

AValiação DE PRODUTOS COMERCIAIS FORMULADOS A BASE DE AGENTES MICROBIANOS DE BIOCONTROLE*

SANTOS, Aline Garske¹, CARDOSO, Guilherme², AZAMBUJA, Rosária Helena Machado³, MOURA, Andréa Bittencourt⁴, BETTIOL, Wagner⁵

¹ *Graduanda em Ciências Biológicas Bolsista CNPq ITI-A,* ² *Graduando em Ciências Biológicas Bolsista CNPq ITI-A,* ³ *Técnica Laboratório Deptº de Fitossanidade,* ⁴ *Professora Departamento de Fitossanidade Bolsista CNPq Produtividade em Pesquisa,* ⁵ *Pesquisador EMBRAPA-CNPMA Bolsista CNPq Produtividade em Pesquisa*

FAEM, UFPel, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. gsbio@hotmail.com

* Projeto com apoio CNPq – Processo 578245/2008-6

1. INTRODUÇÃO

O aumento dos custos do controle químico, a perda de eficiência de alguns desses produtos e os problemas ambientais advindos do uso destes, indicam a necessidade da busca de alternativas para o controle de fitopatógenos, como a utilização de agentes biológicos (BETTIOL, 1991).

A produção e o uso de agentes de biocontrole de doenças e pragas no Brasil têm crescido significativamente nos últimos anos. Porém, ainda não há critérios e padrões estabelecidos para a avaliação da qualidade e conformidade destes produtos. Cada empresa produtora, assim como laboratórios públicos ou privados, utiliza metodologias próprias para a avaliação dos produtos, o que gera resultados conflitantes entre as análises (LOPES, 2009)

O trabalho teve como objetivo avaliar diferentes metodologias para verificação da viabilidade e pureza de produtos feitos à base de microrganismos utilizados como agentes de biocontrole.

2. METODOLOGIA

Devido às diferentes espécies de agentes biocontroladores, bem como de formulações, foram realizadas metodologias próprias para cada uma delas. Para os formulados em pó molhável (PM), foram pesados 0,1g de cada produto e para formulados em concentrado emulsionável (CE), o frasco com a amostra foi agitado em vortex, e coletou-se 1mL da solução (fungo + conservante). Posteriormente ambos foram diluídos em solução salina (NaCl 0,85%) com 5% de Tween 80, em série decimais até a concentração ótima para cada amostra. Para os fungos, inicialmente foi contado o número de esporos e posteriormente, estabelecido o número de esporos viáveis. Para *Bacillus* spp., foram utilizadas duas metodologias, ambas determinaram o número de unidades formadoras de colônias.

2.1 Contagem de esporos

A contagem de esporos totais (viáveis + não viáveis) foi realizada para ambos os formulados (PM e CE) após homogeneização de diluição apropriada, (obtida conforme descrito acima, em vortex) pela observação em câmara de Neubauer em microscópio óptico .

2.2 Avaliação da viabilidade de esporos

Sabendo-se o número total de esporos pode se estabelecer as diluições utilizadas para verificação da viabilidade celular. As diluições foram homogeneizadas em vortex por 30 segundos e coletado um volume de 100µL da amostra. O volume coletado foi plaqueado e espalhado, com auxílio de alça de Drigalsky previamente esterilizada, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas em BOD a 24°C/10 dias, para a posterior contagem das células.

2.3 Avaliação da viabilidade de *Bacillus* spp.

Adicionaram-se 10g do produto a ser testado em Erlenmeyer com 90mL de água peptonada e agitou-se. Posteriormente, o produto foi colocado em banho ultrassônico com aquecimento durante 5 minutos. Após, realizaram-se diluições seriadas em tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada, com transferência de 1mL da suspensão por tubo, agitando-os em vortex. A amostra foi tratada termicamente em banho-maria à 80°C±2°C por 12 minutos e resfriados em banho de gelo.

A diluição utilizada para a contagem foi de 10⁻⁸. Transferiu-se 0,1mL de cada diluição para placas de Petri contendo meio Agar Nutriente (AN). Espalhou-se suspensão com alça de Drigalsky previamente flambada. As amostras foram incubadas em BOD a 37°C/20-24horas e as colônias contadas. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama do produto (UFC/g)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como apresentado na tabela 1, os produtos analisados demonstraram variações de acordo com o agente microbiano.

Durante a realização de contagem de células, observou-se que os agentes BM-01 e CL-01 apresentaram os menores valores de esporos por mL, destacando-se o agente TR-02 com o maior valor alcançado (3,1x10⁷ esporos/mL).

O agente BO-02 apresentou maior número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) enquanto os produtos CL-02 e TR-02 não apresentaram crescimento.

Entre os contaminantes foram encontrados *Trichoderma*, *Penicillium*, *Asperillus*, *Fusarium* e bactérias. A identificação das espécies de contaminantes não foi realizada, pois, este não era o objetivo do trabalho.

Na tabela 2, os dados foram obtidos pela contagem do número de colônias dos produtos formulado a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* de maneira individual ou presentes em uma única formulação (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*). Quando observados individualmente verificou-se que o produto contendo *Bacillus subtilis* apresentou maior quantidade de colônias por mL (4,261x10¹¹) se comparado a formulação de *Bacillus licheniformis* (1,845 x 10¹¹).

Em relação aos formulados contendo os dois agentes (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*) destaque para a formulação (B) que apresentou maior número de colônias existentes na placa.

Tabela 1: Dados da contagem de células, Unidade Formadora de Colônia (UFC)/mL ou g e contaminantes, dos produtos formulados em pó molhável (PM) e concentrado emulsionável (CE)

Produto	Agente Microbiano	Contagem de células (esporos/mL)	UFC/mL ou g	Contaminantes
BM-01	<i>Beauveria + Metarhizium</i>	10 ⁶	NC	
BO-01	<i>Beauveria bassiana</i>	1,22x10 ⁷	8 x 10 ⁴	Leveduras e <i>Trichoderma</i>
BO-02	<i>B. bassiana</i>	10 ⁷	1,2 x 10 ⁵	Leveduras
CL-01	<i>Clonostachys</i>	10 ⁶	5 x 10 ⁴	<i>Penicillium</i> e leveduras
CL-02	<i>Clonostachys</i>	10 ⁷	NC	-
ME-01	<i>Metarhizium anisopliae</i>	2,14x10 ⁷	6 x 10 ⁴	<i>Aspergillus</i> e bactérias
ME-02	<i>M. anisopliae</i>	4,4x10 ⁶	8 x 10 ⁴	Bactérias
TR-01	<i>Trichoderma</i>	1,1x10 ⁶	5 x 10 ⁴	<i>Fusarium</i> e bactérias
TR-02	<i>Trichoderma</i>	3,1x10 ⁷	NC	-
TR-03	<i>Trichoderma</i>	10 ⁷	NC	
VE-01	<i>Verticillium</i>	---	5 x 10 ⁴	Leveduras

Tabela 2: Número de colônias presentes nos produtos com formulação em Pó molhável (UFC/mL)

Diluição	<i>Bacillus subtilis</i>	4,261x10 ¹¹
Diluição	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,845x 10 ¹¹
Diluição	<i>Bacillus subtilis + Bacilluslicheniformis (A)</i>	1,219x10 ¹¹
Diluição	<i>Bacillus subtilis + Bacilluslicheniformis (B)</i>	3,307x10 ¹¹

4. CONCLUSÃO

Constatou-se o crescimento de microrganismos na maioria dos produtos submetidos aos testes e presença de alguns contaminantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: **Controle biológico de doenças de plantas** Bettiol, W. (Org.) Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. 338p. (Embrapa-Cnpda. Documentos, 15).

KADO, C.I.; HESKETT, M.S. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.

LOPES, R.B. A Indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. Cap 2. p.15-28. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p.