

BIOATIVIDADE DO *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) PARA ADULTOS DE *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)

Bioactivity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) to adults of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)

Deodoro Magno Brighenti¹, César Freire Carvalho², Geraldo Andrade Carvalho²,
Carla Regina G. Brighenti³, Stephan Malfitano Carvalho⁴

RESUMO

Avaliou-se a influência do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner) sobre adultos de *Apis mellifera* Linnaeus. Os experimentos foram realizados em laboratório a 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. *B. thuringiensis* foi aplicado com pulverização sobre adultos, e fornecido através de solução aquosa de mel a 50% e em adição à pasta Cândia, utilizando o produto comercial Dipel[®] PM. Esse produto quando aplicado com pulverização ou incorporado à pasta Cândia ou à solução aquosa de mel provocou mortalidade de adultos de *A. mellifera* em todas as concentrações utilizadas, com exceção de 0,25 g de Dipel[®]/100 mL adicionado à solução aquosa de mel a 50%. Ao ser incorporado à pasta Cândia, a CL₅₀ correspondeu a 0,325 g e a CL₉₀ 2,127 g do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/60 g de pasta. Adicionado à solução aquosa de mel a 50%, a CL₅₀ foi de 1,403 g e a CL₉₀ foi de 7,759 g do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/100 mL de solução. Sintomas de infecção pelo *B. thuringiensis* foram identificados nas abelhas adultas e através do isolamento obteve-se uma cultura dessa bactéria o que comprovou a patogenicidade para adultos de *A. mellifera*.

Termos para indexação: Abelha, toxicidade, inseticida biológico.

ABSTRACT

The effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner) on adults of *Apis mellifera* Linnaeus were evaluated. The bioassays were carried out under controlled conditions at 25 ± 2 °C, RH $70 \pm 10\%$ and 12-h photophase. Adults of *A. mellifera* were exposed to the commercial product Dipel[®] PM. The following methods were used: direct spraying; supplying Bt with honey aqueous solution; and by a Candy paste added to Bt. *B. thuringiensis* caused mortality on *A. mellifera* adults, independent of the method used, except at 0.25 g of Bt/100 mL added to the honey aqueous solution. *B. thuringiensis* added to the Candy paste showed CL₅₀ and CL₉₀ of 0.325 g and 2.127 g of the product to 60 g of Candy paste, respectively. Dipel[®] PM added to the honey aqueous solution showed CL₅₀ and CL₉₀ of 1.403 g and 7.759 g of *B. thuringiensis*/100 mL, respectively. Infection symptoms by *B. thuringiensis* were identified on bees adult and by isolation of this bacterium, the toxicity of *B. thuringiensis* on *A. mellifera* was confirmed.

Index terms: Bee, toxicity, biological insecticide.

(Recebido em 24 de setembro de 2003 e aprovado em 22 de abril de 2005)

INTRODUÇÃO

As abelhas produzem cera para construção dos favos onde ocorre o armazenamento de pólen, mel e o desenvolvimento de ovos, larvas e pupas. Para o armazenamento dos favos de cera durante a entressafra é necessária a utilização de técnicas de conservação para evitar o aparecimento da traça *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), encontrada no Brasil, em criações de abelhas, desde 1938 (SCHENK, 1938). As lagartas fazem galerias nos favos, alimentando-se de cera, pólen e mel, podendo destruí-los totalmente, impedindo sua reutilização (VANDENBERG & SHIMANUKI, 1990b).

Em colônias com alta densidade populacional os favos não são prejudicados, porque as abelhas repelem as mariposas e, mesmo quando surgem algumas lagartas da traça, as operárias prontamente realizam a limpeza do favo, impedindo seu desenvolvimento (BURGES, 1978). No caso de baixa densidade populacional deve-se manejar corretamente a colméia, mantendo-se um número adequado de favos nas melgueiras (BURGES & BAILEY, 1968). Além da destruição dos favos, lagartas e adultos da traça podem ser vetores de patógenos e, através das fezes, os adultos podem disseminar esporos das bactérias *Paenibacillus larvae* (White, 1906) causadora da “cria pútrida americana” e *Melissococcus pluton* (Bailey &

¹Zootecnista, Doutorando em Entomologia, M. Sc. Entomologia – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx.P. 3037 – 37.200-000 – Lavras, MG – abelha@ufla.br

²Professores do Departamento de Entomologia/DEN – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37.200-000 – Lavras, MG.

³Matemática, M. Sc., Doutoranda em Estatística e Experimentação Agropecuária – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37.200-000 – Lavras, MG.

⁴Agrônomo, Doutorando em Entomologia – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37.200-000 – Lavras, MG.

Collins, 1982) “cria pútrida européia” (ANDERSON, 1990).

Os prejuízos causados pela traça da cera têm incentivado pesquisadores a buscar métodos alternativos de controle, uma vez que a utilização de produtos químicos nas colméias e nos favos armazenados pode provocar a mortalidade de abelhas, contaminação do mel e demais produtos apícolas. Assim, dentre os métodos de controle empregados, tem-se sugerido o térmico, sendo normalmente de alto custo e de pouca eficiência (BOLLHALDER, 1999). Dessa forma, outras técnicas de controle desse inseto-praga, usando produtos de origem biológica, podem ser empregadas, como a utilização de entomopatógenos (VERMA, 1995). Dentre os produtos de origem microbiana comercializados no Brasil à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) destaca-se o Dipel® 32 PM, que pode ser empregado no controle da traça da cera; contudo, ainda não foi registrado para proteção de favos (DIAS, 2001).

B. thuringiensis é uma bactéria “gram” positiva que, após a fase de crescimento, passa por um processo de esporulação devido à exaustão de nutrientes, produzindo um esporângio que contém um endosporo e inclusões cristalinas de proteínas que são responsáveis por sua ação entomopatogênica. Esse cristal protéico é composto por um polipeptídeo denominado endotoxina (NAVON, 1993). Quando formas larvais de um inseto alimentam-se dessas proteínas, inicia-se uma série de reações que culminam com a morte das mesmas, caracterizando, assim, o efeito do controle biológico (MENDONÇA, 2002). O emprego desse entomopatógeno é uma estratégia para o controle de lagartas não só por causa da sua especificidade, mas também por ser atóxico a seres humanos. Sua eficácia é maior quando ingerida pelas lagartas durante os primeiros ínstares, sendo considerado ineficaz para adultos (PEREIRA et al., 1998).

Segundo Burges & Bailey (1968), formulações de *B. thuringiensis* incorporadas à cera alveolada durante o seu processamento não causaram efeitos prejudiciais às abelhas. Charrière & Imdorf (1999) não encontraram resíduos na cera, mel, pólen e própolis, considerando a bactéria inócua para abelhas. Na Europa, alguns pesquisadores conseguiram resultados satisfatórios na conservação de favos, em que a incorporação de *B. thuringiensis* foi realizada durante o processo de fabricação da cera alveolada, permitindo o controle da traça da cera na entressafra (JYOTI & BREWER, 1999; VANDENBERG & SHIMANUKI, 1990a).

O método que melhor resultado tem proporcionado no controle da traça, apesar do aumento de mão-de-obra, é o emprego de *B. thuringiensis* por meio da pulverização dos favos (BAILEY, 1981; OIRSA, 1988; SINGH, 1962; SZABO & HEIKEL, 1987). Dias (2001) mencionou que a conservação dos favos depois de vazios e limpos por meio de pulverização com Dipel® e armazenamento em local fresco e arejado, pode evitar reinfestações de *G. mellonella*. Em Uttar Pradesh, na Índia, Verma (1995) utilizou uma formulação comercial de Dipel® testada em colônias de *Apis cerana* Fabricius, 1793 infestadas com esse piralídeo. A mortalidade média da traça foi de 98,7% aplicando-se 10 g de Dipel®/1000 mL de água em pulverização, e a eficácia no controle desse inseto perdurou por 5,5 meses, sendo que as larvas das abelhas não foram afetadas.

Levando-se em consideração a importância que representa a traça da cera, tanto para colméias em condições de campo como também para favos que normalmente são armazenados na entressafra, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758.

MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas do apiário experimental da UFPA foram coletadas dos favos de ninhos e transportadas em gaiolas teladas para laboratório. Para a avaliação da bioatividade de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sobre adultos de *A. mellifera*, foram utilizadas três formas de aplicação de Dipel®, encontrado na formulação pó molhável (PM), concentração de 32 g/kg (16.000 unidades internacionais de potência por mg, contendo um mínimo de 25 bilhões de esporos viáveis por grama, de acordo com seu fabricante).

Pulverização de adultos – abelhas foram anestesiadas com CO₂ por 120 segundos e pulverizadas com 10 mL da solução de Dipel® nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g em 100 mL de água destilada, utilizando um pulverizador manual com capacidade para 1000 mL. Em seguida, os indivíduos tratados foram distribuídos em gaiolas de PVC de 15 cm de altura x 10 cm de diâmetro com a parte superior fechada com filó e a inferior com organza, sendo mantidas em sala climatizada a 28 ± 2 °C, UR de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas. Em cada gaiola foi colocado um chumaço de algodão embebido em água destilada e aproximadamente 6 g de pasta Cândi preparada com açúcar de confeitiro e mel.

Adicionado à pasta Cândi – utilizaram-se as mesmas concentrações do Dipel® mencionadas anteriormente, sendo que cada uma foi incorporada à dieta artificial constituída por 60 g de pasta Cândi. Uma alíquota de 6 g

da dieta contaminada foi colocada em um recipiente plástico de 25 mm de diâmetro x 5 mm de altura, o qual foi mantido sobre cada gaiola de PVC de 15 cm de altura x 10 cm de diâmetro para alimentação dos adultos. Colocou-se também chumaço de algodão embebido em água destilada, a qual foi repostada sempre que necessário.

Adicionado à solução aquosa de mel a 50% - empregaram-se as mesmas concentrações do Dipel® em 100 mL de solução aquosa de mel a 50%, fornecendo em cada gaiola, um recipiente de vidro com capacidade para 20 mL, contendo a tampa perfurada, por onde foi inserido um rolo dentário de algodão umedecido na solução aquosa de mel com a respectiva concentração de Dipel®, para alimentação das abelhas.

Nas três formas de aplicação foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, com oito tratamentos e dez repetições, sendo cada uma formada por 10 indivíduos. Avaliou-se a mortalidade das abelhas às 1, 3 e 6h após a aplicação do Dipel® e posteriormente a cada 6h até completar 96h da liberação dos insetos nas gaiolas, a fim de estimar o período de sobrevivência de *A. mellifera*. A mortalidade total em cada tratamento foi corrigida através da fórmula de Abbott (1925).

Aplicou-se teste de médias de agrupamento de Scott & Knott (1974) ($P < 0,05$). Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit, determinando-se curvas de concentração-mortalidade para os três bioensaios, e por meio destas, foram estimados os valores de CL_{50} e CL_{90} (FINNEY, 1971). O teste χ^2 foi usado para medir o ajuste dos pontos da reta probítica. Posteriormente, avaliou-se a sobreposição ou não do intervalo de confiança (IC) das CL_{50} e CL_{90} estimadas. A sobreposição do IC foi interpretada como igualdade de tratamentos. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0,05$.

Os dados de mortalidade ao longo do tempo para cada repetição foram ajustados utilizando o modelo Probit (PREISLER & ROBERTSON, 1989). Calculou-se o tempo letal médio (TL_{50} - tempo estimado para 50% de mortalidade dos indivíduos) e a longevidade média (quociente da soma das longevidades individuais, pelo número de indivíduos). Para cada concentração aplicada, um TL_{50} e seu erro padrão foi calculado, e estabelecido um intervalo de confiança (IC 95%). A sobreposição do IC foi interpretada como igualdade de tratamentos. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0,05$.

As abelhas mortas foram colocadas em placas de Petri e conservadas em freezer a uma temperatura de -18°C para posterior isolamento do *Bacillus* e confirmação da presença da bactéria como a responsável pela mortalidade dos adultos.

O isolamento de *B. thuringiensis* nas abelhas foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA, conforme metodologia proposta por Chaves et al. (1973)⁵ citados por Zanuncio (1976). Em câmara de fluxo laminar colocou-se em uma placa de Petri uma alíquota de cinco abelhas de cada tratamento para cada bioensaio. Acrescentou-se álcool a 70% até a completa imersão das abelhas por 30 segundos, em seguida foram transferidas para outra placa com solução de hipoclorito de sódio a 2% por cinco minutos. Posteriormente, foram colocadas em uma nova placa com água destilada, para retirar o excesso de hipoclorito de sódio, sendo, em seguida, maceradas e colocadas em tubos de vidro de 2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura.

Para eliminação de organismos saprófitos, os tubos de vidro foram colocados em banho-maria a 80°C por 20 minutos, uma vez que as bactérias do gênero *Bacillus* são resistentes a temperaturas mais altas. Em seguida, foram feitas duas placas por tratamento (repicagens) para meio de cultura (Meio Básico I – MBI) composto de 10 g de sacarose, 4 g de extrato de levedo, 8 g de caseína ácida hidrolisada, 2 g de K_2HPO_4 (anidro), 0,3 g de MgSO_4 , 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada (KADO & HESKETT, 1970). Ao término, as placas foram levadas para câmara climatizada em ausência de luz, regulada a $30\pm 2^\circ\text{C}$ por 24h, período suficiente para o crescimento da cultura de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. O produto comercial Dipel® também foi diluído em água esterilizada e transferido para tubo de vidro. Em seguida, foram feitas as repicagens para o meio de cultura MBI para caracterização e comparação das culturas nas placas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pulverização de adultos – o composto Dipel® quando aplicado em pulverização provocou mortalidade significativa das abelhas. Os maiores índices ocorreram nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 10,0 g/100 mL, com mortalidade média de 62,2; 52,4; 54,1 e 45,9%, respectivamente (Tabela 1).

A variação de mortalidade provavelmente ocorreu devido a diferenças de idades dos indivíduos, visto que em abelhas mais jovens, os comportamentos de higiene e lambadura são mais acentuados, o que pode ter propiciado maior ingestão de esporos da bactéria e conseqüentemente maior mortalidade.

⁵ CHAVES, G.; CARVALHO, M. G.; CRUZ-FILHO, J.; RO-MEIRO, R. S. **Roteiro de aulas de fitopatologia**. Viçosa: UFV, 1973. 58 p.

TABELA 1 – Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* após 96 horas da pulverização com Dipel® 32 PM. Temperatura de 28 \pm 2°C, UR de 70 \pm 10% e fotofase de 12 horas.

Dipel® (g/100 mL de água)	Mortalidade	Mortalidade corrigida ²
0,00	39,0 \pm 0,4 a	0,0
0,25	77,0 \pm 1,1 c	62,2
0,50	71,0 \pm 1,4 c	52,4
1,00	72,0 \pm 0,7 c	54,1
2,50	57,0 \pm 0,5 b	29,5
5,00	53,0 \pm 0,6 b	22,9
10,0	67,0 \pm 0,4 c	45,9
20,0	56,0 \pm 0,3 b	27,9
C.V. ³	17,7	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹ Erro Padrão.

² Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

³ Coeficiente de Variação.

Não foi possível estimar a CL₅₀, pois os dados não se ajustaram ao modelo de Probit.

As abelhas que receberam o tratamento com *B. thuringiensis* sobreviveram, em média, de 1,6 a 3,1 dias (Tabela 2).

Pela sobreposição dos intervalos de confiança, pode-se verificar que o TL₅₀ não diferiu para as dosagens testadas, quando da aplicação do Dipel® em pulverização.

A mortalidade pela aplicação do Dipel® em pulverização pode ter ocorrido por duas causas. Uma delas seria o comportamento higiênico no qual a limpeza do tegumento de uma abelha pela outra, pode ter provocado maior ingestão do produto. A outra poderia ser o comprometimento da respiração desses insetos, tendo ocorrido mortalidade mesmo antes da ação da bactéria nos seus intestinos, principalmente nas concentrações mais altas. Estes fatos, possivelmente, explicam a variação na longevidade, pois foi verificado maior porcentagem de mortalidade logo após a pulverização. Observou-se que o TL₅₀ foi elevado, provavelmente, depois de realizada a limpeza, não houve mais contato das abelhas restantes com a bactéria.

Adicionado à pasta Cândi – observaram-se dois grupos distintos de porcentagem de mortalidade pelo Dipel®. No primeiro, concentrações entre 0,25 e 1 g do produto/60 g da pasta Cândi causaram mortalidade entre 54 e 68% (Tabela 3). No segundo, a mortalidade foi superior a 94%, chegando a 100%, em apenas 72h, nas concentrações de 10 e 20 g, evidenciando o elevado efeito do produto na mortalidade.

Verificou-se que os dados se ajustaram ao modelo probit (FINNEY, 1971) ($\chi^2 = 6,87$; gl = 5; p > 0,05) determinado pela equação:

$$\text{Probabilidade de mortalidade} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\hat{y}} \exp\left[-\frac{x^2}{2}\right] dx$$

em que : $\hat{y} = [-0,7667 + 1,5711 \cdot \text{Log}(\text{concentração})]$

Foi constatado que nas concentrações de 0,325 g (IC_{95%} [0,2; 0,453]) e 2,127 g/60 g de pasta Cândi (IC_{95%} [1,571; 3,239]) de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/60 g de pasta Cândi ocorreram 50 e 90% de mortalidade de adultos de *A. mellifera*, respectivamente (Figura 1).

O coeficiente angular da curva concentração-mortalidade (b = 1,5711) é inverso ao desvio padrão da distribuição da tolerância ao inseticida biológico. Dessa forma, maiores coeficientes angulares indicam menor variação na resposta da população ao inseticida.

A longevidade média de abelhas adultas variou entre 2,6 a 3,1 dias (Tabela 4). Na aplicação do Dipel® por adição à pasta Cândi o TL₅₀ não diferiu para as dosagens de 0,25; 0,5 e 1,0 g pela sobreposição dos intervalos de confiança. Observou-se que em função do aumento das concentrações o tempo letal médio foi diminuindo, evidenciando uma ação relativamente rápida do produto.

TABELA 2 – Longevidade média (horas) (\pm EP)¹ e tempo letal de 50% (TL₅₀) de mortalidade de adultos de *Apis mellifera* pulverizados com Dipel®32 PM. Temperatura de 28 \pm 2°C, UR de 70 \pm 10% e fotofase de 12 horas.

Dipel® (g/100 mL de água)	Longevidade	TL ₅₀ (IC 95,0%)
0,25	74,64 \pm 21,79 a	73,31 (66,32; 81,03)
0,50	74,19 \pm 21,09 a	76,57 (69,65; 84,18)
1,00	75,42 \pm 21,17 a	75,67 (68,27; 83,88)
2,50	60,00 \pm 17,68 b	86,31 (75,61; 98,53)
5,00	47,07 \pm 16,29 c	90,12 (76,70; 105,90)
10,0	43,17 \pm 13,19 c	67,56 (55,58; 82,12)
20,0	38,52 \pm 9,77 c	85,28 (67,65; 107,50)
C.V. ²	17,95	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade.

¹ Erro Padrão. , ² Coeficiente de Variação.

TABELA 3 – Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* após 96 horas da alimentação com pasta Cândi contendo Dipel®32 PM. Temperatura de 28 \pm 2°C, UR de 70 \pm 10% e fotofase de 12 horas.

Dipel® (g/60 g de pasta Cândi)	Mortalidade	Mortalidade corrigida ²
0,00	41,0 \pm 0,9 a	0,0
0,25	73,0 \pm 0,4 b	54,2
0,50	75,0 \pm 0,5 b	57,6
1,00	81,0 \pm 0,3 b	67,8
2,50	97,0 \pm 0,2 c	94,9
5,00	98,0 \pm 0,1 c	96,6
10,0	100,0 \pm 0,0c	100,0
20,0	100,0 \pm 0,0 c	100,0
C.V. ³ (%)	9,4	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹ Erro Padrão. , ² Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925). , ³ Coeficiente de Variação.

TABELA 4 – Longevidade média (horas) (\pm EP)¹ e tempo letal de 50% (TL₅₀) de mortalidade de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel®32 PM adicionadas à pasta Cândi. Temperatura de 28 \pm 2°C, UR de 70 \pm 10% e fotofase de 12 horas.

Dipel® (g/60 g de pasta Cândi)	Longevidade Média	TL ₅₀ (IC 95,0%)
0,25	70,71 \pm 26,49 a	78,23 (72,10; 84,89)
0,50	72,09 \pm 23,66 a	77,49 (71,90; 83,52)
1,00	71,52 \pm 25,66 a	77,99 (73,23; 83,06)
2,50	73,98 \pm 25,63 a	60,31 (56,70; 64,16)
5,00	73,20 \pm 27,61 a	46,43 (43,05; 50,07)
10,0	63,30 \pm 33,41 a	43,14 (40,50; 45,96)
20,0	69,39 \pm 32,25 a	38,86 (36,90; 40,93)
C.V. ²	27,04	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade.

¹ Erro Padrão. , ² Coeficiente de Variação.

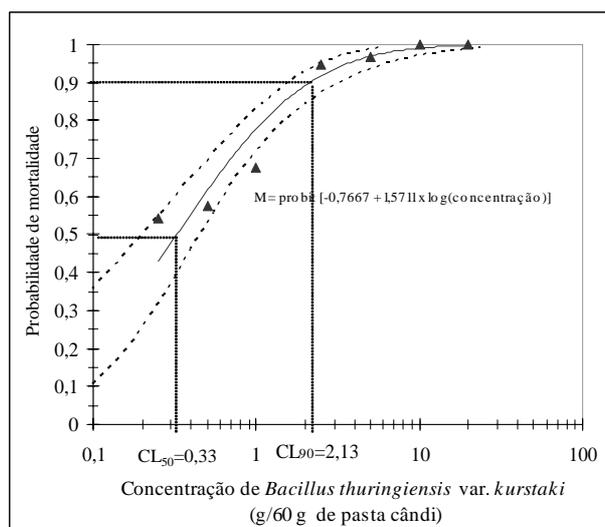


FIGURA 1 – Curva de concentração-mortalidade de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM adicionadas à pasta Cândi.

Adicionado à solução aquosa de mel a 50% - à exceção de 0,25 g de Dipel®/100 mL, as demais concentrações causaram mortalidade significativa das abelhas. As concentrações de 10 e 20 g/100 mL, apresentaram as maiores médias de mortalidade, sendo de 94,7 e 98,2%, respectivamente, e a 2,5 e 5 g de Dipel®/100 mL apresentaram médias de 73,7 e 75,4%, respectivamente. Observou-se mortalidade de 33,3% para as concentrações de 0,5 e 1 g do produto/100 mL (Tabela 5).

Os dados do efeito da concentração do *B. thuringiensis* var. *kurstaki* adicionado à solução aquosa de mel a 50% sobre a mortalidade das abelhas se ajustaram ao modelo Probit (FINNEY, 1971) ($\chi^2 = 6,64$; gl = 5; $p > 0,05$), sendo determinado pela equação:

$$\text{Probabilidade de mortalidade} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\hat{y}} \exp\left[-\frac{x^2}{2}\right] dx$$

em que: $\hat{y} = [-0,2538 + 1,7255 * \text{Log}(\text{concentração})]$

Verificou-se que nas concentrações de 1,403 g (IC_{95%} [1,017; 1,820]) e 7,759 g/100 mL de solução aquosa de mel (IC_{95%} [5,744; 11,672]) do *B. thuringiensis* var. *kurstaki* / 100 mL de solução aquosa de mel ocorreram 50 e 90% de mortalidade de abelhas, respectivamente (Figura 2).

A diferença nas metodologias de aplicação foi evidenciada pela não sobreposição dos intervalos de

confiança da CL₅₀ do *B. thuringiensis* var. *kurstaki* adicionado à pasta Cândi com o IC obtido no bioensaio via solução aquosa de mel. As estimativas da CL₅₀ e da CL₉₀ foram, respectivamente, 4,3 e 3,6 vezes menores, na metodologia por adição à pasta Cândi do que na adição em solução aquosa de mel.

O coeficiente angular, da curva concentração-mortalidade, obtido a partir da análise de Probit na metodologia por adição de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* via solução aquosa de mel a 50%, foi de $b = 1,7255$ e próximo ao coeficiente obtido no bioensaio de pasta Cândi, indicando semelhança na variabilidade de resposta entre as abelhas utilizadas nos dois bioensaios, ou ainda, homogeneidade das populações testadas.

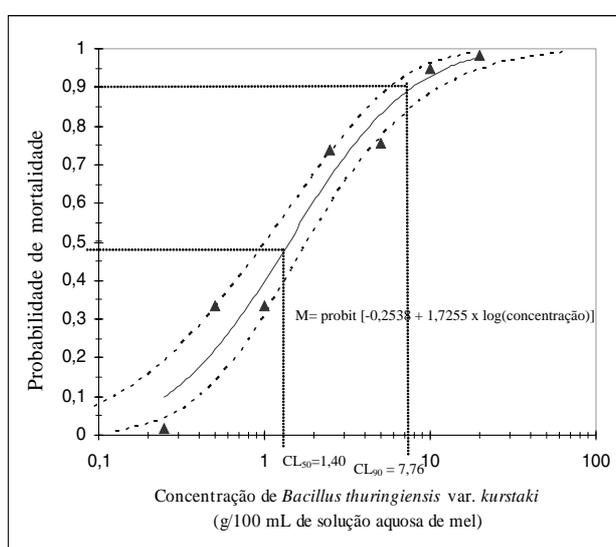
Na aplicação do Dipel® em solução aquosa de mel, o TL₅₀ não diferiu para as concentrações de 10 e 20 g pela sobreposição dos intervalos de confiança. A longevidade média dos adultos de abelhas variou entre 2,3 a 3,2 dias (Tabela 6).

A concentração de 0,25 g Dipel®/100 mL de solução aquosa de mel não causou mortalidade superior a 50% durante o período de 96 horas (Tabela 6). O maior TL₅₀ obtido foi o de 84,2 horas correspondente à concentração de 1 g/100 mL, o que indica uma possibilidade de utilização do produto em concentrações inferiores a este valor uma vez que a CL₅₀ obtida quando se utilizou essa metodologia foi de 1,403 g/100 mL.

TABELA 5 – Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* após 96 horas da alimentação com solução aquosa de mel a 50% contendo Dipel® 32 PM. Temperatura de $28\pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Dipel® (g/100 mL de solução aquosa de mel a 50%)	Mortalidade	Mortalidade corrigida ²
0,00	43,0 \pm 0,4 a	0,0
0,25	44,0 \pm 0,5 a	1,8
0,50	62,0 \pm 0,5 b	33,3
1,00	62,0 \pm 0,5 b	33,3
2,50	85,0 \pm 0,2 c	73,7
5,00	86,0 \pm 0,3 c	75,4
10,0	97,0 \pm 0,2 d	94,7
20,0	99,0 \pm 0,1 d	98,2
C.V. ³ (%)	11,2	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ¹Erro Padrão. ²Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925). ³Coefficiente de Variação.

**FIGURA 2** – Curva de concentração-mortalidade de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM adicionadas à solução aquosa de mel a 50%.**TABELA 6** – Longevidade média (horas) (\pm EP)¹ e tempo letal de 50% (TL₅₀) de mortalidade de adultos de *Apis mellifera* alimentados com Dipel® em solução aquosa de mel a 50%. Temperatura de $28\pm 2^\circ\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Dipel® (g/100 mL de solução aquosa de mel)	Longevidade Média	TL ₅₀ (IC 95,0%)
0,25	76,86 \pm 28,40 a	---
0,50	70,68 \pm 29,56 a	80,19 (69,35; 92,72)
1,00	74,82 \pm 26,59 a	84,20 (75,05; 94,46)
2,50	63,42 \pm 27,29 a	63,76 (57,38; 70,85)
5,00	70,02 \pm 24,47 a	71,50 (66,06; 77,39)
10,0	54,12 \pm 21,64 b	53,22 (48,77; 58,07)
20,0	54,39 \pm 19,49 b	53,84 (49,92; 58,17)
C.V. ²	26,14	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ¹Erro Padrão. ²Coefficiente de Variação.

Comparando-se as três formas de aplicação, constatou-se menor mortalidade através da aplicação em solução aquosa de mel a 50% até a concentração de 1 g; acima dessa, o método em que se constatou menor mortalidade foi a de pulverização. A mortalidade causada pela aplicação de 0,5 g de Dipel® não diferiu significativamente entre as formas de aplicação. A partir de 2,5 g não houve diferença entre os resultados, quando da adição em pasta Cândi e solução aquosa de mel a 50%. Com relação à testemunha, a mortalidade foi significativamente mais baixa e não diferiu entre as metodologias empregadas (Figura 3).

Quanto à longevidade média, observou-se que nas três metodologias os menores valores foram obtidos nas concentrações de 10 e 20 g de Dipel®. A maior variabilidade da longevidade ocorreu na metodologia de aplicação por pulverização (entre 75,42 e 38,52 horas) (Tabela 2), e a menor na pasta Cândi, onde a longevidade média variou entre 73,98 e 63,30 horas (Tabela 4). É importante notar que a longevidade média no caso da aplicação por pulverização, praticamente não diferiu para as dosagens de 0,25; 0,5 e 1 g de Dipel®, e foi decrescente com o aumento das demais dosagens, fato não constatado nas outras metodologias.

A vantagem do método de aplicação por pulverização em laboratório é que as abelhas são expostas principalmente pelo contato direto, como ocorre durante o

forrageamento em culturas onde é utilizado o Dipel® para controle de insetos-praga. Dias (2001) sugeriu a conservação dos favos, pulverizando-os com Dipel®; entretanto, não eram conhecidos os efeitos deletérios desse produto para larvas e/ou adultos de *A. mellifera*.

O isolamento de *B. thuringiensis* em abelhas retiradas dos tratamentos, nas três formas de aplicação do inseticida biológico, foi realizado pelo método MBI, totalizando 24 placas de cultura. Após 24 horas do isolamento, fez-se a comparação dos isolados dos tratamentos com a cultura obtida diretamente do produto comercial Dipel®. Os isolados de todos os tratamentos, à exceção da testemunha, foram considerados idênticos, comprovando-se ser o mesmo microrganismo patogênico para todos os grupos de abelhas utilizados.

Os sintomas externos provocados pelo *B. thuringiensis* em adultos de *A. mellifera* não eram conhecidos, uma vez que esse produto é indicado para controle de lagartas de lepidópteros, larvas de coleópteros e dípteros. Foi observado que o comportamento de limpeza do corpo e de agregação noturna das abelhas adultas foi alterado. Nas primeiras horas após o fornecimento do produto na pasta Cândi e solução aquosa de mel, houve rejeição do alimento, principalmente quando utilizadas concentrações mais altas, fato não ocorrido na aplicação por pulverização. Possivelmente, distúrbios intestinais

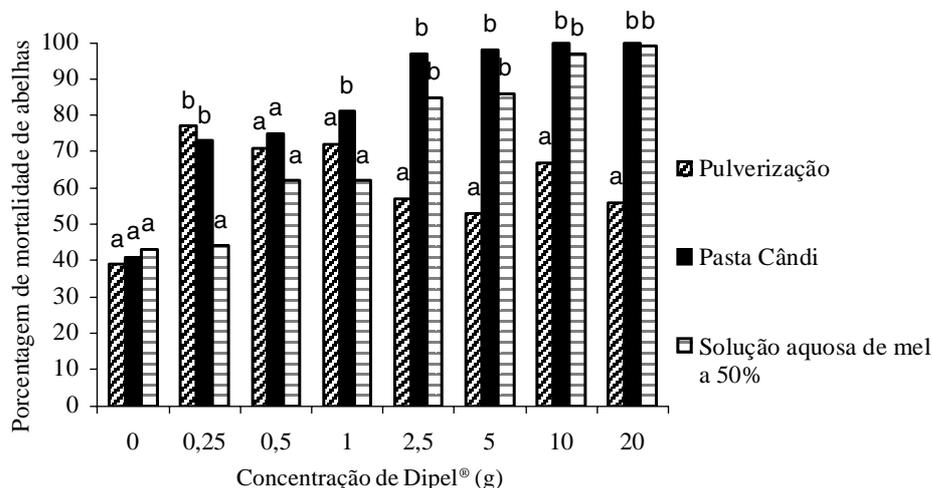


FIGURA 3 – Porcentagens de mortalidade de adultos de *Apis mellifera* submetidos a diferentes metodologias de aplicação do Dipel® 32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

passaram a ocorrer, pois grande fluxo de fezes líquuefeitas foi encontrado nas paredes da gaiola, aspecto não presente no tratamento testemunha. Quando os adultos foram pulverizados, notou-se a presença de fezes das abelhas na dieta posicionada na parte superior da gaiola.

Também foi realizado o isolamento do *B. thuringiensis* pelo método MBI, na pasta Cândi com resíduos de fezes obtidos do experimento por pulverização. A cultura obtida foi idêntica ao isolamento realizado com o produto comercial Dipel®, confirmando a passagem desta bactéria pelo trato intestinal destes insetos.

Constatou-se também um aumento de 20 a 30% do volume do abdome de abelhas que foram submetidas aos tratamentos com maiores concentrações do Dipel®, independente do método de aplicação utilizado (Figura 4). Houve perda de agilidade, observando-se a presença de abelhas caminhando lentamente, com posterior paralisia geral antes de morrer. Indivíduos vivos tentavam retirar, do fundo do recipiente, as abelhas mortas nas primeiras 60 h da aplicação do produto, caminhando com o adulto morto para a lateral da gaiola, preso em suas mandíbulas, comportamento característico das abelhas, como descrito por Gramacho (2002). Após esse período não foi observado o hábito de limpeza, aumentando o número de indivíduos que se mantinham isolados durante a noite, o que não ocorreu no tratamento testemunha, quando se mantiveram sempre agregados.

Foram observadas modificações evidentes no comportamento, sobrevivência e longevidade em todos

as metodologias empregadas. Verma (1995), na Índia, relatou que não houve mortalidade de larvas e adultos de *A. cerana* pulverizados com Dipel®, provavelmente por se tratar de uma outra espécie de abelha. Brighenti et al. (2002) e Carvalho et al. (2002) mencionaram que Dipel® foi inócua para as abelhas com concentrações inferiores às utilizadas neste trabalho. Os resultados obtidos confirmaram o efeito deletério de *B. thuringiensis* para adultos de abelhas nestas concentrações e de acordo com Sebesta & Horska (1970)⁶, citados por Arantes (1989), a b-exotoxina pode causar envenenamento nos adultos. Heimpel & Angus (1960) relataram que lepidópteros adultos da família Geometridae e abelhas são susceptíveis aos esporos de *B. thuringiensis*.

Levando-se em consideração a necessidade de controle da traça, torna-se necessário o desenvolvimento de outras pesquisas, como, por exemplo, o efeito dessa bactéria sobre adultos e larvas de *A. mellifera* após o período de armazenamento dos favos tratados na entressafra, ou mesmo no mel e em outros derivados, em concentrações menores. Burges & Bailey (1968) e Charrière & Imdorf (1999), em suas pesquisas, não encontraram resíduos de *B. thuringiensis aizawai* na cera, pólen e própolis e consideraram o produto inócua às abelhas.

⁶ SEBESTA, K.; HORSKÁ, K. Mechanism of inhibition of DNA dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 209, p. 357-367, 1970.



FIGURA 4 – Adultos de *Apis mellifera* com intumescimento abdominal após o tratamento com Dipel® 32 PM (abaixo) e adultos da testemunha (acima).

CONCLUSÕES

1. *B. thuringiensis* var. *kurstaki* presente no Dipel®, é comprovadamente tóxico a adultos de *A. mellifera*.

2. O Dipel® na concentração de 0,25 g/100 mL adicionado à solução aquosa de mel a 50 % não provocou mortalidade de abelhas.

3. A CL₅₀ *B. thuringiensis* var. *kurstaki* incorporado à pasta Cândi é de 0,325 g do Dipel®/60g de pasta Cândi e a CL₉₀ 2,127 g.

4. A CL₅₀ do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/100 mL de solução aquosa de mel 50% é de 1,403 e a CL₉₀ é de 7,759 g.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p. 265-267, 1925.
- ANDERSON, D. L. Pest and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Fiji. **Journal of Apicultural Research**, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 53-59, 1990.
- ARANTES, O. M. N. **Caracterização molecular do gene da delta-endotoxina, sua clonagem e transformação em *Bacillus thuringiensis* Berliner**. 1989. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1989.
- BAILEY, L. **Honey bee pathology**. New York: Academic, 1981. 124 p.
- BOLLHALDER, F. *Trichogramma* for wax moth control. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 139, n. 9, p. 711-712, 1999.
- BRIGHENTI, D. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; GUIMARÃES, C. R.; CARVALHO, S. M. Longevidade de adultos *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) pulverizados com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915). In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. CD-ROM.
- BURGES, H. D. Control of wax moths: physical, chemical and biological methods. **Bee World**, Bucks, v. 59, n. 4, p. 129-138, 1978.
- BURGES, H. D.; BAILEY, L. Control of the greater and lesser wax moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 11, n. 2, p. 184-195, 1968.
- CARVALHO, E. M.; CARVALHO, S. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; SOUZA, B. Impacto de inseticidas fornecidos a adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) por meio de pasta Cândi contaminada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBA, 2002. p. 114.
- CHARRIÈRE, J. D.; IMDORF, A. Protection of honey combs from wax moth damage. **American Bee Journal**, [S.l.], v. 139, n. 8, p. 627-630, 1999.
- DIAS, L. F. Controle biológico da traça da cera. **Informativo Zum Zum**, [S.l.], v. 35, n. 301, p. 7, 2001.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University, 1971. 333 p.
- GRAMACHO, K. P. Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBA, 2002. p. 170.
- HEIMPEL, A. M.; ANGUS, T. S. Bacterial insecticides. **Bacteriological Reviews**, [S.l.], v. 29, n. 3, p. 266-288, 1960.
- JYOTI, J. L.; BREWER, G. J. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) as vectors of *Bacillus thuringiensis* for control of banded sunflower moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 28, n. 6, p. 1172-1176, 1999.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- MENDONÇA, P. C. **Caracterização e sequenciamento dos plasmídeos pMC1 e pMC2 de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* isolado T01 328**. 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: Wiley, 1993. 311 p.

- OIRSA, B. **Manejo y control de la abeja africanizada Programa Regional para el Manejo y Control de la Abeja Africanizada**. El Salvador: [s.n.], 1988. 229 p.
- PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B.; REIS, P. R. Segurança no emprego de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- PREISLER, H. K.; ROBERTSON, J. L. Analysis of time-dose-mortality data. **Journal of Economic Entomology**, College, Park, v. 82, p. 1534-1542, 1989.
- SCHENK, E. **O apicultor brasileiro: guia completo de apicultura no Brasil**. 7. ed. [S.l.: s.n.], 1938. 320 p.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 502-512, 1974.
- SINGH, S. **Beekeeping in India**. New Delhi: Indian Council Agricultural Research, 1962. 214 p.
- SZABO, T. I.; HEIKEL, D. T. Fumigation with SO₂ to control dried fruit moth in honeybee combs. **Bee World**, Bucks, v. 68, n. 1, p. 37-38, 1987.
- VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Application methods for *Bacillus thuringiensis* used to control larvae of the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) on stored beeswax combs. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, n. 3, p. 766-771, 1990a.
- VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Viability of *Bacillus thuringiensis* and its efficacy for larvae of the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) following storage of treated combs. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, n. 3, p. 760-765, 1990b.
- VERMA, S. K. Studies on the control of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. in *Apis cerana* F. colonies with the biological insecticide, Dipel. **Indian Bee Journal**, Nainital, v. 57, n. 3, p. 121-123, 1995.
- ZANUNCIO, J. C. **Efeito do controle químico e microbiológico sobre três pragas de eucalipto e outros insetos**. 1976. 76 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1976.