

COMPATIBILITA' DEL BATTERIO ANTAGONISTA *BACILLUS SUBTILIS* CEPPO BSF4 CON FUNGICIDI E INSETTICIDI

M. DEAN, P. GUERRINI, F. PACI
Agribiotec S.r.l. - Via per Concordia, 115 - 41032 Cavezzo (MO)
mariangela.dean@agribiotec.com

RIASSUNTO

La compatibilità del batterio antagonista *Bacillus subtilis* ceppo BSF4 nei confronti di diversi fungicidi e insetticidi è stata valutata nel corso di prove *in vitro* atte ad accertare mediante due diverse metodologie l'effetto dei formulati considerati sulla crescita batterica. *B. subtilis* è risultato totalmente compatibile con tutti gli insetticidi e, tra i fungicidi, con azoxystrobin, cyprodinil + fludioxonil, fenhexamid, fosetyl, penconazole, pyrimethanil, triadimenol e zolfo.

Parole chiave: *Bacillus subtilis*, insetticidi, fungicidi, compatibilità

SUMMARY

COMPATIBILITY OF THE ANTAGONISTIC BACTERIUM *BACILLUS SUBTILIS* BSF4 WITH FUNGICIDES AND INSECTICIDES

In vitro trials were carried out on the compatibility of the antagonistic bacterium, *Bacillus subtilis* BSF4 strain with some fungicides and insecticides. Their effects were evaluated on colony growth by means of two different methods. *B. subtilis* showed high compatibility with all the insecticides tested and with azoxystrobin, cyprodinil + fludioxonil, fenhexamid, fosetyl, penconazole, pyrimethanil, triadimenol and sulphur fungicides.

Keywords: *Bacillus subtilis*, insecticides, fungicides, compatibility

INTRODUZIONE

Bacillus subtilis (Erhenberg) Cohn è un microrganismo da tempo noto come valido antagonista di molti agenti causali di malattie di colture frutticole, orticole e floricole (Baker *et al.*, 1983; Pusey e Wilson, 1984; Pusey, 1989, Roberti e Selmi, 1999). In particolare, il ceppo BSF4 di *B. subtilis* è stato studiato e sperimentato in Italia soprattutto nel contenimento di colpo di fuoco batterico causato da *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow in esperienze di serra (Alexandrova *et al.*, 2000; 2002) e successivamente in campo con esiti molto interessanti (Bazzi e Paci, 2004; Maccagnani *et al.*, 2004).

L'impiego del formulato microbiologico contenente tale antagonista e la concreta possibilità di inserirlo in calendari e strategie di lotta integrata presuppone un'approfondita conoscenza degli effetti sul microrganismo dei prodotti di sintesi di possibile utilizzazione sulle colture alle quali sono destinati. I dati attualmente disponibili in letteratura sugli effetti *in vitro* di alcuni fungicidi sulla crescita di diversi ceppi di *B. subtilis* (Pusey *et al.*, 1986; Hwang e Chakravarty, 1992; Benuzzi *et al.*, 2004) evidenziano notevoli differenze di compatibilità con i vari principi attivi in relazione ai diversi ceppi batterici saggiati. Sulla base di tali esperienze e di altre effettuate con altri microrganismi antagonisti (Roberti *et al.*, 2002), sono state eseguite, nel corso di più anni, prove di valutazione *in vitro* della compatibilità di *B. subtilis* ceppo BSF4, contenuto nell'omonimo formulato commerciale, con diversi fungicidi e insetticidi con i quali l'antagonista può venire a contatto in programmi di lotta integrata su colture orticole, floricole e frutticole. Tali studi di compatibilità possono essere riferiti sia ad un impiego combinato di formulati microbiologici in miscela estemporanea con prodotti di sintesi, sia ad interventi ben distinti in programmi di lotta integrata.

MATERIALI E METODI

Le prove sono state effettuate *in vitro* valutando l'effetto su *B. subtilis* ceppo BSF4 di diversi fungicidi e insetticidi, comunemente impiegati su colture orticole, floricole e frutticole. Per saggiare la compatibilità del ceppo BSF4 di *B. subtilis* con i fungicidi e gli insetticidi elencati in tabella 1, sono state impiegate due diverse metodologie. In un caso si è operato in piastre Petri di 90 mm di diametro, su terreno PCA, Plate Count Agar (Oxoid) inoculato, dopo solidificazione, con 0,1 ml di coltura liquida del batterio con conta vitale 10^7 UFC/ml. Con tale coltura era stata allestita precedentemente una sospensione in glicerolo conservata a -50 °C ed utilizzata nel corso di tutte le prove effettuate. Ciascun fungicida e ciascun insetticida è stato sospeso in acqua sterile sino ad ottenere due concentrazioni di formulato commerciale, la più elevata delle quali corrispondeva alla dose di impiego in campo e l'altra ad un 1/10 della dose di campo. 40 μ l di ciascuna diluizione sono stati depositati su un dischetto di carta da filtro sterilizzato, di 15 mm di diametro, appoggiato sul PCA al centro della piastra. Sono state predisposte 4 piastre per ciascuna diluizione e per il testimone non trattato. Dopo 3 giorni di incubazione al buio a 35 °C, è stata verificata la presenza di un eventuale alone di inibizione della crescita attorno al dischetto sul quale era stata depositata la sospensione di agrofarmaco. La valutazione della compatibilità del batterio con i fungicidi e gli insetticidi è stata inoltre effettuata in capsule Petri, su terreno PCA cui il formulato era stato addizionato a due concentrazioni, come sopra descritto, prima di versarlo nelle piastre. In questo caso il batterio è stato inoculato al centro della piastra sotto forma di un cilindretto di agar di circa 10 mm di diametro prelevato da una coltura in crescita su PCA. Sono state allestite 4 piastre per ciascuna diluizione e per il testimone non trattato. Dopo un'incubazione di 3-5 giorni al buio a 35 °C si è proceduto a misurare il diametro delle colonie cresciute in ciascuna piastra. La percentuale di inibizione è stata determinata rapportando i diametri delle colonie cresciute sui testimoni non trattati, in assenza di inibizione, con quelli delle colonie presenti sui terreni addizionati con i vari formulati. Con i soli prodotti chimici che avevano mostrato un'attività inibente, è stato effettuato un secondo ciclo di prove al fine di mettere a punto una metodologia alternativa per la determinazione delle percentuali di inibizione della crescita. A 200 ml di Nutrient Broth (Oxoid) è stato aggiunto il prodotto chimico alla dose di campo. 1 ml di coltura liquida del batterio con conta vitale 10^7 UFC/ml è stata utilizzata come inoculo. Sono state predisposte quattro beute per ciascun formulato, utilizzato alle due dosi previste nel saggio su terreno agarizzato, e per il testimone non trattato. Le colture sono state incubate a 35 °C in agitazione (80 rpm) al buio. Alla fine del periodo necessario a raggiungere la fase stazionaria di crescita, individuato in saggi preliminari, il numero delle UFC/ml presenti in ciascuna coltura è stato determinato mediante diluizioni successive su PCA. Dopo un'incubazione di 24 ore al buio a 35°C si è proceduto a contare le colonie del batterio. Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate rapportando la media del numero di UFC/ml dei testimoni non trattati con la media del numero di UFC/ml delle colture trattate.

In rapporto alle percentuali di inibizione ottenute è stato dato il seguente giudizio arbitrario di compatibilità fungo-prodotto chimico: completa (+++), media (++), ridotta (+), nulla (-). La compatibilità completa corrisponde all'assenza di inibizione, quella media ad una inibizione compresa fra 1 e 40%, quella ridotta ad un'inibizione compresa fra 41 ed 80 % ed infine quella nulla ad un'inibizione superiore all' 80%.

Tabella 1 – Composizione e dosi dei fungicidi ed insetticidi utilizzati nei saggi di compatibilità

Sostanza attiva (concentrazione % nel formulato commerciale)	Formulati utilizzati	Dose di campo del formulato commerciale
Fungicidi		
Azoxystrobin (23,2)	Ortiva	2 ml/l
Captan (45)	Captane	2,5 g/l
Cymoxanil (45)	Cymoxan 45 WG	0,5 g/l
Cyprodinil + fludioxonil (37,5 + 25)	Switch	0,8 g/l
Chlorothalonil (40)	Daconil Liquido	3 ml/l
Dichlofluanid (50)	Euparen	2 g/l
Dithianon (66)	Delan	1,5 g/l
Dodine (35)	Dodene 35 L	2 ml/l
Fenhexamid (50)	Teldor	0,15%
Fosetyl-aluminium (80)	Aliette	2,5 g/l
Iprodione (50)	Rovral	1,5 g/l
Mancozeb (75)	Penncozeb DG	2 g/l
Penconazole (10,2)	Topas 10 EC	0,45 ml/l
Pirimethanil (37,4)	Scala	2 ml/l
Thiram (49)	Pomarsol 50	5 g/l
Tolilfluanid(50)	Euparen Multi	1,5 g/l
Triadimenol (22,9)	Bayfidan EC	0,2 ml/l
Zolfo (80)	Tiovit Jet	6 g/l
Insetticidi		
Acephate (42,5)	Orthene S	1,5 g/l
Buprofezin (25)	Applaud	1,5 l
Chlorpyrifos (22,33)	Pennphos 240	2,2 ml/l
Deltamethrin (1,63)	Decis Jet	1,2 ml/l
Flufenoxuron (4,7)	Cascade 50 DC	1,5 ml/l
Imidacloprid (17,8)	Confidor 200 SL	0,5 ml/l
Pirimicarb (17,5)	Emiscam MGD	2 g/l

RISULTATI

Compatibilità *in vitro* con fungicidi

Nei saggi riguardanti i fungicidi, la valutazione qualitativa dell'eventuale presenza di alone di inibizione ha messo in evidenza come *B. subtilis* ceppo BSF4 sia stato inibito in modo consistente da captan, dodine, mancozeb, thiram e iprodione applicati alla dose di normale utilizzo in campo. L'effetto negativo di tali fungicidi è stato confermato anche dal saggio effettuato su substrato agarizzato dove si è potuto inoltre calcolare l'inibizione percentuale, mentre la valutazione effettuata mediante saggi in coltura liquida, ha fornito valori percentuali superiori, ma non dissimili dai precedenti. L'azione inibente di dodine e iprodione è risultata drasticamente ridotta quando saggiate alle dosi ridotte ad 1/10 della dose di campo, mentre per captano, mancozeb e thiram è stata confermata la presenza di inibizione anche a tali dosaggi inferiori (tabella 2).

Tabella 2 – Compatibilità *in vitro* di *B. subtilis* BSF4 con fungicidi

Sostanza attiva (concentrazione % nel formulato commerciale)	Dose di formulato commerciale	Inibizione*		Grado di compatibilità	
		Saggio del dischetto di carta	Saggio del substrato avvelenato		Saggio in coltura liquida
Azoxystrobin (23,2)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Captan (45)	campo	si	94	98	-
	1/10	si	60	82	-
Cymoxanil (45)	campo	si	28	33	++
	1/10	no	0	nd	+++
Cyprodinil + fludioxonil (37,5 + 25)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Chlorothalonil (40)	campo	si	65	72	+
	1/10	no	0	nd	+++
Dichlofluanid (50)	campo	si	30	37	++
	1/10	no	0	nd	+++
Dithianon (66)	campo	si	20	27	++
	1/10	no	0	nd	+++
Dodine (35)	campo	si	78	85	-
	1/10	si	17	24	++
Fenhexamid (50)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Fosetyl-aluminium (80)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Iprodione (50)	campo	si	60	67	+
	1/10	no	0	nd	+++
Mancozeb (75)	campo	si	89	95	-
	1/10	si	66	70	+
Penconazole (10,2)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Pyrimethanil (37,4)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Thiram (49)	campo	si	95	98	-
	1/10	si	66	74	+
Tolyfluanid (50)	campo	si	25	32	++
	1/10	no	0	nd	+++
Triadimenol (22,9)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Zolfo (80)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++

*Valutazione qualitativa dell'eventuale presenza di alone di inibizione
nd = non determinata

Dai diversi test di compatibilità, sono risultati dotati di media-bassa capacità inibitoria nei confronti della crescita del ceppo BSF4 cymoxanil, chlorothalonil, dichlofluanid, dithianon e tolyfluanid.

Compatibilità *in vitro* con insetticidi

Relativamente agli effetti dei diversi insetticidi su *B. subtilis* ceppo BSF4 riportati in tabella 3, si è osservata, nel saggio del dischetto di carta, una totale assenza di inibizione con tutti i

prodotti saggiati. Il saggio a valutazione quantitativa, mediante substrato avvelenato, ha confermato nessuna inibizione nei confronti del batterio antagonista da parte di tutti i prodotti insetticidi testati.

Tabella 3 – Compatibilità *in vitro* di *B. subtilis* BSF4 con insetticidi

Sostanza attiva (concentrazione % nel formulato commerciale)	Dose di formulato commerciale	Inibizione*	Inibizione (%)		Grado di compatibilità
		Saggio del dischetto di carta	Saggio del substrato avvelenato	Saggio in coltura liquida	
Acephate (42,5)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Buprofezin (25)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Chlorpyrifos (22,33)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Delthametrin (1,63)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Flufenoxuron (4,7)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Imidacloprid (17,8)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++
Pirimicarb (17,5)	campo	no	0	nd	+++
	1/10	no	0	nd	+++

*Valutazione qualitativa dell'eventuale presenza di alone di inibizione.

nd = non determinata

CONCLUSIONI

In generale, il ceppo BSF4 di *B. subtilis* ha mostrato una differente sensibilità ai diversi agrofarmaci presi in esame. Nel dettaglio, il batterio antagonista è risultato completamente compatibile con tutti gli insetticidi saggiati e, tra i fungicidi, con azoxystrobin, cyprodinil + fludioxinil, fenhexamid, fosetyl, penconazole, pyrimethanil, triadimenol e zolfo. Tutti gli altri fungicidi hanno manifestato un'elevata capacità inibitoria nei confronti di *B. subtilis* e quindi scarsa o nulla compatibilità, ad eccezione di cymoxanil, chlorothalonil, dichlofluanid, dithianon e tolyfluanid, risultati invece mediamente compatibili con l'antagonista.

E' da rilevare che le percentuali di inibizione della crescita, calcolate sulla base dei risultati forniti dai saggi effettuati su terreno agarizzati e substrato liquido, sono in sostanziale accordo benché i valori del parametro tendano ad essere più elevati se si utilizza la seconda metodologia. Si può ipotizzare che questa leggera differenza dipenda dalle condizioni più drastiche che si creano in coltura liquida addizionata di prodotto chimico.

Dai risultati ottenuti nel presente studio emergono alcune utili indicazioni: in particolare, nei numerosi casi di completa compatibilità, si può procedere ad un impiego combinato del formulato microbiologico con i diversi fungicidi ed insetticidi, mentre tale applicazione dovrebbe essere evitata con quei prodotti di sintesi risultati non compatibili. L'impiego di *B. subtilis* ceppo BSF4 potrà comunque avere luogo in strategie di lotta integrata che prevedano l'utilizzo di formulati chimici con parziale o nulla compatibilità, purché venga osservato un calendario d'intervento e un intervallo di tempo sufficiente a permettere la riduzione della concentrazione della sostanza attiva in gardo di inibire la crescita del microrganismo.

LAVORI CITATI

- Alexandrova M., Poppi S., Bazzi C., 2000. Lotta biologica al colpo di fuoco batterico con il ceppo antagonista BS-F3 di *Bacillus subtilis*. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 371-378.
- Alexandrova M., Sponza G., Galasso O., Bazzi C., 2002. Studi sulla lotta biologica al colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*). *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 557-562.
- Baker C. J., Stavely J. R., Thomas C. A., Sasser M., Macfall J. S., 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, St. Paul, 73, 1148-1152
- Bazzi C., Paci F., 2004. Profilassi del colpo di fuoco batterico mediante uso di *Bacillus subtilis*. *L'Informatore Agrario*, 18, 99-101.
- Benuzzi I. M., Albonetti E., Fiorentini F., 2004. Serenade, nuovo fungicida a base di *Bacillus subtilis* per la difesa contro *Botrytis cinerea* e marciume acido su vite: risultati di alcune sperimentazioni. *2° Convegno sulla difesa delle colture in agricoltura biologica*, 27.
- Hwang SF., Chakravarty P., 1992. Potential for the integrated control of *Rhizoctonia* root-rot of *Pisum sativum* using *Bacillus subtilis* and a fungicide. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 99 (6), 626-636.
- Maccagnani B., Bazzi C., Alexandrova M., Biondi E., Betti F., Tesoriero D., Maini S., 2004. Use of *Osmia cornuta* (Latreille) as a carrier of antagonist bacteria in biological control of Fire Blight. *10° International Workshop on Fire Blight, Bologna*. 56-57.
- Pusey P.L., 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pesticide Science, London*, 27, 133-140
- Pusey P.L., Wilson C.L., 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease, St. Paul*, 68, 753-756
- Pusey P. L., Wilson C. L., Hotchkiss M. W., Franklin J. D., 1986. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran and cold-storage condition. *Plant Disease*, 70, 587-590.
- Roberti R., Selmi C., 1999. *Bacillus subtilis* nella lotta contro i patogeni delle piante. *Informatore Fitopatologico*, 7(8), 15-21
- Roberti R., Flori P., Brunelli A., Bini F., 2002. Compatibilità dei funghi antagonisti *Ampelomyces quisqualis* e *Beauveria bassiana* con fungicidi. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 541-546