

BIOLOGICAL CONTROL

Avaliação de Estirpes e de uma Nova Formulação Granulada de *Bacillus sphaericus* Neide para o Controle de MosquitosLUIS F.A. ALVES^{1,2}, SÉRGIO B. ALVES^{2,3}, JOSÉ LOPES⁴ E ROGÉRIO B. LOPES³¹Lab. Zoologia, Campus de Cascavel/CCBS, Unioeste, C. postal 711, 85819-110, Cascavel, PR²Bolsista de Produtividade em Pesquisa/CNPq³Depto. Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, C. postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP⁴Depto. Biologia Animal e Vegetal, UEL, C. postal 6001, 86051-990, Londrina, PR*Neotropical Entomology* 35(4):493-499 (2006)Evaluation of Isolates and a New Granular Formulation of *Bacillus sphaericus* Neide for Control of Mosquitoes

ABSTRACT - Nineteen *Bacillus sphaericus* Neide strains obtained in Brazil were evaluated in addition to a standard strain (2362) supplied by Pasteur Institute. Most strains were more efficient than the standard, and seven of them caused mortality equal to or higher than 80%, at a low concentration (7×10^2 spores/ml). Strain ESALQ MS6 was selected for formulation, since it showed better yield in liquid culture medium (3×10^9 CFU/ml). The G4 granular formulation was tested in artificial rearing sites, consisting of plastic buckets containing 10 L water and twenty 3rd-instar larvae of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). The efficiency of formulation was compared against a commercial product, at three different concentrations. Evaluations were taken every 24h, at seven and 18 days after inoculation, with subsequent replacement of larvae in the bucket. The G4 formulation was similar to the commercial product, and controlled 100% of the larvae at the concentrations tested; however, the granules remained at the surface for a longer period. In tannery effluent treatment ponds, the G4 formulation at a concentration of 2 kg/ha reduced the number of larvae by 21%, 47%, 85%, and 94%, after 1, 3, 7, and 15 days, respectively.

KEY WORDS: Screening of strains, bacteria, bioinsecticide

RESUMO - Foram estudadas 19 estirpes de *Bacillus sphaericus* Neide obtidos no Brasil além de uma estirpe considerada padrão (2362) fornecida pelo Instituto Pasteur. A maioria das estirpes foi mais eficiente que o padrão, sendo que sete deles causaram mortalidade igual ou superior a 80%, em baixa concentração (7×10^2 esporos/ml). A estirpe ESALQ MS6 foi selecionada para formulação por apresentar melhor produção, em meio de cultura líquido (3×10^9 UFC/ml). A formulação granulada G4 foi testada em criadouros artificiais, constituídos de baldes plásticos com 10 L de água e 20 larvas de 3^o instar de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Comparou-se a eficiência da formulação em teste, em três concentrações diferentes, com um produto comercial. As avaliações foram feitas 24 horas, sete e 18 dias após a inoculação, seguindo-se a reposição de larvas no balde. A formulação G4 foi semelhante ao produto comercial, controlando 100% das larvas nas concentrações testadas, contudo teve maior tempo de permanência dos grânulos na superfície. Em lagoas de tratamento de efluentes de cortume, a formulação G4, na concentração de 2 kg/ha reduziu o número de larvas em 21%, 47%, 85% e 94%, após 1, 3, 7 e 15 dias, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Seleção de estirpes, bactéria, bioinseticida

A variabilidade natural dos seres vivos é uma característica que deve ser explorada em programas de controle biológico, visto que, no caso dos entomopatógenos, tal variabilidade manifesta-se na forma de produção de toxinas ou enzimas, crescimento em meio de cultura, resistência às

condições ambientais (temperatura, radiação UV, pH, etc.), entre outros (Azevedo 1998, Paccola-Meireles 1998).

A primeira estirpe de *Bacillus sphaericus* Neide obtido por Kellen *et al.* (1965) apresentava baixa atividade larvicida, sendo que novas estirpes mais virulentas foram obtidas e

superaram a atividade original em mais de 10.000 vezes. Trezentas estirpes de *B. sphaericus* foram registradas no Instituto Pasteur; cerca da metade apresentava ação larvicida (Barjac 1990), sendo por conseqüência, necessária e justificável a busca de novas estirpes.

A estirpe 2362, obtida de adultos de *Simulium* sp. Latreille (Diptera: Simuliidae), é a mais utilizada nos produtos comerciais, e considerada padrão e superior em sua atividade larvicida em relação às demais, previamente obtidas (Vilarinhos *et al.* 1998).

A busca contínua tem resultado em sucesso como o obtido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), onde a partir de amostras de solo de diferentes regiões do Brasil, foi selecionada a estirpe S2 que, segundo Schenkel *et al.* (1992), caracteriza-se por possuir maior toxicidade para larvas de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) quando comparado com a estirpe padrão 2362.

Embora *B. sphaericus* possa permanecer por algum tempo no ambiente devido à resistência natural do esporo às condições ambientais adversas, verifica-se que após a aplicação na água, os esporos tendem a se sedimentar no ambiente, ficando fora da zona de alimentação das larvas e com isso a população poderá voltar a crescer (Lacey 1984).

Formular um entomopatógeno tem como objetivo melhorar sua distribuição e liberação no ambiente, bem como aumentar sua persistência, protegendo-o, por exemplo, contra a ação da radiação ultravioleta. No Brasil, especificamente em relação à formulação de *B. sphaericus*, os estudos caminham no sentido de se obter uma formulação líquida na forma de concentrado emulsional, testada em diferentes condições e com resultados favoráveis, com eficiência comparável a outros produtos (Cônoli *et al.* 1997).

Contudo, Vilarinhos *et al.* (1998) afirmam que o uso de *B. sphaericus* para o controle de pernilongos no Brasil pode ser ampliado com o advento de formulações sólidas, mais fáceis de serem aplicadas, uma vez que dispensam as misturas e diluições. Segundo Lacey (1984), as formulações sólidas flutuantes retardam a sedimentação do patógeno e penetram mais facilmente na vegetação das margens dos criadouros.

Neste sentido, Alves *et al.* (1999, 2001) realizaram uma série de estudos visando desenvolver e avaliar uma formulação granulada de *B. sphaericus*, à base de sabugo de milho moído, acrescido de 20% de biomassa fresca do patógeno (6×10^8 UFC/g) e adjuvantes, sendo denominada G4, cuja eficiência foi comprovada em laboratório, contra larvas de *C. quinquefasciatus*.

Dando continuidade aos estudos com essa formulação, este trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar novas estirpes de *B. sphaericus* visando sua incorporação na formulação G4, a qual foi também avaliada em criadouros artificiais e naturais.

Material e Métodos

Seleção de estirpes. O trabalho foi realizado utilizando-se estirpes de *B. sphaericus* pertencentes ao Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, Departamento de Entomologia,

Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Esalq/USP e larvas de *C. quinquefasciatus* criadas no mesmo laboratório.

Foram testadas 20 estirpes da bactéria, sendo 19 de origem brasileira e a estirpe 2362, considerada padrão (Tabela 1). Previamente à execução dos bioensaios, as mesmas foram encaminhadas à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a fim de serem caracterizados por meio de serotipagem baseada no antígeno flagelar. Uma vez caracterizadas, uma amostra da cultura estoque das respectivas estirpes foi retirada com alça de platina e transferida para erlenmeyers de 250 ml de capacidade, contendo 50 ml do meio caldo nutriente + extrato de levedura 0,1% (CNY), sendo incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e 200 rpm, durante 24h (caldo pré-fermentado). Em seguida, 1 ml do caldo pré-fermentado de cada estirpe foi inoculado seguindo os mesmos procedimentos anteriores, porém, incubado durante 48h. O meio fermentado foi centrifugado e o material precipitado foi coletado e transferido para um tubo "ependorff" e armazenado em freezer a -10°C , até que fosse utilizado nos bioensaios.

Para a realização dos bioensaios amostras de 0,01g da biomassa armazenada foram suspensas em 10 ml de água + espalhante adesivo 0,01% (Tween 80), em frascos de vidro fechados com filme de PVC. Após agitação durante 1 min, os frascos foram submetidos a choque térmico (80°C durante 12 min), banho ultra-som por 5 min e agitação por mais 1 min, com a finalidade de eliminar eventuais células presentes e dispersar acúmulos de esporos no material. Em seguida, com o auxílio de uma câmara de Petroff-Hauser determinou-se a concentração de esporos totais nas suspensões, que foram então, padronizadas nas concentrações de: 5×10^3 , 2×10^3 , 1×10^3 e 7×10^2 esporos/ml, consistindo cada uma delas em um tratamento.

Alíquotas de 1 ml das diferentes suspensões foram inoculadas em copos plásticos contendo 99 ml de água destilada e 15 larvas de *C. quinquefasciatus* no 3º instar, sendo utilizadas quatro repetições para cada tratamento. Na testemunha, os copos foram inoculados com 1 ml de água destilada esterilizada + espalhante adesivo 0,01%.

Os copos foram mantidos em câmara B.O.D. ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 14h de fotofase) e a mortalidade das larvas foi avaliada 24h e 48h a aplicação. Foram selecionadas para a fase seguinte as estirpes que causaram no mínimo 90% de mortalidade.

As estirpes selecionadas foram novamente multiplicadas, seguindo metodologia descrita anteriormente, e ao final do período de incubação, foram retiradas amostras de 2 ml do caldo fermentado de cada um dos frascos, que foram submetidas ao choque térmico e ultra-som e então diluídas para 10^{-5} e 10^{-6} vezes. Em seguida, alíquotas de 5 μl de cada diluição foram aplicadas em seis a oito pontos na superfície do meio de cultura ANY (caldo nutriente acrescido de ágar 20g/L) em placas de Petri (três placas para cada repetição), seguindo uma adaptação da técnica desenvolvida por Rios, citada por Alves *et al.* (1998).

As placas foram deixadas abertas na câmara de fluxo laminar por aproximadamente 10 min e, após secagem, foram incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16h, quando então foram feitas contagens do número colônias em cada um dos pontos (UFC).

Os dados obtidos da produção foram submetidos à análise de variância, usando-se o teste F e também a

Tabela 1. Procedência e serotipos de estirpes de *B. sphaericus* avaliados contra larvas de *C. quinquefasciatus*.

| Estirpe | Local | Procedência | Serótipo ¹ |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| ESALQ AM1 | Manaus/ AM | Solo do Rio Preto | H5a5b |
| ESALQ MG2 | Lavras/ MG | Solo não cultivado | ? |
| ESALQ MS1 | Angélica/ MS | Solo de pastagem | H5a5b |
| ESALQ MS2 | Corumbá/ MS | Ninho de formiga | H5a5b |
| ESALQ MS3 | Corumbá/ MS | Solo de beira de rio | H5a5b |
| ESALQ MS5 | Corumbá/ MS | Solo de beira de rio | ? |
| ESALQ MS6 | Corumbá/ MS | Solo de beira de rio | H5a5b |
| ESALQ MS7 | Corumbá/ MS | Solo de beira de rio | H5a5b |
| ESALQ MS8 | Corumbá/ MS | Solo de beira de rio | H5a5b |
| ESALQ PI1 | Paraíba/ PI | Solo de cultura de feijão | H5a5b |
| ESALQ PR9 | Arapongas/ PR | Solo de rio | H5a5b |
| ESALQ PR10 | Arapongas/ PR | Solo de borda de mata | ? |
| ESALQ PR12 | Arapongas/ PR | Solo de reflorestamento | H5a5b |
| ESALQ SC1 | Chapecó/ SC | Solo de lavoura - EPAGRI | H5a5b |
| ESALQ SP10 | Alfredo Marcondes/ SP | Solo cultivado | H5a5b |
| ESALQ SP11 | Presidente Bernardes/ SP | Solo cultivado | H5a5b |
| ESALQ SP12 | Anhumas/ SP | - | H5a5b |
| ESALQ SP13 | Capivari/ SP | Solo de canteiro - residência | ? |
| ESALQ SP16 | São Pedro/ SP | Solo | H5a5b |
| 2362 | Liofilizado - Inst. Pasteur/França) | | H5a5b |

¹Caracterização serológica realizada pela Embrapa/ Cenargen.
? = Não houve relação com nenhum dos soros conhecidos.

comparação das médias de produção pelo teste de Tukey, utilizando o programa estatístico SANEST (Zonta & Machado 1987), sendo que para a comparação das médias os dados foram transformados em $x = \frac{1}{\sqrt{y}}$.

Avaliação da formulação em criadouros artificiais. O formulado foi colocado em baldes de plástico contendo 10 L de água e larvas de *C. quinquefasciatus* de 3º instar, e foi avaliado nas seguintes condições: água desclorada (água limpa) e água desclorada + 1% de esterco fresco de coelho como fonte de matéria orgânica em suspensão (água poluída). Para cada condição foram utilizadas três repetições. Na testemunha, as larvas foram mantidas em baldes contendo água limpa e com matéria-orgânica.

Inicialmente foi realizado o ensaio com água poluída, sendo os baldes mantidos em uma casa-de-vegetação sob fotoperíodo natural. Entre a incorporação do esterco à água feita no início do mês de dezembro de 1997 e a aplicação do patógeno decorreu o período de 10 dias.

Os baldes foram dispostos em fileiras de 4 × 3 e receberam a formulação G4 (contendo 20% de biomassa fresca do patógeno ou 6 × 10⁸ UFC/g), nas concentrações de 0,06; 0,12 e 0,24 g/balde, correspondentes a 1, 2 e 4 kg/ha, por serem

estas as concentrações mais utilizadas nos trabalhos de avaliação de formulações de *B. sphaericus*. Em seguida, os recipientes foram infestados com 20 larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus*, provenientes da criação do laboratório. Após um, dois, sete e dezoito dias da inoculação foram feitas as avaliações, registrando-se o número de larvas nos baldes. Em seguida, procedeu-se à recolonização com a liberação de 20 larvas em cada um dos recipientes.

Posteriormente, foi realizado o ensaio em água limpa, sendo repetidos todos os procedimentos, porém, utilizando como tratamentos a formulação nas concentrações proporcionais a 2 kg/ha e 4 kg/ha, e também a formulação comercial Vectolex® (Abott Labs. Ltda.) (51,2% de *B. sphaericus* 2362), na concentração de 4 kg/ha. Os baldes foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (26 ± 1°C) e com fotoperíodo natural (aproximadamente 14h de luz).

Para todos os experimentos, as médias foram comparadas entre si, pela análise da variância com a aplicação do teste F e teste de Tukey, segundo delineamento experimental fatorial.

Avaliação da formulação em lagoas de tratamento de efluentes. O experimento foi realizado na cidade de Londrina, Região Norte do estado do Paraná, de 5 a 20 de maio de 1998. O local escolhido foi uma lagoa de tratamento de resíduos de

curtume de couro bovino, retangular e com área de 800 m². A água de cor escura, continha muita matéria orgânica em suspensão, odor fétido, sendo um local apropriado para o desenvolvimento de *Culex* spp. A lagoa vem sendo utilizada desde o ano de 1994, para estudos de ecologia e controle de culicídeos. Assim, o local já é bem conhecido quanto à ocorrência das espécies e níveis populacionais de pernilongos.

Antes da aplicação, foram feitas amostragens da população de larvas, coletando-as com rede de nylon nos vértices da lagoa, sendo os insetos levados ao Laboratório de Entomologia do Depto. de Biologia Animal e Vegetal, da UEL para quantificação e identificação dos mesmos. Em seguida, foi feita a aplicação manual da formulação G4, ao longo de toda a margem, na proporção equivalente a 2 kg/ha, baseando-se nos resultados do experimento em criadouros artificiais.

Os resultados obtidos durante as avaliações foram comparados com os dados preliminares à aplicação, no sentido de se estabelecer a redução percentual da população ao longo do tempo.

Resultados e Discussão

Seleção de estirpes. As estirpes testadas acusaram, em todas

as concentrações, mortalidade larval muito variável, cujos valores oscilaram entre 10 e 100%, em todas as concentrações utilizadas (Tabela 2).

As estirpes ESALQ MS1, ESALQ MS2, ESALQ MS3, ESALQ PI1, ESALQ SC1 e ESALQ SP16 mostraram baixa atividade, não causando mais que 10% de mortalidade, mesmo na maior concentração. Por outro lado, houve estirpes com atividade entre 80% e 100% de mortalidade, contudo, não se verificou nenhuma relação desta com o serótipo, uma vez que a maioria foi caracterizada como pertencente ao serótipo H5.

Resultados semelhantes foram obtidos por Schenkel *et al.* (1992) e Vilarinhos *et al.* (1998), testando diversas estirpes de *B. sphaericus*, e da mesma forma, embora a maioria deles pertencesse ao mesmo serótipo, houve grande variação na eficiência contra larvas de culicídeos. Além disso, o fato de a estirpe padrão ter sido menos eficiente que outras testadas corrobora observações de Vilarinhos *et al.* (1998), os quais citaram estirpes com atividade superior a 70% em relação à mesma estirpe 2362 (Tabela 2).

Assim, considerando-se estirpes de um mesmo serótipo, a existência de diferenças na toxicidade pode se dever à melhor expressão das toxinas ou à produção em maior quantidade por algumas estirpes em relação às demais, que

Tabela 2. Mortalidade média de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* submetidas às estirpes de *B. sphaericus*, 48h após a inoculação (Temp.: 26 ± 1°C, fotofase: 14h).

| Estirpe | Concentração (esporos/ml) | | | | Testemunha |
|------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------|
| | 5 × 10 ³ | 2 × 10 ³ | 1 × 10 ³ | 7 × 10 ² | |
| ESALQ AM1 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 |
| ESALQ MG2 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 |
| ESALQ MS1 | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ESALQ MS2 | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ESALQ MS3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ESALQ MS5 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 93,3 | 0,0 |
| ESALQ MS6 | 93,3 | 93,3 | 98,3 | 93,3 | 0,0 |
| ESALQ MS7 | 92,0 | 92,0 | 93,3 | 98,3 | 0,0 |
| ESALQ MS8 | 100,0 | 91,67 | 100,0 | 73,3 | 0,0 |
| ESALQ PI1 | 3,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ESALQ PR9 | 100,0 | 100,0 | 95,0 | 90,0 | 0,0 |
| ESALQ PR10 | 31,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ESALQ PR12 | 83,3 | 75,0 | 55,0 | 35,0 | 0,0 |
| ESALQ SC1 | 3,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ESALQ SP10 | 100,0 | 100,0 | 95,0 | 90,0 | 0,0 |
| ESALQ SP11 | 100,0 | 95,0 | 70,0 | 45,0 | 0,0 |
| ESALQ SP12 | 76,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ESALQ SP13 | 98,3 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 |
| ESALQ SP16 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2362 | 100,0 | 86,25 | 50,0 | 0,0 | 0,0 |

provavelmente pode ter ocorrido neste trabalho (R.M.L. Schenkel, comunicação pessoal).

Em se tratando de um trabalho inicial de seleção, optou-se apenas pela contagem de esporos totais no preparo das suspensões, como forma de padronizá-las e para dar um indicativo na escolha de estirpes que causassem, no mínimo, 90% de mortalidade nas concentrações mais baixas, indicando o potencial larvicida elevado. Assim, foi possível agilizar o processo de seleção inicial, obtendo-se parâmetros indicativos da ação patogênica das estirpes, visando estudos mais aprimorados.

Na menor concentração (7×10^2 esporos/ml), as estirpes de melhor desempenho foram ESALQ AM1, ESALQ MG2, ESALQ MS6, ESALQ MS7, ESALQ PR9, ESALQ SP10 e ESALQ SP13. Considerou-se também a estirpe 2362 por ser um padrão de comparação.

Com relação à produção de esporos, a estirpe ESALQ MS6 foi a que mais produziu em comparação ao padrão 2362 (cerca de 20 vezes mais), diferindo significativamente deste ($P \geq 0,05$), sendo que para os demais não houve diferença quanto a esse parâmetro (Tabela 3).

Da mesma forma que para a atividade larvicida, variações na produção de esporos também são relatadas na literatura, havendo inclusive isolados com capacidade de esporulação muito acima da apresentada pelo isolado 2362 (Yousten *et al.* 1985, Schenkel *et al.* 1992).

Assim, a combinação entre os parâmetros produção e virulência levou a optar-se pela estirpe ESALQ MS6 para a elaboração da formulação denominada G4 desenvolvida por Alves *et al.* (2001).

Avaliação da formulação em criadouros artificiais. A atividade do patógeno na água contendo esterco foi constatada durante todo o período de experimentação, não havendo diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre as concentrações nas duas primeiras avaliações. Contudo, a partir do terceiro dia ocorreram diferenças, visto que a redução na atividade larvicida nos tratamentos de 1 kg/ha e 2 kg/ha foi grande. Embora significativa, a redução da atividade na maior concentração foi menos intensa (Tabela 4).

Após sete dias da aplicação, a mortalidade larval elevou-

Tabela 3. Produção (média \pm EP) de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml de meio das estirpes de *B. sphaericus*, em caldo nutriente + extrato de levedura 1% (Temp.: 30°C, 200 rpm, 48h).

| Estirpe | UFC/ponto ¹ | UFC/ml ($\times 10^9$) ² |
|------------|------------------------|---------------------------------------|
| | n = 9 | n = 9 |
| 2362 | 6,5 | 0,13 \pm 0,78 b |
| ESALQ AM1 | 7,3 | 1,50 \pm 0,82 ab |
| ESALQ MG2 | 10,4 | 2,00 \pm 0,68 ab |
| ESALQ MS6 | 15,1 | 3,00 \pm 1,79 a |
| ESALQ MS7 | 9,3 | 1,85 \pm 1,35 ab |
| ESALQ PR9 | 12,8 | 2,57 \pm 3,86 ab |
| ESALQ SP10 | 13,0 | 2,60 \pm 2,30 ab |
| ESALQ SP13 | 12,4 | 2,49 \pm 3,03 ab |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey, submetidas à transformação de $x = 1/\sqrt{y}$

¹ Médias expressas em seus valores originais.

² Valores obtidos pela fórmula: $x = \frac{m}{d}$ onde m = média de UFC/ponto e d = diluição.

se significativamente em todas as concentrações ($P \geq 0,05$), provavelmente pela multiplicação da bactéria nas larvas mortas que não foram retiradas dos baldes. Finalmente, na última avaliação, a mortalidade larval igualou-se entre as concentrações e ocorreu nos mesmos níveis da atividade original, ou seja, próximo de 100%.

Nos estudos realizados por Skovmand & Baudin (1997) com uma formulação granulada avaliada em criadouros artificiais, obteve-se em água poluída 100% de mortalidade larval durante sete dias, com a formulação aplicada na concentração de 3 kg/ha. Contudo, na avaliação de 11 dias a atividade decresceu para 86%. Além disso, na água limpa aos 18 dias a mortalidade larval ainda era de 66%. Tais resultados

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* causada por *B. sphaericus* (formulação granulada G4), aplicada em diferentes concentrações em criadouros artificiais com água + esterco (Temp.: 28 \pm 1°C, dezembro de 1997).

| Dias | Testemunha | Concentração aplicada (kg/ ha) | | |
|------|------------|--------------------------------|-----------|-----------|
| | | 1 | 2 | 4 |
| 1 | 0,0 A b | 100,0 A a | 100,0 A a | 100,0 A a |
| 2 | 0,0 A b | 80,0 B a | 90,0 A a | 100,0 A a |
| 3 | 0,0 A d | 17,5 D c | 42,5 C b | 75,0 B a |
| 7 | 0,0 A d | 37,5 C c | 72,5 B b | 82,5 AB a |
| 18 | 0,0 A b | 95,0 A a | 97,5 A a | 95,0 A a |

C.V. = 2,37%

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha e dentro de cada tipo de água, não diferem entre si pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

Tabela 5. Porcentagem de mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* causada por *B. sphaericus* (formulações granuladas G4 e Vectolex® em criadouros artificiais com água limpa (Temp.: 25 ± 1°C, dezembro de 1997)

| Dias | Testemunha | G4 | | Vectolex |
|------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | | 2 kg/há | 4 kg/ha | 4 kg/ha |
| 1 | 0,0 A c | 60,0 B b | 95,0 A a | 100,0 A a |
| 2 | 0,0 A c | 65,0 B b | 100,0 A a | 100,0 A a |
| 3 | 0,0 A c | 75,0 AB b | 86,7 A a | 100,0 A a |
| 7 | 0,0 A c | 75,0 AB b | 93,3 A a | 95,0 A a |
| 18 | 0,0 A b | 95,0 A a | 95,0 A a | 100,0 A a |

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha e dentro de cada tipo de água, não diferem entre si pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

foram cerca de 30% inferiores aos obtidos com a formulação G4, utilizada na concentração de 2 kg/ha (Skovmand & Bauduin 1997).

Na comparação da atividade de G4 com o produto Vectolex® nos criadouros artificiais com água limpa, ambos apresentam semelhança na atividade larvicida, a despeito da diferença no percentual de bactéria presente na composição de ambos os produtos testados. Além disso, embora a flutuação não seja o determinante para se ter boa eficiência do produto, a formulação G4 permaneceu por mais tempo na superfície que o produto Vectolex®, que decantou totalmente em menos de 24h, ainda que não tenha sido feita nenhuma quantificação (Tabela 5).

Avaliação da formulação em lagoas de tratamentos de efluentes. A espécie de pernilongo predominante foi identificada como *Culex saltanensis* Dyar. A ação do produto sobre a população de insetos iniciou-se a partir de 24h após a aplicação, com redução de 21% do número médio de larvas.

Tal redução acentuou-se ainda mais ao longo do período de observação, alcançando 85% de redução larval após uma semana e 94% ao final do período (cerca de 2 semanas após

Tabela 6. Porcentagem média de redução populacional de larvas de *C. saltanensis* em lagoa de tratamento de resíduo orgânico de cortume de couros, após aplicação de *B. sphaericus* (formulação granulada G4). Londrina, PR; maio de 1998.

| Dias após a aplicação | Número médio de larvas ¹ | Redução populacional (%) ² |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 0 (pré-aplicação) | 1049,4 ± 54,36 | - |
| 1 | 826,6 ± 28,09 | 21 |
| 3 | 556,3 ± 30,31 | 47 |
| 7 | 157,4 ± 15,27 | 85 |
| 15 | 62,2 ± 3,75 | 94 |

¹Referente a quatro pontos de coleta.

²Em relação ao número médio de larvas na avaliação pré-aplicação.

a aplicação) (Tabela 6).

Ainda que de forma preliminar, a eficiência foi demonstrada, pois não houve interrupção na atividade da bactéria sendo a mortalidade continuamente crescente durante o período de observação. Foi possível observar a presença de ovos e larvas pequenas, indicando a reposição natural dos insetos, contudo, a população não se elevou. Deve-se mencionar que durante o período de experimentação não foi registrada a ocorrência de chuva.

Embora tenha se alcançado ao final do período de avaliação um nível elevado de controle, a redução inicial da população foi de apenas de 21% e 47%, respectivamente, para 24h e 48h após a aplicação.

Deve-se ressaltar, porém, que a avaliação larval, após a aplicação do bioinseticida, foi realizada com peneira, cuja malha reteve principalmente larvas de 3º e 4º instares. Assim, a baixa resposta numérica no resultado inicial de controle pode indicar ação mais efetiva sobre larvas de instares iniciais. Desta forma, as larvas maiores e menos suscetíveis mantiveram-se vivas e as mais jovens (mais suscetíveis) foram eliminadas, fazendo cair a população nos dias subsequentes, pois as larvas de 3º e 4º instares transformaram-se em adultos, não ocorrendo sucessão de populações de larvas de diferentes instares.

A mesma formulação comercial Vectolex® foi testada em pântanos para o controle de *Mansonia uniformis* (Theobald) e os resultados foram semelhantes aos aqui obtidos com a formulação G4, com controle inicial não tão elevado (39% de redução larval após 4 dias da aplicação) e 87,5% de redução na população larval 14 dias após a aplicação do produto (Yap *et al.* 1991).

A menor eficiência verificada no presente estudo, quando comparada aos resultados obtidos com o produto Vectolex®, pode estar associada à concentração aplicada. Recomenda-se entre 5,6 kg/ha e 11,2 kg/ha do produto comercial para áreas infestadas e com elevada concentração de matéria orgânica, como é o caso do ambiente estudado, e a formulação experimental foi utilizada em concentração bastante inferior. Além disso, pode-se também atribuir tal diferença à concentração de bactéria, sendo que no produto comercial a concentração é de 51,2% em biomassa seca e no segundo 20% de biomassa fresca. Também, o controle deve ter sido afetado pela liberação

lenta do patógeno agregado aos grânulos da formulação, que somente com o passar de alguns dias atingiu a concentração adequada de esporos e cristais para causar elevado percentual de mortalidade. É possível que as larvas mortas tenham disponibilizado mais inóculo, contribuindo para o controle mais eficiente.

Desta forma, frente aos resultados obtidos, e considerando que a formulação G4 apresenta-se estável, mantendo 100% da eficiência contra larvas de *C. quinquefasciatus* após 10 meses de armazenamento em condições ambiente e 50% após permanecer por 60 dias a 50°C (Alves *et al.* 2001), conclui-se que a mesma apresenta excelente potencial para utilização no controle de pernilongos, sendo necessárias novas avaliações em diferentes condições, seja populacional ou ambiental.

Agradecimentos

Á Bióloga Solange Aparecida Vieira, técnica do Departamento de Entomologia da Esalq/USP, pelo auxílio na condução dos experimentos e ao Dr. Antonio Batista Filho, PqC - Instituto Biológico de São Paulo, pelas sugestões na preparação do manuscrito. Ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

Referências

- Alves, L.F.A., S.B. Alves & N.T. Augusto. 1999. Seleção de inertes e adjuvantes com vistas ao desenvolvimento de formulação granulada de *Bacillus sphaericus* Neide. Arq. Inst. Biol. 66: 77-81.
- Alves, L.F.A., S.B. Alves, R.B. Lopes & N.T. Augusto. 2001. Estabilidade de uma formulação de *Bacillus sphaericus* armazenada sob diferentes condições. Sci. Agric. 58: 21-26.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998. Técnicas de laboratório, p. 637-710. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 2ª edição, 1163p.
- Azevedo, J.L. 1998. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético, p.69-96. In: I.S. de Mello & J.L. Azevedo (ed.), Controle biológico. Jaguariúna, Embrapa, 262p.
- Barjac, H. de. 1990. Classification of *Bacillus sphaericus* strains and comparative toxicity to mosquito larvae, p.228-236. In H. de Barjac & D.J. Sutherland (ed.), Microbial control of mosquitoes and blackflies. New Brunswick, Rutgers University Press, 360p.
- Cônsoli, R.A.G.B., B.S. Santos, M.A. Lamounier, N.F.C. Secundino, L. Rabinovitch, C.M.B. Silva, R.A.S. Alves & N.F.F. Carneiro. 1997. Efficacy of a new formulation of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92: 571-573.
- Lacey, L.A. 1984. Production and formulation of *Bacillus sphaericus*. Mosq. News 44: 153-159.
- Paccola-Meireles, L.D. 1998. Genética e melhoramento de fungos agentes de controle biológico, p.171-200. In I.S. de Mello & J.L. Azevedo (ed.), Controle biológico. Jaguariúna, Embrapa, 262p.
- Schenkel, R.M.L., L. Nicolas, E. Frachon & S. Hamon. 1992. Characterization and toxicity to mosquito larvae of four *Bacillus sphaericus* strains isolated from Brazilian soils. J. Invertebr. Pathol. 60: 10-14.
- Skovamand, O. & S. Bauduin. 1997. Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in West African Countries. J. Vector Ecol. 22: 43-51.
- Vilarinhos, P.T.R., J.M.C.S. Dias, C.F.S. Andrade & C.J.P.C. Araújo-Coutinho. 1998. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos, p.447-480. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 2ª edição, 1163p.
- Yap, H.H., H.T. Tan, A.M. Yahaya, R. Baba & N.L. Chong. 1991. Small scale field trials of *Bacillus sphaericus* (strain 2362) formulations against *Mansonia* mosquitoes in Malaysia. J. Mosq. Contr. Assoc. 7: 24-29.
- Yousten, A.A., S.B. Fretz & S.A. Jelley. 1985. Selective medium for mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. Appl. Environm. Microbiol. 94: 1532-1533.
- Zonta, E.P. & A.A. Machado. 1987. SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas, DMEC/IFM/UFPel, 138p.

Received 17/V/05. Accepted 26/I/06.