

Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Marcel Ricardo Tanzini¹
Sérgio Batista Alves¹
Adriana Setten¹
Nilson Toschi Augusto²

RESUMEN. Con el objetivo de desarrollar formulaciones estables de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* se evaluó la compatibilidad de estos hongos con los tensoactivos Agrimul PW, Deydol KS 60, Surfion D-oxiteno, Sulfofon NSS, Sulpragil WP, Surfax 345, Surfion 950, Surfion PW, Texapon Zacd, Vixil-S y Vixilex. Los tensoactivos fueron agregados al medio de cultivo PDA en una concentración de 2%. Posteriormente, se inocularon los entomopatógenos en tres puntos de cada caja de Petri. Después de la inoculación las cajas se mantuvieron en una cámara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 10\%$ HR y 12 horas de fotofase durante 8 días, para el crecimiento de las colonias y la reproducción de los hongos. Los tensoactivos Agrimul PW, Sulfofon NSS, Surfion 950, Surfion PW, Vixil-S y Vixilex fueron compatibles con los entomopatógenos; mientras que, Dehydol KS 60, Sulpragil WP, Surfax 345 y Texapon Zacd fueron muy tóxicos para los mismos.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Formulaciones, Adyuvantes, Hongos entomopatógenos.

ABSTRACT. **Compatibility of adjuvants with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.** With the aim of developing stable formulations of *M. anisopliae* and *B. bassiana*, the compatibility of these fungi with the adjuvants Agrimul PW, Deydol KS 60, Surfion D-oxiteno, Sulfofon NSS, Sulpragil WP, Surfax 345, Surfion 950, Surfion PW, Texapon Zacd, Vixil-S and Vixilex was evaluated. The adjuvants were mixed with culture medium PDA in a 2% concentration. Then the entomopathogens were inoculated on three points of each Petri dish. After inoculation, the plates were kept in an acclimatized camera at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 10\%$ RH and 12 hours of photophase for 8 days, to allow growth of the colonies and reproduction of the fungi. The adjuvants Agrimul PW, Sulfofon NSS, Surfion 950, Surfion PW, Vixil-S and Vixilex were compatible with the entomopathogens; where as Dehydol KS 60, Sulpragil WP, Surfax 345 and Texapon Zacd were highly toxic to the fungi.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Formulation, Adjuvants, Entomopathogens.

Introducción

En la naturaleza, los hongos entomopatógenos pueden eliminar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos. *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sorok y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. son los más estudiados y utilizados debido a la eficiencia y facilidad de multiplicación en laboratorio, constituyendo uno de los principales grupos de patógenos de insectos utilizados en el control microbiano (Azevedo y Melo 1998).

En condiciones de laboratorio es difícil mantener la viabilidad de esos hongos por mucho tiempo, como

lo demostraron Clerk & Madelin (1965), Wasltad *et al.* (1970), Abreu *et al.* (1983) y Alves *et al.* (1987). Los estudios de compatibilidad pueden ser realizados con formulaciones ya disponibles en el mercado, buscando el control asociado con productos compatibles con los entomopatógenos. Esos estudios también son importantes para los inertes y tensoactivos utilizados en el proceso de formulación de los productos microbianos. De esta manera, formular un entomopatógeno consiste en adicionarle determinados compuestos que mejoren su desempeño en el campo, facilitando su manejo

Recibido: 27/01/2000. Aprobado: 23/02/2001.

¹ Dep. de Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola, ESALQ/USP. Piracicaba, San Paulo, Brasil. Correo electrónico: sebalves@carpa.ciagri.usp.br

² Instituto Biológico, Estação Experimental de Campinas. Campinas, SP. Brasil. Correo electrónico: mrtanzin@carpa.ciagri.usp.br

y aplicación y, principalmente, permiten su almacenamiento en condiciones que disminuyen el costo, con una pérdida mínima de las cualidades del producto (Batista *et al.* 1998).

De acuerdo con las propiedades preponderantes, los surfactantes pueden ser clasificados como adherentes, dispersantes y emulsificantes (Arruda 1985). En los Estados Unidos existían registrados 262 productos adyuvantes, distribuidos en las clases de adherentes, penetrantes, extensores, anti-espumantes y controladores de deriva, entre otros. En Brasil se dispone de poca información, debido a que, generalmente, ésta es poco divulgada por las compañías que los desarrollan.

Zhang *et al.* (1992) evaluaron agentes mojantes y aditivos para su utilización con conidios puros de *B. bassiana* y seleccionaron dos formulaciones. Sin embargo, sus propiedades no fueron significativamente diferentes a aquellas obtenidas con los conidios puros en polvo.

Considerando que una buena formulación es la base para el éxito de un insecticida microbiano, la posibilidad de obtener productos adecuados depende de las propias características del microorganismo y su relación con los adyuvantes y el ambiente de almacenamiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar algunos agentes tensoactivos disponibles, con el propósito de seleccionar los más compatibles a *B. bassiana* y *M. anisopliae*, para elaborar formulaciones adecuadas con estos entomopatógenos.

Materiales y métodos

Esta evaluación fue realizada en el Laboratorio de Patología y Control Microbiano de Insectos del Departamento de Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola de la Universidad de São Paulo, en el municipio de Piracicaba-SP, Brasil, entre junio y agosto de 1998.

Se utilizaron los hongos *B. bassiana* (cepa PL63), aislado de *Atta* sp., y *M. anisopliae* (cepa 1037), obtenido de *Solenopsis* sp., ambos almacenados en el Banco de Patógenos de este laboratorio.

Los tensoactivos evaluados fueron: Agrimul PM (sal de sodio condensado de ácido de naftaleno sulfónico), Dehydol PM (alquipoliglicol éter absorbido en sílica), Sulfofon NSS (naftaleno sulfonato de sodio condensado con formol), Surfax 345 (asociación de copolímeros oxialquilados y sulfosuccinatos absorbidos en inertes), Surfion D-Oxiteno (formulación balanceada de tensoactivos y hidrocarbonetos sintéticos), Surfion 950 (nomil fenol etoxilado), Texapon

ZALD (laurilulfato de sodio amónico), Vixil S (lignosulfato de sodio), Vixilex (lignosulfonato desazucarado), Surfion PW (nomil fenol etoxilado) y Sulpragil WP (desconocido).

Cada tratamiento constó de 3 cajas de Petri de 9,0 x 1,5 cm con 98 ml de medio de cultivo PDA (200 g de papa, 15 g de dextrosa, 20 g de agar y 0,5 g de antibiótico estreptomina en 1 L de agua destilada) y 2 g de tensoactivo. Los entomopatógenos fueron inoculados en tres puntos equidistantes de la caja de Petri utilizando un Cabo de Kolle. Posteriormente, las cajas fueron mantenidas en cámaras climatizadas (BOD), durante ocho días, a 26±1°C de temperatura, 75%±10% H.R. y 12 horas de fotofase.

Para la verificación de la compatibilidad de los agentes tensoactivos con los hongos se evaluaron cuatro colonias para cada agente tensoactivo, se midió el crecimiento radial, a través del diámetro de las colonias y el número de conidios producidos. Para el conteo de los conidios, las colonias fueron recortadas y colocadas en un tubo con 10 ml de agua destilada más adherente (Tween 20 al 0,1%). Posteriormente, se evaluó el número de conidios por colonia, para lo cual se usó una cámara de Neubauer en microscopio de fases.

Los valores referentes al crecimiento radial y al número de conidios fueron analizados mediante la prueba de homocedasticidad, utilizándose la prueba de Hartley (división de la varianza máxima entre la mínima, el valor obtenido se compara con el índice de Pearson y Hartley) y los datos fueron transformados por $\log x+3$. Se realizó un análisis de varianza mediante prueba F y las medias comparadas por la prueba de Tukey a 5% de probabilidad.

Para la clasificación de la toxicidad de los productos, los datos de crecimiento de colonias y número de conidios fueron utilizados para el cálculo de los valores de T, fórmula propuesta por Alves (1998)

$$T = \frac{20(CV) + 80(ESP)}{100}$$

T: valor corregido del crecimiento vegetativo y esporulación para clasificación del producto;

CV: porcentaje de crecimiento vegetativo con relación al testigo;

ESP: porcentaje de esporulación con relación al testigo;

Los productos fueron clasificados de acuerdo con los siguientes límites de valores T: 0-30= muy tóxico; 31-45= tóxico; 46-60= moderadamente tóxico; > 60= compatible.

Resultados y discusión

La reproducción de *B. bassiana* en cajas de Petri conteniendo el producto Sulfofon NSS fue 8,7 veces mayor con relación al testigo, siendo también estadísticamente diferente a los medios que contenían los productos Dehydol KS 60, Sulpragil WP, y Texapon Zacd que tuvieron un crecimiento nulo. El crecimiento radial del hongo fue mayor en los tratamientos con los productos Agrimul PW, Surfion PW y Vixil-S, con diámetro 1,5 veces superior con respecto al testigo. Vixilex y los mismos productos que inhibieron la producción de conidios del hongo también impidieron su crecimiento (Cuadro 1).

La producción de conidios de *M. anisopliae* en medios de cultivo conteniendo Agrimul PW, Surfion

PW, Surfion D-oxiteno, Sulfofon NSS y Vixilex fue 8,7; 8,3; 7,2; 4,8 y 4,0 veces mayor que la del testigo, respectivamente. En cuanto al crecimiento de las colonias de *M. anisopliae*, los productos que presentaron diferencias significativas fueron Surfion D-oxiteno, Surfion PW, Vixil-S, Vixilex y Agrimul PW, siendo 1,6; 1,4; 1,2; 1,2 y 1,1 veces mayores, respectivamente que el crecimiento del tratamiento sólo con el hongo. Los productos Dehydol KS 60, Sulpragil WP, Surfax 345, Surfion 950 y Texapon Zacd fueron estadísticamente diferentes al testigo, con valores menores en las dos variables evaluadas. El Sulfofon NSS presentó el menor diámetro de colonias (Cuadro 2).

Según los valores determinados de "T" (Alves *et al.* 1998), los productos Agrimul PW, Sulfofon NSS,

Cuadro 1. Diámetro de colonias y número medio de conidios de *B. bassiana* en medios conteniendo diferentes agentes tensoactivos. Brasil, 1999.

Tratamientos	Nº conidios (n. x 10 ⁶)	% Esporulación*	Diámetro (cm)	% Crecimiento**
Testigo	0,12 ± 0,01ab	100	1,31 ± 0,68b	100
Agrimul PW	0,32 ± 0,08ab	267	1,97 ± 0,22a	150
Dehydol KS 60	0,00 ± 0,00b	0	0,00 ± 0,00e	0
Sulfofon NSS	1,05 ± 1,12a	875	1,05 ± 0,06bcd	80
Sulpragil WP	0,00 ± 0,00b	0	0,00 ± 0,00e	0
Surfax 345	0,00 ± 0,00b	0	0,64 ± 0,24d	49
Surfion D-oxiteno	0,05 ± 0,03ab	42	1,20 ± 0,18bc	92
Surfion 950	0,23 ± 0,10ab	192	0,67 ± 0,10cd	51
Surfion PW	0,67 ± 0,27ab	558	2,02 ± 0,21a	154
Texapon Zacd	0,00 ± 0,00b	0	0,00 ± 0,00e	0
Vixil- S	0,15 ± 0,06ab	125	2,02 ± 0,05a	154
Vixilex	0,59 ± 0,42ab	492	0,00 ± 0,13e	0

* Porcentaje de esporulación con relación al testigo.

** Porcentaje de crecimiento con relación al testigo.

Medias seguidas de la misma letra no difieren entre sí al nivel de 5% de probabilidad.

Cuadro 2. Número de conidios, porcentaje de esporulación, diámetro de colonias de *M. anisopliae* en medios con diferentes agentes tensoactivos. Brasil, 1999.

Tratamientos	Nº conidios (n. x 10 ⁷)	% Esporulación*	Diámetro (cm)	% Crecimiento**
Testigo	1,20 ± 0,20d	100	1,60 ± 0,56bcd	100
Agrimul PW	10,40 ± 2,95a	867	1,77 ± 0,31bc	111
Dehydol KS	0,00 ± 0,00d	0	1,21 ± 0,33cde	76
Sulfofon NSS	5,77 ± 0,40bc	481	1,05 ± 0,06de	66
Sulpragil WP	0,00 ± 0,50d	0	0,00 ± 0,00f	0
Surfax 345	0,44 ± 0,00d	37	0,85 ± 0,13e	53
Surfion D-oxiteno	8,63 ± 1,74ab	719	2,60 ± 0,18a	163
Surfion 950	0,00 ± 0,00d	0	0,80 ± 0,08e	50
Surfion PW	9,97 ± 1,74a	831	2,28 ± 0,51ab	143
Texapon Zacd	0,00 ± 0,00d	0	0,00 ± 0,00f	0
Vixil- S	3,10 ± 0,61cd	258	1,94 ± 0,24ab	121
Vixilex	4,77 ± 1,08c	398	1,90 ± 0,22ab	119

* Porcentaje de esporulación con relación al testigo.

** Porcentaje de crecimiento con relación al testigo.

Medias seguidas de la misma letra no difieren entre sí al nivel de 5% de probabilidad.

Surfon 950, Surfon PW, Vixil-S y Vixilex fueron compatibles con los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Dehydol KS 60, Sulpragil WP, Surfax 345 y Texapon Zacd resultaron muy tóxicos para ambos entomopatógenos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación toxicológica de los agentes tensoactivos evaluados para la formulación de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Brasil, 1999.

Tratamientos	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>
Testigo	-	-
Agrimul PW	compatible	compatible
Dehydol KS 60	muy tóxico	muy tóxico
Sulfopon NSS	compatible	compatible
Sulpragil WP	muy tóxico	muy tóxico
Surfax 345	muy tóxico	muy tóxico
Sulfon D oxiteno	moder. tóxico	tóxico
Surfor 950	compatible	compatible
Surfon PW	compatible	compatible
Texapon Zacd	muy tóxico	muy tóxico
Vixil-S	compatible	compatible
Vixilex	compatible	compatible

Literatura citada

- Abreu, OC; Valarini, PJ; Cruz, RPB; Oliveira, DA; Gabriel, D. 1983. Viabilidade e patogenezidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em função do período e condições de armazenamento. Arquivos do Instituto Biológico (Brasil) 50 (1/4):57-63.
- Alves, SB; Silveira Neto, S; Pereira, RM; Macedo, N. 1987. Estudo de formulações do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. Ecosistema (Brasil) 12: 78-87.
- Alves, SB; Moino Júnior, A; Almeida, JEM, 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In Alves, SB. Ed. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Brasil, FEALQ, cap. 8.
- Arruda, AC, 1995. Distribuição volumétrica dos bicos de pulverizadores. Pesquisa Agropecuária Brasileira 20(11): 1239-1244.
- Azevedo, JL; Melo, IS. 1998. Controle microbiano de insetos - pragas e seu melhoramento genético. Controle Biológico (Brasil) 1:69-93.
- Batista Filho, A; Alves, SB; Alves, LFA; Pereira, RM; Augusto, NT. 1998. Formulação de entomopatógenos. In Alves, SB. Ed. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Brasil, FEALQ, cap. 3.
- Marques (1993) en un estudio similar sobre la compatibilidad de los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* con agentes mojantes y emulsionantes, comprobó que Surfax 250 y Surfax 586 inhibieron *M. anisopliae* con 24 h de incubación, cuando fueron utilizados en una concentración de 2%, mientras que el efecto negativo de Surfax 250 fue observado hasta las 48 horas de incubación. Drewfax 550 y Unitol L30 fueron perjudiciales en las dos concentraciones evaluadas, tanto para *M. anisopliae* como para *B. bassiana*.

Conclusiones

Los tensoactivos Agrimul PW, Sulfopon NSS, Surfon 950, Surfon PW, Vixil-S y Vixilex son compatibles con *B. bassiana* y *M. anisopliae* y pueden ser utilizados para formulaciones con estos entomopatógenos.

Los productos Dehydol KS 60, Sulpragil WP, Surfax 345 y Texapon Zacd son considerados muy tóxicos para los hongos evaluados.

Agradecimiento

Los autores agradecen a Enrique Castiglioni por la traducción del artículo al español.

- Clerk, TC; Madelin, MF. 1965. The longevity of three insect-parasiting hyphomycetes. Transactions British Mycological Society 48(2):193-209.
- Marques, EJ. 1993. Efeitos de formulações na preservação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sob diferentes condições de armazenamento. Tese de Doutorado Piracicaba, Brasil, ESALQ/USP. 146 p.
- Walstad, JD; Anderson, RF; Stambaugh, WJ. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungus (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate Pathology 16:221-226.
- Zhang, AW; Liu, WZ; Deng, CS; Nong, XR; WU, ZK; Gno, WL; Jiang, B; Wang, SF; Song, LW; Chen, F. 1990. Field control of Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* (Lep., Pyralidae) with different preparations form of *Beauveria bassiana*. Chinese Journal of Biological Control 6(3):118-20. Apd Review of Agricultural Entomology 79(4):416.
- Zhang, AW; Liu, WZ; Nong, XQ; Deng, CS; Guo, WLM; Jang, B. 1992. A trial production of wattle powder of *Beauveria bassiana*. Chinese Journal of Biological Control 8(3):118-120.