0,0 f	— <sup>3</sup>	—
Tebuconazole	½ R	0,0 f	—	—
Fentin Hydroxyde	R	0,0 f	—	—
Fentin Hydroxyde	½ R	0,0 f	—	—
CV (%)		9,49		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

<sup>1</sup> Concentração dos produtos: R= recomendada, ½ R= metade da recomendada

<sup>2</sup> 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 a redução em relação à testemunha

<sup>3</sup> Cálculo não realizado por não haver formação de UFC

<sup>4</sup> Diferença com relação ao inóculo inicial = [(Concentração inicial de inóculo (UFC/mL) nos frascos erlenmeyer) – (Concentração celular (UFC/mL) após 24h)], sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução.

Com relação aos herbicidas, nenhum produto apresentou média de UFC/mL superior à testemunha. Sulfentrazone, em ambas as concentrações, foi o único produto que apresentou formação de UFC/mL, porém, com respectiva redução de 60,3% e 77,9% para a metade da concentração e concentração recomendada, quando comparados à testemunha. Entretanto, salienta-se que da mesma forma como a observada para os fungicidas, quando as médias de UFC/mL são comparadas à concentração do inóculo adicionada inicialmente nos frascos erlenmeyer, verifica-se que houve crescimento bacteriano (Tabela 10).

Tabela 10. Média de UFC/mL ( $\pm$  EP) a partir de células de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* após incubação em caldo nutriente ( $30\pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm, 24h) com herbicidas em diferentes concentrações.

Tratamentos	Conc. <sup>1</sup>	Média UFC/mL ( $\times 10^5$ )	% Relação Testemunha <sup>2</sup>	Dif.Inóc.Inic. <sup>4</sup> ( $\times 10^5$ ) UFC/ mL
Testemunha	—	272 $\pm$ 1,25 a	—	+ 270
Sulfentrazone	½ R	108 $\pm$ 0,48 b	- 60,3	+ 106
Sulfentrazone	R	60 $\pm$ 0,38 c	- 77,9	+ 58
Fenoxaprop	R	0,0 d	— <sup>3</sup>	—
Fenoxaprop	½ R	0,0 d	—	—
Lactofen	R	0,0 d	—	—
Lactofen	½ R	0,0 d	—	—
Metribuzin	R	0,0 d	—	—
Metribuzin	½ R	0,0 d	—	—
Imazethapyr	R	0,0 d	—	—
Imazethapyr	½ R	0,0 d	—	—
CV (%)		11,35		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

<sup>1</sup> Concentração dos produtos: R= recomendada, ½ R= metade da recomendada

<sup>2</sup> 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 a redução em relação à testemunha

<sup>3</sup> Cálculo não realizado por não haver formação de UFC

<sup>4</sup> Diferença com relação ao inóculo inicial = [(Concentração inicial de inóculo (UFC/mL) nos frascos erlenmeyer) – (Concentração celular (UFC/mL) após 24h)], sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução.

## 4.2 METABOLIZAÇÃO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS POR BTK

Verificou-se a capacidade de metabolização de Btk para alguns produtos fitossanitários, sendo que esta capacidade variou conforme a concentração utilizada do produto. No caso dos fungicidas, nenhum dos tratamentos diferiu significativamente da testemunha. Contudo, é importante salientar que epoxiconazole, em ambas as concentrações, e azoxystrobin e carbendazin, na metade da concentração recomendada, apresentaram médias de UFC/mL superiores à testemunha, com crescimento variando de 35% a 100%, quando comparados à testemunha (Tabela 11).

Além disso, é importante destacar que, da mesma forma como para azoxystrobin e carbendazin, na metade da concentração, e carbendazin, na concentração recomendada, o desenvolvimento das UFC/mL se deu normalmente, sem alterações morfológicas visíveis, assemelhando-se a testemunha (Figuras 9 e 10).

Por outro lado, nos demais tratamentos, exceto para carbendazin na concentração recomendada, houve redução na média de UFC/mL quando comparados à testemunha, chegando a 65% no caso de tebuconazole, na metade da concentração recomendada (Tabela 11).

Também é importante salientar que ao comparar-se à média de UFC/mL obtida na contagem das placas com a média de UFC/mL inoculada inicialmente nos frascos Erlenmeyer, verifica-se que houve crescimento populacional em todos os tratamentos, com exceção do produto tebuconazole na metade da concentração recomendada (Tabela 11).

De maneira geral, em todos os tratamentos com os fungicidas, houve um aumento do pH do meio de cultura, porém sem atingir níveis que poderiam danificar a atividade metabólica da célula (Tabela 11).

Tabela 11. Média de UFC/mL ( $\pm$  EP) a partir de células de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* após incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm, 24h) com água e fungicidas em diferentes concentrações e pH inicial e final.

Tratamento	Conc. <sup>1</sup>	Média UFC/mL ( $\times 10^4$ )	% Relação Testem. <sup>2</sup>	Dif.Inóc.Inic. <sup>3</sup> ( $\times 10^4$ ) UFC/ mL	pH	
					0 h	24 h
Testemunha	—	34 $\pm$ 0,56 abc	—	+ 20	6,65	7,50
Epoxiconazole	R	68 $\pm$ 0,37 a	+ 100	+ 54	6,80	7,65
Azoxystrobin	½ R	52 $\pm$ 0,52 ab	+ 53	+ 38	6,67	7,63
Carbendazin	½ R	50 $\pm$ 0,75 abc	+ 47	+ 36	6,75	7,66
Epoxiconazole	½ R	46 $\pm$ 0,58 abc	+ 35	+ 32	6,70	7,68
Carbendazin	R	34 $\pm$ 0,30 abc	0	+20	6,85	7,70
Azoxystrobin	R	32 $\pm$ 0,30 abc	- 6	+ 18	6,85	7,68
Fentin Hidróxido	R	22 $\pm$ 0,23 bc	- 35	+ 8	7,36	7,75
Fentin Hidróxido	½ R	18 $\pm$ 0,38 bc	- 47	+ 4	7,03	7,75
Tebuconazole	R	16 $\pm$ 0,25 bc	- 53	+ 2	6,15	7,28
Tebuconazole	½ R	12 $\pm$ 0,22 c	- 65	- 2	6,40	7,28
CV (%)		49,32				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ )

<sup>1</sup> Concentração dos produtos: R= recomendada, ½ R= metade da recomendada

<sup>2</sup> 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 a redução em relação à testemunha

<sup>3</sup> Diferença com relação ao inóculo inicial = [(Concentração inicial de inoculo (UFC/mL) nos frascos erlenmeyer) – (Concentração celular (UFC/mL) após 24h)], sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução.

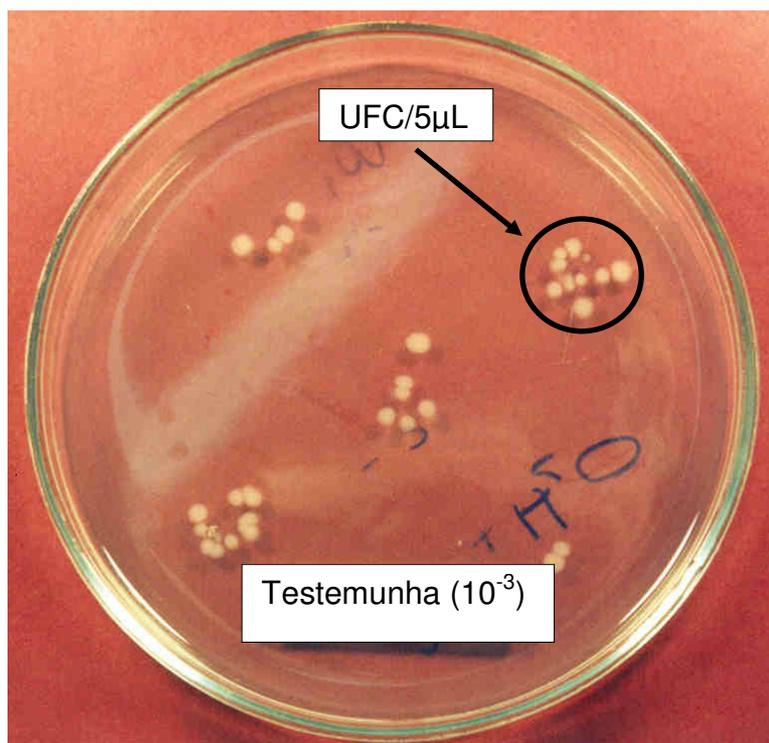


Figura 9. UFC/5µL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubados em meio de cultura (30°C±2, 24h), após incubação (30°C±2 e 150 rpm, 24h) em água destilada.

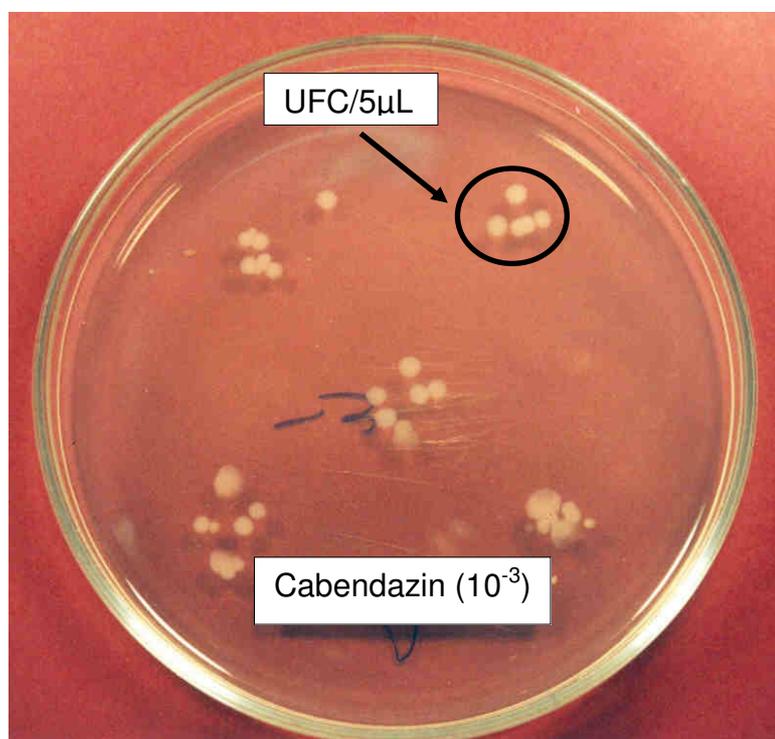


Figura 10. UFC/5µL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incubados em meio de cultura (30°C±2, 24h), após incubação (30°C±2 e 150 rpm, 24h) em água destilada com carbendazin, na concentração recomendada.

Com relação aos herbicidas, somente sulfentrazone, na concentração recomendada obteve média de UFC/mL significativamente superior à testemunha, com crescimento de 129,4%. Porém, para sulfentrazone e imazethapyr, na metade da concentração, as médias de UFC/mL foram superiores à testemunha com crescimento de 82,3% e 23,5%, respectivamente. Por outro lado, nos demais tratamentos verificaram-se redução das médias de UFC, quando comparadas à testemunha, sendo que esta redução de 35,3% a 88,2% (Tabela 12).

Fenoxaprop, na concentração recomendada, foi o produto que mais afetou Btk e o único que reduziu a população bacteriana quando comparado à concentração adicionada inicialmente nos frascos erlenmeyer, sendo esta redução de  $12 \times 10^4$  UFC/mL. Entretanto, nos demais tratamentos, assim como observado para os fungicidas, verificou-se com os herbicidas, que houve crescimento populacional com relação à concentração inoculada nos frascos erlenmeyer e o obtido na contagem das placas, variando de  $2 \times 10^4$  a  $64 \times 10^4$  UFC/mL (Tabela 12).

Além disso, um outro fator que pode estar relacionado às reduções observadas para lactofen e fenoxaprop, em ambas as concentrações, é o pH, sendo que ambos os produtos apresentaram os menores valores (Tabela 12). De acordo com Moraes et al. (1998), o pH inicial ideal seria em torno de 7,2 a 7,6; uma vez que no início da fermentação tem-se um queda do pH.

Tabela 12. Médias de UFC/mL ( $\pm$  EP) a partir de células *B. thuringiensis* var. *kurstaki* após incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm, 24h) com água e herbicidas em diferentes concentrações e pH inicial e final.

Tratamento	Conc. <sup>1</sup>	Média UFC/mL ( $\times 10^4$ )	% Rel. Testem. <sup>2</sup>	Dif.Inóc.Inic. <sup>3</sup> ( $\times 10^4$ ) UFC/ mL	pH	
					0 h	24 h
Testemunha	--	34 $\pm$ 0,56 bcd	—	+20	6,65	7,50
Sulfentrazone	R	78 $\pm$ 0,50 a	+ 129,4	+ 64	7,81	7,25
Sulfentrazone	½ R	62 $\pm$ 0,48 ab	+82,3	+ 48	7,53	7,70
Imazethapyr	½ R	42 $\pm$ 0,50 abc	+ 23,5	+ 28	6,45	7,52
Metribuzin	R	28 $\pm$ 0,60 bcd	- 17,6	+ 14	6,90	7,68
Imazethapyr	R	22 $\pm$ 0,43 cd	- 35,3	+ 8	6,60	7,55
Metribuzin	½ R	22 $\pm$ 0,38 cd	- 35,3	+ 8	6,66	7,66
Lactofen	½ R	18 $\pm$ 0,23 cd	- 47,0	+ 4	4,78	7,16
Fenoxaprop	½ R	16 $\pm$ 0,25 cd	- 52,9	+ 2	5,77	6,20
Lactofen	R	16 $\pm$ 0,20 cd	- 52,9	+ 2	4,57	6,50
Fenoxaprop	R	2 $\pm$ 0,13 d	- 88,2	- 12	5,65	7,52
CV (%)		25,78				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

<sup>1</sup> Concentração dos produtos: R= recomendada, ½ R= metade da recomendada

<sup>2</sup> 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 a redução em relação à testemunha

<sup>3</sup> Diferença com relação ao inóculo inicial = [(Concentração inicial de inoculo (UFC/mL) nos frascos erlenmeyer) – (Concentração celular (UFC/mL) após 24h)], sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução.

Diante dos resultados verificados para ambas as classes de produtos fitossanitários, devido ao aumento da população bacteriana em relação ao inóculo inicial, pode-se inferir que os produtos fitossanitários em si e/ou alguma substância presente nestes, pode ser utilizada como nutriente por Btk, sendo, portanto metabolizada e propiciando a manutenção e em alguns casos, o aumento da população bacteriana.

### 4.3 EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE ESPOROS DE BTK

Diferentemente dos demais testes realizados com a célula, a maioria dos produtos fitossanitários no teste de compatibilidade com esporos pode ser classificada como compatível. Além disso, em todos os tratamentos as médias de UFC foram bem superiores às observadas nos outros experimentos (Tabela 13).

Embora tenha apresentado um dos piores resultados nos testes anteriores, tebuconazole, na concentração recomendada, apresentou as maiores médias, em ambos os tempos avaliados, diferindo significativamente da testemunha no tempo de duas horas, sendo, portanto, um produto que estimula a germinação de esporos de Btk. Por outro lado, fentin hidróxido foi o produto que apresentou a maior redução na germinação de esporos, em ambos os tempos e ambas as concentrações, sendo esta de 97,1% e 96,8% no tempo de uma hora, para a concentração recomendada e a metade desta, respectivamente, e 99,1% e 97,9% no tempo de duas horas, para a concentração recomendada e a metade desta, respectivamente. Todos os demais tratamentos apresentaram médias de UFC/mL significativamente iguais à testemunha no tempo de uma hora (Tabela 13).

De maneira geral, na maioria dos tratamentos houve tendência de redução da germinação dos esporos com o aumento do tempo de contato destes com os produtos fitossanitários. Porém, verificou-se diferença significativa apenas para carbendazin, na metade da concentração recomendada, e fentin hidróxido na concentração recomendada (Tabela 13).

Por outro lado, tebuconazole e azoxystrobin na concentração recomendada, azoxystrobin, na metade da concentração e a testemunha apresentaram um aumento na germinação ao longo do tempo. Porém, houve diferença significativa

apenas para azoxystrobin, na metade da concentração recomendada, e tebuconazole, na concentração recomendada. Entretanto, exceto para tebuconazole, na concentração recomendada, mesmo com um aumento significativo na média de germinação de esporos no tempo de duas horas, verificou-se redução na média de germinação com relação à testemunha. Para azoxystrobin, em ambas as concentrações a redução variou de 4,4% a 5,03% (Tabela 13).

Tabela 13. Média de UFC/mL ( $\pm$  EP) a partir de esporos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* com 1 e 2 horas de incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm) com água e fungicidas em diferentes concentrações.

Tratamento	Conc. <sup>1</sup>	Germinação (1h)		Germinação (2h)	
		UFC/mL ( $\times 10^5$ )	% Relação Testem. <sup>2</sup>	UFC/mL ( $\times 10^5$ )	% Relação Testem. <sup>2</sup>
Testemunha		618 $\pm$ 0,51 Aab	—	676 $\pm$ 1,06 Ab	—
Tebuconazole	R	738 $\pm$ 1,08 Ba	+19,40	792 $\pm$ 1,95 Aa	+17,16
Epoxiconazole	½ R	664 $\pm$ 0,68 Aab	+ 7,44	662 $\pm$ 1,67 Ab	- 2,07
Carbendazin	R	650 $\pm$ 1,39 Aab	+ 5,18	646 $\pm$ 0,42 Ab	- 4,44
Tebuconazole	½ R	650 $\pm$ 1,39 Aab	+ 5,18	622 $\pm$ 1,14 Ab	- 7,99
Carbendazin	½ R	646 $\pm$ 0,80 Aab	+ 4,53	526 $\pm$ 0,86 Bb	- 22,19
Azoxystrobin	R	638 $\pm$ 0,71 Aab	+ 3,24	642 $\pm$ 1,98 Ab	- 5,03
Epoxiconazole	R	636 $\pm$ 0,79 Aab	+ 2,91	632 $\pm$ 0,48 Ab	- 6,51
Azoxystrobin	½ R	608 $\pm$ 0,78 Bb	- 1,62	646 $\pm$ 1,39 Ab	- 4,44
Fentin Hidróxido	½ R	20 $\pm$ 0,42 Ac	- 96,80	14 $\pm$ 0,28 Ac	- 97,93
Fentin Hidróxido	R	18 $\pm$ 0,20 Ac	- 97,10	6 $\pm$ 0,18 Bc	- 99,11
CV (%)		6,03		5,18	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ )

<sup>1</sup> Concentração dos produtos: R= recomendada, ½ R= metade da recomendada

<sup>2</sup> Relação com a testemunha = [(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 a redução

Na avaliação com herbicidas observou-se que todos os produtos, independentemente da concentração, foram classificados como compatíveis em relação aos esporos, pois não diferiram significativamente da respectiva testemunha quanto à redução da média de UFC/mL. Entretanto, salienta-se que os produtos fenoxaprop, lactofen, metribuzin, sulfentrazone e imazethapyr, na concentração recomendada, estimularam a germinação de esporos, no tempo de uma hora, com diferença significativa apenas para fenoxaprop (Tabela 14).

Ressalta-se ainda, que lactofen e imazethapyr, na metade da concentração recomendada, embora não tenham diferido significativamente, a média de germinação foi superior à testemunha no tempo de uma hora (Tabela 14).

Os tratamentos com os produtos fitossanitários, na concentração recomendada, foram os que apresentaram as maiores médias de UFC/mL, no tempo de uma hora, o que denota estímulo a germinação dos esporos. Porém, assim como verificado para os fungicidas, o aumento no tempo de incubação dos esporos de Btk com a maioria dos herbicidas tem influência negativa na germinação.

Assim, verificou-se que no tempo de duas horas, em todos os tratamentos, com exceção para metribuzin, na concentração recomendada, houve redução na porcentagem de germinação, porém, sem diferença significativa. Contudo, fenoxaprop e lactofen, ambos na concentração recomendada, apresentaram diferença significativa de redução da germinação dos esporos em relação ao tempo de incubação (Tabela 14).

Entretanto, ressalta-se que diferentemente do observado com os fungicidas, no tempo de duas horas, vários herbicidas apresentaram aumento no número de UFC/mL, sendo estes sulfentrazone, fenoxaprop, metribuzin e lactofen, todos na metade da concentração recomendada. Todavia, salienta-se que somente os

herbicidas fenoxaprop e metribuzin, na metade da concentração recomendada, apresentaram médias significativamente diferentes com relação ao tempo de incubação (Tabela 14).

Tabela 14. Média de UFC/mL ( $\pm$  DP) a partir de esporos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* com 1 e 2 horas de incubação ( $30\pm 2^\circ\text{C}$  e 150 rpm) com água e herbicidas em diferentes concentrações.

Tratamento	Conc. <sup>1</sup>	Germinação (1h)		Germinação (2h)	
		UFC/mL ( $\times 10^5$ )	Relação Testem. <sup>2</sup>	UFC/mL ( $\times 10^5$ )	Relação Testem. <sup>2</sup>
Testemunha	--	618 $\pm$ 0,51 Abcd	—	676 $\pm$ 1,06 Aab	—
Fenoxaprop	R	742 $\pm$ 1,27 Aa	+ 20,06	634 $\pm$ 0,42 Bb	- 6,21
Lactofen	R	708 $\pm$ 0,84Aab	+ 14,56	628 $\pm$ 0,43 Bb	- 7,10
Metribuzin	R	688 $\pm$ 2,36 Aab	+ 11,33	738 $\pm$ 1,32 Aa	+ 9,17
Sulfentrazone	R	682 $\pm$ 1,01Aab	+ 10,36	634 $\pm$ 1,29 Ab	- 6,21
Imazethapyr	R	662 $\pm$ 1,50 Aab	+7,12	642 $\pm$ 0,74 Aab	- 5,03
Lactofen	½ R	640 $\pm$ 1,38Abc	+ 3,56	662 $\pm$ 0,83Aab	- 2,07
Imazethapyr	½ R	640 $\pm$ 1,25Abc	+ 3,56	640 $\pm$ 0,77Aab	- 5,32
Sulfentrazone	½ R	614 $\pm$ 0,68Abcd	- 0,65	632 $\pm$ 0,48Ab	- 6,51
Fenoxaprop	½ R	566 $\pm$ 1,01Bcd	- 8,41	642 $\pm$ 0,63Aab	- 5,03
Metribuzin Se	½ R	532 $\pm$ 1,19Bd	- 13,92	618 $\pm$ 1,01Ab	- 8,58
CV (%)		3,18		4,27	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ )

<sup>1</sup> Concentração dos produtos: R= recomendada, ½ R= metade da recomendada

<sup>2</sup> Relação com a testemunha = [(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 a redução

Nessa técnica de avaliação, ao se comparar os herbicidas e fungicidas, verifica-se que a maioria dos herbicidas são compatíveis aos esporos do Btk, no tempo de uma hora, uma vez que a percentagem de aumento de UFC/mL com relação à testemunha foi maior para os mesmos. Além disso, o maior percentual de redução da média de UFC/mL para os herbicidas, nos tempos de uma e duas horas, foi de 13,9% e 8,6% para metribuzin, na metade da concentração recomendada, ao passo que no tratamento com o fungicida fentin hidróxido, a redução variou de 96,8% a 99,1% (Tabelas 13 e 14).

#### 4.4 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO

Ao cultivar o Btk em caldo nutriente adicionado de produtos fitossanitários e caldo nutriente sem os produtos (testemunha), foi constatada uma variação no comportamento do patógeno entre os tratamentos e durante o período de incubação. Para a testemunha a fase de adaptação (*fase lag*) foi mais curta quando comparada aos outros dois tratamentos, sendo que o crescimento exponencial (*fase log*) ocorreu da segunda até a sexta hora de incubação (Figura 11).

Por outro lado, na presença de azoxystrobin, a *fase lag* foi maior, com início da *fase log* por volta da quarta hora de incubação, perdurando até o início da nona hora (Figura 12).

Verificou-se que a velocidade de crescimento calculada da *fase log* também variou entre os tratamentos, sendo que na testemunha, esta atingiu  $0,72 \text{ h}^{-1}$  ao passo que na presença de azoxystrobin a velocidade foi de  $1,11 \text{ h}^{-1}$  (Figuras 11 e 12).

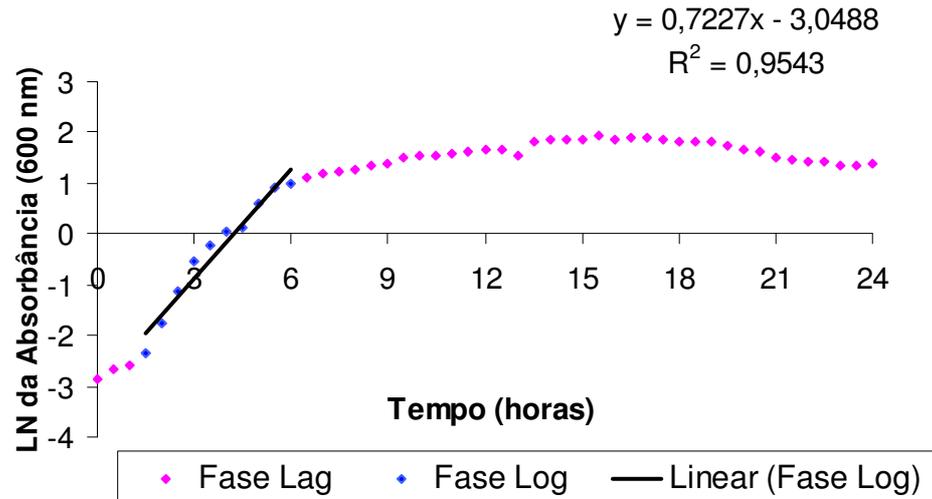


Figura 11. Curva de crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio caldo nutriente, incubado ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$  e 150 rpm, 24h) e equação da reta obtida na fase exponencial de crescimento.

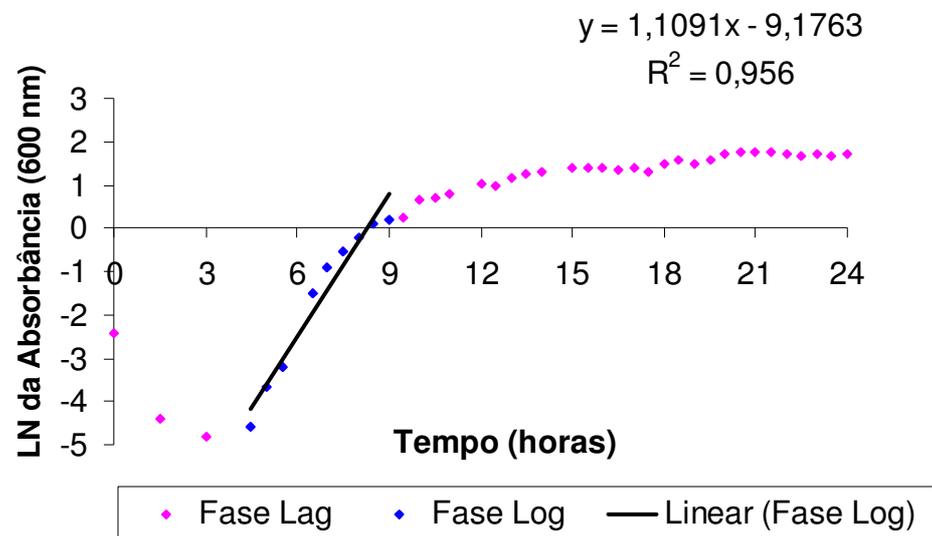


Figura 12. Curva de crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio caldo nutriente com azoxystrobin, na concentração recomendada, incubado ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$  e 150 rpm, 24h) e equação da reta obtida na fase exponencial de crescimento.

Os resultados sugerem que a bactéria necessita de um maior tempo de adaptação na presença de azoxystrobin para que possa, a partir de então, iniciar o processo de metabolização. No tratamento testemunha, a *fase lag* foi mais curta porque as células já estavam adaptadas ao caldo nutriente, uma vez que o inóculo foi pré-cultivado nesse meio. De acordo com Madigan et al. (2002), a *fase lag* é comum ao adicionar a população de bactéria a qualquer meio de cultura. Ainda conforme os autores, logo que são inoculadas em um meio de cultura, as células selecionam os nutrientes do ambiente para a síntese de enzimas e coenzimas, essenciais para processo de divisão celular.

Nesse sentido, infere-se que após esse período de preparação do aparato enzimático e com maior disponibilidade de nutrientes, o crescimento se dá de forma mais acelerada, o que justifica a maior quantidade de UFC/mL na presença do produto, como verificado nas técnicas de avaliação em meio líquido e metabolização apresentados nos itens 4.1.2.1 e 4.2 (Tabelas 9 e 11).

Além disso, pode-se inferir que alguma substância ou molécula constituinte do produto fitossanitário, ou o próprio produto em si, estimule de alguma forma o processo de divisão celular.

O mesmo comportamento de estímulo no crescimento de Btk foi verificado com epoxiconazole, porém, a absorbância teve uma variação, oscilando entre números negativos, devido provavelmente a uma interferência de algum componente do produto fitossanitário na leitura. Assim, o comportamento foi diferente do verificado nos outros dois tratamentos, onde se evidencia dois momentos de crescimento acelerado, além da presença de pontos discrepantes (Figura 13).

Certamente o produto fitossanitário em si e/ou algum componente deste, ou até mesmo um possível metabólito resultante da degradação do produto pela

bactéria possa ter interferido no processo de leitura, dando um resultado de absorvância negativo.

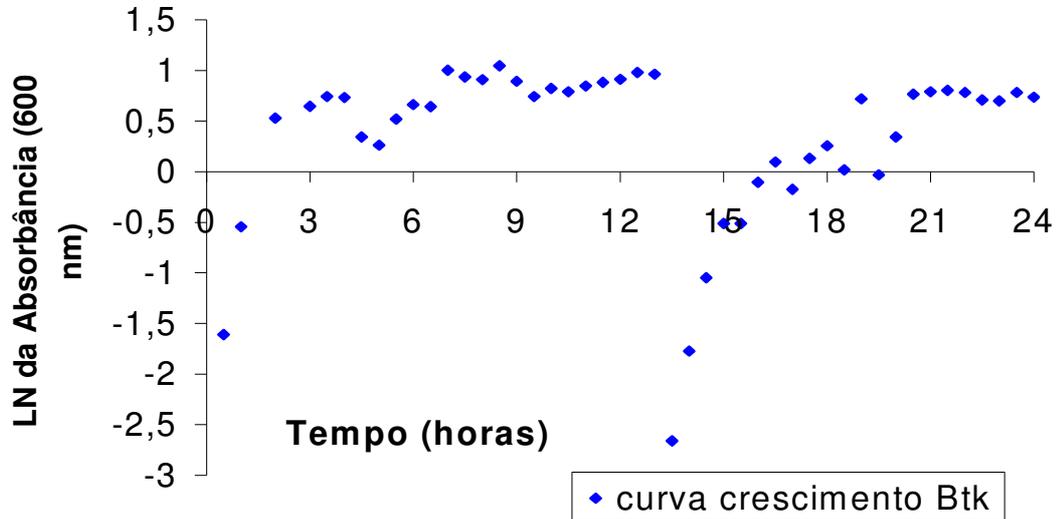


Figura 13. Curva de crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em caldo nutriente com epoxiconazole, na concentração recomendada, incubado ( $30^{\circ}\text{C}\pm 2$  e 150 rpm, 24h).

O produto epoxiconazole é classificado como altamente tóxico, e de periculosidade ambiental do grupo (II), sendo que age como inibidor da biosíntese do ergosterol, um lipídio constituinte da membrana de fungos, e também no transporte de elétrons na mitocôndria. Assim, a compatibilidade com Btk pode ser justificada pela especificidade do modo de ação do produto e as características do patógeno. No caso, trata-se de um procarionto, o qual é destituído de organelas citoplasmáticas, como a mitocôndria, além de possuir um arranjo estrutural molecular de parede celular diferenciado dos fungos, ao qual o produto é direcionado.

Além disso, como já mencionado para azoxystrobin, o produto epoxiconazole pode conter moléculas, ou substâncias que de alguma forma estimulam o processo de divisão celular.

#### 4.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE CÉLULA DE BTK E AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE ESPOROS DE BTK

Como pode ser verificado, o efeito dos produtos fitossanitários sobre Btk variou conforme a técnica de avaliação empregada, a categoria dos produtos fitossanitários testados, o estágio ou fase do ciclo de vida do patógeno (célula e esporo), bem como, as concentrações dos produtos fitossanitários utilizados.

A maioria dos trabalhos referentes à compatibilidade entre produtos fitossanitários e entomopatógenos é desenvolvida *in vitro*, cuja vantagem é o fato de propiciar a exposição máxima dos entomopatógenos aos produtos avaliados. Assim, detectada a inocuidade de um produto em condições de laboratório, sua aplicação em campo é praticamente garantida com relação ao efeito testado em laboratório. Contudo, a toxicidade em laboratório não significa que o mesmo se refletirá em campo (Alves et al. 1998).

O desenvolvimento e a utilização da técnica de avaliação por meio de discos de papel impregnados com substâncias se deu na década de 1940, com a finalidade de se obter uma maior praticidade na avaliação dos efeitos de antibióticos sobre os microrganismos. Nesse sentido, de acordo com Koneman et al. (2001), quando o disco impregnado entra em contato com a superfície úmida do meio de cultura, a água é absorvida para o papel numa velocidade maior do que a difusão da substância no meio circundante. Assim, a velocidade de extração da substância para fora do papel é maior do que a difusão desta para o meio de cultura, de tal forma que a concentração do produto, imediatamente adjacente ao disco, pode exceder à do próprio disco.

Ainda de acordo com Koneman et al. (2001), à medida que aumenta a distância em relação ao disco, há uma redução logarítmica da concentração da substância, de forma que quando é alcançada uma massa celular bacteriana crítica, a atividade inibitória é ultrapassada e aparece o crescimento bacteriano.

De acordo com a técnica de impregnação de produtos nos discos de papel, a maioria dos produtos testados foi considerada compatível, uma vez que apenas o produto fentin hidróxido apresentou a formação de um grande halo de inibição (Figuras 3 e 4, Tabela 8).

Resultado semelhante foi observado por Dougherty et al. (1971), que em testes de compatibilidade de herbicidas e fungicidas com Bt, observaram variação entre as categorias de produtos fitossanitários testados, sendo os inseticidas em sua maioria compatíveis.

Como já mencionado, os resultados obtidos com os herbicidas por meio da técnica de impregnação de produtos em papel-filtro nesse trabalho, denotam a influência das concentrações dos produtos fitossanitários utilizadas nos testes de compatibilidade, corroborando Jimenez et al. (1989) que realizaram trabalho semelhante.

Entretanto, em trabalhos semelhantes, resultados discrepantes foram observados por Dougherty et al. (1971) e Jimenez et al. (1989) para os produtos malation e paration. De acordo com Jimenez et al. (1989), os produtos são classificados como compatível e incompatível respectivamente, sendo resultado contrário ao verificado por Dougherty et al. (1971). Porém, a falta de informação com relação às concentrações utilizadas por Dougherty et al. (1971), compromete a comparação dos resultados de forma mais específica.

É importante salientar que os resultados obtidos por meio dessa técnica são apenas visuais, sem a quantificação do inóculo. Além disso, de acordo com Konemam et al. (2001), não há necessariamente uma relação entre a velocidade de difusão *in vitro* com a atividade antimicrobiana *in vivo*, ou seja, o tamanho do halo não está relacionado com a sua atividade antimicrobiana. Assim, se o produto for tóxico ao microrganismo haverá a formação de um halo de inibição ao redor do disco de papel, que variará conforme a capacidade de difusão do produto no meio de cultura.

Dessa forma, mesmo no caso do produto fentin hidróxido, o qual apresentou um halo de inibição bem visível, somente por meio dessa técnica, não haveria como afirmar que este seja incompatível ou que os demais tratamentos sejam compatíveis. Isto porque não se tem o conhecimento sobre as características físico-químicas de cada produto, para relacionar a formação do halo com a capacidade de difusão do destes. Além disso, a necessidade desse tipo de informação para uma correta interpretação dos resultados descaracterizaria a praticidade do teste, além de não fornecer uma informação exata.

Na maioria dos tratamentos, verificou-se a formação de halo de inibição, porém com algumas UFC/mL presentes. De acordo com Koneman et al. (2001), pode se tratar de colônias mutantes oriundas de células mais resistentes ou o cultivo não é puro.

Contudo, no caso do referido trabalho, acredita-se que sejam colônias resistentes, pois além das colônias presentes no halo serem semelhantes à colônia do Btk no tratamento testemunha, não se verificou qualquer tipo de contaminante. Além disso, a hipótese da contaminação do produto pode ser descartada, pois na

técnica de avaliação, na qual se misturou o produto ao meio de cultura, no caso dos herbicidas, não houve a formação de nenhuma UFC/mL.

Nesse sentido, a possibilidade da existência de células resistentes, juntamente com a possibilidade da difusão irregular do produto no meio de cultura, justificam a formação de halos de inibição com a presença, em maior ou menor quantidade, de UFC.

Os resultados obtidos na avaliação da compatibilidade por meio da técnica, na qual se misturam os produtos fitossanitários ao meio de cultura e posteriormente se realiza a inoculação, foram os que apresentaram os efeitos mais negativos, diferindo de todas as demais técnicas testadas, tanto para os fungicidas como para os herbicidas.

No caso dos fungicidas, de acordo com a técnica de mistura dos produtos ao meio de cultura semi-sólido, os fungicidas que foram compatíveis na técnica de discos de papel impregnados, como epoxiconazole e azoxystrobin, em ambas as concentrações, foram classificados como incompatíveis. Isto porque não se verificou a formação de UFC/mL em nenhuma das concentrações.

Por outro lado, carbendazin, em ambas as concentrações, foi classificado como compatível na técnica de impregnação em discos, sendo que na técnica de mistura dos produtos ao meio de cultura apresentaram média de UFC/mL, em ambas as concentrações testadas, sendo significativamente igual à testemunha somente na metade da concentração recomendada.

Os resultados para carbendazin diferem dos obtidos por Salerno et al. (1999), que em trabalho semelhante, com mistura de produtos ao meio de cultura, verificaram que carbendazin, na concentração recomendada, foi compatível com 16 cepas de Bt, inclusive Btk. Contudo, salienta-se que a diferença nos trabalhos se

refere à formulação, sendo que Salerno et al. (1999) utilizaram pó molhável (PM) e no seguinte trabalho foi utilizada suspensão concentrada (SC). Variação semelhante quanto à formulação também foi verificada por Tamai et al. (2002), em trabalho com fungos, e segundo os autores, a causa da toxicidade pode estar relacionada com os constituintes de cada formulação que não o ingrediente ativo. Ainda, de acordo com Anderson & Roberts citados por Tanzini et al. (2002), inseticidas formulados como concentrado emulsionável (CE) inibiram a germinação dos conídios de *B. bassiana*, ao passo que os de formulação pó molhável não causaram inibição e, em alguns casos, favoreceram o crescimento do fungo.

Para os herbicidas, os resultados são ainda mais discrepantes, pois enquanto que na técnica que mistura dos produtos ao meio de cultura semi-sólido não se observou nenhum tratamento com média de UFC/mL, na técnica dos discos de papel impregnados, todos foram classificados como compatíveis. Contudo, houve uma variação em relação à quantidade de discos com a presença ou não de halo de inibição entre os tratamentos, com tendência de compatibilidade naqueles com a metade da concentração recomendada (Tabelas 7 e 8).

Ambas as técnicas mencionadas, discos de papel impregnados e a mistura de produtos fitossanitários ao meio de cultura, são semelhantes quanto à condição de oxigenação. Dessa forma, além de não estar relacionada com a capacidade de difusão dos produtos fitossanitários ao meio de cultura, a técnica de mistura dos produtos fitossanitários ao meio de cultura, permite a quantificação do patógeno, sendo, portanto a mais confiável com relação à técnica de discos impregnados. Entretanto, a diferença na formação de UFC observada entre as duas técnicas pode estar relacionada com a quantidade de inóculo empregada, que foi maior na técnica dos discos impregnados. Além disso, a distribuição dos produtos fitossanitários, de

forma mais uniforme, é garantida na técnica na qual se mistura os produtos ao meio de cultura, comparada à técnica dos discos impregnados. Assim, além de uma menor quantidade de inóculo empregada, evidenciou-se que a mistura dos produtos fitossanitários ao meio de cultura causou um menor crescimento no crescimento bacteriano (Tabelas 6 e 7).

O fator oxigenação pode ser relacionado aos resultados obtidos, ao comparar-se a técnica dos produtos misturados ao meio de cultura e a técnica de mistura dos produtos em meio líquido e posterior incubação com Btk.

Embora Bt seja uma bactéria anaerobicamente facultativa, de acordo com Moraes et al. (1980), há a necessidade de uma condição ideal de oxigenação, pois tanto a ausência como o excesso de O<sub>2</sub> inibem o crescimento bacteriano. De acordo com resultados obtidos pela autora, em trabalho sobre a influência da oxigenação no crescimento de Bt, houve um aumento na taxa de respiração quando o valor de saturação de O<sub>2</sub> foi aumentado de 2.5% para 10%, sendo que acima desse valor ocorreu a inibição. Comportamento semelhante também foi verificado em trabalho desenvolvido por Ignatenko et al. (1983), no qual verificaram que o aumento, a constância e a redução do crescimento vegetativo variaram conforme a taxa de oxigenação.

Da mesma forma, Avignone-Rossa et al. (1992), em estudos sobre a influência da oxigenação sobre a produção de esporos e cristais de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, verificaram que a limitação de oxigênio diminuiu a produção de esporos e toxinas do cristal.

Assim, de acordo com Pinto<sup>4</sup>, os efeitos negativos obtidos nesse trabalho, na técnica de mistura dos produtos fitossanitários ao meio de cultura em relação à

---

<sup>4</sup> Prof. Doutoranda Fabiana Pinto – professora da disciplina de Microbiologia do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas (CCMF) e Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Unioeste, *Campus* Cascavel – comunicação pessoal, 2006.

incubação em meio líquido, podem ser justificados pela diferença de oxigenação, sendo que a difusão do O<sub>2</sub> em meio com agitação é maior. Ainda de acordo com a professora, no caso da técnica com os produtos misturados ao meio de cultura, as células se encontram num estado *quorum sensi*, ou seja, muito próximas umas às outras. Nessa condição, há uma constante troca de sinais localmente na colônia, com produção de metabólitos secundários, que podem ter efeito inibitório sobre as mesmas. Por sua vez, a troca de sinais entre as células, no caso da incubação em meio líquido, se dá através do meio de cultura e não célula a célula, de forma que o efeito dos metabólitos secundários é minimizado.

Nesse sentido, com referência à compatibilidade da célula aos produtos fitossanitários, a avaliação em meio líquido é a mais confiável, pois além de possibilitar a dispersão dos metabólitos secundários produzidos pelas células no meio de cultura, garante constante oxigenação necessária ao crescimento bacteriano, bem como a total distribuição do produto no meio de cultura. Assim, tais fatores, juntamente com o constante contato do patógeno com o substrato, aumentam a possibilidade de metabolização dos componentes do meio e conseqüente crescimento populacional.

Isso pode ser evidenciado neste trabalho, uma vez que além da compatibilidade entre a bactéria e alguns produtos fitossanitários, verificou-se um estímulo do crescimento, que variou de 107,3% a 333,8% para os produtos epoxiconazole, em ambas as concentrações, e azoxystrobin, na metade da concentração recomendada, quando comparados à testemunha. Por outro lado, somente com tebuconazole e fentin hidróxido, em ambas as concentrações, não houve a formação de UFC/mL (Tabela 9).

Entretanto, nessa técnica de avaliação, inexplicavelmente, o produto carbendazin, em ambas as concentrações, apresentou redução da média de UFC/mL, quando comparado à testemunha, o que não ocorreu nas técnicas de discos impregnados e na mistura dos produtos fitossanitários ao meio de cultura, sendo que nesta última, carbendazin foi o único produto que apresentou média de UFC/mL.

No caso dos herbicidas, os resultados obtidos na avaliação em meio líquido corroboram aos obtidos na técnica de mistura dos produtos ao meio de cultura semi-sólido, com exceção de sulfentrazone, que independente da concentração, permitiu a formação de UFC/mL.

Todas as avaliações realizadas com as células nesse trabalho, exceto o teste de metabolização, são de extrema importância, uma vez que podem simular o que poderia ocorrer na hemolinfa do inseto, com a ingestão simultânea da bactéria e do produto fitossanitário.

Entretanto, é importante considerar a compatibilidade de um ponto de vista aplicado, que seria a compatibilidade com esporos e cristais da bactéria, uma vez que estes representam a forma bacteriana utilizada no campo e que possivelmente seriam ingeridos pelos insetos. Além disso, sabe-se que no modo de ação de Bt nos insetos, os cristais e esporos agem primeiramente, e posterior invasão da hemolinfa.

Nesse sentido, os resultados obtidos na avaliação da compatibilidade dos esporos com os produtos fitossanitários foram muito satisfatórios, pois se observou que todos os tratamentos, tanto de fungicidas como de herbicidas foram compatíveis com o esporo, com única exceção para o fungicida fentin hidróxido, que independente da concentração utilizada e do tempo de incubação, reduziu a média de UFC/mL, diferindo significativamente da testemunha (Tabela 13).

Como já mencionado, a maioria dos tratamentos apresentou uma tendência de redução da germinação dos esporos com o aumento do tempo de contato destes com os produtos fitossanitários. Além disso, o efeito da concentração utilizada variou conforme a categoria do produto fitossanitário, sendo que no caso dos fungicidas, os tratamentos com a metade da concentração recomendada apresentaram as maiores médias de UFC/mL, ao passo que para os herbicidas as maiores médias foram verificadas para os produtos nas concentrações recomendadas (Tabelas 13 e 14).

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos obtidos por Chen et al. (1974), que realizaram testes de compatibilidade de inseticidas e do produto Biotrol XK à base de Bt e verificaram que carbaryl e stirophos diminuíram a viabilidade dos esporos, ao passo que propoxur aumentou. Da mesma forma, observaram que o produto Biotrol BTB foi compatível com todos os produtos testados. Porém, salienta-se que a técnica utilizada neste trabalho diferencia-se da utilizada por Chen et al. (1974), que filtraram os esporos separando-os dos produtos antes da inoculação.

Morris (1975) também avaliou a compatibilidade de produtos fitossanitários e Bt, porém por meio de uma outra técnica de avaliação, com maior tempo de incubação, com contagem e análise das características morfológicas dos esporos e cristais. Segundo o autor, a germinação dos esporos de Bt, na presença de produtos fitossanitários variou conforme a concentração utilizada, sendo que as maiores concentrações de fenitrothion, SBP e Gardona (*in sic*) reduziram a germinação. Além disso, o autor chama a atenção para as substâncias emulsificantes presentes nos produtos, salientando que a presença destas diminui a germinação dos esporos, pois o mesmo resultado não foi verificado no caso do produto Orthene (*in sic*), que sem nenhum emulsificante e na maior concentração, não reduziu a germinação.

Ainda é importante salientar que no presente trabalho foi utilizado produtos comerciais, não se considerando isoladamente o efeito das substâncias emulsificantes presentes nestes. Assim, os resultados sugerem, na maioria dos tratamentos avaliados, compatibilidade com os esporos, independente da presença de emulsificantes.

Em todas as técnicas utilizadas para testar a compatibilidade da célula e na técnica utilizada para a avaliação do esporo, os resultados corroboram somente para fentin hidróxido, uma vez que independente da concentração, os tratamentos com esse produto apresentaram a formação de halo de inibição, a ausência de UFC, além da maior redução da germinação de esporos.

Por outro lado, uma grande variação foi observada para tebuconazole, uma vez que este foi classificado como parcialmente compatível na técnica dos discos impregnados, incompatível na técnica de mistura dos produtos ao meio de cultura em placas e no meio líquido, porém foi o produto que apresentou a maior média de germinação de esporos, na concentração recomendada, em ambos os tempos.

A comparação entre os efeitos de produtos fitossanitários sobre Bt com os efeitos destes produtos sobre fungos não é viável em razão da fisiologia dos microrganismos. O modo de ação dos fungicidas é específico para os fungos, e conseqüentemente se verificará um efeito negativo maior nesse caso. Porém, um breve comentário será feito, uma vez que as técnicas aqui comparadas são semelhantes como no caso da mistura dos produtos no meio semi-sólido.

Assim, os resultados obtidos para tebuconazole com as células de Bt, com exceção da técnica de discos impregnados, corroboram com os obtidos por Loureiro et al. (2002) para quatro espécies de fungos, sendo que verificaram através da técnica de mistura dos produtos ao meio de cultura, que tebuconazole, na

concentração recomendada, inibiu o crescimento das colônias das quatro espécies de fungos testadas, sendo classificado como muito tóxico.

Além de tebuconazole, Tamai et al. (2002) avaliaram vários produtos fitossanitários como os fungicidas azoxystrobin e carbendazin. Segundo os autores, os três produtos foram classificados como muito tóxicos para *B. bassiana*, corroborando, exceto para carbendazin, com o observado neste trabalho somente na técnica de mistura dos produtos ao meio de cultura.

Tal variação entre as técnicas de avaliação também foi observada por Silva & Neves (2005), em trabalho com fungos, onde verificaram variação entre as técnicas, concentrações e produtos utilizados. Assim, os resultados obtidos por Silva & Neves (2005), juntamente com os obtidos neste trabalho, chamam a atenção também para a adequabilidade das técnicas empregadas na avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários e microrganismos de forma geral, para que se possa atestar com segurança a toxicidade de produtos fitossanitários.

Com relação aos efeitos sobre os esporos, de forma geral, as UFC/mL obtidas nos tratamentos apresentaram um crescimento normal. Isto evidencia que os produtos não interferiram negativamente no metabolismo celular ao entrarem em contato com os esporos.

Considerando-se um ponto de vista aplicado, a avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários e esporos do Bt é de fundamental importância para o sucesso da estratégia de manejo, pois o contato direto com o produto fitossanitário é uma condição que realmente acontecerá. Por sua vez, não menos importante, porém de efeito secundário, deve-se considerar a compatibilidade dos produtos fitossanitários com a célula do Bt, pois simula um contato que eventualmente ocorreria na hemolinfa do inseto. Cabe ainda ressaltar que a condição extrema, a

qual foi submetida à avaliação das células do Bt não ocorreria em campo, o que aumentaria as chances de sobrevivência da bactéria na presença do produto fitossanitário. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho sugerem, exceto para fentin hidróxido, a utilização conjunta de esporos de Btk e os referidos produtos fitossanitários testados em campo.

Entretanto, para que se comprove definitivamente a possibilidade da utilização de tal estratégia de integração, são necessários mais estudos referentes aos efeitos dos produtos sobre os cristais, uma vez que estes são os responsáveis diretos pelo sucesso do produto biológico no controle de pragas.

## 5 CONCLUSÕES

Houve diferença nos resultados entre as técnicas estudadas, sendo o teste em meio líquido o mais indicado para a avaliação da compatibilidade de células de Btk e produtos fitossanitários.

O Btk tem a capacidade de metabolizar os fungicidas expoxiconazole e azoxystrobin e os herbicidas sulfetrazone e imazethapyr.

No teste com esporos, tanto os fungicidas, quanto os herbicidas foram compatíveis, exceto o produto fentin hidróxido, que foi classificado como incompatível com Btk, tanto para células como para os esporos. .

As concentrações dos produtos fitossanitários e tempo de exposição dos esporos aos produtos fitossanitários influenciam os resultados de compatibilidade.

Todos os herbicidas, independente da concentração, são incompatíveis com células de Btk.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCINELLI, C.; SCREPANTI, C.; VICARI, A. & CATIZONE, P. Influence of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* on the degradation of glyphosate and glufosinate-ammonium in soil samples. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.103, p. 497-507, 2004.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; LAMAS, C.; LEITE, L.G.; TRAMA, M. & SANO, A.H. AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NA CONSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO MANEJO DE PRAGAS DO CAFEEIRO. **Arquivos Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.79-84, jan./mar.,2003.

ALVES, L.F.A. & PINTO, F.G.S. Interações entre agroquímicos e bactérias entomopatogênicas. In. 8º Simpósio de Controle Biológico, São Pedro, 2003. **Resumos**. São Pedro – SP, 2003. p. 41.

ALVES, S.B.; MOINO JÚNIOR, A. & ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998. Capítulo 8, p. 217-238: Produtos fitossanitários e entomopatogênicos.

ALVES, S.B. & MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998. Capítulo 23, p. 765-797: Quantificação de inóculo de patógenos de insetos.

AL-ZUBADI, A.N.O.; ALI, A.S.A. & ALDERGAZALI, T.A. Compatibility of the microbial insecticide 'Bactospeine' with some chemical insecticides for control of three lepidopterous pests in protected agriculture. **Journal of Agriculture and Water Resources Research Plant Production**, v.7, n.2, p.217-271, 1988./Resumo/

AMALIN, D.M.; PENE, J.E.; YU, S.J. & MCSOELEY, R. Selective toxicity of some pesticides to *Hibana velox* (Araneae: Anyphaenidae), a predator of citrus leafminer. **Florida Entomologist**, v.83, n.3, p.254-262, 2000./Resumo/

ANDALÓ, V.; MOINO JR, A.; SANTA-CECÍLIA, V.C. & SOUZA, G.C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com Agrotóxicos Visando o Controle da Cochonilha-da-Raiz-do-Cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n.4, p. 463-467, 2004.

ARANTES, O.M.N.; VILAS-BÔAS, L. A. & VILAS-BÔAS, G.T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, L.C.; BARROS, N.M. & AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Bioteecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, Caxias do Sul: EDUCS, 2002. Capítulo 9, p. 271-291: *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico.

AVIGNONE-ROSSA, C.; ARCAS, J. & MIGNONE, C. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures.

**World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, n.3, p.301-304, 1992.

BACCI, L.; PICANÇO, M.C.; GUSMÃO, M.R.; CRESPO, A.L.B. & PEREIRA, E.J.G.

Seletividade de Inseticidas a *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemíptera: Aphididae) e ao Predador *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.4, p. 707-713, 2001.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. & LAMAS, C. Effect of Thiamethoxam on Entomopathogenic Microorganisms. **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.437-447, 2001.

BATISTA FILHO, A.; RAMIRO, Z.A.; ALMEIDA, J.E.M.; LEITE, L.G.; CINTRA, E.R.R. & LAMAS, C. MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS EM SOJA: IMPACTO DE INSETICIDAS SOBRE INIMIGOS NATURAIS. **Arquivos Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.61-67, jan./mar., 2003.

BHATTACHARYYA, B.; DUTTA, P.; BASIT, A. & DAS, B.C. Compatibility of some common pesticides to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of the Agricultural Science Society of North East India**, v.11, n.2, p. 233-334, 1998. /Resumo/

BHATTACHARYYA, S.; DUTTA, S. & DHAR, T. In vitro compatibility of different entomopathogens to pesticides, plant growth regulators and micronutrients. **Annals of Plant Protection Sciences**, v.12, n.1, p. 199-202, 2004. /Resumo/

BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G. & BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.843-850, set./out. 2003.

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Desenvolvimento da Produção. In: Defensivos Agrícolas um Setor Estratégico para o Sucesso do Agronegócio Brasileiro, **Fórum de competitividade**, /2003?/

BRIGHENTI, D.M.; CARVALHO, C.F.; CARVALHO, G.A. & BRIGHENTI, C.R. EFICIÊNCIA DO *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) NO CONTROLE DA TRAÇA DA CERA *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.60-68, jan./fev. 2005.

BUENO, C.J.; MEYER, M.C. & de SOUZA, N.L. Efeito de fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (Semia 5019 e Semia 5079) e na nodulação da soja **Acta Scientiarum: Agronomy**, v.25, n.1, p.231-235, 2003.

CANNON, R.J.C. Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis* – Based Pesticides **Pesticide Science**, v.37, n.4, p.331-335, mar. 1993.

CARVALHO, G. A.; PARRA, J.L.P. & BAPTISTA de G.C. IMPACTO DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS UTILIZADOS NA CULTURA DO TOMATEIRO NA FASE ADULTA DE DUAS LINHAGENS DE *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE). **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.3, p.560-568, maio/jun., 2001.

CAVALCANTI, R.S.; MOINO JUNIOR, A.; SOUZA, G.C. & ARNOSTI, A. EFEITO DOS SPRODUTOS FITOSSANITÁRIOS FENPROPATRINA, IMIDACLOPRIDE, IRRODIONE E TIAMETOXAM SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO FUNGO *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. **Arquivos Instituto Biológico**, v.69, n.3, p.17-22, jul./set., 2002.

CHEN, K.; FUNKE, B.R.; SCHULZ, J.T.; CARLSON, R.B. & PROSHOLD, F.I. Effects of Certain Organophosphate and Carbamate Insecticides on *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.67, n.4, p.471-473, ago. 1974.

CHUNG, Y.K.; LAM-PHUA, E.G.; CHUA, Y.T. & YATIMAN, R. Evaluation of biological and chemical insecticide mixture against *Aedes aegypti* larvae and adults by thermal fogging in Singapore. **Medical and Veterinary Entomology**, v.15, p.321-327, 2001.

CORRÊA-FERREIRA, B.S. Controle biológico por parasitóides na cultura da soja: evolução e perspectivas futuras. In. 8º Simpósio de Controle Biológico, São Pedro, 2003. **Resumos**. São Pedro, SP, 2003. p. 45.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. & DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.807-813, 1998.

DOUGHERTY, E.M.; REICHELDERFER, C.F. & FAUST, R.M. Sensitivity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* to Various Insecticides and Herbicides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.17, n.2, p.292-293, 1971.

FAST, P.G. & MORRISON, I.K. The  $\delta$ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* IV. The Effect of  $\delta$ -Endotoxin on Ion Regulation by Midgut Tissue of *Bombyx mori* Larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.20, p.208-211, 1972.

FERREIRA, D.F. Sistema Sisvar para análises estatísticas. <<http://www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm>> Acessado em 23 de dez., 2005.

FIUZA, L.M. *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos: diversidade, especificidade e impacto ambiental. In. 8º Simpósio de Controle Biológico, São Pedro, 2003. **Resumos**. São Pedro, SP, 2003. p.47.

FOERSTER, L.A. Seletividade de inseticidas a predadores e parasitóides In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. & BENTO, J.M.S. (Ed) **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**, São Paulo: Manole, 2002. Capítulo 6, p. 95-103: Seletividade de inseticidas a predadores e parasitóides.

FRAGOSO, D.B.; JUSSELINO-FILHO,P.; GUEDES, N.C. & PROQUE,R. Seletividade de Inseticidas a Vespas Predadoras de *Leucoptera coffeella* (Guér. – Mènev.) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.139-144, 2001.

FURTADO, R. A controvérsia dos OGMs nos 30 anos da Engenharia Genética, **Scientific American**, ano 2, n.3, p.26-33, nov. 2003.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**, 3 ed. vol.10 Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GASPARIN, D.C. Defensivos Agrícolas e seus Impactos sobre o Meio Ambiente. Curitiba, 2005. 94 f. Monografia (Graduação) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

GILL, S.S.; COWLES, E.A. & PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Reviews Entomology**, v. 37, p.615-636, 1992.

GILL, S. S. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.90, n.4, p.69-74, jan./feb. 1995.

GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; PROCÓPIO,S.O.; MANZONI, C.G.; LIMA, C.A.B. & NÖRNBERG, S.D. Seletividade de Formulações de Glyphosate a *Trichogramma pretiosum* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE). **Planta Daninha**, v. 23, n.3, p. 457-463, 2005.

GRAVENA, S. & BENVENGA, S. Mais lucro no tomate industrial. **Cultivar**, p.26-29, out./nov., 2000.

HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* VAR. *kurstaki* (H: 3a-3b) PARA O CURUQUERÊ DO ALGODÃO, *Alabama argillacea* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE). **Revista Agricultura**, v.59, n.3, p. 263-282, 1984.

HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998. Capítulo 12, p. 383-446: Bactérias entomopatogênicas.

HARDMAM, J.M. & GAUL, S. O. Mixtures of *Bacillus thuringiensis* and Pyrethroids Control Winter Moth (Lepidoptera: Geometridae) In Orchards Without Causing Outbreaks of Mites. **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.3, p.920-936, june, 1990.

HAFEZ, M.; SALAMA, H.S.; ABOUL ELA, R.G. & RAGAEI, M. Evaluation of adjuvants for use with *Bacillus thuringiensis* against *Heliothis armigera* (Hübner). **Journal Applied Entomology**, v.103, p.313-319, 1987.

IGNATENKO, YU.N.; SAKHAROVA, Z.V.; KHOVRYCHEV, M.P. & SHEVTSOV, V.V. EFFECT OF TEMPERATURE AND AERATION ON GROWTH AND SPORE FORMATION IN *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, v.52.n.5, p. 553-556, 1983.

JIMENEZ, J.; ACOSTA, N. & FERNANDEZ, R. Efecto de insecticidas y fungicidas sobre la actividad biológica de preparaciones de *Bacillus thuringiensis*. **Protección de Plantas**, v.12 n.1, p.45 –59, 1989.

KHALIQUE, F. & AHMED, K. Impact of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Kurstaki* on Biology of *Helicoverpa armigera*. **Pakistan Journal of Biological Science**, v.6, n.6, p.615-621, 2003.

KIZILKAYA, R. & AKSOY, H.M. Determination of the effects of pesticides on the growth of different *Bacillus* spp.. **Ondokuzmayis Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi**, v.14, n.3, p.76-87, 1999./Resumo/

KONEMAN, E.W.; ALLEN,S.D.; JANDE,W.M.; SHERECKENBUGER,P.C.; JRWINN,W.C. Provas de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. In: KONEMAN, E.W.; ALLEN,S.D.; JANDE,W.M.; SHERECKENBUGER,P.C.; JRWINN,W.C (Eds) **Diagnóstico Microbiológico**, Rio de Janeiro:Medici, 2001. Capítulo 15, p.795-865: Provas de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K. & VAILS Insect Pathogens as Biological Control Agents:Do They Have a Future?. **Biological Control**, v.21, p.230-248, 2001.

LAMBERT, B. & PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*: facts and mysteries about successful biopesticide. **BioScience**, v.42, n.2 p.112-122, 1992.

LARA, R.I.R.; PERIOTO, N.W.; SANTOS, J.C.C.; SELEGATTO, A. & LUCIANO, E.S. AVALIAÇÃO DE THIAMETHOXAM 250WG NO CONTROLE DE *LIRIOMYZA HUIDOBRENSIS* (BLANCAHRD, 1926) E DE SUA SELETIVIDADE SOBRE HIMENÓPTEROS PARASITÓIDES EM CULTURA DE BATATA (*SOLANUM TEBEROSUM* L.). **Arquivos Instituto Biológico**, v.69, n.3, p.57-61, jul./set., 2002.

LOUREIRO, E. de S.; MOINO JR, A.; ARNOSTI, A. & SOUZA, G.C. Efeito de Produtos Fitossanitários Químicos Utilizados em Alface e Crisântemo Sobre Fungos Entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v.31, n.2, p.263-269, 2002.

LÜTHY, P.; CORDIER, J.L. & FISCHER, H.M. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application In: KURSTAK, E. (Ed) **Microbial and Viral Pesticides**, New York: MARCEL DEKKER, 1982, Capítulo 2, p. 35-74: *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. & BROCK, J.P. Microbial growth. In: MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. & BROCK, J.P (Eds) **Biology of Microorganisms**, Frentile Hall, 2002. Capítulo 6, p.138-166: Microbial growth.

McGUIRE, M.R.; SHASHA, B.S.; LEWIS, L.C.; BARTELT, R.J. & KINNEY, K. Field Evaluation of Granular Starch Formulations of *Bacillus thuringiensis* Against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) **Journal Economic Entomology**. v.83, n.6, p.2207-2210, 1990.

MELLO, S.C.M. de; ÁVILA, Z.R. de; OLIVEIRA, C. de & HATANO, L.T. Avaliação do efeito de pesticidas no crescimento micelial de *Cercospora caricis*. **Embrapa: Comunicado Técnico**, Brasília, n.50, 2003.

MENDES, D.; PITELLI, R.A. & COELHO, L. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE HERBICIDAS SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Fusarium* SP. (ISOLADO FCAV#940). **Planta Daninha**, v.22, n.1, p.85-93, 2004.

MILLER, J.C. Effects of a Microbial Insecticide, *Bacillus thuringiensis kurstaki* , on nontarget Lepidoptera in a Spruce Budworm-infested Forest. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v.29, n.4, p.267-276, 1990.

MOHAMED, S.H. & AHMED, S.A. Susceptibility of the cotton leafworm to mixtures of commercial *Bacillus thuringiensis* with chemical herbicides, and sensitivity of the pathogen to the herbicides. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, v.21, n.5, p.341-351, 1990.

MORAES, I.O.; SANTANA, M.H.A. & HOKKA, C.O. THE INFLUENCE OF OXYGEN CONCENTRATION ON MICROBIAL INSECTICIDE PRODUCTION. **Bergman Press**, p. 75-79, 1980.

MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. & ARRUDA, R.O.M Produção de bactérias entomopatogênicas In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998. Capítulo 26, p.815-843: Produção de bactérias entomopatogênicas.

MORRIS, O.N. Effect of Some Chemical Insecticides on the Germination and Repelication of Commercia *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.26, n.2. p. 199-204, 1975.

MOSCARDI, F.; LEITE, L.G.; ZAMATARO, E.O. & RADI, A.J. Controle da lagarta da soja por misturas de *Baculovirus anticarsia* com doses reduzidas de inseticidas, In: EMBRAPA: Centro Nacional de Pesquisa da Soja, Londrina, PR. **Resultados de pesquisa da soja, safra 1984-1985**, Londrina, 1985, p.53-69. (Documentos, 15).

MOSCARDI, F.; LEITE, L.G.; ARAÚJO, M.S. & FERRAZ, E.B. Controle da lagarta da soja por misturas de *Baculovirus anticarsia* com doses reduzidas de inseticidas, In: EMBRAPA: Centro Nacional de Pesquisa da Soja, Londrina, PR. **Resultados de pesquisa da soja, safra 1985-1986**, Londrina, 1987, p.58-67. (Documentos,20).

MOSCARDI, F. & CORSO, I.C. Controle da lagarta da soja por misturas de *Baculovirus anticarsia* com doses reduzidas de inseticidas, In: EMBRAPA: Centro Nacional de Pesquisa da Soja, Londrina, PR. **Resultados de pesquisa da soja, safra 1987-1988**, Londrina, 1988, p.35-39. (Documentos,36).

MOURÃO, S.A.; VILELA, E.F.; ZANUNCIO, J.C.; ZAMBOLIM, L. & TUELHER, E.S. Seletividade de Defensivos Agrícolas ao Fungo Entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Neotropical Entomology**, v.32, n.1, p.103-106, 2003.

NARDO, E.A.B. & CAPALBO, D.M.F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Ed) **Controle Biológico**, Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. Capítulo 8, p. 231-260: Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações.

NEGRISOLI JÚNIOR, A. S. Avaliação de técnicas para estudos de compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos Rhabditida (Heterorhabditidae, Steinernematidae). Lavras-MG, 2005, 79p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras.

NEVES, P.M.O.J.; HISROSE, E.; TCHUJO, P.T. & MOINO JÚNIOR, A. Compatibility of Entomopathogenic Fungi with Neonicotinoid Insecticides. **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p. 263-268, 2001.

OLIVEIRA, C.N.de; NEVES, P.M.O.J. & KAWAZOE, L.S. COMPATIBILITY BETWEEN THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Beauveria bassiana* AND INSECTICIDES USED IN COFFEE PLANTATIONS. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.663-667, oct./dec. 2003.

PAPAIIOANNOU, S.P.; MARKOYIANNAKI, P.D.; TSAGKARAKOU, A.; RUMBOS, I. & ADAMAMOPOULOS, I. Effects of different fungicides and insecticides on populations of *Phytoseius finitimus* (Ribaga) in vineyard in four regions of Greece. **Redia**, v.81, p.17-35, 1998./Resumo/

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. & BENTO, J.M.S. Controle Biológico: terminologia In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. & BENTO, J.M.S.(Editores). **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**, São Paulo: Manole, 2002. Capítulo 1, p. 1-13: Controle Biológico: terminologia.

PAWINSKA, M. The use of Novodor FC in mixture with fungicides and insecticides against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. **Say Materiay Sesji Instytutu Ochrony Roslin**, v.32,n.1, p.238-249, 1992./Resumo/

PERIOTO, N.W.; LARA, R.I.R.; SANTOS, J.C.C.; SELEGATTO, A. & LUCIANO, E.S. SELETIVIDADE DE THIAMETHOXAM SOBRE A ENTOMOFAUNA DE HIMENÓPTEROS PARASITÓIDES (INSECTA, HYMENOPTERA) NA CULTURA DO FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) EM RIBEIRÃO PRETO, SP. **Arquivos Instituto Biológico**, v.69, n.3. p.29-32, jul./set., 2002.

PICANÇO, M.C.; de MOURA, M.F.; MIRANDA, M.M.M.; GONTIJO, L.M. & FERNANDES, F.L. Seletividade de inseticidas a *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermoptera: Forficulidae e *Cotesia* sp. (Hymenoptera: Braconidae) inimigos naturais de *Ascia monuste orseis* (Godart, 1818) (Lepidoptera *in sic*: Pieridae). **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.183-188, mar./abr., 2003.

POLANCZYK, R.A.; da SILVA, R.F.P. & FIUZA, L.M. SCREENING OF BACILLUS THURINGIENSIS ISOLATES PATHOGENIC TO SPODOPTERA FRUGIPERDA (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE). **Arquivos Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.69-72, jan./mar.,2003.

POLANCZYK, R.A. Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Piracicaba, SP, 2004. 144 f. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo.

PRAÇA, L.M.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B.; SOUZA DIAS, D.G.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R. & MONNERAT, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.1, p.11-16, jan. 2004.

ROGOFF, M.H.; IGNOFFO, C.M.; SINGER, S.; GARD, I. & PRIETO, A.P. Insecticidal Activity of Thirty-one Strains of *Bacillus* Against Five Insect Species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.14, p.122-129, 1969.

SALEH, M.S.; KELADA, N.L. & ABDEEN, M.I. Factors affecting efficacy of *Bacillus thuringiensis* H-14 against mosquito larvae with special reference to the joint action of the pathogen with three chemical insecticides **Anzeiger fur Schadlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz**, v.63, n.1, p.10-15, 1990./Resumo/

SALERNO, C.; DIAS, S.; SAGARDOY, M. Efecto de pesticidas sobre cepas de *Bacillus thuringiensis* bajo condiciones controladas. **Rev. Argentina de Microbiologia**, v.31, p. 58-64, 1999.

SCHUSTER, D.J. ADJUVANTS TANK-MIXED WITH *BACILLUS THURINGIENSIS* FOR CONTROL OF CABBAGE LOOPER LARVAE ON CABBAGE. **Journal Georgia Entomology Society**, v.14, n.2, 1979.

SELEENA, P. LEE, H.L. & CHIANG, Y. F. Compatibility of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis e chemical insecticides for de control of *Aedes* mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v.24, n.2, p. 216-223, 1999.

SILVA da, L.K.F. & CARVALHO de, A. G. PATOGENICIDADE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* (BERLINER, 1909) EM LAGARTAS DE *URBANUS ACAWOIOS* (WILLIAMS, 1926) (LEPIDOPTERA, HESPERIIDAE). **Arquivos Instituto Biológico**, v.71, n.2, p.249-252, abr./jun., 2004

SILVA da, R.Z. & NEVES, P.M.O.J. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and *in vitro* phytosanitary products **Pest Management Science**, v.61, p. 667-674, 2005.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M. C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.2, n.12, p.38-42, 2000.

SILVA, M.T.B. Associação de *Baculovirus anticarsia* com subdosagens de inseticidas no controle de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.353-358, 1995.

SMIT, A.K.; INDJIC, D.; VOJINOVIC, M.M. & ORBOVIC, B. Biological compatibility of insecticides and fungicides in tank mix used in potato production. In: 46<sup>th</sup> International symposium on crop protection, 625-637, 1994. Gent, Belgium, may, 1994. p. 625-637./Resumo/

SOSA-GOMES, D.R. & MOSCARDI, F. Importância das interações entre agroquímicos e entomopatógenos em programas de MIP. In. 8º Simpósio de Controle Biológico, São Pedro, 2003. **Resumos**. São Pedro, SP, 2003. p. 59.

STWART, J.G.; LUND, J.E & THOMPSON, L.S. Factors affecting the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* against larvae of the Colorado potato beetle. **Proceedings of the Entomological Society of Ontario**, v.122, p.21-25, 1991.

SUTTER, G. R. ; ABRAHANSON, M.D. ; HAMILTON, E.W. & VICK, I.D. Compatibility of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* and Chemical insecticides. 1. Effect of Insecticide Doses on Bacterial Replication Rate. **Journal of Economic Entomology**, v.64, n.6, p. 1348-1350, dec., 1971.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; FAION, M. PADULLA, L.F.L. TOXICIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS PARA *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. **Arquivos Instituto Biológico**, v.69, n.3, p. 89-96, jul./set., 2002.

TANZINI, M.R.; ALVES, S.B. & SETTEN, A. TOXICIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS UTILIZADOS NO CONTROLE DE *LEPTOPHARSA HEVEAE* PARA FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS. **Arquivos Instituto Biológico**, v.69, n.4, p. 65-69, out./dez., 2002.

TORRES, J.B.; SILVA-TORRES, C.S.A.; SILVA,M.R. & FERREIRA, J.F. Compatibilidade de Inseticidas e Acaricidas com o Percevejo Predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) em Algodoeiro. **Neotropical Entomology**, v.31, n.2, p.311-317, 2002.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W. & DE SOUZA, M.T. Engenharia genética de microrganismo agentes de controle biológico. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Eds) **Controle Biológico**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. Capítulo 7, p. 201-230: Engenharia genética de microrganismo agentes de controle biológico.

van den BOSCH, R.; MESSENGER, P.S. & GUTIERREZ, A.P. Na introduction to biological control, New York: Plenum Press, 1982,247p.