

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMPACTO DE FUNGICIDAS E INSETICIDAS NA DENSIDADE
POPULACIONAL DE *Beauveria bassiana* NO SOLO SOB EFEITO DA
MICROBIOTA NATIVA

Flávia Barbosa Soares
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMPACTO DE FUNGICIDAS E INSETICIDAS NA DENSIDADE
POPULACIONAL DE *Beauveria bassiana* NO SOLO SOB EFEITO DA
MICROBIOTA NATIVA

Flávia Barbosa Soares

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FLÁVIA BARBOSA SOARES – Filha de Antônio Luis Soares e Elizabeth Aparecida Barbosa Soares, nascida em 01 de agosto de 1986, em São Joaquim da Barra. Graduou-se em Ciências Biológicas, em 2005, na modalidade bacharel, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Em 2010, graduou-se na modalidade licenciatura, pela mesma universidade. Estagiou no laboratório de Ecologia de Microrganismos (Departamento de Produção Vegetal) de maio de 2007 a novembro de 2008. Em agosto de 2009, ingressou no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, no Departamento de Produção Vegetal da Unesp, Campus de Jaboticabal. Durante o Mestrado, participou de simpósios e congressos, apresentando três trabalhos e publicando um artigo em periódico científico na área de atuação.

“Depende de nós
Quem já foi ou ainda é criança
Que acredita ou tem esperança
Quem faz tudo pra um mundo melhor

Depende de nós
Que o circo esteja armado
Que o palhaço esteja engraçado
Que o riso esteja no ar
Sem que a gente precise sonhar
Que os ventos cantem nos galhos
Que as folhas bebam orvalhos
Que o sol descortine mais as manhãs

Depende de nós
Se este mundo ainda tem jeito
Apesar do que o homem tem feito

Se a vida sobreviverá”

(Depende de nós – Ivan Lins)

OFEREÇO

Aos meus pais

Pelo apoio, carinho e por compartilharem todas as minhas conquistas e derrotas, encorajando-me a ser persistente, sempre;

DEDICO

Ao meu namorado, Leandro

Por estar sempre presente mesmo quando distante, pela paciência nos maus momentos e pelas broncas quando necessárias.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me guiar e me manter sempre no caminho dos meus objetivos almeçados;

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro** – pelos ensinamentos, oportunidades concedidas e por ser não somente um orientador, mas também um amigo.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Barbosa** – pela paciência e auxílio com as análises estatísticas.

A **Edna Testa D'áquila** – pela amizade, atenção, festas de confraternização e longas conversas.

Ao técnico **Luis Carlos de Assis** – pelo auxílio na elaboração do meio de quitina.

Ao funcionário **José Gilson Leite** – pela educação, atenção e pela concessão dos agrotóxicos utilizados neste trabalho.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** – pela dúvidas retiradas, pela ajuda, pelo bom humor.

À banca de Qualificação e Defesa – Dra. **Dinalva Alves Mochi**, Prof. Dra. **Margarete Camargo** e Prof. Dr. **Dráuzio Rangel**, por todas as sugestões, que ajudaram a melhorar a qualidade deste trabalho.

Aos amigos do laboratório - **Ana, Dinalva, Lucas, Aline e Nancy**, pelas sugestões nos experimentos, apoio e, principalmente, pelos momentos de descontração.

Às amigas – **Flavia, Jhoanne, Ciça, Aline e Fernanda**, por todas as risadas, companheirismo, por fazerem as dificuldades parecerem mais fáceis e por tornarem a estadia em Jaboticabal um momento digno de saudades.

SUMÁRIO	Página
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Microbiota nativa do solo e fungos entomopatogênicos.....	2
2.2 Agrotóxicos e biomassa microbiana.....	4
2.3 Controle biológico.....	8
3. REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 2 – DENSIDADE POPULACIONAL DE <i>Beauveria bassiana</i> NO SOLO SOB AÇÃO DE FUNGICIDAS E DA MICROBIOTA NATIVA	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Experimento com meio de cultura.....	25
2.2 Experimento com solo.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Experimento com meio de cultura.....	29
3.2 Experimento com solo.....	30
3.2.1 Tiofanatometílico.....	30
3.2.2 Piraclostrobina.....	34
3.2.3 Mancozeb.....	36
3.2.4 Oxiclureto de cobre.....	38
4. CONCLUSÕES	39
5. REFERÊNCIAS	40

CAPÍTULO 3 - AÇÃO DA MICROBIOTA NATIVA NA DENSIDADE POPULACIONAL DE <i>Beauveria bassiana</i> NO SOLO SOB O EFEITO DE INSETICIDAS.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Experimento com meio de cultura.....	51
2.2 Experimento com solo.....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.1 Experimento com meio de cultura.....	55
3.2 Experimento com solo.....	57
3.2.1 Abamectina.....	57
3.2.2 Tiametoxam.....	59
3.2.3 Carbofurano.....	61
3.2.4 Clorpirifós.....	63
4. CONCLUSÕES.....	65
5. REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Página
<p>Figura 1. Interações entre as populações de <i>Beauveria bassiana</i> e microbiota nativa do solo sob ação do fungicida contendo o princípio ativo tiofanatometílico. Adição do fungicida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do fungicida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.....</p>	33
<p>Figura 2. Interações entre as populações de <i>Beauveria bassiana</i> e microbiota nativa do solo sob ação do fungicida contendo o princípio ativo piraclostrobina. Adição do fungicida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do fungicida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.....</p>	35
<p>Figura 3. Interações entre as populações de <i>Beauveria bassiana</i> e microbiota nativa do solo sob ação do fungicida contendo o princípio ativo mancozebe. Adição do fungicida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do fungicida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.....</p>	37

Figura 4. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do fungicida contendo o princípio ativo oxiclóreto de cobre. Adição do fungicida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do fungicida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.....38

Capítulo 3

Figura 1. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do inseticida contendo o princípio ativo abamectina. Adição do inseticida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do inseticida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.....59

Figura 2. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do inseticida contendo o princípio ativo tiametoxam. Adição do inseticida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do inseticida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.....60

Figura 3. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do inseticida contendo o princípio ativo carbofurano. Adição do inseticida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do inseticida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.....62

Figura 4. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do inseticida contendo o princípio ativo clorpirifós. Adição do inseticida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do inseticida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.....64

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2	Página
Tabela 1. Fungicidas utilizados nos ensaios, com os respectivos nomes comerciais, grupos químicos, princípios ativos, doses e culturas onde são aplicados.....	26
Tabela 2. Viabilidade de <i>Beauveria bassiana</i> cultivada em meio contendo diferentes fungicidas nas doses recomendadas pelos fabricantes, valores do índice biológico e classificação dos produtos quanto à toxicidade ao fungo.....	30
Tabela 3. Correlação entre a população de <i>Beauveria bassiana</i> e as populações de bactérias totais, fungos totais e actinomicetos obtidos para os fungicidas nos diferentes tratamentos.....	32
 Capítulo 3	
Tabela 1. Inseticidas utilizados nos ensaios, com os respectivos nomes comerciais, grupos químicos, princípios ativos, doses e culturas onde são aplicados.....	51
Tabela 2. Desempenho de <i>Beauveria bassiana</i> cultivada em meio contendo diferentes inseticidas nas doses recomendadas pelos fabricantes, valores do índice biológico e classificação dos produtos quanto à toxicidade ao fungo.....	55
Tabela 3. Correlação entre a população de <i>Beauveria bassiana</i> e as populações de bactérias totais, fungos totais e actinomicetos obtidos para os inseticidas nos diferentes tratamentos.....	58

IMPACTO DE FUNGICIDAS E INSETICIDAS NA DENSIDADE POPULACIONAL DE *Beauveria bassiana* NO SOLO SOB EFEITO DA MICROBIOTA NATIVA

RESUMO – O solo, reservatório natural de muitas espécies microbianas nativas, abriga também agentes de controle biológico, sendo essencial no sucesso do manejo integrado de pragas. Nesse ambiente, a sobrevivência dos entomopatógenos é influenciada tanto pelo efeito dos agrotóxicos como pela ação da microbiota nativa, que pode, inclusive, degradar os produtos químicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se a microbiota nativa influencia a ação tóxica de fungicidas e inseticidas, aplicados em diferentes situações, sobre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no solo. Fungicidas contendo os ingredientes ativos tiofanatometílico, piraclostrobina, mancozebe e oxicloreto de cobre, assim como inseticidas contendo abamectina, tiametoxam, carbofurano e clorpirifós foram utilizados nas doses recomendadas pelos fabricantes. A análise da toxicidade dos agrotóxicos foi feita inicialmente em meios de cultura adicionados dos produtos, através da avaliação da germinação, crescimento micelial e esporulação. Após, os produtos foram adicionados no solo contido em placas de Petri, nas seguintes situações: 1) 1 hora depois da inoculação do solo com 2 mL de suspensão de *B. bassiana* (10^7 conídios/mL); 2) 1 hora antes da inoculação do solo com 2 mL de suspensão de *B. bassiana*; 3) 48 horas depois da inoculação do solo com 2 mL de suspensão de *B. bassiana*; e 4) inoculação do solo com 2 mL de suspensão de *B. bassiana* sem adição de fungicida ou inseticida. A cada sete dias, durante 28 dias, avaliou-se a densidade populacional do entomopatógeno, de bactérias totais, de fungos totais e de actinomicetos, através da determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) usando meios de cultura específicos. No experimento realizado no meio de cultura, todos os fungicidas foram classificados como tóxicos para *B. bassiana*, inibindo completamente o crescimento micelial e a esporulação. Em relação aos inseticidas, somente clorpirifós obteve esta classificação, sendo os demais considerados compatíveis com o fungo. No solo observou-se menor toxicidade dos fungicidas em relação àquela verificada no meio de cultura em função da ação da microbiota nativa. A população de actinomicetos foi a que exerceu maior influência sobre a densidade populacional do entomopatógeno, inibindo-o ou contribuindo para a sua sobrevivência e crescimento no solo através da degradação do fungicida, como observado no experimento com piraclostrobina. No

experimento com adição de oxiclreto de cobre, a população de bactérias totais também contribuiu para a sobrevivência do fungo, degradando o fungicida. A população de fungos totais exerceu menor influência no efeito tóxico dos fungicidas, assim como na densidade populacional do entomopatógeno nos solos contendo tiofanatometílico e oxiclreto de cobre, onde observou-se padrão semelhante de aumento ou redução de ambas as populações. Dos inseticidas adicionados ao solo, somente clorpirifós foi considerado inibitório para o crescimento de *B. bassiana*, sendo a população de bactérias totais a única a auxiliar na diminuição da toxicidade deste ingrediente ativo sobre a população fúngica. Nos solos com adição de abamectina, carbofurano e clorpirifós, a população de actinomicetos influiu negativamente na sobrevivência do entomopatógeno, enquanto a de fungos totais inibiu esta população quando em contato com o inseticida abamectina. Entretanto, quando houve adição do inseticida carbofurano, a população de fungos totais e de *B. bassiana* mostraram padrão semelhante de crescimento, caracterizada por uma relação de neutralismo. A microbiota nativa influenciou a ação de fungicidas e inseticidas para *B. bassiana* no solo. Quando estes agroquímicos se mostraram tóxicos, a microbiota, principalmente os actinomicetos, reduziu esta toxicidade.

Palavras-chave: agrotóxicos, controle biológico, microbiota do solo, sobrevivência, entomopatógeno, compatibilidade

IMPACTS OF FUNGICIDES AND INSECTICIDES ON THE POPULATION DENSITY OF *Beauveria bassiana* IN SOIL WITH THE ACTION OF NATIVE MICROBIOTA

ABSTRACT - Soil, a natural reservoir of many native microorganisms, protects biological control agents, which are essential in the success of integrated pest management. In this environment, the survival of entomopathogens is influenced by the effects of pesticides, as well as by the activity of the native microbiota, which can degrade the pesticides. Thus, this work aimed to clarify if the native microbiota influence the toxic action of some fungicides and insecticides applied in different situations on agricultural cultures using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in soil. Fungicides containing the active ingredients tiophanate-methyl, piraclostrobin, mancozeb, and copper oxychloride, as well as insecticides containing abamectin, thiametoxam, carbofuran, and chlorpiriphós were used at the doses recommended by the manufacturers. The toxicity of the pesticides to *B. bassiana* was first analyzed by evaluating the germination, mycelial growth, and sporulation. Then, the products were added to soil in Petri dishes in the following situations: 1) one hour after soil inoculation with 2 ml of suspension of *B. bassiana* (10^7 conidia/ml); 2) one hour before soil inoculation with 2 ml of suspension of *B. bassiana*; 3) 48 hours after soil inoculation with 2 ml of suspension of *B. bassiana*; and 4) soil inoculation with 2 ml of suspension of *B. bassiana* without addition of fungicides or insecticides. Every seven days for 28 days, the population density of the entomopathogen, total bacteria, total fungi, and actinomycetes was evaluated by determining the number of colony forming units (CFU) with specific culture media. In the experiment on culture media, all the fungicides were classified as toxic to *B. bassiana*, completely inhibiting the mycelial growth and sporulation. In relation to insecticides, only chlorpiriphos was toxic, and the others were compatible with the fungi. The fungicides were less toxic in the soil than in the culture media due to the action of native microgiota. The actinomycete population exerted the greatest influence on the populational density of the entomopathogen, inhibiting or contributing to its survival and growth in the soil through fungicide degradation, as observed in the experiment with piraclostrobin. In the experiment with copper oxychloride, the total bacteria population also contributed to fungal survival, by degrading the fungicide. The total fungal population exerted less influence on the toxic effects of the fungicides, as well as on the population density of the entomopathogen in the

soils containing thiophanate-methyl and copper oxychloride, where a similar pattern of increase or reduction were observed for both populations. Of all the insecticides added to soil, only chlorpyrifos inhibited *B. bassiana* growth, with total bacteria population being the only aid that reduced the toxicity of this active ingredient. In soils with added abamectin, carbofuran, and chlorpyrifos, the actinomycete population negatively influenced the survivor of the entomopathogen, while total fungi population inhibited this population in contact with the abamectin insecticide. However, when carbofuran was added, total fungi population and *B. bassiana* showed a similar growth pattern, characterized by a neutral relation. The native microbiota influenced the action of the fungicides and insecticides on *B. bassiana* in soil. When these pesticides showed some toxicity, the native microbiota, mainly the actinomycete population, reduced their toxicity.

Keywords: pesticides, biological control, soil microbiota, survival, entomopathogen, compatibility

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Desde os anos 1940, o controle de pragas tem sido baseado principalmente em produtos químicos (VEGA *et al.*, 2009). Inúmeras são as substâncias comercializadas atualmente com esse fim, porém, muitas delas podem causar efeitos negativos no meio ambiente e na saúde animal (LOUREIRO *et al.*, 2002; AMPOFO *et al.*, 2009). Tais compostos agem em certas vias metabólicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se quer controlar e, sendo algumas dessas vias comuns a todos eles, organismos não-alvo podem ser atingidos. O efeito dos agrotóxicos não fica restrito às pragas, pois os seres vivos interagem entre si, e qualquer intervenção pode afetar o equilíbrio presente no ambiente (SPADOTTO, 2006).

Uma das alternativas apresentadas ao uso dos agroquímicos é o manejo integrado de pragas (MIP), com uso concomitante destes produtos e de agentes de controle biológico, como os fungos entomopatogênicos. Dentre os principais produtos químicos utilizados no controle de pragas estão os inseticidas e os fungicidas que, se aplicados de forma indiscriminada, podem diminuir o potencial de controle de pragas por seus predadores, parasitóides e patógenos naturais; além disso, essas substâncias podem afetar, ainda, o restante da microbiota presente no solo. Portanto, para o sucesso do MIP, é necessário o conhecimento do impacto dos agrotóxicos sobre os agentes de controle biológico que, caso seja microbiano, podem ter o crescimento vegetativo, esporulação, viabilidade ou composição genética afetados, influenciando negativamente em sua virulência (ALVES *et al.*, 1998).

Calcula-se que 40% das áreas agrícolas passam por um processo de degradação, sendo o principal responsável o uso de agrotóxicos contra pragas e doenças de culturas (DUMANSKI & PIERI, 2000). O uso de produtos químicos em grandes quantidades pode diminuir as populações de microrganismos presente no solo, afetando a decomposição da matéria orgânica e a fixação dos nutrientes (MESQUITA, 2005). Vários são os trabalhos relatando os efeitos negativos de

agrotóxicos sobre os microrganismos presentes no solo (OLIVEIRA & NEVES, 2004; KINNEY *et al.*, 2005; LUKE & BATEMAN, 2006).

A importância da microbiota nativa do solo está relacionada à decomposição da matéria orgânica e disponibilidade dos nutrientes nesse ambiente, que determinam a fertilidade do solo. Estes microrganismos auxiliam no ciclo dos nutrientes, no fluxo de energia e produção vegetal (FERREIRA *et al.*, 2006), que proporcionam estabilidade ao ecossistema (KENNEDY, 1999).

A microbiota nativa também interage com os agentes de controle biológico, podendo inibi-los. Microrganismos de ocorrência natural no solo, como bactérias, fungos e actinomicetos, assim como seus metabólitos secundários, podem agir como antagonistas sob certas condições do solo, influenciando a sobrevivência e infectividade de fungos entomopatogênicos (LINGG & DONALDSON, 1981; McCOY *et al.*, 2000).

No entanto, ainda há um pequeno número de trabalhos relatando qual o efeito de compostos químicos e da microbiota nativa sobre as populações de fungos entomopatogênicos no solo. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo verificar se a microbiota nativa influencia a ação tóxica de fungicidas e inseticidas, aplicados em diferentes situações, sobre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no solo.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota nativa do solo e fungos entomopatogênicos

O solo é um ambiente constituído de três fases: sólida, líquida e gasosa (SMILES, 1988). Na fase sólida, os principais constituintes são substâncias inorgânicas, como areia, silte e argila, e substâncias orgânicas, como ligninas, celulose, amido e lipídeos. Tais partículas são permeadas por poros pequenos ou grandes, onde ocorre a proliferação de microrganismos (LIDDELL, 1997), que fazem parte da microbiota do solo. A fase líquida é aquela onde estão elementos químicos e moléculas diluídas ou em suspensão e a fase gasosa é constituída por gases que ficam entre as partículas do solo, cuja origem são os processos metabólicos (ZILLI *et al.*, 2003).

A participação da biomassa microbiana (BM) no solo é realizada através da decomposição da matéria orgânica que libera carbono, nitrogênio e fósforo (DIAZ-RAVIÑA *et al.*, 1993; STENBERG, 1999) e da ação provisória como reservatório dos nutrientes, evitando a perda dos mesmos por lixiviação e facilitando seu uso pelas plantas (ESPINDOLA *et al.*, 2001). Além disto, a biomassa microbiana atua no biocontrole das pragas e doenças (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002) e da descontaminação de poluentes ambientais (AELION & BRADLEY, 1991).

A quantidade de microbiota presente nesse ambiente é muito alta. Um grama desse substrato pode conter 10 bilhões de microrganismos, divididos em milhares de espécies (ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001). Tais microrganismos participam diretamente dos ciclos dos nutrientes no solo, catalizando a ciclagem dos nutrientes e da matéria orgânica, fatores influentes na fertilidade natural do ambiente em questão e, conseqüentemente, na produtividade do ecossistema. Além disso, a biomassa microbiana é um reservatório natural de nitrogênio, fósforo e enxofre (FERREIRA *et al.*, 2006).

Entre os microrganismos presentes na biomassa microbiana do solo, encontram-se os fungos entomopatogênicos. Este ambiente tem papel importante como reservatório desses fungos, e muitas espécies dos mesmos são encontradas em solos cultivados em todo o mundo (SUN *et al.*, 2008) sendo que várias espécies têm potencial para controlar naturalmente insetos-praga da agricultura.

Como no restante dos níveis tróficos, há interações constantes entre a microbiota nativa do solo e fungos entomopatogênicos, podendo ocorrer entre estas relações de sinergismo, antagonismo, mutualismo etc. Alguns organismos, entre estes agentes de controle biológico, quando introduzidos em um local, dependendo do habitat, podem ser impedidos de se instalar por organismos autóctones. Isso propicia o desenvolvimento, por parte desses, de nichos ecológicos distintos, fazendo com que a microbiota do solo apresente uma grande variedade de organismos (STAMFORD *et al.*, 2005).

Em estudos feitos com *B. bassiana*, sugeriu-se que a inibição deste fungo em solos naturais é causada mais pela fungistase do que pela competição com outros microrganismos (McCOY *et al.*, 2000; LINGG & DONALDSON, 1981). Várias espécies de actinomicetos, principalmente *Streptomyces* sp., produzem substâncias ativas com amplo espectro de ação,

inclusive com efeitos fungistáticos (SAMAC *et al.*, 2003). Em experimento realizado por AUGUSTYNIUK-KRAM *et al.* (2007), a quantidade de unidades formadoras de colônias de *B. bassiana* após sete dias de inoculação em solo contendo *Streptomyces griseoviridis* foi de três a sete vezes menor em relação ao grupo controle. De acordo com POPOWSKA-NOWAK *et al.* (2003), metabólitos voláteis produzidos pelos actinomicetos *Streptomyces flavescens* inibem completamente o crescimento de linhagens de *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces farinosus*, enquanto os metabólitos produzidos por bactérias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Pseudomonas aurantiaca* têm somente efeito fungistático.

Bactérias também são conhecidas por inibirem o crescimento de fungos através da liberação de substâncias fungistáticas, como antibióticos, cuja produção pode aumentar quando essas são colocadas em contato com outros microrganismos (MAURHOFER *et al.*, 2004). Os efeitos destes compostos em fungos vão desde a inibição do crescimento vegetativo à inibição da esporulação (KAI *et al.*, 2009). Quando analisadas 197 bactérias em relação à produção de compostos voláteis com efeitos fungistáticos, constatou-se que 14 realmente produziam estes compostos (FERNANDO *et al.*, 2005).

O crescimento de *B. bassiana* foi inibido ao ser inoculado conjuntamente com *Trichoderma* sp. Colônias de *B. bassiana* inoculadas isoladamente atingiram diâmetros de 16 mm em média, quando inoculadas conjuntamente com *Trichoderma* sp. atingiram diâmetros de 2,35 mm, indicando inibição do primeiro pelo segundo. De acordo com os autores do trabalho, nota-se halos de inibição ao redor das colônias de *B. bassiana* (MOINO Jr. & ALVES, 1999). Patulina, um metabólito produzido por *Penicillium urticae*, foi também inibitória para germinação e crescimento de *B. bassiana* (SHIELDS *et al.*, 1981).

2.2 Agrotóxicos e biomassa microbiana

O homem é responsável por causar um grande número de impactos no meio ambiente. Dentre estes impactos, estão o uso abusivo de produtos químicos para controle das mais diversas pragas que atacam as plantações, causando degradações no meio ambiente e na saúde dos animais, incluindo o homem. Além dos impactos gerados no ecossistema, outro problema com o

uso dos agrotóxicos é que a eficácia dos mesmos decresce conforme aumentam o número de aplicações, pois restam indivíduos com genótipo mais resistente aos produtos, não reduzindo completamente a população de determinadas pragas (FERREIRA *et al.*, 2006).

Outra desvantagem do uso desses produtos é que, além da ação tóxica na praga-alvo, ao atingirem o solo, podem entrar em contato com organismos não-alvos, como a microbiota nativa do solo e inimigos naturais, como os fungos entomopatogênicos (GHINI & KIMATI, 2000).

Vários são os trabalhos realizados em laboratório, em meio de cultura, para testar a toxicidade de compostos químicos para a microbiota e para as populações de fungos entomopatogênicos. Entretanto, o efeito de tais substâncias pode variar quando os microrganismos se encontram no solo. Isso porque o solo é um ambiente complexo, onde vários fatores estão atuando, como o tipo de solo, a compactação, textura e pH, o que pode, inclusive, afetar não só a sobrevivência dos propágulos de fungos (LANZA *et al.*, 2004) como a ação tóxica de compostos químicos sobre esses propágulos.

Compostos químicos são geralmente degradados por microrganismos presentes no solo, que assimilam os produtos provenientes da degradação. A degradação microbiana de pesticidas é uma etapa importante na biorremediação, e os actinomicetos têm um grande papel nesse processo (FUENTES *et al.*, 2010). Por outro lado, vários produtos têm efeito deletério na microbiota (MARTÍNEZ-TOLEDO *et al.*, 1992).

O efeito *in vitro* de 17 fungicidas aplicados em plantas ornamentais foi testado por BRUCK (2009) sobre a germinação e o crescimento micelial de *M. anisopliae*, bem como a persistência do fungo no tronco e na rizosfera após 30 dias de aplicação dupla de cada fungicida em intervalo de 7 a 28 dias. Dos produtos testados, sete inibem a germinação de *Metarhizium anisopliae*, 14 inibem o crescimento micelial e somente três não inibem nenhum dos parâmetros. Não houve efeito dos fungicidas na persistência do fungo no tronco e rizosfera.

O efeito dos inseticidas tiametoxam, carbosulfam, endosulfam, imadaclopride, diafentiuron, acefato, monocrotofós, deltametrina e fipronil sobre os microrganismos *Aschersonia aleyrodis*, *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus anticarsia*, *B. bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *M. anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *P. farinosus*, *Sporothrix insectorum* e *V. lecanii* *sensu lato* foi testado por BATISTA FILHO *et al.* (2001). Endosulfam, monocrotofós e

deltametrina são os que mais afetam os microrganismos *B. thuringiensis*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *S. insectorum*.

No município de Paty do Alferes – RJ, MESQUITA (2005) realizou um trabalho sobre o efeito de agrotóxicos na microbiota de solo. Em junho, o solo era cultivado com tomates, e o uso de agrotóxicos era realizado, enquanto em novembro o solo se transformava em pastagem, onde não era aplicado o agrotóxico. Foi constatado, levando-se em consideração os parâmetros respiração basal, biomassa microbiana e coeficiente metabólico, que o solo submetido ao cultivo de tomates tem a quantidade e a eficiência da microbiota diminuídas, principalmente no mês de junho.

O efeito de 16 agrotóxicos, entre herbicidas, fungicidas, acaricidas e inseticidas, sobre a atividade respiratória do fungo *M. anisopliae* em solo autoclavado foi estudado por MOCHI *et al.* (2005). Os fungicidas são os que mais reduzem a atividade respiratória, sendo que os demais compostos têm pequena influência sobre o parâmetro avaliado.

Em solos cultivados com uva, na região do semi-árido brasileiro em Petrolina, SILVA *et al.* (2005), testaram o efeito tóxico dos fungicidas metalaxil e fenarimol sobre a microbiota em casa de vegetação através de vários parâmetros. Foi verificado que ambos os fungicidas têm efeito negativo em três dos cinco parâmetros testados.

A ação do herbicida glifosato, do inseticida endossulfam e de uma mistura de ambos sobre a atividade microbiana do solo em cultura de soja foi verificada por PEREIRA *et al.* (2008). A aplicação de glifosato não diminui a atividade microbiana, enquanto a aplicação de endossulfam, tanto isoladamente quanto em combinação com o herbicida, faz com que a produção de CO₂ seja reduzida, assim como a biomassa microbiana.

O efeito de três agrotóxicos, sendo um inseticida (dimetoato) e dois herbicidas (paraquat e glifosato), sobre o número total de bactérias em solo cultivado foi avaliado por AMPOFO *et al.* (2009). Houve redução de 82,5% no número de organismos no solo tratado com glifosato e de 92,86% no solo tratado com paraquat. A população de bactérias no solo tratado com o inseticida dimetoato não teve decréscimo.

Assim como a matéria orgânica é degradada pela microbiota, o mesmo acontece com inseticidas (DAS & MUKHERJEE, 2000) e outros compostos químicos, cuja degradação é influenciada por microrganismos com enzimas catabólicas específicas (AISLABIE & LLOYD-

JONES, 1995). Entretanto, mesmo que os microrganismos ajam para degradar os agrotóxicos, restam no solo resíduos desses compostos químicos, que ficam ativos por determinado tempo. Dependendo do tipo de substância de que é constituído o composto, o tempo para que se tornem inativos varia, sendo em média de um a seis meses para derivados de fenoxi, toluinas e nitrilas e de um a dezoito meses para derivados de uréia, triazinas e picloram (HELLAWELL, 1988).

Em condições de laboratório, SILVA *et al.* (1999) verificaram a degradação de carbendazim, um subproduto da hidrólise do fungicida benomil, pelo fungo *Alternaria alternata* cultivado em meio de cultura. No segundo dia de incubação, no meio onde o fungo foi cultivado, a porcentagem de degradação do composto é de 66,21%, e no sétimo dia a concentração de carbendazim no meio chega a 16,13% da concentração inicial.

A degradação biótica e abiótica do herbicida azimsulfurom pela microbiota em amostras de solo foi verificada por VALLE *et al.* (2006). Constataram que o herbicida é degradado em maior quantidade nas amostras de solo que não foram esterilizadas e continham o microcosmo, do que naquelas amostras cuja degradação é abiótica.

Em um experimento realizado *in vitro* para verificar a degradação dos herbicidas clorotoluron, diuron, isoproturon e linuron pelo fungo do solo *Mortierella* sp. após 26 dias de incubação, BADAWI *et al.* (2009) verificaram que a quantidade de clorotoluron reduz de 43,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 17 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e isoproturon é completamente eliminado. Nesse mesmo período, o herbicida diuron é completamente transformado pelo fungo. O herbicida linuron tem um rápido decréscimo nos cinco primeiros dias de incubação. Nenhuma transformação ou degradação abiótica foi detectada.

A biodegradação do inseticida diazinom pelas bactérias *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* sp. e por consórcio das mesmas, em meio de cultura, foi observada por CYCÓN *et al.* (2009). Em 14 dias, de 80 a 92% da dose inicial do inseticida é degradada.

Uma bactéria identificada como *Ochrobactrum lupini*, isolada de solo, degrada 90,4 e 99,7% de clorotalonil, um fungicida de amplo espectro, adicionado a sal mineral (50 mg L^{-1}) e em solo autoclavado (50 $\mu\text{g g}^{-1}$), respectivamente, após quatro e sete dias de incubação (SHI *et al.*, 2010). Outra bactéria do mesmo gênero, *Ochrobactrum tritici*, também isolada de solo contaminado com piretróide sintético, degrada uma grande variedade de piretróides, sendo que a eficiência de degradação é dependente da estrutura molecular do produto (WANG *et al.*, 2011).

Duas espécies de fungos, *Fusarium poae* e *Fusarium solani* foram isolados de solo contaminado com lindane, um pesticida do grupo dos clorados. A degradação do composto por *F. poae* foi de 56,7%, enquanto que por *F. solani* foi de 59,4%. Através de análise de cromatografia gasosa, foram confirmadas a utilização e a biodegradação do lindane por ambos os fungos (SAGAR & SINGH, 2011).

Foram isoladas, de solos tratados com o herbicida alachlor, 53 linhagens de actinomicetos, que foram testados quanto à degradação do composto *in vitro*. Destes, 16 isolados foram tolerantes a altas concentrações do composto (acima de 720 mg L⁻¹) e seis mostraram-se capazes de crescer e degradar o composto (72 mg L⁻¹) em meio com sal mineral (SETTE *et al.*, 2005).

Uma bactéria isolada de água de efluente, identificada como *Streptomyces sp.* HU-S-01 em condições ótimas de crescimento (pH e temperatura) foi capaz de degradar eficientemente 10 a 250 mg L⁻¹ de cipermetrina em 48 horas e de degradar completamente, dentro de 30 horas, uma concentração mais baixa que 50 mg L⁻¹ do mesmo composto. A concentração de 250 mg L⁻¹ é a máxima encontrada contaminando solo e água (LIN *et al.*, 2011).

Portanto, a dissipação e a perda da atividade biológica de uma ampla variedade de agrotóxicos devem-se, em grande parte, à degradação microbiana (ALEXANDER, 1981). Quando um princípio ativo é utilizado várias vezes em uma determinada área acaba por selecionar microrganismos que, ao degradarem o produto, utilizam-no como fonte de nutrientes para seu crescimento. Assim, estes microrganismos têm vantagens, pois seu crescimento se torna rápido e acaba sobrepondo o de outras populações (OLIVEIRA, 2001), que são inibidas por competição ou por metabólitos produzidos pela microbiota.

2.3 Controle Biológico

O uso contínuo de produtos químicos para controlar pragas da agricultura resulta em: aumento de resistência das pragas a estes produtos e ressurgência das mesmas; eliminação de insetos benéficos tanto economicamente quanto no controle de pragas; e a toxicidade para a vida humana e silvestre. Todos estes problemas levaram à busca de alternativas para o manejo de

pragas, visando a produção de alimentos livres de pesticidas (MAHDNESHIN *et al.*, 2009). Uma das alternativas é o controle biológico, incluindo-se neste a utilização de microrganismos entomopatogênicos, como fungos e bactérias.

O controle biológico com fungos entomopatogênicos ou outros agentes é muitas vezes utilizado concomitantemente com produtos químicos no manejo integrado de pragas (MIP). O MIP se constitui em um método mais seguro e eficiente que o controle realizado somente através de produtos químicos (LOUREIRO *et al.*, 2002). Em algumas culturas, como árvores frutíferas de clima temperado, citros e café, assim como algodão, o controle integrado pode ser uma alternativa interessante (ALVES *et al.*, 1998). Nesta perspectiva, o solo torna-se um ambiente importante no controle biológico realizado por fungos entomopatogênicos, já que é um habitat protegido de radiação solar ultravioleta, além de sofrer menor influência de fatores externos, tanto bióticos como abióticos (KELLER & ZIMMERMAN, 1989). Em várias regiões do mundo, há ocorrências de fungos de solo parasitando insetos naturalmente.

Após período de chuvas em plantação de soja, no Maranhão, LOURENÇÃO *et al.* (2001) verificaram a infestação natural de *Verticillium lecanii sensu lato* em ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, com redução drástica da população da praga. Em um estudo sobre fatores que afetam a ocorrência e distribuição natural de fungos entomopatogênicos em áreas cultivadas na Espanha, QUESADA-MORAGA *et al.* (2007) isolaram *M. anisopliae* e *B. bassiana* de 175 das 244 amostras de solo colhidas.

Utilizando larvas de *Galleria mellonella*, SUN *et al.* (2008) verificaram a ocorrência natural de fungos entomopatogênicos em amostras de solo colhidas de pomares e lavouras. Um total de 29 espécies foram isoladas e identificadas, sendo 25 espécies encontradas em solos de lavoura e 20 espécies em solos de pomares. *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosorosea* foram encontrados no solo, em ambos os tipos de cultivos.

Assim, os fungos entomopatogênicos são agentes promissores no controle integrado de pragas. Além de serem encontrados naturalmente no solo, têm vantagens sobre outros patógenos, pois não somente matam seu hospedeiro pela ação tóxica causada por sua ingestão oral, como penetram no hospedeiro diretamente pelo integumento, através de um tubo de germinação proveniente de um esporo germinado. Isso indica que o controle não fica limitado a pragas que

comem partes da planta, mas também a homópteros e artrópodes com aparelhos bucais sugadores e cortadores (McCOY & TIGANO-MILANI, 1992).

A patogenicidade do fungo *M. anisopliae* isoladamente ou associada a fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas foi testada para larvas, pupas e adultos da mosca-das-frutas, *Ceratitis capitata*, em solo autoclavado. O fungo foi aplicado na superfície do solo na forma de suspensão ou incorporado a este na forma de conídios secos. Os produtos testados isoladamente pouco influenciaram na sobrevivência da mosca-das-frutas, porém o entomopatógeno reduziu sua sobrevivência nas fases de pupa e adulto, bem como a mortalidade total, na presença de todos os agrotóxicos (MOCHI *et al.*, 2006).

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, foram testados nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL⁻¹ sobre a mortalidade, fecundidade e fertilidade dos ovos de *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae), *in vitro*, por WEKESA *et al.* (2006). Todas as concentrações utilizadas, de ambos os fungos, diminuíram a eclodibilidade das larvas, bem como a fecundidade das fêmeas. A mortalidade de larvas, protoninfas, deutoninfas e adultos, na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹, diferiu significativamente da mortalidade observada no controle, indicando que os fungos são eficientes no controle do ácaro testado.

Quatro isolados do fungo *M. anisopliae* e quatro isolados de *B. bassiana* foram utilizadas por MARANINNO *et al.* (2006) para controle de larvas neonatas de *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae), *in vitro*. Três isolados de *M. anisopliae* tiveram uma eficácia de 100% no controle e um dos isolados teve uma eficácia de 68,5%. O fungo *B. bassiana* foi menos patogênico, com mortalidades variando de 23,5% a 73%.

A patogenicidade do fungo *M. anisopliae* para larvas de segundo instar, pupas e adultos de *Megalurothrips sjostedti* foi verificada, *in vitro*, por EKESI & MANIANIA (2000). A maior mortalidade foi ocasionada nos adultos, com valores de 64,1, 72,7 e 100% nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL⁻¹, respectivamente.

Concentrações de 10^3 , 10^4 e 10^5 dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram testadas, *in vitro*, sobre a mortalidade e biologia de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Na concentração mais alta, os fungos afetaram vários dos parâmetros testados. *B. bassiana* diminuiu a viabilidade das larvas e ovos, a fecundidade e a longevidade de machos e de fêmeas, enquanto

M. anisopliae, na mesma concentração, diminuiu a viabilidade larval, dos ovos e pupal, o período pupal e a longevidade de machos e de fêmeas (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

SOOKAR *et al.* (2008) testaram sete isolados de *M. anisopliae*, cinco isolados de *B. bassiana* e dois isolados de *I. fumosorosea*, todos obtidos de amostras de solo, no controle de adultos de duas espécies de mosca-das-frutas, *Bactrocera zonata* e *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). Exceto um isolado de *B. bassiana*, que não foi efetivo no controle de *B. cucurbitae*, todos os demais mostraram-se eficientes para controlar ambas as espécies de mosca. O ensaio foi realizado com inoculação na superfície ventral do inseto com auxílio de micropipeta.

3. REFERÊNCIAS

AELION, C.M., BRADLEY, P.M. Aerobic degradation potencial of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 57-63, 1991.

AISLABIE, J.; LLOYD-JONES, G. A review of bacterial-degradation of pesticides. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 33, n. 6, p. 945-942, 1995.

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, Washington, v. 211, n. 4478, p. 132-138, 1981.

ALVES, S.B., MOINO Jr., A.; ALMEIDA, J. E. M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos, p. 217-238. In: S.B. Alves (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2a. ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

AMPOFO, J.A.; TETTEH, W.; BELLO, M. Impact of commonly used agrochemicals on bacterial diversity in cultivated soils. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3 , p. 223-229, 2009.

AUGUSTYNIUK-KRAM, A.; MANDRIK, M.N.; ROMANOVSKAYA, T.V.; KOLOMIETS, E.I.; KUPTSOV, V.N. Survival rate, insecticidal and fungistatic activity of antagonistic actinomycete *Streptomyces griseoviridis* and entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in separate and combined introductions to the soil. **Journal of Plant Protection Research**, v. 47, n. 2, 179-186, 2007.

BADAWI, N.; RONHEDE, S.; OLSSON, S.; KRAGELUND, B.B.; JOHNSEN, A.H.; JACOBSEN, O.S.; AAMAND, J. Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. **Environmental pollution**, Barking, v. 157, n. 10, p. 2806-2812, 2009.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 437-447, 2001.

BRUCK, D.J. Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the rhizosphere, bulk soil and in vitro. **BioControl**, Dordrecht, v. 54, n. 4, p. 597-606, 2009.

CYCÓN, M.; WÓJCIK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Biodegradation of the organophosphorus diazinon by *Serratia* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 76, n. 4, p. 494-501, 2009.

DAS, A.C., MUKHERJEE, D. Effect of insecticides on the availability of nutrients, nitrogen fixation, and phosphate solubility in the rhizosphere soil of rice. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 18, n. 1, p. 37-41, 2000.

DIAZ-RAVIÑA, M.; ACEA, M.J.; CARBALLAS, T. Microbial biomass and its contribution to nutrient concentrations in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 25, p. 25-31, 1993.

DUMANSKI, J.; PIERI, C. Land quality indicators: research plan. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdã, v. 81, n. 2, p. 93-102, 2000.

EKESI, S.; MANIANIA, N.K. Susceptibility of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 94, n. 3, p. 229-236, 2000.

ESPINDOLA, J.A.A.; ALMEIDA, D.L. de; GUERRA, J.G.M.; SILVA, E.M.R da. Flutuação sazonal da biomassa microbiana e teores de nitrato e amônio de solo coberto com *Paspalum notatum* em um agroecossistema. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 8, n.1, p. 104-113, 2001.

FERNANDO, W.G.D.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A.S.; SAVCHUK, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.

FERREIRA, A.P.F.; CUNHA, C.L.N.; WERMELINGER, E.D.; SOUZA, M.B. de; LENZI, M.F.; MESQUITA, C.M.; JORGE, L.C. Impacto de pesticidas na atividade microbiana do solo e sobre a saúde dos agricultores. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 30, n. 2, p. 309-321, 2006.

FUENTES, M.S.; BENIMELI, C.S.; CUOZZO, S.A.; AMOROSO, M.J. Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: Bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 6, p. 434-441, 2010.

GHINI, R. & KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

HELLAWELL, J.M. Toxic substances in rivers and streams. **Environmental Pollution**, Barking, v. 50, n. 1-2, p. 61-85, 1988.

KAI, M.; HAUSTEIN, M.; MOLINA, F.; PETRI, A.; SCHOLZ, B.; PIECHULLA, B. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, n. 6, p. 1001-1012, 2009.

KELLER, S.; ZIMMERMANN, G. 1989. Mycopathogens of soil insects. In: Wilding, N.; Collins, N.M.; Hammond, P.M.; Webber, J.F. (Eds.) **Insect-fungus interactions**. Academic Press, London, p. 240-270.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdã, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.

KINNEY, C.A.; MANDERNACK, K.W.; MOSIER, A. R. Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 837-850, 2005.

LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E.B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p.1757-1762, 2004.

LIDDELL, C.M. Abiotic factors and soilborne diseases. In: Hillocks, R.J. & Waller, J.M. (Eds.) **Soilborne Diseases of Tropical Crops**. Wallingford. CAB International. 1997. pp.365-376.

LIN, Q.S.; CHEN, S.H.; HU, M.Y.; UL HAQ, M.R.; YANG, L.; LI, H. Biodegradation of cypermethrin by a newly isolated actinomycetes HU-S-01 from wastewater sludge. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 45-56, 2011.

LOUREIRO, E.S.; MOINO Jr., A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G.C. de. Efeitos de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 263-269, 2002.

LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA, M.A.C.; ALVES, S.B. Ocorrência epizoótica de *Verticillium lecanii* em *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) no estado do Maranhão. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 183-185, 2001.

LUKE, B.M, BATEMAN, R. P. Effects of chemical and botanical insecticides used for locust control on *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia after short-to medium-term storage at 30 °C. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 761-766, 2006.

MAHDNESHIN, D.; SAFARALIZADAH, M.H.; GHOSTA, Y. Study on the efficacy of iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin against *Rizopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 9, n. 2, p.170-174, 2009.

MARANINNO, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; LILLO, E. de; QUESADA-MORAGA, E.A. A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 93, n. 3, p. 210-213, 2006.

MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; SALMERÓN, V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ. Effect of an organophosphorus insecticide, profenofos, on agricultural soil microflora. **Chemosphere**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 71-80, 1992.

MAURHOFER, M.; BAEHLER, E.; NOTZ, R.; MARTINEZ, V.; KEEL, C. Cross talk between 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol pseudomonads on wheat roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 1990-1998, 2004.

McCOY, C.W.; TIGANO-MILANI, M. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, s/n, p. 87-93, 1992.

McCOY C.W.; QUINTELA E.D.; DE FARIA M. 2000. Environmental Persistence of Entomopathogenic Fungi. In: **Factors Affecting the Survival of Entomopathogens** (M.E. Baur, J.R. Fuxa, eds.). Louisiana State University Agricultural Center, Southern Cooperative Series Bulletin 400.

MESQUITA, C.M. de. **Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos na microbiota do solo**. Estudo de caso: Paty do Alferes – RJ. 2005. 103 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) - Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2005.

MOCHI, D.A.; MONTEIRO, A.C.; BARBOSA, A.C. Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 961-971, 2005.

MOCHI, D.A.; MONTEIRO, A.C.; DE BORTOLI, S.A.; DÓRIA, H.O.S.; BARBOSA, J.C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 3, 2006.

MOINO Jr. A.; ALVES, S.B. Efeito antagônico de *Trichoderma sp.* no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 217-224, 1999.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Xenobióticos no Solo. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 243-284.

OLIVEIRA, M.F de. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: **Plantas daninhas e seu manejo**. OLIVEIRA, R. S. de; CONSTANTIN, J. Guaíba: Agropecuária, 2001. p.316-355.

OLIVEIRA, R.C., NEVES, P.M.O.J. Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 353-358, 2004.

OLIVEIRA, M.A.P. de; MARQUES, E.J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; BARROS, R. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Sobre características biológicas de *Diatrea sacharallis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, 2008.

PEREIRA, J.L.; PICANÇO, M.C.; SILVA, A.A.; SANTOS, E.A.; TOMÉ, H.V.V.; OLARTE, J.B. Effects of glyphosate and endosulfan on soil microorganisms in soybean crop. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 825-830, 2008.

POPOWSKA-NOWAK, E.; BAJAN, C.; AUGUSTINYUK-KRAM, A.; KOLOMIEC, E.; CHIKILEVA, A.; LOBANOK, A. Interactions between soil microorganisms: bacteria, actinomycetes and entomopathogenic fungi of the genera *Beauveria* and *Paecilomyces*. **Polish Journal of Ecology**, Lomianki, v. 51, n. 1, p. 85–90, 2003.

QUESADA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; MARANHÃO, E.A.A.; ORIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 8, p. 947-966, 2007.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SAMAC, D.A.; WILLERT, A.M.; McBRIDE, M.J.; KINKEL, L.L. Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfafa. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 55-66, 2003.

SHIELDS, M.S.; LINGG, A.J.; HEIMSCH, R.C. Identification of a *Penicillium urticae* metabolite which inhibit *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 38, n. 3, p. 374–377, 1981.

SHI, X.; GUO, R.J.; TAKAGI, K.; MIAO, Z.Q.; LI, S.D. Chlorotalonil degradation by *Ochrobactrum lupini* strain TP-D1 and identification of its metabolites. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 8, p.1755-1764, 2010.

SILVA, C.M.M. de S.; DE MELO, I.S. de; MAIA, A. de H.; ABAKERLI, R.B. Isolamento de fungos degradadores de carbendazim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1255-1264, 1999.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F.; VIEIRA, R.F. Efeito dos fungicidas metalaxil e fenarimol na microbiota do solo. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 93-104, 2005.

SMILES, D.E. Aspects of the physical environment of soils organisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 6, n. 3, p. 204-215, 1988.

SOOKAR, P.; BHAGWANT, S.; AWOR OUNA, E. Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 132, n. 9-10, p. 778-788, 2008.

SPADOTTO, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manuel, 9 p., 2006.

STAMFORD, N.P. ; RODRIGUES, J.J.V.; HECK, R.J.; ANDRADE, D.E.G.T. Microbiota dos solos tropicais. In : MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife, UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p. 61-92.

SAGAR, V.; SINGH, D.P. Biodegradation of lindane pesticide by non white-rots soil fungus *Fusarium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, n.8, p. 1747-1754, 2011.

SETTE, L.D.; OLIVEIRA, V.M. de; MANFIO, G.P. Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 81-89, 2005.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Soil and Plant Science**, Copenhagen, v. 49, p. 1-24, 1999.

SUN, B.; YU, H.; CHEN, A.J.; LIU, X. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. **Crop Protection**, Guilford, v. 27, n. 11, p. 1421-1426, 2008.

VALLE, A.; BOSCHIN, G.; NEGRI, M.; ABBRUSCATO, P.; SORLINI, C.; D'AGOSTINA, A.; ZANARDINI, E. The microbial degradation of azimsulfuron and its effect on soil bacterial community. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 2, p. 443-452, 2006.

VEGA, F.E. ; GOETTEL, M.S. ; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M.A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N.K.; MONZÓN, A.; OWNLEY, B.H.; PELL, J.K.; RANGEL, D.E.N.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.

WANG, B; MA, Y.; ZHOU, W.; ZHENG, J. ; ZHU, J.; HE, J.; LI, S. Biodegradation of synthetic pyrethroids by *Ochrobactrum tritici* strain pyd-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 2315-2324, 2011.

WEKESA, V.W.; KNAPP, M.; MANIANIA, N.K.; BOGA, H.I. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 130, n. 3, p. 155-159, 2006.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-311, 2003.

CAPÍTULO 2 - DENSIDADE POPULACIONAL DE *Beauveria bassiana* NO SOLO SOB AÇÃO DE FUNGICIDAS E DA MICROBIOTA NATIVA

RESUMO - O solo é um ambiente complexo onde a atividade da microbiota nativa tem importante papel, podendo influenciar o efeito de fungicidas para os bioagentes de controle de pragas. Este trabalho teve por objetivo investigar se a sobrevivência do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no solo é influenciada pela ação de fungicidas usados no manejo de culturas agrícolas, aplicados em diferentes situações, e pela microbiota nativa. Foram usados fungicidas contendo os ingredientes ativos tiofanatometílico, piraclostrobina, mancozebe e oxiclureto de cobre nas doses recomendadas pelos fabricantes. A toxicidade destes produtos para *B. bassiana* foi inicialmente analisada em meio de cultura através da avaliação da germinação, crescimento micelial e esporulação em meio de cultura contendo os fungicidas. Em seguida, os fungicidas foram adicionados ao solo uma hora antes, uma hora depois e 48 horas depois da inoculação do fungo. Avaliou-se a cada 7 dias por 28 dias, a densidade populacional de *B. bassiana*, de fungos totais, de actinomicetos e de bactérias totais. Todos os fungicidas foram classificados como tóxicos para *B. bassiana* no experimento com meio de cultura, pois apesar de terem pouco efeito sobre a germinação, inibiram completamente o crescimento micelial e a esporulação. No solo, os fungicidas tiveram menor toxicidade para *B. bassiana*, ficando evidenciada a ação da microbiota que interferiu no efeito tóxico destes produtos para o fungo. A população de actinomicetos foi a que exerceu maior influência sobre a população do entomopatógeno, inibindo-a ou degradando os fungicidas, contribuindo para a sobrevivência e crescimento de *B. bassiana* no solo. As populações de fungos e de bactérias totais exerceram menor influência sobre a densidade populacional do entomopatógeno, bem como no efeito tóxico dos fungicidas para esta população.

Palavras-chave: controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, microrganismos do solo, compatibilidade, toxicidade

CHAPTER 2 - POPULATION DENSITIES OF *Beauveria bassiana* IN SOILS UNDER THE ACTION OF FUNGICIDES AND THE NATIVE MICROBIOTA

ABSTRACT - Soil is a complex environment where the activity of the native microbiota plays an important role, possibly influencing the effect of fungicides as pest-control bioagents. This study investigated whether the survival of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in soils is influenced by the action of fungicides used for the management of agricultural crops, applied in different situations, and by the native microbiota. The fungicides used here contained the active ingredients thiophanate-methyl, pyraclostrobin, mancozeb, and copper oxychloride at the doses recommended by the manufacturers. The toxicity of these products for *B. bassiana* was initially analyzed in a culture medium containing the fungicides through the evaluation of the germination, mycelial growth and sporulation. Next, the fungicides were added to a soil sample one hour before, one hour after, and 48 hours after inoculation with the fungus. The population densities of *B. bassiana*, total fungi, actinomycetes, and of total bacteria were evaluated every 7 days for 28 days. All fungicides were classified as toxic for *B. bassiana* in the experiment with the culture medium because they completely inhibited the mycelial growth and sporulation despite having little effect on the germination. In the soil, the fungicides had a lower toxicity for *B. bassiana*, emphasizing the action of the microbiota, which interfered with the toxic effect of these products for the fungus. The population of actinomycetes had the greatest influence on the population of the entomopathogen, inhibiting it or degrading the fungicides, contributing to the survival and growth of *B. bassiana* in the soil. The populations of fungi and of total bacteria had a smaller influence on the population density of the entomopathogen and on the toxic effect of the fungicides for this population.

Keywords: biological control, microbial control, entomopathogenic fungus, soil microorganisms, compatibility, toxicity

1. INTRODUÇÃO

Dentre os agrotóxicos utilizados no manejo de culturas agrícolas, os fungicidas destacam-se, já que são uns dos mais utilizados no mundo todo, representando 27% do mercado mundial. O Brasil ocupa a 15ª posição no ranking dos países exportadores de agrotóxicos sendo que, desse mercado, 29% é voltado para a exportação de fungicidas, enquanto a importação deste mesmo composto químico pelo país atinge 39% de todo o mercado de pesticidas, segundo dados médios de 2000-2007 (HOFFMAN *et al.*, 2010).

No manejo integrado de pragas (MIP), estes produtos podem ser um problema, já que, quando alcançam o solo, podem entrar em contato com organismos não-alvos, como os entomopatógenos (MOCHI *et al.*, 2005), afetando-os de diversas maneiras (JAROS-SU *et al.*, 1999). Uma estratégia do manejo integrado é manter o agente de controle biológico no ecossistema onde foi aplicado, sendo que para isso deve-se saber qual a ação dos produtos químicos sobre os inimigos naturais das pragas (BATISTA FILHO *et al.*, 2003). Assim, testes de compatibilidade entre agrotóxicos e fungos entomopatogênicos são essenciais para o sucesso do MIP (DA SILVA & NEVES, 2005). A maioria dos testes é realizada em laboratório, com a adição dos produtos a serem testados no meio de cultura sintético onde o fungo será cultivado, o que não reflete a situação de campo, onde o contato do produto com o agente de controle ocorre no solo (MOCHI *et al.*, 2005).

A sobrevivência de fungos entomopatogênicos em ambientes naturais é influenciada por fatores bióticos e abióticos. Fatores abióticos, como temperatura e umidade atmosférica e do solo, tipo de solo e luminosidade, bem como a concentração de oxigênio são extremamente importantes na infectividade e sobrevivência de fungos entomopatogênicos (McCOY *et al.*, 2000). Fatores como salinidade e acidez (pH) também influenciam os entomopatógenos (STAMFORD *et al.*, 2005). Os fatores bióticos principais são o reservatório de invertebrados, os antagonistas naturais e os artificiais (McCOY *et al.*, 2000). Entre os antagonistas naturais está a microbiota nativa do solo, um dos fatores que mais atuam em relação à persistência de fungos neste ambiente (JARONSKI, 2010).

Quando aplicados no ecossistema agrícola os fungicidas atingem diretamente o solo ou chegam a este ambiente através das águas das chuvas, podendo interagir com a microbiota nativa, sofrendo degradação ou inibindo o crescimento da mesma. A degradação microbiana é um dos principais fatores responsáveis pela não-acumulação de pesticidas no solo (ARBELI & FUENTES, 2007) e por meio dela o composto químico é utilizado como fonte de carbono pela microbiota do solo, cujas populações crescem consideravelmente (BHUYAN *et al.*, 1993, DAS & MUKHERJEE, 1994). Os microrganismos necessitam de fontes assimiláveis de carbono, que são encontradas em moléculas de compostos químicos, para produção de energia (PLUMBRIDGE, 2009), podendo levar a um aumento considerável da biomassa. Este aumento pode influenciar outros microrganismos presentes no solo, como os fungos, pela inibição causada por fungistase. A fungistase ocorre devido à produção de compostos antifúngicos por microrganismos do solo (ZOU *et al.*, 2007), sendo apontada como uma das principais influências na sobrevivência de fungos (LANZA *et al.*, 2004).

As populações fúngicas do solo podem ser beneficiadas pela degradação enzimática dos produtos químicos pela microbiota nativa, já que estes podem ser transformados em subprodutos menos tóxicos ou danosos (LOPES *et al.*, 2010), o que diminui o efeito inibitório sobre estes microrganismos. No entanto, quando a microbiota sofre ação antagônica do agrotóxico, já que alguns destes não são utilizados pelos microrganismos do solo como fonte de energia, pode haver uma ação deletéria destes produtos, ocasionando redução da sobrevivência e conseqüentemente do crescimento das populações de microrganismos expostos a determinados produtos químicos (MARTINEZ-TOLEDO *et al.*, 1992; AMPOFO *et al.*, 2009).

Além de atuarem sobre a microbiota nativa do solo e afetarem indiretamente os fungos entomopatogênicos presentes neste ambiente, os fungicidas podem agir diretamente sobre esses inimigos naturais das pragas, inibindo seu desenvolvimento e reprodução, com efeitos negativos no MIP (MALO, 1993). Muitas espécies de fungos entomopatogênicos habitam o solo, entre eles *Beauveria bassiana* (QUESADA-MORAGA *et al.*, 2007) que, devido à sua distribuição cosmopolita e frequente presença na natureza, é um dos mais encontrados e reconhecidos fungos patógenos de insetos (REHNER, 2005). No Brasil são feitas aplicações deste fungo para o controle de determinadas pragas de culturas importantes, como a broca-do-cafeeiro *Hypothenemus hampei* (NEVES *et al.*, 2010), a broca-da-bananeira *Cosmopolites sordidus*

(BATISTA FILHO *et al.*, 2010) e o ácaro-da-falsa-ferrugem *Phyllocoptruta oliivora* (ALVES *et al.*, 2005) dos citros.

Os efeitos dos fungicidas sobre fungos utilizados no controle biológico foram pouco explorados, principalmente no solo, com a presença da microbiota. Assim sendo, são necessários estudos para analisar se a ação destes produtos é influenciada por estes microrganismos. Portanto, este trabalho teve por objetivo investigar se a sobrevivência do fungo entomopatogênico *B. bassiana* no solo é influenciada pela ação de fungicidas usados, em diferentes formas de aplicação, no manejo de culturas agrícolas e pela microbiota nativa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento com meio de cultura

Foi utilizado o isolado JAB 06 de *Beauveria bassiana* mantido em cultura estoque na coleção do laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). O fungo foi cultivado em meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA), mantido em estufa a 27 ± 1 °C, em ausência de luz, durante 25 dias.

Foram usados os fungicidas descritos na Tabela 1 pelo ingrediente ativo, grupo químico, dose recomendada pelo fabricante e culturas para as quais são recomendados. As doses dos fungicidas foram adicionadas ao meio BDA na temperatura próxima de 45 a 50 °C, evitando, assim, possíveis alterações das propriedades dos mesmos. Após vertido em placa de Petri, o meio foi inoculado por picada em ponto central usando uma agulha de platina previamente imersa em suspensão contendo 10^7 conídios mL⁻¹, obtida de colônias jovens do fungo.

Como parâmetros de avaliação do desempenho do fungo em relação aos fungicidas foram usados a germinação dos conídios, o crescimento vegetativo e a esporulação. O crescimento das colônias foi quantificado através de medidas, em milímetros, de três diâmetros marcados na parte externa do fundo da placa de Petri. As medidas foram efetuadas a cada três dias, do 3^o ao 15^o dias

após a inoculação. Cada placa correspondeu a uma repetição, e para cada fungicida (tratamento) foram feitas cinco placas.

Tabela 1. Fungicidas utilizados nos ensaios, com os respectivos nomes comerciais, grupos químicos, princípios ativos, doses e culturas onde são aplicados^a.

Nome Comercial	Grupo químico	Princípio ativo	Dose	Culturas
Cercobin [®]	Benzimidazóis	Tiofanatometílico	250 g/100 L água. Volume de calda de 1000 L ha ⁻¹	Café, citros
Comet [®]	Estrobilurinas	Piraclostrobina	15 mL/ 100 L água. Volume de calda de 2000 L ha ⁻¹	Banana, café
Mancozeb [®]	Ditiocarbamatos	Mancozebe	150 g/ 100 L água. Volume de calda de 1000 L ha ⁻¹	Citros
Cobox [®]	Cúpricos	Oxicloreto de Cobre	250 g/ 100 L água. Volume de calda de 1000 L ha ⁻¹	Café, citros

^aFonte: Compêndio de Defensivos Agrícolas, 6^a ed., Editora Andrei, São Paulo, 1999, 672p.

A produção de conídios foi avaliada coletando-se uma amostra do centro, uma da parte mediana e uma da periferia de cada colônia com auxílio de um furador de rolha de 8 mm de diâmetro, esterilizado, no 15^o dia de incubação, sendo coletadas amostras de três colônias (repetições). As amostras foram transferidas individualmente para tubos de ensaio com 10 mL de uma solução 1:1 de NaCl (0,089% p v⁻¹) e Tween 80[®] (0,1% v v⁻¹) esterilizada. Após a remoção dos conídios por vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, foi feita, para cada tubo, a contagem ao microscópio óptico em câmara de Neubauer, utilizando-se diluição da suspensão quando necessário.

A viabilidade dos conídios foi avaliada através de cultivo e exame direto em lâmina ao microscópio. Lâminas de microscopia esterilizadas foram recobertas com uma fina camada de BDA contendo os fungicidas nas doses recomendadas. Na parte inferior de cada lâmina foram

marcados três campos e sobre o meio de cultura foi inoculado, em cada campo, 0,05 mL de suspensão fúngica com 10^5 con. mL^{-1} . Após 15 horas de incubação a 27 ± 1 °C e ausência de luz, o processo de germinação foi interrompido, pingando-se uma gota de corante [1 mL de solução estoque (1 g de azul de metileno em 20 mL de ácido láctico) adicionada em 29 mL de ácido láctico] em cada campo. Foram observados 150 conídios em cada campo da lâmina, entre germinados e não germinados, sendo estabelecida uma porcentagem. Para cada tratamento foram feitas três repetições (três lâminas) que foram inoculadas com suspensões distintas obtidas de colônias jovens.

O ensaio foi organizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa AgroEstat (BARBOSA & MALDONADO, 2010).

Para determinar o efeito tóxico dos produtos foi utilizada a fórmula descrita por ROSSI-ZALAF *et al.* (2008) envolvendo os parâmetros germinação, crescimento vegetativo e esporulação:

$$IB = \frac{47[CV] + 43[ESP] + 10[GER]}{100}$$

Em que:

IB = índice biológico; CV: porcentagem de crescimento vegetativo da colônia após 15 dias, em relação à testemunha; ESP: porcentagem de esporulação após 15 dias, em relação à testemunha; GER: porcentagem de germinação dos conídios após 15 horas, em relação à testemunha. Não foram utilizadas casas decimais para o cálculo do IB.

Com os valores obtidos de I.B. fez-se a classificação toxicológica dos produtos, nas diferentes dosagens, de acordo com a escala descrita por ROSSI-ZALAF *et al.* (2008): de 0 a 41 – tóxico; de 42 a 66 – moderadamente compatível; > 66 – compatível.

2.2 Experimento com solo

O efeito tóxico dos fungicidas para *B. bassiana* foi também avaliado no ambiente do solo. Foi utilizado um Latossolo Vermelho textura argilosa (53% de argila, 18% de silte e 29% de

areia) coletado na profundidade de 0 a 20 cm, em área de preservação ambiental pertencente à FCAV-UNESP. O solo foi seco em temperatura ambiente, destorroado e peneirado em peneira com malha de 1 mm. Para cada ensaio com um fungicida foi coletada uma nova amostra de solo. A capacidade de saturação de água foi determinada antes da execução do ensaio.

Foram utilizadas placas de Petri de 100 mm contendo 80 g de solo não-autoclavado. Para facilitar as trocas gasosas, a abertura das placas foi ampliada, fixando, no lado interno da tampa, dois palitos de madeira. O solo recebeu, em câmara asséptica, água destilada esterilizada até atingir 65% da capacidade de saturação e permaneceu em repouso durante uma hora para estabilização. Os fungicidas foram adicionados ao solo, nas doses recomendadas pelos fabricantes e em volumes proporcionais adequados aos ensaios, nas seguintes situações: a) uma hora depois da inoculação do fungo; b) uma hora antes da inoculação do fungo; e c) 48 horas depois da inoculação do fungo. A inoculação foi feita distribuindo na superfície do solo 2 mL de suspensão fúngica com concentração de $1,0 \times 10^7$ con. mL⁻¹. As placas com o solo permaneceram em estufa a 27 ± 1 °C, no escuro por 28 dias, com reposição semanal da água perdida por evaporação. A testemunha consistiu de solo inoculado com suspensão fúngica, sem adição de produtos químicos.

Para a avaliação da sobrevivência do fungo foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) nos períodos de 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação. Uma amostra de 1 g de solo úmido colhida pela amostragem de 12 a 15 pontos da superfície do solo em cada placa, foi suspensa em 9 mL de solução de Tween 80[®] a 0,1% (v v⁻¹). A partir da suspensão inicial, foram feitas diluições seriadas e, destas diluições foram semeados 0,1 mL em placas de Petri, contendo meios de cultura para determinação das populações de *B. bassiana* (JOUSSIER & CATROUX, 1976, modificado pela supressão de suco de legumes e oxigall), bactérias totais (BUNT & ROVIRA, 1955), fungos totais (MARTIN, 1950) e actinomicetos (HSU & LOCKWOOD, 1973).

Para cada fungicida foi feito um ensaio usando o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F para examinar: a) o crescimento da população de cada microrganismo ao longo dos períodos de avaliação em um mesmo tratamento; b) o crescimento da população de *B. bassiana* entre os tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de

probabilidade. Foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson, a 5% de probabilidade, para verificar a interação entre as populações de bactérias totais, fungos totais e actinomicetos com a população de *B. bassiana*. Para a execução das análises foi usado o programa AgroEstat (BARBOSA & MALDONADO, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento com meio de cultura

A germinação dos conídios não foi afetada pela presença dos fungicidas no meio de cultivo, com exceção daquele contendo mancozebe. Entretanto, não houve crescimento vegetativo nem, conseqüentemente, esporulação de *B. bassiana* nos meios contendo as doses recomendadas de todos os fungicidas avaliados. Apesar do resultado obtido para a germinação de conídios, todos os fungicidas foram classificados como tóxicos para *B. bassiana* (Tabela 2). Fungicidas tendo tiofanatometílico e mancozebe como princípios ativos também foram classificados por LOUREIRO *et al.* (2002) como muito tóxicos para o isolado CB 66 de *B. bassiana*, tendo ambos inibido completamente o crescimento vegetativo e esporulação do fungo.

Para que ocorra germinação de conídios, uma fonte de carbono é necessária como um sinal extracelular para que ocorra a tradução, que culmina na germinação (OSHEROV & MAY, 2000), e pode ser explicada através da utilização de fontes endógenas de carbono e nitrogênio, sem utilizar fontes exógenas presentes no meio de cultura (LEFEVBRE, 1931). Dessa maneira, a germinação dos conídios de *B. bassiana* teria ocorrido antes do fungo entrar em contato com os fungicidas adicionados ao meio, sem causar a inibição. Porém, para que houvesse crescimento vegetativo e esporulação, a hifa teria que sofrer uma extensão após a germinação, e neste momento o fungo necessitaria de fontes exógenas de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultura adicionado de fungicida, o que inibiria a continuação do crescimento.

Tabela 2. Viabilidade de *Beauveria bassiana* cultivada em meio contendo diferentes fungicidas nas doses recomendadas pelos fabricantes, valores do índice biológico e classificação dos produtos quanto à toxicidade ao fungo.

Fungicidas	Viabilidade (%)	Índice biológico	Classificação toxicológica
Testemunha	97,07±1,48 a		
Oxicloreto de cobre	93,95±0,66 a	9	Tóxico
Tiofanatometílico	93,69±0,82 a	9	Tóxico
Piraclostrobina	74,26±27,41 ab	7	Tóxico
Mancozebe	50,10± 6,18 b	3	Tóxico
Teste F	8,37**		
C.V. (%)	12,77		

Valores originais, mas análise realizada com dados transformados em arc seno. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas do desvio padrão. C.V. Coeficiente de variação.

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Estes resultados são importantes para o MIP, pois mostraram que os fungicidas, apesar de se mostrarem tóxicos para *B. bassiana*, não inibiram completamente a germinação dos conídios que é o evento responsável pelo início do processo de penetração do fungo no hospedeiro (ALVES & LECUONA, 1998). Além disso, no ambiente do solo, a toxicidade dos fungicidas pode não ser a mesma, devido à influência da microbiota nativa.

3.2 Experimento com solo

3.2.1 Tiofanatometílico

No solo em que foi adicionado tiofanatometílico uma hora depois da inoculação de *B. bassiana* observou-se uma correlação linear e diretamente proporcional ($r=0,78532$; $p\leq 0,01$)

entre o crescimento da população do entomopatígeno e de fungos totais (Tabela 3), sugerindo que o crescimento de ambas as população pode estar associado (Figura 1A). Em experimento realizado por DRAGANOVA *et al.* (2008), a linhagem 412 de *B. bassiana* estimulou o crescimento de fungos do solo em até 30 vezes o valor encontrado no controle. De acordo com estes autores, por serem microrganismos heterotróficos e necessitarem de matéria orgânica como fonte de carbono para produção de energia, pode haver uma interação sinérgica entre estas populações. Esta interação é importante nos processos de degradação de compostos orgânicos no solo, já que este ocorre em etapas e engloba a ação de muitos microrganismos diferentes fisiologicamente (STAMFORD *et al.*, 2005). Com a degradação conjunta dos compostos orgânicos, as duas populações seriam beneficiadas, aproveitando nutrientes e exibindo um padrão semelhante de crescimento.

Neste mesmo tratamento (Figura 1A), a correlação entre as populações de actinomicetos e *B. bassiana* foi inversamente proporcional ($r=-0,57798$; $p\leq 0,05$) indicando que o aumento da população de actinomicetos está relacionado ao decréscimo da população do fungo (Tabela 3). O crescimento dos actinomicetos a partir do sétimo dia de avaliação pode ter gerado uma relação de competição com *B. bassiana* por fontes de nutrientes e espaço, inibindo-a. Outra possível explicação para a inibição seria a existência da relação de amensalismo. Os actinomicetos podem ter liberado compostos microbiostáticos que causam fungistase (STAMFORD *et al.*, 2005). Solos autoclavados reinfestados com actinomicetos apresentaram substâncias fungistáticas voláteis, que foram responsáveis pela inibição da germinação dos esporos de *Trichoderma viride*, *Zygorhynchus vuileminii* e *Gonatobotrys simplex* (HORA & BAKER, 1972).

Padrão semelhante de inibição de *B. bassiana* por actinomicetos também foi observado nos tratamentos onde o fungicida tiofanatometílico foi adicionado ao solo uma hora antes ($r=-0,49914$; $p\leq 0,05$) (Figura 1B) e 48 horas depois ($r=-0,51566$; $p\leq 0,05$) (Figura 1C) a inoculação do entomopatígeno (Tabela 3). Do mesmo modo que anteriormente, a inibição pode ser atribuída à liberação, pela população de bactérias actinomicetas, de compostos com efeitos inibidores. Actinomicetos que liberam odores conhecidos como cheiro de terra podem ser uma fonte produtora de voláteis inibidores, responsáveis pela fungistase (HORA & BAKER, 1970).

Tabela 3. Correlação entre a população de *Beauveria bassiana* e as populações de bactérias totais, fungos totais e actinomicetos obtidos para os fungicidas nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Coeficiente de correlação de Pearson (r) ^a		
	Bactérias totais	Fungos totais	Actinomicetos
Tiofanatometílico			
Adição 1 hora DIBb	-0,29284 ^{NS}	0,78532**	-0,57798**
Adição 1 hora AIBb	-0,17005 ^{NS}	0,91740**	-0,49914*
Adição 48 horas DIBb	-0,32250 ^{NS}	0,88365**	-0,51566*
Testemunha	-0,55585*	0,82688**	-0,40840 ^{NS}
Piraclostrobina			
Adição 1 hora DIBb	0,27867 ^{NS}	-0,17031 ^{NS}	0,32915 ^{NS}
Adição 1 hora AIBb	0,21512 ^{NS}	-0,65064**	0,58913**
Adição 48 horas DIBb	0,04262 ^{NS}	-0,58207**	0,61853**
Testemunha	0,22528 ^{NS}	-0,75968**	0,35766 ^{NS}
Mancozebe			
Adição 1 hora DIBb	0,08069 ^{NS}	0,19538 ^{NS}	0,28576 ^{NS}
Adição 1 hora AIBb	0,05629 ^{NS}	0,06766 ^{NS}	-0,48714*
Adição 48 horas DIBb	0,34106 ^{NS}	0,19314 ^{NS}	0,16840 ^{NS}
Testemunha	0,18944 ^{NS}	0,58354**	-0,41728 ^{NS}
Oxicloreto de cobre			
Adição 1 hora DIBb	0,01847 ^{NS}	0,91818**	-0,37650 ^{NS}
Adição 1 hora AIBb	0,69148**	0,84943**	-0,46717*
Adição 48 horas DIBb	0,82772**	0,72213**	-0,22961 ^{NS}
Testemunha	0,58644**	0,95867**	-0,36780 ^{NS}

^a Valores de correlação positivos indicam que as variáveis tem o mesmo direcionamento, enquanto valores negativos indicam que as variáveis tem direcionamento oposto. Quanto mais próximo de +1 ou -1, maior o grau de correlação entre as variáveis. DIBb: depois da inoculação de *Beauveria bassiana*; AIBb: antes da inoculação de *Beauveria bassiana*. ^{NS} Não significativo; ** Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade.

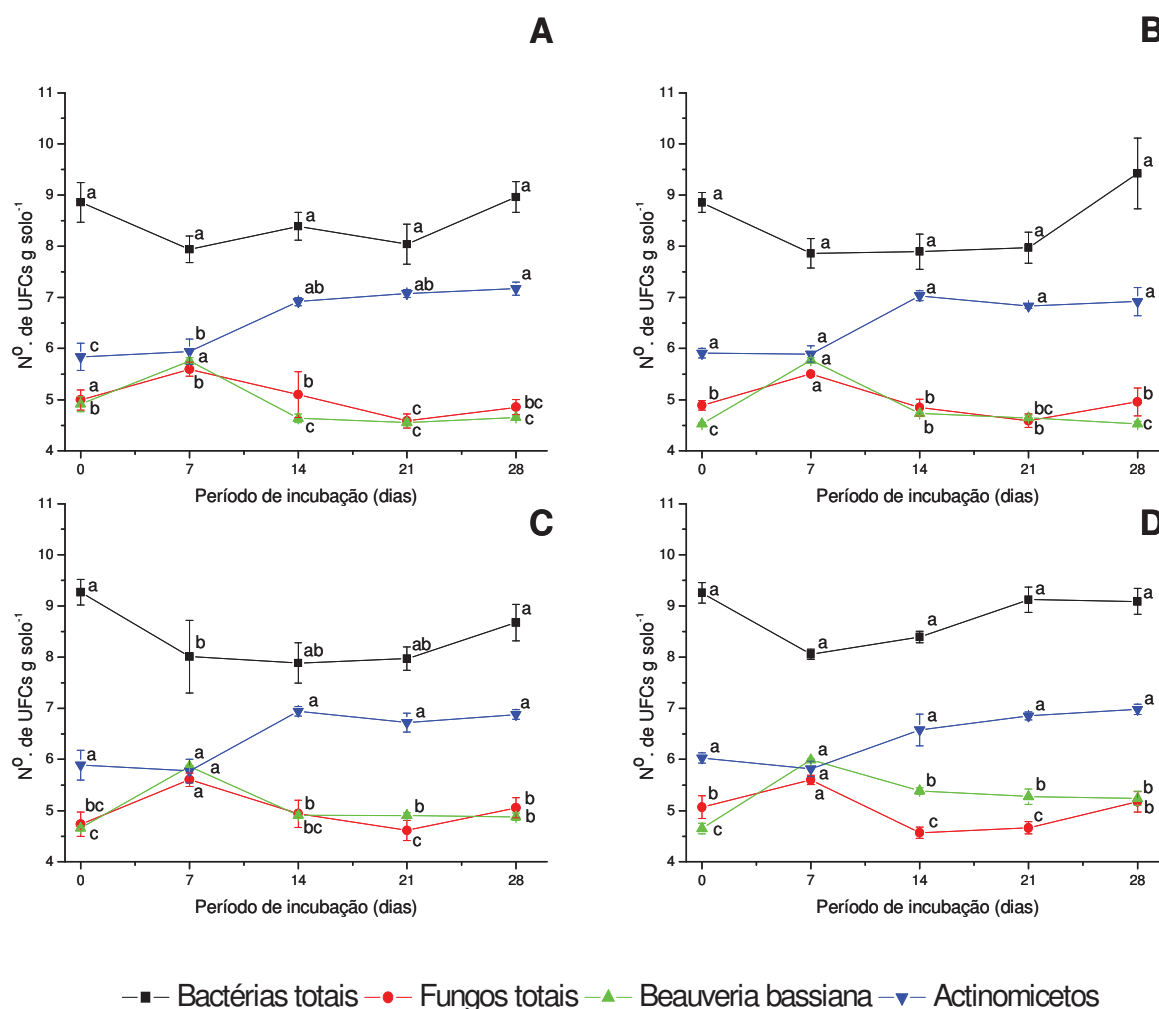


Figura 1. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do fungicida contendo o princípio ativo tiofanatometílico. Adição do fungicida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do fungicida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.

Na testemunha, a correlação negativa ($r=-0,55585$; $p\leq 0,05$) (Tabela 3) entre as populações de bactérias totais e de *B. bassiana*, sugere que a primeira inibiu a segunda (Figura 1D). Bactérias também são conhecidas por produzirem substâncias com efeito fungistático e até mesmo fungicida. ZOU *et al.* (2007) isolaram 1018 bactérias de solo e verificaram que, destas, 328

produziram compostos voláteis com efeito fungistático que inibiram a germinação e crescimento micelial de duas espécies de fungos.

As médias da densidade populacional de *B. bassiana* nos diferentes tratamentos indicaram que o fungicida contendo tiofanatometílico teve pequeno efeito tóxico sobre esta população. No tratamento sem adição do fungicida observou-se maior estabilidade da população do fungo, seguida do tratamento onde a adição do fungicida no solo foi feita 48 horas depois da inoculação de *B. bassiana* ($F=258,55$; $p\leq 0,01$). Provavelmente, esta forma de aplicação propiciou ao fungo tempo suficiente para germinar e formar hifas antes de entrar em contato com o fungicida, aumentando as chances de sobrevivência do patógeno.

Nos tratamentos onde o produto foi adicionado ao solo uma hora antes ou uma hora depois da inoculação do fungo, as densidades populacionais foram estatisticamente menores do que na testemunha. O efeito do tiofanatometílico sobre a população do entomopatógeno pode ser explicado pela toxicidade apresentada por seu produto de conversão, o metil-benzimidazol-2-ilcarbamato, que inibe o fungo atuando na mitose celular (DAVIDSE, 1973). Uma inibição progressiva na síntese de DNA, RNA e proteínas faz com que haja falhas na mitose ou citocinese normais (HAMMERSCHLAG & SISLER, 1972).

3.2.2 Piraclostrobina

Quando o fungicida contendo piraclostrobina como ingrediente ativo foi adicionado ao solo uma hora antes (Figura 2B) e 48 horas depois (Figura 2C) da inoculação de *B. bassiana*, houve correlação positiva entre o crescimento da população de actinomicetos com este fungo ($r=0,58913$ e $r=0,61853$; $p\leq 0,01$, respectivamente) (Tabela 3). O fungicida pode ter sido usado como fonte de energia para a população de bactérias actinomicetas, que são os microrganismos mais atuantes na degradação de compostos complexos encontrados no solo (GOODFELLOW, 1983), levando ao aumento da densidade populacional destas. Provavelmente, a degradação do produto ocasionou a conversão do ingrediente ativo em um subproduto menos tóxico, favorecendo o crescimento do entomopatógeno.

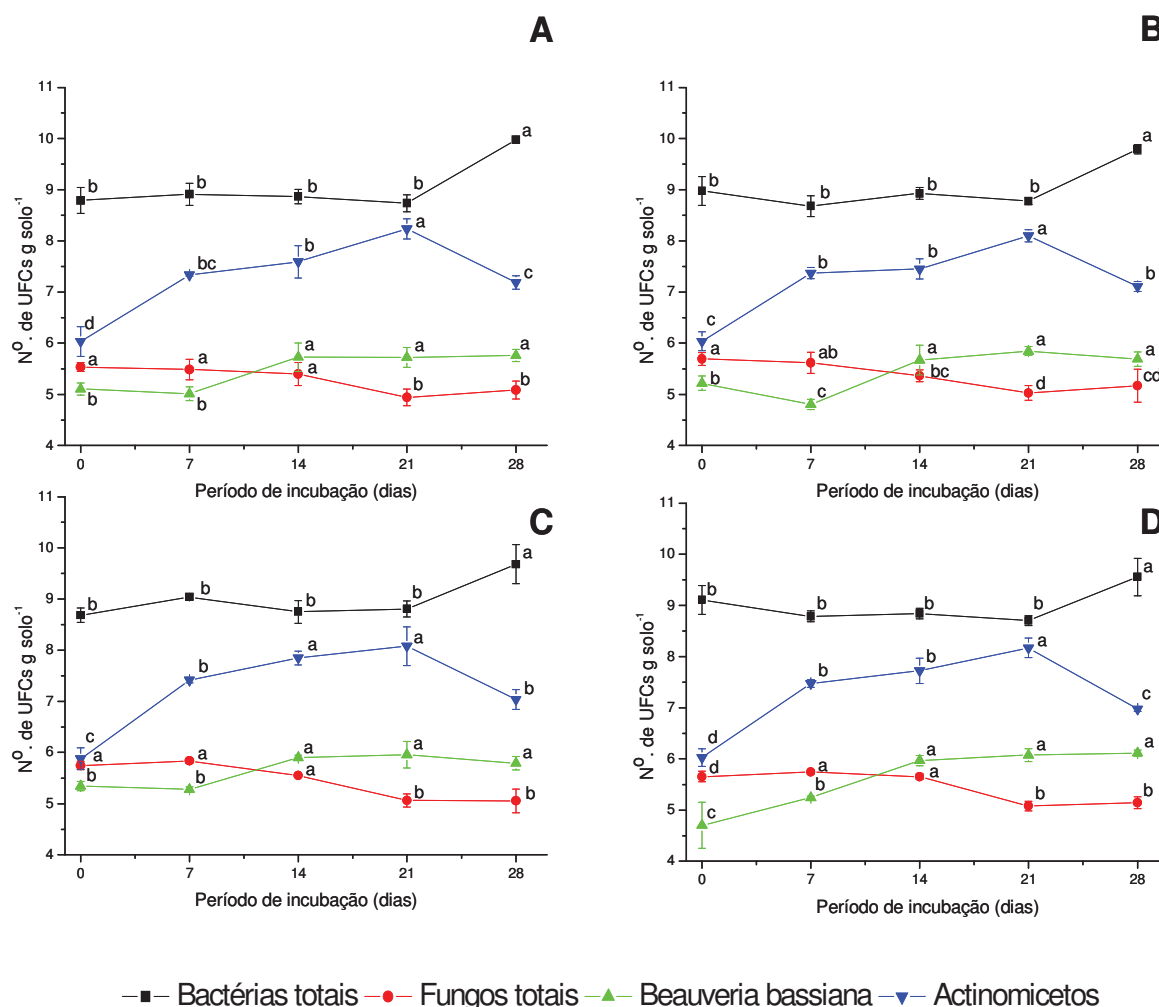


Figura 2. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do fungicida contendo o princípio ativo piraclostrobina. Adição do fungicida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do fungicida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.

A densidade populacional de *B. bassiana* foi significativamente menor ($F=5,79$; $p \leq 0,05$) nos tratamentos onde piraclostrobina foi adicionada ao solo uma hora antes e uma hora depois da inoculação do fungo. Na testemunha e no tratamento onde o fungicida foi aplicado no solo 48 horas depois do fungo as densidades populacionais foram maiores. Este resultado sugere a

existência de um efeito do produto, bem como dos tratamentos, sobre o entomopatógeno, já que, quando o fungicida foi aplicado no solo uma hora antes e uma hora depois da inoculação de *B. bassiana*, não houve tempo para que o fungo germinasse, havendo a inibição. Porém, no tratamento onde a aplicação do fungicida foi feita somente 48 horas depois da inoculação do fungo no solo, a ação tóxica foi menor, permitindo a germinação antes do contato com o produto químico, reduzindo a inibição. De acordo com SARTORATO (2006), a piraclostrobina controlou completamente o crescimento do fungo *Colletotrichum lindemutianum*, evidenciando seu efeito fungistático, o que está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho.

3.2.3 Mancozeb

No experimento realizado com o fungicida mancozebe, a correlação entre as populações de *B. bassiana* e actinomicetos foi inversamente proporcional ($r=-0,48714$; $p\leq 0,05$) (Tabela 3) no tratamento onde o produto foi adicionado ao solo uma hora antes do fungo. Isso indica que *B. bassiana* pode ter sido levemente inibida pela população de actinomicetos, embora a análise estatística do crescimento de ambas as populações (Figura 3B) não tenha detectado este fenômeno. Na testemunha (Figura 3D), entretanto, não existiu correlação significativa entre as duas populações (Tabela 3), sugerindo que a possível inibição da população de *B. bassiana* pode ter sido consequência da degradação do fungicida pelos actinomicetos. Em experimento realizado por BROADBENT *et al.* (1971), 80% das espécies de *Streptomyces* sp. inibiu o crescimento de fungos através da produção de antibióticos, enquanto o restante das espécies privou os fungos de adquirirem nutrientes.

Comparando-se os experimentos realizados com adição de mancozebe no meio de cultura e no solo, verifica-se uma diferença na toxicidade para *B. bassiana*. No experimento com o meio de cultura, o fungicida foi classificado como tóxico para o fungo, entretanto, no solo, este fato não foi observado, pois a população de *B. bassiana* na testemunha não diferiu significativamente da observada nos tratamentos com a presença do fungicida ($F=1,27^{NS}$). Isto pode ser devido à influência do solo na toxicidade dos produtos químicos para os microrganismos. Fungicidas que tiveram efeitos completamente tóxicos para *B. bassiana* em meio de cultura, quando aplicados em campo não apresentaram os mesmos efeitos (CLARK *et al.*, 1982). O efeito tóxico de um

produto químico a um microrganismo de solo em uma cultura pura é diferente daquele causado ao mesmo organismo no seu habitat natural. Na cultura pura, a relação existente é somente entre o produto e o organismo, enquanto na segunda, a relação é entre o organismo, que está protegido pelas características do solo, e o produto químico (KREUTZER, 1963).

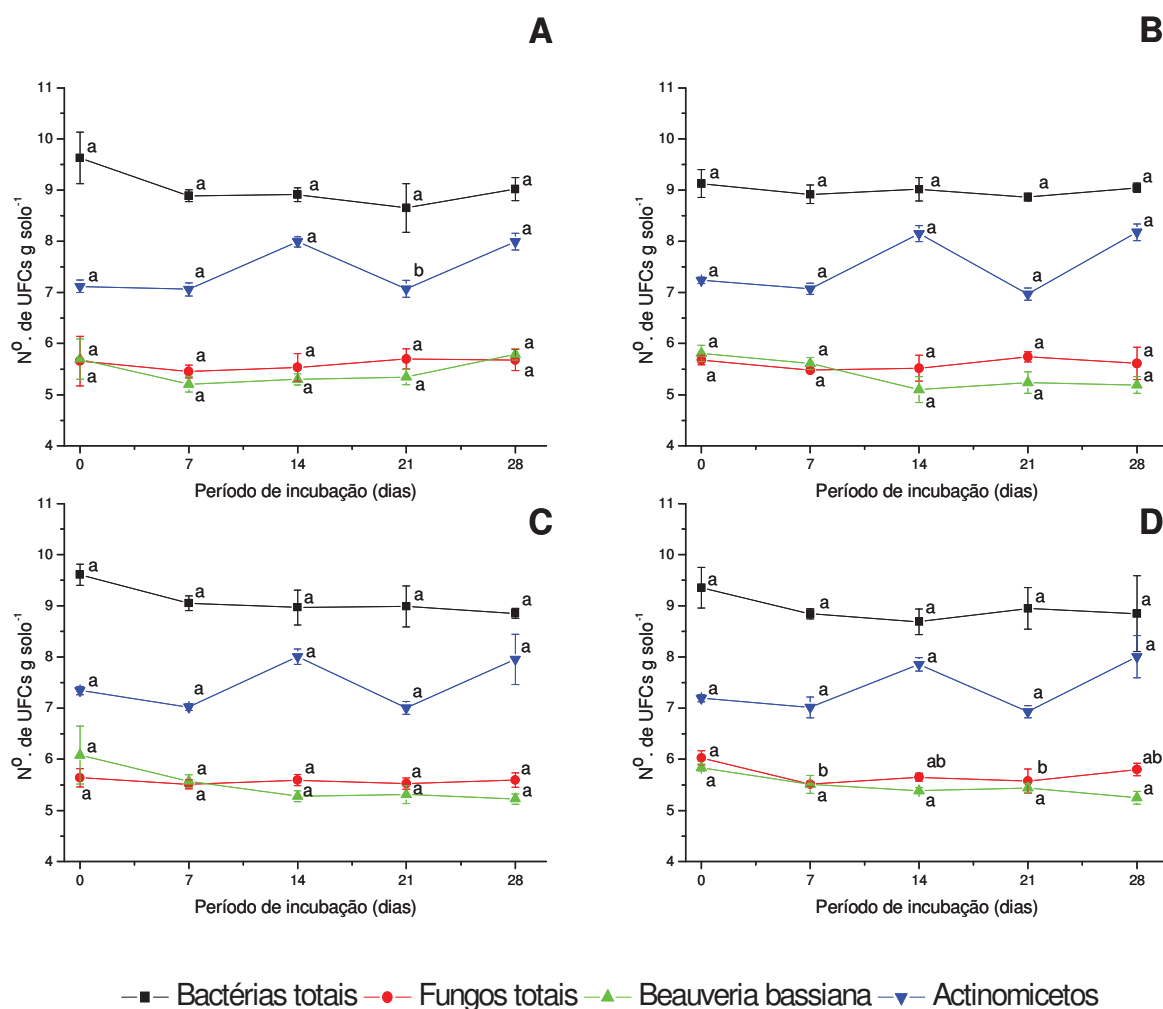


Figura 3. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do fungicida contendo o princípio ativo mancozebe. Adição do fungicida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do fungicida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.

3.2.4 Oxiclureto de cobre

Nos tratamentos onde o oxiclureto de cobre foi adicionado ao solo uma hora antes (Figura 4B), 48 horas depois da inoculação do fungo (Figura 4C) e na testemunha (Figura 4D), os coeficientes de correlação entre as populações de bactérias totais e *B. bassiana* foram positivos ($r=0,69148$, $r=0,82772$ e $r=0,58644$; $p \leq 0,01$, respectivamente) (Tabela 3).

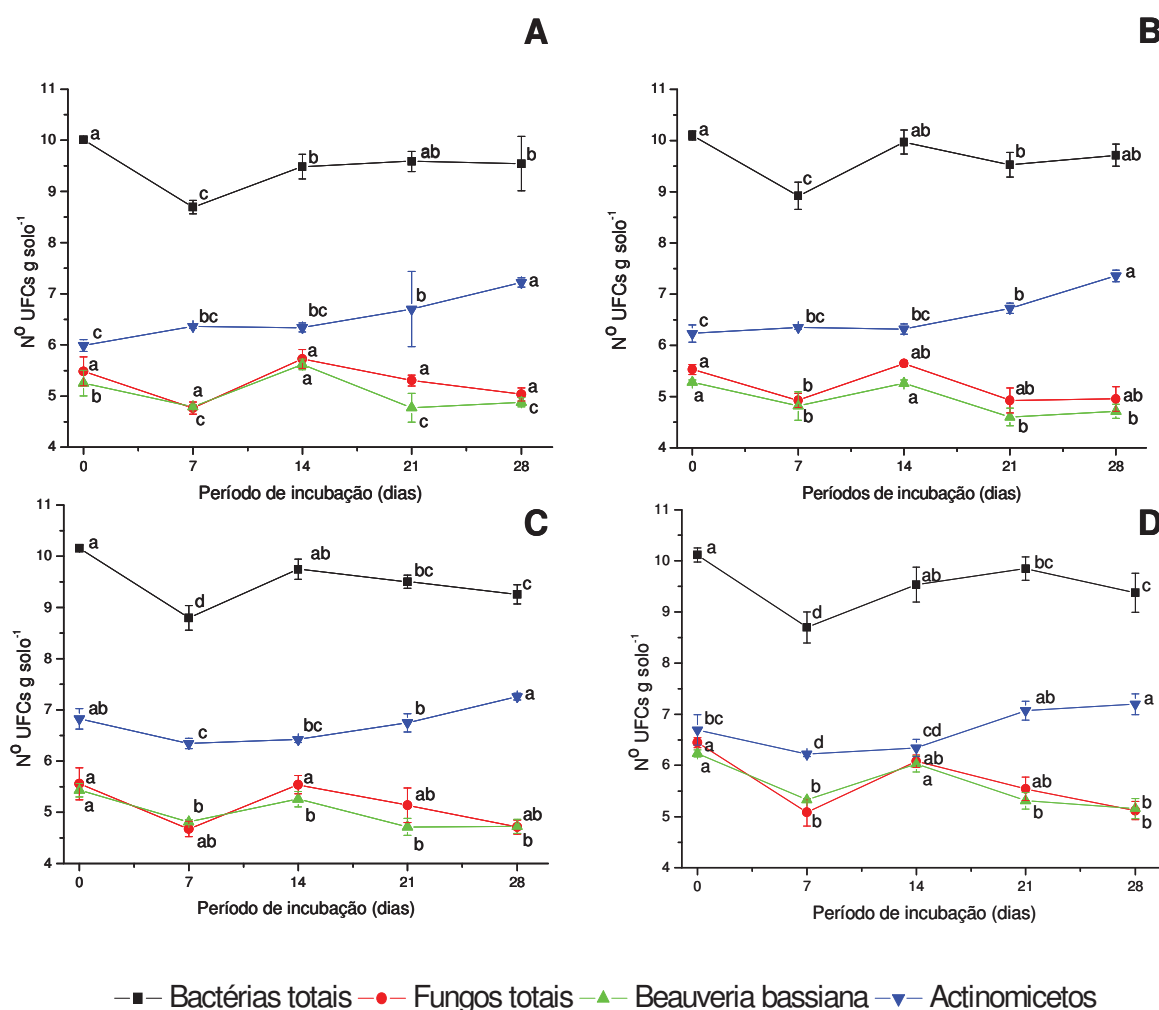


Figura 4. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do fungicida contendo o princípio ativo oxiclureto de cobre. Adição do fungicida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do fungicida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.

Este resultado sugere que o desenvolvimento da população bacteriana no solo não restringiu a população de *B. bassiana*, podendo até estimulá-la, como provavelmente se observa na testemunha onde ocorreu a maior densidade populacional do fungo (Figura 4D). Há relatos que indicam que este estímulo pode ocorrer devido à hormese, um fenômeno onde bactérias secretam substâncias que são fungistáticas, mas que, se liberadas em pequena quantidade, podem estimular genes de outros microrganismos e desencadear um processo de crescimento destas populações (MLOT, 2009).

Quando o fungicida foi adicionado ao solo uma hora antes do fungo entomopatogênico (Figura 4B), a população de actinomicetos inibiu a população de *B. bassiana* ($r=-0,46717$; $p\leq 0,05$) (Tabela 3). Actinomicetos são conhecidos por secretarem substâncias que inibem outros microrganismos, como antibióticos, que podem atuar na inibição do crescimento e germinação de fungos (SCHIPPERS *et al.* 1987). Tal fato pode ter motivado a correlação negativa entre as duas populações.

As populações de fungos totais e de *B. bassiana* mostraram padrão semelhante de crescimento, verificando-se correlação positiva entre ambas em todos os tratamentos ($r=0,91818$, $r=0,84943$, $r=0,72213$ e $r=0,96867$; $p\leq 0,01$) (Tabela 3). Nos grupos tratados com o oxiclureto de cobre, este fato pode ser decorrente da não seletividade do fungicida, que inibiu ambas as populações. Os actinomicetos cresceram no solo de todos os tratamentos, mas isso não resultou na diminuição da toxicidade do fungicida para *B. bassiana* no solo, pois houve pequena redução da população do entomopatógeno na maioria dos tratamentos.

O oxiclureto de cobre mostrou efeito tóxico para *B. bassiana* no solo, já que na testemunha a densidade populacional do fungo foi maior que a encontrada nos demais tratamentos ($F=52$; $p\leq 0,01$). Contudo, a forma de aplicação do fungicida não influenciou o efeito tóxico.

4. CONCLUSÕES

- Os fungicidas avaliados quanto à toxicidade ao fungo *B. bassiana* neste trabalho foram extremamente tóxicos quando adicionados no meio de cultura;

- No solo, a toxicidade dos fungicidas foi menor, pois permitiu o crescimento do entomopatógeno;
- O ambiente biótico do solo parece interferir acentuadamente no efeito tóxico dos fungicidas;
- A população de bactérias totais teve pequena interferência no processo, enquanto a população de actinomicetos mostrou papel importante, seja pela diminuição da toxicidade dos fungicidas ou pela inibição do crescimento da população do entomopatógeno;
- A população de fungos totais pode tanto inibir a população de *B. bassiana* através da competição por nutrientes ou liberação de metabólitos tóxicos, quanto, em alguns casos, ter um padrão semelhante de aumento ou diminuição em relação a este fungo;
- O efeito tóxico dos fungicidas foi influenciado pela forma de aplicação, sendo maior quando a adição ocorreu uma hora antes ou depois da inoculação do fungo no solo.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, Fealq, 1998. p. 97-170.
- ALVES, S.B.; TAMAI, M.A.; ROSSI, L.S.; CASTIGLIONI, E. *Beauveria bassiana* pathogenicity to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 3, n. 1-2, p. 117-122, 2005.
- AMPOFO, J.A.; TETTEH, W.; BELLO, M. Impact of commonly used agrochemicals on bacterial diversity in cultivated soils. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3 , p. 223-229, 2009.

ARBELI, Z.; FUENTES, C.L. Accelerated biodegradation of pesticides: an overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 12, p. 1733-1746, 2007.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W. AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos, Versão 1.0, 2010.

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 do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p.61-67, 2003.

BATISTA FILHO, A.; MOINO Jr; A.; ALVES, S.B. Recomendações para o uso de micoinseticidas destinados ao controle da broca-do-cafeeiro. In: ALVES, L.F.A.; NEVES P.M.J.O.; DE FARIA, M.R. (Orgs.). **Recomendações para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas**. CP2, Piracicaba, 2010. p.21-24.

BHUYAN, S., SREEDHARAN, B., ADHYA, T.K., SETHUNATHAN, N. Enhanced biodegradation of g-hexachlorocyclohexane (g-HCH) in HCH (commercial) acclimatized flooded soil: factors affecting its development and persistence. **Pesticide Science**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 49-55, 1993.

BROADBENT, P.; BAKER, K.F.; WATERWORTH, Y. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in australian soils. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 24, n. 4, p. 925-944, 1971.

BUNT, J.S.; ROVIRA, A.D. Microbiological studies of some subantarctic soils. **Journal of Soil Science**, v. 6, n. 1, p. 119-128, 1955.

CLARK, R.A.; CASAGRANDE, R.A.; WALLACE, D.B. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. **Environmental Entomology**, College Park, v. 11, n. 1, p. 67-70, 1982.

COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS: Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 6^a ed., Editora Andrei, São Paulo, 1999, 672 p.

DAS, A.C., MUKHERJEE, D. Effect of insecticides on the availability of nutrients, nitrogen fixation, and phosphate solubility in the rhizosphere soil of rice. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 18, n. 1, p. 37-41, 1994.

DAVIDSE, L.C. Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 3, n. 3, 317-325, 1973.

DA SILVA, 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**, Sussex, v. 61, n. 7, p. 667-674, 2005.

DRAGANOVA, S.; DONKOVA, R.; GEORGIEVA, D. Impact of strains of entomopathogenic fungi on some main groups of soil microorganisms. **Journal of Plant Protection Research**, Poznan, v. 48, n. 2, p. 169-179, 2008.

GOODFELLOW, M. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, 1983.

HAMMESCHERLAG, R.S.; SISLER, H.D. Differential action of benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC) in *Saccharomyces pastorianus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 2, n. 1, 123-131, 1972.

HOFFMANN, R.M. *et al.* A inserção do Brasil no comércio internacional de agrotóxicos 2000-07. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, v. 38, n. 1, p. 103-128, 2010.

HORA, T.S.; BAKER, R. Volatile factor in soil fungistasis. **Nature**, Londres, v. 225, p. 1071-1072, 1970.

HORA, T.S.; BAKER, R. Soil fungistasis: microflora producing a volatile inhibitor. **Transactions of the British Mycological Society**, Grã-Bretanha, v. 59, n. 3, p. 491-500, 1972.

HSU, S.; LOCKWOOD, L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 29, n 3, p. 422-426, 1973.

JARONSKI, S.T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 129-145, 2010.

JAROS-SU, J.; GRODEN, E.; ZHANG, J. Effects of selected fungicides and the timing of fungicide application on *Beauveria bassiana*-induced mortality of the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Biological Control**, Orlando, v. 15, n. 3, p. 259-269, 1999.

JOUSSIER, D. ; CATROUX, G. Mise au point d'un milieu de culture pour le denombrement de *Beauveria tenella* dans les sols. **Entomophaga**, Paris, v. 21, n. 3, p. 223-225, 1976.

KREUTZER, W.A. Selective toxicity of chemicals to soil microorganisms. **Annual Review of Phytopathology**, v. 1, n. 1, p. 101-126, 1963.

LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E.B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p.1757-1762, 2004.

LEFEBVRE. C.L. Preliminary observations on two species of *Beauveria* attacking the corn borer, *Pyrauster nubilalia hubner*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 21, n. , p.1115-1128, 1931.

LOPES, F.M.; BATISTA, K.A.; BATISTA, G.L.A.; MITIDIERI. S.; BATAUS, L.A.M.; FERNANDES, K.F. Biodegradation of epoxyconazole and piraclostrobin fungicides by *Klebsiella* sp. from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1155-1161, 2010.

LOUREIRO, E.S. de; MOINO Jr, A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G.C. de. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 263-269, 2002.

MALO, A. R. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. **Revista Colombiana de Entomologia**, Santafe de Bogota, v. 19, n. 1, p. 151-158, 1993.

MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Baltimore, v.69, p.215-232, 1950.

MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; SALMERÓN, V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Effect of an organophosphorous insecticide, profenofos, on agricultural soil microflora. **Chemosphere**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 71-80, 1992.

McCOY C., QUINTELA E.D., DE FARIA M. 2000. Environmental Persistence of Entomopathogenic Fungi. **In**: “Factors Affecting the Survival of Entomopathogens (M.E. Baur, J.R. Fuxa, eds.). Louisiana State University Agricultural Center, Southern Cooperative Series Bulletin 400.

MLOT, C. Antibiotics in nature: beyond biological warfare. **Science**, Washington, v. 324, n. 5935, p.1637-1639, 2009.

MOCHI, D.A.; MONTEIRO, A.C.; BARBOSA, A.C. Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 961-971, 2005.

NEVES, P.M.J.O.; MOINO Jr, A.; ALVES, S.B. Recomendações para o uso de micoinseticidas destinados ao controle da broca-do-cafeeiro. In: ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.J.O.; DE FARIA, M.R. (Orgs.). **Recomendações para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas**. CP2, Piracicaba, 2010, p. 25-28.

OSHEROV, N.; MAY, G. Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. **Genetics**, Austin, v. 155, n. 2, p. 647-656, 2000.

PLUMBRIDGE, J. Regulation of carbon assimilation in bacteria. In: LEDERBERG J (Ed.) **Encyclopedia of Microbiology**. Academic, San Diego, p. 375-394, 2009.

QUESADA-MORAGA, E.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; MARANHÃO, E.A.A.; ORTIZ-URQUIZA, A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 8, p. 947-966, 2007.

REHNER, S.A. Ecology and evolution of fungal endophytes and their role against insects. In: Vega FE, Blackwell M (Eds.). **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. Oxford University Press, Oxford, p. 74-96, 2005.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; SILVEIRA NETO, S.; TANZINI, M.R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds.) **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. FEALQ, Piracicaba, p. 270-302, 2008.

SARTORATO, A. Sensibilidade “in vitro” de isolados *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 211-213, 2006.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W; BAKKER, H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, 339-358, 1987.

STAMFORD, N.P.; RODRIGUES, J.J.V.; HECK, R.J.; ANDRADE, D.E.G.T. Microbiota dos solos tropicais. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife, UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p. 61-92.

ZOU, C.; MO, M.; GU, Y.; ZHOU, J.; ZHNG, K. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 9, 2371-2379, 2007.

CAPÍTULO 3 - AÇÃO DA MICROBIOTA NATIVA NA DENSIDADE POPULACIONAL DE *Beauveria bassiana* NO SOLO SOB O EFEITO DE INSETICIDAS

RESUMO – Os inseticidas, assim como os demais agrotóxicos aplicados no controle de pragas, chegam ao solo rapidamente através da água das chuvas que os remove da parte aérea das plantas, ou pela incorporação da palhada após a colheita. Nesse ambiente, entram em contato com agentes microbianos de controle biológico e com a microbiota nativa, podendo influenciar a sobrevivência destes organismos, assim como as relações existentes entre eles. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a microbiota nativa do solo influencia a ação de inseticidas, aplicados em diferentes situações, na sobrevivência de *Beauveria bassiana* no solo. Inseticidas contendo os ingredientes ativos abamectina, tiametoxam, carbofurano e clorpirifós foram utilizados nas doses recomendadas pelos fabricantes. Foi analisada a toxicidade destes produtos para *B. bassiana* primeiramente em meio de cultura contendo os inseticidas, através da avaliação da germinação, crescimento micelial e esporulação. Após, os inseticidas foram adicionados ao solo uma hora antes, uma hora depois e 48 horas depois da inoculação do fungo, avaliando-se a cada 7 dias, por 28 dias, a densidade populacional de *B. bassiana*, de bactérias totais, de fungos totais e de actinomicetos. Com exceção do inseticida clorpirifós, todos os demais foram considerados compatíveis com o fungo no meio de cultura, já que não inibiram ou inibiram levemente a viabilidade do fungo, o crescimento vegetativo e a esporulação. No solo, somente o inseticida clorpirifós foi tóxico para o entomopatógeno, sendo que a população de bactérias totais foi a única que influenciou a toxicidade deste produto para *B. bassiana*. A população de actinomicetos foi a de maior influência negativa na sobrevivência do entomopatógeno, inibindo o desenvolvimento, enquanto a de fungos totais teve um pequeno efeito inibitório sobre a densidade populacional de *B. bassiana*.

Palavras-chave: agroquímicos, microrganismos do solo, controle microbiano, sobrevivência, fungo entomopatogênico

CHAPTER 3 – ACTION OF THE NATIVE MICROBIOTA ON *B. bassiana* POPULATIONAL DENSITY ON SOIL UNDER THE EFFECT OF INSECTICIDES

ABSTRACT – Insecticides, as well as other pesticides used on pest control get to the soil through rain water, that remove them from the shoot of plants, or through crash incorporation after the harvest. In this environment, get in touch with biological control agents and the native microbiota, influencing the survivor of these organisms and the relations between them. The aim of this work was to evaluate if the native microbiota influences the action of some insecticides, applied in different ways, on the survivor of *Beauveria bassiana* in soil. Insecticides containing the active ingredients abamectin, thiametoxam, carbofuran and chlorpiriphos were used at the doses recommended by the manufacturer. The toxicity of these products to *B. bassiana* was first analyzed in a culture medium containing the insecticides, through the evaluation of the germination, vegetative growth and sporulation. Next, the insecticides were added to the soil one hour after, one hour before and 48 hours after inoculation with the fungus, evaluating every seven days for 28 days, the populational densities of *B. bassiana*, total bacteria, total fungi and actinomycetes. With the exception of chlorpiriphos, all the tested insecticides were compatible with the fungus in the culture media, since they did not inhibited or slightly inhibited the viability, the vegetative growth and the sporulation. In soil, chlorpiriphos was considered toxic to the fungus, being total bacteria population the only that influenced the toxicity of this product to *B. bassiana*. The actinomycetes was of most negative influence on the pathogen survivor, inhibiting the development, while total fungi population had only a little inhibitory effect on the populational density of *B. bassiana*.

Keywords: pesticides, soil microorganisms, microbial control, survivor, entomopathogenic fungi

1. INTRODUÇÃO

As doenças fúngicas são muito comuns em insetos, e podem ser um método para controlar surtos de populações de pragas agrícolas. Quase todas as ordens de insetos são suscetíveis a doenças causadas por fungos (HAJEK & ST. LEGER, 1994). Os fungos mais comumente encontrados na natureza, assim como na maioria dos bioprodutos comercializados, são os gêneros *Beauveria* sp., *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces* sp. (VEGA *et al.*, 2009). Devido ao fato de serem encontrados naturalmente, a aplicação de fungos entomopatogênicos no controle biológico é uma das alternativas ao uso de inseticidas químicos, já que diminui os efeitos indesejáveis destes sobre organismos não-alvos, evita o desenvolvimento de resistência por parte das pragas e polui menos o ambiente (JARAMILLO *et al.*, 2005).

O uso combinado do controle microbiano e do controle químico no manejo integrado de pragas (MIP) pode ser um meio de controle de pragas mais efetivo que o uso isolado de algum destes dois métodos, sendo que vários trabalhos testando esta eficácia já foram realizados, com resultados satisfatórios (JARAMILLO *et al.*, 2005, MORALES-RODRIGUEZ & PECK, 2009). Porém, para que haja um efeito sinérgico entre o inseticida químico e o agente de controle microbiano, são necessários testes para verificação da compatibilidade entre ambos. Há uma grande quantidade de testes realizados em laboratório, com o cultivo do entomopatógeno no meio de cultura adicionado de inseticida (ALMEIDA *et al.*, 2003, KOUASSI *et al.*, 2003, LUKE & BATEMAN 2006), mas esta situação é diferente do que ocorre no campo, onde a ação do produto químico sobre o fungo geralmente vai ocorrer no solo.

Neste ambiente, vários são os fatores que podem influenciar na compatibilidade entre os agentes de controle. Dentre aqueles que mais podem afetar a sobrevivência dos entomopatógenos estão os abióticos, como a temperatura, a umidade, o tipo de solo, presença de substâncias tóxicas, e os bióticos, entre os quais artrópodes, os exsudados de plantas e outros microrganismos do solo, como bactérias, fungos e actinomicetos (McCOY *et al.*, 1992).

As populações microbianas nativas do solo são os principais agentes de mudanças em moléculas que são metabolizadas nas águas e nos solos (ALEXANDER, 1981), diminuindo a toxicidade destas substâncias e reduzindo seu potencial inibitório sobre as populações de fungos

entomopatogênicos. Além disso, essas populações podem interferir na ação dos agrotóxicos para os fungos entomopatogênicos através da degradação dos produtos, pois muitos são utilizados por esses microrganismos como fonte de carbono, sendo degradados (AMPOFO *et al.*, 2009). Por outro lado, durante o catabolismo do agroquímico a biomassa microbiana do solo pode aumentar devido à presença de fontes de carbono (GRISEL, 2007) e competir com as populações de entomopatógenos por espaço e nutrientes (CANFIELD *et al.*, 2005) ou inibi-las através da liberação de compostos com efeitos microbiostáticos (MACKIE & WHEATLEY, 1999; FERNANDO *et al.*, 2005; DE BOER *et al.*, 2006).

Caso não seja utilizado como fonte de carbono por determinados microrganismos, o composto químico também pode ter efeito supressivo nestes, que são importantes na decomposição da matéria orgânica e na quebra e fixação de nutrientes existentes neste habitat (MESQUITA, 2005). A maioria dos pesticidas, mesmo aqueles que são aplicados nas partes foliares das culturas, acabam alcançando o solo, e desta forma podem afetar o crescimento e a atividade da microbiota nativa (SINGH *et al.*, 2003).

Inseticidas são amplamente usados no controle de pragas. Além dos efeitos indiretos nos fungos entomopatogênicos devido à ação da microbiota nativa, podem também afetar diretamente os entomopatógenos ao entrar em contato com eles. DUARTE *et al.*, (1992) ressaltaram a necessidade de se considerar os efeitos antagônicos de agrotóxicos sobre os fungos entomopatogênicos em qualquer fase do ciclo de vida destes organismos, pois estes produtos podem afetar seu efeito potencial como agente de controle de pragas e reduzir a incidência de epizootias.

A maioria dos trabalhos realizados para se verificar a compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e inseticidas químicos são realizados em meio de cultura, e não mostram a influência da microbiota nativa nesta interação. Apesar de ser uma das espécies mais estudadas e utilizadas como agente de controle em bioprodutos (WRAIGHT *et al.*, 2000), *B. bassiana* foi pouco estudada em relação à sua sobrevivência em solos adicionados de produtos químicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a microbiota nativa influencia na sobrevivência deste fungo no solo, quando em contato com inseticidas em diferentes situações de aplicações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento com meio de cultura

Foi utilizado o isolado JAB 06 de *Beauveria bassiana* mantido em cultura estoque na coleção do laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). O fungo foi cultivado em meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA), mantido em estufa a 27 ± 1 °C, em ausência de luz, durante 25 dias.

Foram usados os seguintes inseticidas, descritos pelo ingrediente ativo e grupo químico, dose recomendada pelo fabricante e culturas para as quais são recomendados:

Tabela 1. Inseticidas utilizados nos ensaios, com os respectivos nomes comerciais, grupos químicos, princípios ativos, doses e culturas onde são aplicados^a.

Nome Comercial	Grupo químico	Princípio ativo	Dose	Culturas
Actara®	Neonicotinóides	Tiametoxam	20 g/ 100 L água. Volume de calda de 200 L ha ⁻¹	Café, citros
Furadan®	Metilcarbamato de benzofuranila	Carbofurano	400 mL/ 100 L água. Volume de calda de 300 L ha ⁻¹	Banana, café
Vertimec®	Avermectina	Abamectina	125 mL/ 100 L água. Volume de calda de 1000 L ha ⁻¹	Café, citros
Pyrinex®	Organofosforados	Clorpirifós	200 mL/ 100 L água. Volume de calda de 1000 L ha ⁻¹	Café, citros

^a Fonte: Compêndio de Defensivos Agrícolas, 6^a ed., Editora Andrei, São Paulo, 1999, 672p.

As doses dos inseticidas foram adicionadas ao meio BDA na temperatura próxima de 45 a 50 °C, evitando, assim, possíveis alterações das propriedades dos mesmos. Após vertido em

placa de Petri, o meio foi inoculado por picada em ponto central usando uma agulha de platina previamente imersa em suspensão contendo 10^7 conídios mL^{-1} , obtida de colônias jovens do fungo.

Os parâmetros de avaliação do desempenho do fungo em relação aos inseticidas foram: germinação dos conídios, crescimento vegetativo e esporulação. O crescimento das colônias foi quantificado através de medidas, em milímetros, de três diâmetros marcados na parte externa do fundo da placa de Petri. As medidas foram efetuadas a cada três dias, do 3^o ao 15^o dias após a inoculação. Cada placa correspondeu a uma repetição, e para cada inseticida (tratamento) foram feitas cinco placas.

A produção de conídios foi avaliada coletando-se uma amostra do centro, uma da parte mediana e uma da periferia de cada colônia com auxílio de um furador de rolha de 8 mm de diâmetro, esterilizado, no 15^o dia de incubação. Para cada tratamento foram coletadas amostras de três colônias (repetições). As amostras foram transferidas individualmente para tubos de ensaio com 10 mL de uma solução 1:1 de NaCl (0,089% p v^{-1}) e Tween 80[®] (0,1% v v^{-1}) esterilizada. Após a remoção dos conídios por vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, foi feita, para cada tubo, a contagem ao microscópio óptico em câmara de Neubauer, utilizando-se diluição da suspensão quando necessário.

A viabilidade dos conídios foi avaliada através de cultivo e exame direto em lâmina ao microscópio. Lâminas de microscopia esterilizadas foram recobertas com uma fina camada de BDA contendo os inseticidas nas doses recomendadas. Na parte inferior de cada lâmina foram marcados três campos e sobre o meio de cultura foi inoculado, em cada campo, 0,05 mL de suspensão fúngica com 10^5 con. mL^{-1} . Após 15 horas de incubação a 27 ± 1 °C e ausência de luz, o processo de germinação foi interrompido, pingando-se uma gota de corante [1 mL de solução estoque (1 g de azul de metileno em 20 mL de ácido láctico) adicionada em 29 mL de ácido láctico] em cada campo. Foram observados 150 conídios em cada campo da lâmina, entre germinados e não germinados, sendo estabelecida uma porcentagem. Para cada tratamento foram feitas três repetições (três lâminas) que foram inoculadas com suspensões distintas obtidas de colônias jovens.

O ensaio foi organizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa AgroEstat (BARBOSA & MALDONADO, 2010).

Para determinar o efeito tóxico dos produtos foi utilizada a fórmula descrita por ROSSI-ZALAF *et al.* (2008) envolvendo os parâmetros crescimento vegetativo, esporulação e viabilidade:

$$IB = \frac{47[CV] + 43[ESP] + 10[GER]}{100}$$

Em que:

IB = índice biológico; CV: porcentagem de crescimento vegetativo da colônia após 15 dias, em relação à testemunha; ESP: porcentagem de esporulação após 15 dias, em relação à testemunha; GER: porcentagem de germinação dos conídios após 15 horas, em relação à testemunha. Não foram utilizadas casas decimais para o cálculo do IB.

Com os valores obtidos de IB fez-se a classificação toxicológica dos produtos, nas diferentes dosagens, de acordo com a escala descrita por ROSSI-ZALAF *et al.* (2008): de 0 a 41 – tóxico; de 42 a 66 – moderadamente compatível; > 66 – compatível.

2.2 Experimento com solo

O efeito tóxico dos inseticidas para *B. bassiana* foi também avaliado no ambiente do solo. Foi utilizado um Latossolo Vermelho textura argilosa (53% de argila, 18% de silte e 29% de areia) coletado na profundidade de 0 a 20 cm, em área de preservação ambiental pertencente à FCAV-UNESP. O solo foi seco em temperatura ambiente, destorroado e peneirado em peneira com malha de 1 mm. Para cada ensaio com um inseticida foi coletada uma nova amostra de solo. A capacidade de saturação de água foi determinada antes da execução do ensaio.

Foram utilizadas placas de Petri de 100 mm contendo 80 g de solo não-autoclavado. Para facilitar as trocas gasosas a abertura das placas foi ampliada, fixando, no lado interno da tampa, dois palitos de madeira. O solo recebeu, em câmara asséptica, água destilada estéril até atingir 65% da capacidade de saturação e permaneceu em repouso durante uma hora para estabilização.

Os inseticidas foram adicionados ao solo, nas doses recomendadas pelos fabricantes e em volumes proporcionais adequados aos ensaios, nas seguintes situações: a) uma hora depois da inoculação do fungo; b) uma hora antes da inoculação do fungo; e c) 48 horas depois da inoculação do fungo. A inoculação foi feita distribuindo na superfície do solo 2 mL de suspensão fúngica com concentração de $1,0 \times 10^7$ con. mL⁻¹. As placas com o solo permaneceram em estufa a 27 ± 1 °C, no escuro por 28 dias, com reposição semanal da água perdida por evaporação. A testemunha consistiu de solo inoculado com suspensão fúngica, sem adição de produtos químicos.

Para a avaliação da sobrevivência do fungo foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) nos períodos de 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação. Uma amostra de 1 g de solo úmido colhida pela amostragem de 12 a 15 pontos da superfície do solo em cada placa, foi suspensa em 9 mL de solução de Tween 80[®] a 0,1% (v v⁻¹). A partir da suspensão inicial, foram feitas diluições seriadas e, destas diluições foram semeados 0,1 mL em placas de Petri, contendo meios de cultura para determinação das populações de *B. bassiana* (JOUSSIER & CATROUX, 1976, modificado pela supressão de suco de legumes e oxigall), bactérias totais (BUNT & ROVIRA, 1955), fungos totais (MARTIN, 1950) e actinomicetos (HSU & LOCKWOOD, 1973).

Para cada inseticida foi feito um ensaio usando o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F para examinar: a) o crescimento da população de cada microrganismo ao longo dos períodos de avaliação em um mesmo tratamento; b) o crescimento da população de *B. bassiana* entre os tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson, a 5% de probabilidade, para verificar a interação entre as populações de bactérias totais, fungos totais e actinomicetos com a população de *B. bassiana*. Para a execução das análises foi usado o programa AgroEstat (BARBOSA & MALDONADO, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimento com meio de cultura

Observou-se compatibilidade entre *B. bassiana* e todos os inseticidas testados no meio de cultura, exceto aquele contendo clorpirifós, que foi considerado tóxico para o fungo (Tabela 2). Os inseticidas tiametoxam e carbofurano foram considerados compatíveis com *B. bassiana* em trabalho realizado por ANDALÓ *et al.* (2004), resultado este também obtido neste trabalho.

Tabela 2. Desempenho de *Beauveria bassiana* cultivada em meio contendo diferentes inseticidas nas doses recomendadas pelos fabricantes, valores do índice biológico e classificação dos produtos quanto à toxicidade ao fungo.

Inseticidas	Crescimento (mm)	Esporulação (x 10 ⁷ con./mL)	Viabilidade (%)	Índice biológico	Classificação toxicológica
Testemunha	39,10±1,34 a	1,22±0,19 a	99,00± 0,00 a		
Abamectina	33,20± 3,83 b	0,76±0,89 ab	97,88±1,17ab	83	Compatível
Tiametoxam	37,60±1,63 ab	1,26±0,21 a	96,10±1,25 b	97	Compatível
Carbofurano	35,40±0,65 ab	1,47±0,65 a	94,36±2,58 b	94	Compatível
Clorpirifós	16,60±3,02 c	0,05±0,02 b	84,96±1,48 c	30	Tóxico
Teste F	71,94**	5,47**	24,88**		
C.V. (%)	7,41	4,75	3,58		

Valores originais, mas análise realizada com dados transformados em arc seno para viabilidade e log (x+5) para esporulação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas do desvio padrão. C.V.: Coeficiente de variação. ** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Houve inibição do crescimento vegetativo do entomopatógeno na presença dos inseticidas abamectina e clorpirifós, já que os tratamentos com adição destes produtos mostraram diferenças

significativas em relação ao controle. Em experimento realizado por AMUTHA *et al.* (2010), o inseticida clorpirifós inibiu o crescimento de *B. bassiana* em 49,76% em relação ao controle, resultado confirmado por este trabalho. A inibição do crescimento pelo inseticida abamectina está de acordo com os resultados obtidos por LOUREIRO *et al.* (2002), que encontraram redução do diâmetro das colônias do fungo *B. bassiana* por este mesmo ingrediente ativo. O produto contendo tiametoxam não inibiu o crescimento vegetativo deste fungo, assim como nos resultados obtidos por BATISTA FILHO *et al.* (2001).

Na presença do inseticida clorpirifós, a esporulação do fungo diferiu significativamente da verificada na testemunha, indicando inibição deste parâmetro. OLIVEIRA *et al.* (2004) verificaram que a esporulação de *B. bassiana* foi totalmente inibida por este mesmo inseticida. Tiametoxam e carbofurano não inibiram a produção de conídios e no meio onde houve adição de carbofurano o valor numérico foi maior que o verificado na testemunha. Em uma situação onde o fungo produz mais esporos na presença de produtos químicos do que na ausência destes, pode estar havendo um esforço reprodutivo deste microrganismo, já que o produto químico altera o meio ambiente e pode prejudicar seu desenvolvimento (MOINO Jr & ALVES, 1998).

Em relação à germinação de conídios, clorpirifós foi o mais inibitório, corroborando os resultados obtidos por OLIVEIRA *et al.* (2004), nos quais o ingrediente ativo clorpirifós inibiu completamente a viabilidade dos conídios de *B. bassiana*. Nos demais, com exceção de abamectina, houve diferenças em relação ao controle, embora os valores de germinação tenham sido altos na presença de todos os produtos testados. Resultado semelhante foi encontrado por ANDALÓ *et al.* (2004), onde a germinação de conídios de *B. bassiana* na presença de tiametoxam foi alta, sendo que não houve diferença significativa em relação à testemunha. A germinação dos esporos é um fator mais importante que o crescimento micelial, já que esses são as fontes de disseminação do patógeno (KHALIL *et al.*, 1985). Desta forma, o uso concomitante de clorpirifós com agentes de controle microbiano no MIP não seria eficaz, já que a germinação destes agentes poderia ficar prejudicada.

3.2 Experimento com solo

3.2.1 Abamectina

No experimento com solo onde foi adicionada abamectina, o coeficiente de correlação foi inversamente proporcional e significativo entre as populações de actinomicetos e *B. bassiana*, em todos os tratamentos (Tabela 3). Analisando-se os gráficos de crescimento destas populações (Figura 1), verifica-se que houve um aumento na densidade populacional dos actinomicetos, enquanto a população de *B. bassiana* decresceu no período de avaliação, indicando que ocorreu inibição da população do fungo pela população de actinomicetos. Em experimento realizado no solo por ROSENZWEIG & STOTZKY (1979), duas espécies de actinomicetos, *Nocardia paraffinae* e *Streptomyces nodosus*, inibiram quatro espécies de fungos, enquanto o actinomiceto *Micromonospora chalcone* inibiu duas espécies fúngicas, sendo a inibição resultado de competição entre estes microrganismos. Como houve aumento da densidade populacional dos actinomicetos, há indícios de que a inibição da população do entomopatógeno, neste trabalho, tenha sido pela competição por nutrientes e espaço, tendo os actinomicetos se sobressaído em detrimento da população fúngica.

Em todos os tratamentos com abamectina foram observadas correlações negativas da população de fungos totais com *B. bassiana* (Tabela 3), sugerindo que estes fungos possam utilizar o inseticida como fonte de nutrientes para o crescimento, o que provocou a inibição do entomopatógeno (Figura 1). Há evidências de que certas espécies fúngicas que habitam os solos produzem compostos que inibem outras populações. O efeito fungistático de um composto produzido por *Penicillium urticae* sobre *B. bassiana* foi demonstrado por LINGG & DONALDSON (1981). A correlação negativa entre os fungos totais e a população do entomopatógeno pode ser devida à existência de espécies fúngicas produtoras de metabólitos com efeitos microbiostáticos.

A densidade populacional do entomopatógeno no solo com abamectina não diferiu significativamente da encontrada na testemunha ($F=1,84^{NS}$), indicando que o ingrediente ativo não foi tóxico para *B. bassiana* no solo, assim como observado no meio de cultura.

Tabela 3. Correlação entre a população de *Beauveria bassiana* e as populações de bactérias totais, fungos totais e actinomicetos obtidos para os inseticidas nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Coeficiente de correlação de Pearson (r) ^a		
	Bactérias totais	Fungos totais	Actinomicetos
Abamectina			
Adição 1 hora DIBb	-0,18135 ^{NS}	-0,55485**	-0,56843**
Adição 1 hora AIBb	-0,43898 ^{NS}	-0,60602**	-0,45817*
Adição 48 horas DIBb	-0,09829 ^{NS}	-0,66111**	-0,44422*
Testemunha	-0,03043 ^{NS}	-0,58357**	-0,48724*
Tiametoxam			
Adição 1 hora DIBb	0,44300 ^{NS}	0,43183 ^{NS}	0,14455 ^{NS}
Adição 1 hora AIBb	0,20520 ^{NS}	0,16455 ^{NS}	0,04864 ^{NS}
Adição 48 horas DIBb	-0,0143 ^{NS}	-0,01329 ^{NS}	-0,05635 ^{NS}
Testemunha	0,21576 ^{NS}	0,45270*	-0,0587 ^{NS}
Carbofurano			
Adição 1 hora DIBb	0,07081 ^{NS}	0,67114**	-0,31844 ^{NS}
Adição 1 hora AIBb	0,37782 ^{NS}	0,73133**	-0,51880*
Adição 48 horas DIBb	0,31395 ^{NS}	0,59952**	-0,48711*
Testemunha	0,60777**	0,58354**	-0,47166*
Clorpirifós			
Adição 1 hora DIBb	0,59723**	-0,07721 ^{NS}	0,11612 ^{NS}
Adição 1 hora AIBb	0,18031 ^{NS}	0,22515 ^{NS}	-0,52194*
Adição 48 horas DIBb	0,25920 ^{NS}	0,12030 ^{NS}	0,05688 ^{NS}
Testemunha	0,35723 ^{NS}	0,14885 ^{NS}	-0,43605 ^{NS}

^a Valores de correlação positivos indicam que as variáveis tem o mesmo direcionamento, enquanto valores negativos indicam que as variáveis tem direcionamento oposto. Quanto mais próximo de +1 ou -1, maior o grau de correlação entre as variáveis. DIBb: depois da inoculação de *Beauveria bassiana*; AIBb: antes da inoculação de *Beauveria bassiana*. ^{NS} Não significativo; ** Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade.

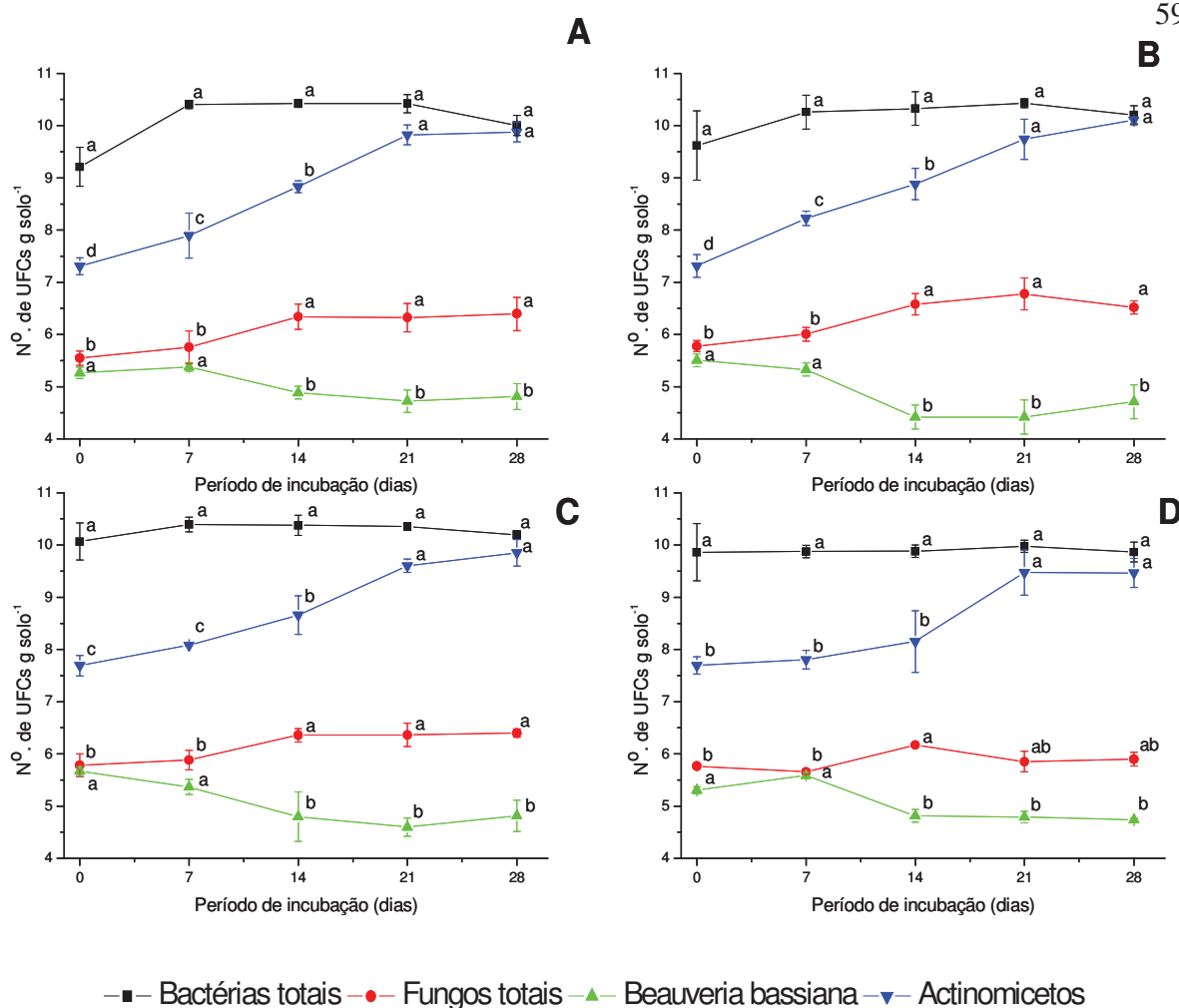


Figura 1. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do inseticida contendo o princípio ativo abamectina. Adição do inseticida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do inseticida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.

3.2.2 Tiametoxam

Nos grupos onde houve adição do inseticida tiametoxam, não foram observadas correlações entre a população de *B. bassiana* e as demais populações (Tabela 3), sugerindo que o

inseticida não interferiu no desenvolvimento tanto da microbiota do solo quanto do entomopatógeno (Figura 2).

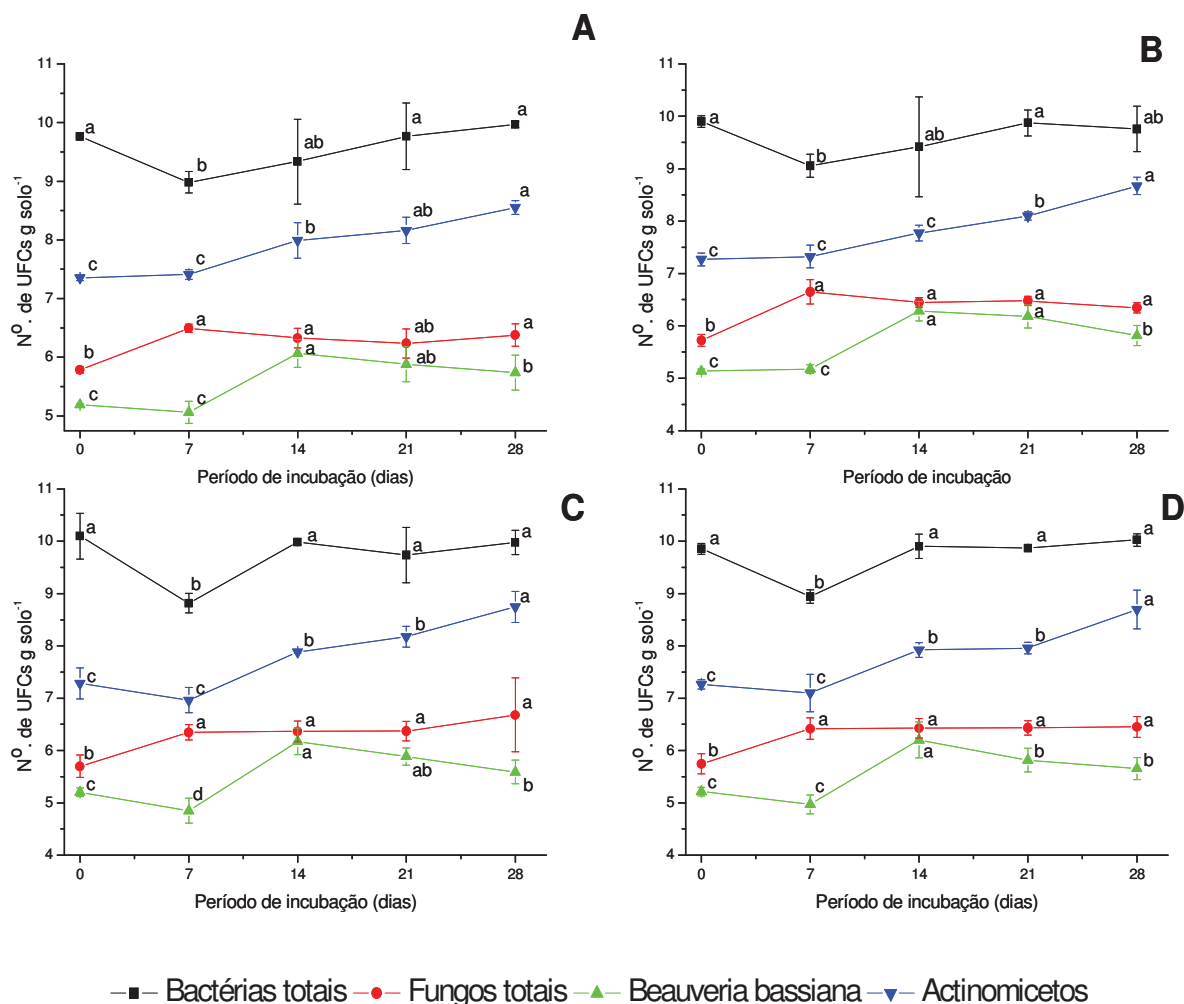


Figura 2. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do inseticida contendo o princípio ativo tiametoxam. Adição do inseticida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do inseticida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em log (x+5). Médias seguidas do desvio padrão.

Somente na testemunha, onde não houve adição de tiametoxam, as populações de fungos totais e do entomopatígeno se correlacionaram positivamente ($r=0,45270$; $p\leq 0,05$) (Tabela 3), sugerindo a existência de um possível efeito sinérgico entre as duas populações. A densidade populacional de *B. bassiana* no solo adicionado do inseticida tiametoxam e na testemunha não diferiu significativamente ($F=1,04^{NS}$) evidenciando a não toxicidade do produto para este fungo, assim como verificado no experimento com meio de cultura.

3.2.3 Carbofurano

Nos tratamentos nos quais a adição de carbofurano no solo foi feita uma hora antes e 48 horas depois da inoculação do fungo, além da testemunha, observou-se a existência de correlação inversamente proporcional entre as populações de actinomicetos e de *B. bassiana* ($r=-0,51880$, $r=-0,48711$, $r=-0,47166$; $p\leq 0,05$) (Tabela 3), evidenciando o efeito inibitório que a população destas bactérias exerceu sobre o entomopatígeno. Este efeito pode ser ratificado pela observação do crescimento dos actinomicetos no período de avaliação nos tratamentos acima citados, assim como pelo decréscimo da população do fungo (Figuras 3B, 3C e 3D). TAECHOWISAN *et al.* (2003) demonstraram que algumas espécies de actinomicetos endofíticos podem inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos, sendo que, no ambiente do solo, esta interação também pode ocorrer através da liberação de antibióticos. Estes metabólitos são definidos como substâncias que inibem o crescimento de outros microrganismos, e são produzidos principalmente por *Streptomyces* sp., uma espécie de actinomiceto (BEHAL, 2000).

Entre as populações de bactérias totais e do entomopatígeno, a correlação foi positiva na testemunha ($r=0,60777$; $p\leq 0,01$) (Figura 3D). Na primeira semana de avaliação, ambas mantiveram-se estáveis, tendo decrescido a partir da terceira semana. Sugere-se que a densidade populacional de *B. bassiana* foi favorecida pela densidade da população de bactérias totais, já que o decréscimo de uma população foi acompanhado pelo decréscimo da outra. Entre as populações de fungos totais e *B. bassiana* observou-se correlações positivas em todos os tratamentos (Tabela 3). Analisando-se as curvas de crescimento em quaisquer dos tratamentos (Figura 3), observa-se que decresceram nos dias de avaliação seguindo um mesmo padrão, mostrando que não havendo

efeito positivo nem negativo do crescimento de uma sobre a outra, sugerindo a existência de uma relação de neutralismo entre estas populações.

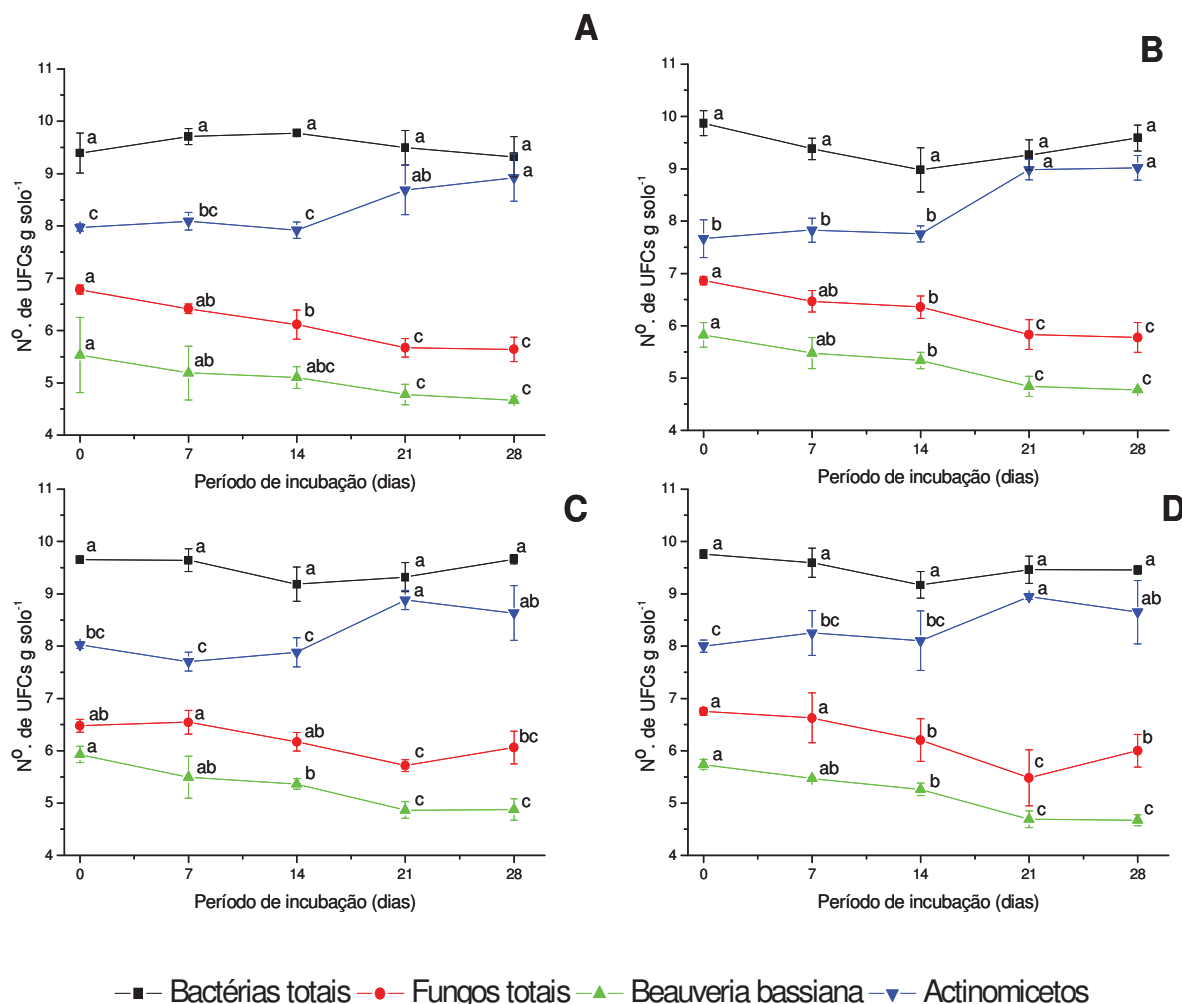


Figura 3. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do inseticida contendo o princípio ativo carbofurano. Adição do inseticida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do inseticida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em $\log(x+5)$. Médias seguidas do desvio padrão.

A análise da densidade populacional de *B. bassiana* nos tratamentos com adição de carbofurano e a testemunha não resultou em diferença significativa ($F=1,48^{NS}$), indicando que, assim como no experimento realizado com meio de cultura, o produto não foi tóxico para este fungo no ambiente do solo.

3.2.4 Clorpirifós

No tratamento onde a adição do inseticida clorpirifós foi feita uma hora antes da inoculação do fungo houve correlação negativa entre a população de actinomicetos e *B. bassiana* ($r=-0,52194$; $p\leq 0,05$) (Tabela 3), evidenciando o efeito fungistático dos actinomicetos sobre o entomopatógeno. A maioria dos antibióticos é produzida por espécies de actinomicetos, especialmente *Streptomyces* sp., que são encontrados no solo (BEHAL, 2000). A presença destes microrganismos no solo e a liberação de antibióticos por parte destes, podem ter tido efeito inibitório sobre o fungo entomopatogênico, que demonstrou uma leve redução da população no período de avaliação (Figura 4B).

Correlação positiva foi encontrada entre as populações de bactérias totais e do fungo entomopatogênico no tratamento onde a adição de clorpirifós foi feita uma hora após a inoculação de *B. bassiana* ($r=0,59723$; $p\leq 0,01$) (Tabela 3). Uma pequena queda na densidade populacional do fungo no período de avaliação é notada, provavelmente pela toxicidade do produto, como verificado no experimento com meio de cultura. No entanto, é possível que a população de bactérias totais tenha atuado na degradação do inseticida, diminuindo seu efeito tóxico para o fungo. Esse fato resultou em declínio da população de *B. bassiana* menor do que seria esperado sem a ação da população de bactérias totais (Figura 4). Uma das possíveis conseqüências da introdução de produtos químicos no solo, como os inseticidas, é a ação de microrganismos que diminuem a toxicidade destas moléculas aos demais organismos (ALEXANDER, 1981).

Entre os tratamentos nos quais adicionou-se clorpirifós ao solo, as densidades populacionais do entomopatógeno não diferiram entre si sendo, entretanto, significativamente menores do que na testemunha ($F=9,60^{**}$). Este resultado indica que o inseticida foi tóxico para o fungo, corroborando os resultados obtidos no experimento com meio de cultura, onde o produto

foi classificado como tóxico para *B. bassiana*. Altos níveis de toxicidade em meio de cultura nem sempre significam que, no campo, ou, no caso deste experimento, no solo, irá ocorrer o mesmo, porém mostra uma possibilidade de que os resultados sejam semelhantes (ALVES *et al.*, 1998), o que foi confirmado para clorpirifós.

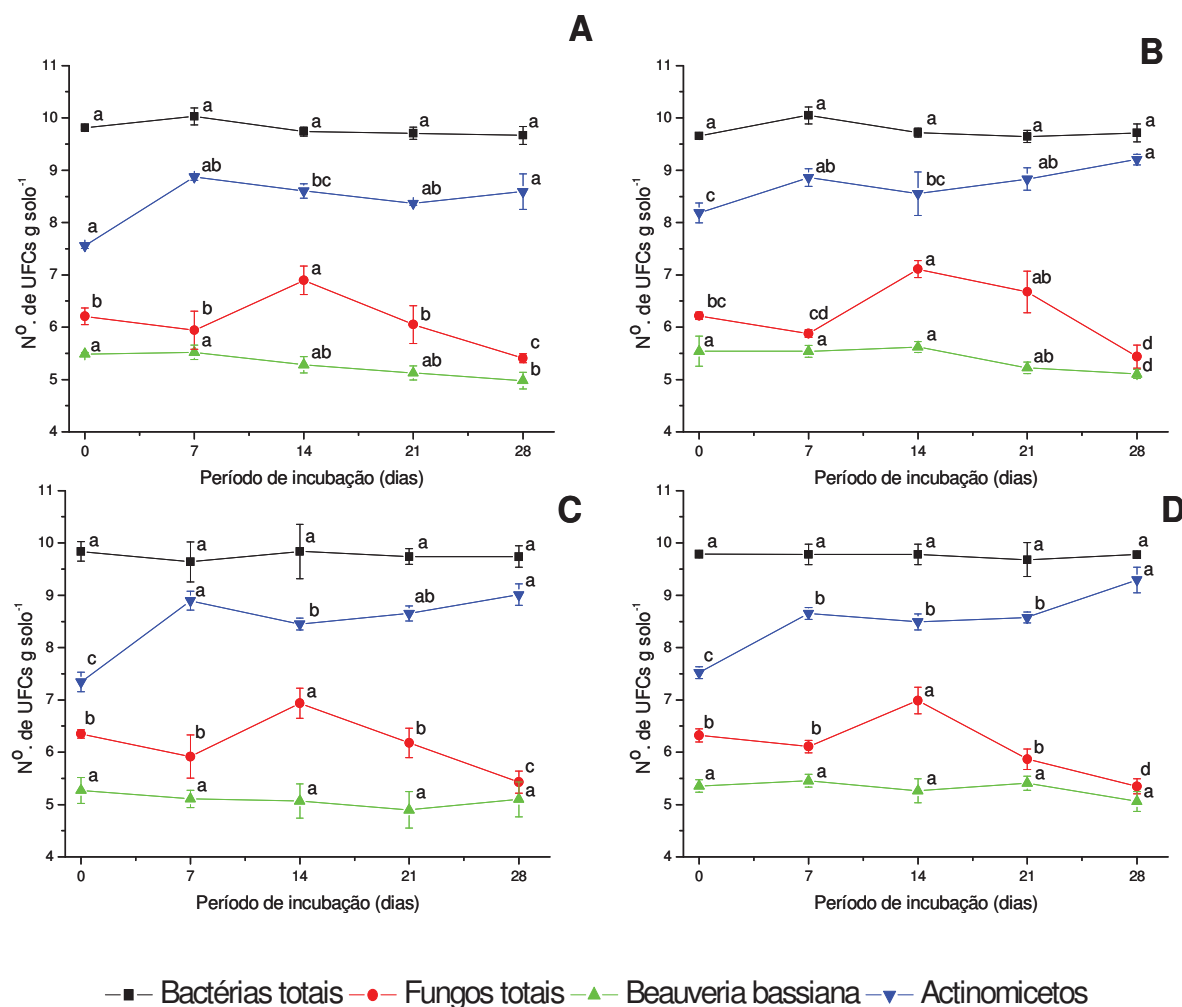


Figura 4. Interações entre as populações de *Beauveria bassiana* e microbiota nativa do solo sob ação do inseticida contendo o princípio ativo clorpirifós. Adição do inseticida em diferentes situações: A) uma hora depois da inoculação do fungo, B) uma hora antes da inoculação do fungo, C) 48 horas depois da inoculação do fungo e D) sem adição do inseticida. Letras minúsculas iguais, nos períodos de incubação de uma mesma população, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise realizada com dados transformados em log (x+5). Médias seguidas do desvio padrão.

4. CONCLUSÕES

- Os inseticidas avaliados neste trabalho se mostraram compatíveis com *B. bassiana* quando adicionados ao meio de cultura ou ao solo, com exceção de clorpirifós, que se mostrou tóxico em ambas as situações;
- A população de bactérias totais teve pequena influência sobre a população do entomopatógeno, contribuindo para sua sobrevivência, enquanto a população de fungos totais teve pequeno efeito inibitório sobre a população do fungo;
- A população de actinomicetos mostrou-se inibitória para a população de *B. bassiana*, sendo o maior fator biótico responsável pela redução da mesma;
- A forma de aplicação dos inseticidas não influenciou o efeito sobre *B. bassiana* no solo.

5. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, Washington, v. 211, n. 4478, p. 132-138, 1981.
- 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 do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 79-84, 2003.
- ALVES, S.B.; MOINO Jr., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Fealq, São Paulo, 1998, p. 217-238.

AMPOFO, J.A.; TETTEH, W.; BELLO, M. Impact of commonly used agrochemicals on bacterial diversity in cultivated soils. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 223-229, 2009.

AMUTHA, M.; BANU, J.G.; SURULIVELU, T.; GOPALAKRISHNAN, N. Effect of commonly used insecticides on the growth of white Muscardine fungus, *Beauveria bassiana* under laboratory conditions. **Journal of Biopesticides**, v. 3, número especial, p. 143-146, 2010.

ANDALÓ, V.; MOINO Jr, A.; SANTA-CECÍLIA, L.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**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 463-467, 2004.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JR, W. AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agronômicos, Versão 1.0, 2010.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 437-447, 2001.

BEHAL, V. Bioactive products from *Streptomyces*. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 47, p. 113-156, 2000.

BUNT, J.S.; ROVIRA, A.D. Microbiological studies of some subantarctic soils. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 119-128, 1955.

CANFIELD, D.E.; THAMDRUP, B.; KRISTENSEN, E. Structure and growth of microbial populations. In: SOUTHWARD, A.J.; TYLER, P.A.; YOUNG, C.M.; FUIMAN, L.A. (eds). **Advances in marine biology**. Elsevier Academic Press, 2005, p 23-65.

COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS: Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 6^a ed., Editora Andrei, São Paulo, 1999, 672 p.

DE BOER, W.; WAGENAAR, A-M.; GUNNEWIEK, P.J.A.K.; VAN VEEN, J.A. In vitro supression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 177-185, 2006.

DUARTE, A.; MENENDEZ, J.M.; TRIGUERO, N. Estudio preliminar sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* com algunos plaguicidas quimicos. **Revista Forestal Baracoa**, La Habana, v. 22, n. 2, p. 31-39, 1992.

FERNANDO, W.G.D.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A.S.; SAVCHUK, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.

GRISEL, M.F.C. **Efeito de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado**. 2007. 61 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2007.

HAJEK, A.E.; St. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 39, n.1, 293-322, 1994.

HSU, S.; LOCKWOOD, L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 29, n 3, p. 422-426, 1973.

JARAMILLO, J.; BORGEMEISTER, C.; EBSSA, L.; GAIGL, A.; TOBÓN, R.; ZIMMERMANN, G. Effect of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imadacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cynidae). **Biological Control**, Orlando, v. 34, n. 1, p. 12-20, 2005.

JOUSSIER, D.; CATROUX, G. Mise au point d'un milieu de culture pour le denombrement de *Beauveria tenella* dans les sols. **Entomophaga**, Paris, v. 21, n. 3, p. 223-225, 1976.

KHALIL, S.K.; SHAH, M.A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 13, n. 3-4, p. 329-334, 1985.

KOUASSI, M.; CODERRE, D.; TODOROVA, S.I. Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, n. 7, p. 421-426, 2003.

LINGG, A.J.; DONALDSON, M.D. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 38, n. 2, p. 191-200, 1981.

LOUREIRO, E.S. de; MOINO Jr, A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G.C. de. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 263-269, 2002.

LUKE, B.M.; BATEMAN, R.P. Effects of chemical and botanical insecticides used for locust control on *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia after short-to-medium-term storage at 30° C. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, n.7, p. 761-766, 2006.

MACKIE, A.E.; WHEATLEY, R.E. Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 31, n.3, p.375-385, 1999.

MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Baltimore, v.69, p.215-232, 1950.

McCOY, C.W.; TIGANO-MILANI, M. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, s/n, p. 87-93, 1992.

MESQUITA, C.M. de. **Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos na microbiota do solo**. Estudo de caso: Paty do Alferes – RJ. 2005. 103 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) - Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.

MOINO Jr, A.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 611-619, 1998.

MORALES-RODRIGUEZ, A.; PECK, D.C. Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. **Biological Control**, Orlando, v. 51, n. 1, p. 169-180, 2009.

OLIVEIRA, R.C. de; NEVES, P.M.J.O. Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 353-358, 2004.

ROSENZWEIG, W.D.; STOTZKY, G. Influence of environmental factors on antagonism of fungi by bacteria in soil: clay minerals and pH. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 38, n. 6, p. 1120-1126, 1979.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; SILVEIRA NETO, S.; TANZINI, M.R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. FEALQ, Piracicaba, p. 270-302, 2008.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 4, p.381-385, 2003.

VEGA, F.E. ; GOETTEL, M.S. ; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M.A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N.K.; MONZÓN, A.; OWNLEY, B.H.; PELL, J.K.; RANGEL, D.E.N.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.

SINGH, B.K.; WALKER, A.; MORGAN, J.A.W.; WRIGHT, D.J. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5198-5206, 2003.

WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I.; JARONSKI, S.T.; BRADLEY, C.A.; GARZA, C.J.; GALAINI-WRAIGHT, S. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Biological Control**, Orlando, v.17, n. 3, p. 203-217, 2000.