

FLOCTER® (*BACILLUS FIRMUS* I-1582): NUOVO NEMATOCIDA BIOLOGICO PER IL CONTROLLO DELLE PRINCIPALI SPECIE DI NEMATODI PARASSITI DANNOSI ALLE COLTURE ORTICOLE

S. ROFFENI TIRAFERRI, G. ARCANGELI, A. BOEBEL, M. GOLLO,
A. GUALCO, S. RAMELLA, A. CANTONI
Bayer CropScience S.r.l., v.le Certosa 130, 20156 Milano
stefano.roffeni@bayer.com

RIASSUNTO

Flocter® è un nematocida biologico, formulato come polvere bagnabile contenente il 5% di *Bacillus firmus* I-1582, batterio naturalmente presente nel terreno. Il ceppo *B. firmus* I-1582 è risultato dotato di buona efficacia contro le principali specie di Nematodi fitoparassiti, in particolare appartenenti al genere *Meloidogyne*. Vengono qui riportate le caratteristiche fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche di *B. firmus* ed i risultati di prove effettuate in Italia sulle principali colture orticole per il controllo dei Nematodi galligeni (*Meloidogyne* spp.) e cisticoli (*Heterodera* spp.).

Parole chiave: BFI, *Bacillus firmus* I-1582, nematodi, *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp.

SUMMARY

FLOCTER® (*BACILLUS FIRMUS* I-1582): A NOVEL BIOLOGICAL NEMATICIDE TO CONTROL THE MAIN PLANT PARASITIC NEMATODE SPECIES AFFECTING VEGETABLE CROPS

Flocter® is a biological nematicide. It is a wettable powder formulation which contains 5% of *Bacillus firmus* I-1582, a naturally occurring in soil bacterium. It is endowed with a good efficacy against the main plant parasitic Nematode species, belonging in particular to genus *Meloidogyne*. In this paper are presented the physical-chemical, toxicological and ecotoxicological properties of *B. firmus*, and the results of trials conducted in Italy on main vegetable crops to control root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and cyst nematodes (*Heterodera* spp.).

Keywords: BFI, *Bacillus firmus* I-1582, nematodes, *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp.

INTRODUZIONE

Bacillus firmus è un batterio estremamente ubiquitario che normalmente si ritrova nel terreno, nell'aria, nell'acqua di mare e persino nei pozzi di petrolio. Alcuni ceppi di *B. firmus* si sono rivelati in grado di degradare gli idrocarburi aromatici, altri sono risultati dotati di attività chitinolitica. Diversi ricercatori in passato hanno documentato la possibilità di controllo microbiologico dei Nematodi fitoparassiti (Dong *et al.*, 2006).

B. firmus I-1582, un ceppo inizialmente isolato in un terreno coltivato in Israele, in alcuni studi preliminari manifestava un'attività nematocida superiore rispetto ad altri formulati commerciali (Keren-Zur, *et al.*, 2000). Flocter® è un formulato PB al 5% di *B. firmus* I-1582 che è risultato efficace contro le principali specie di Nematodi fitoparassiti (*Ditylenchus*, *Heterodera*, *Pratylenchus*, *Rhadinopholus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*), in particolare i Nematodi galligeni appartenenti al genere *Meloidogyne*. Scopo di questo articolo è presentarne le caratteristiche chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche, oltre a diversi risultati sperimentali ottenuti negli ambienti italiani contro alcuni dei più importanti Nematodi fitoparassiti dannosi alle colture orticole.

Formulazione

E' stata sviluppata una formulazione contenente 50 g/kg di *Bacillus firmus* I-1582 (Flocter®).

Proprietà chimiche e chimico-fisiche della sostanza attiva

Nome comune (ISO)	<i>Bacillus firmus</i> I-1582
Fase di sviluppo:	spore
Contenuto:	min. $1,0 \times 10^{11}$ cfu/g; max. $2,5 \times 10^{11}$ cfu/g
Stato fisico: solido (polvere)	marrone chiaro
pH:	7,0-8,0 a 1%
Infiammabilità:	non infiammabile
Temperatura di autoaccensione:	non infiammabile spontaneamente
Proprietà comburenti:	nessuna
Esplosività:	non esplosivo (92/69/CEE, A.14 / OCSE 113)

Caratteristiche tossicologiche (sostanza attiva)

Tossicità acuta

Orale (DL ₅₀) ratto:	> 2000 mg/kg peso corporeo
Dermale (DL ₅₀) ratto:	> 2000 mg/kg peso corporeo
Irritazione cutanea coniglio:	leggero effetto irritante
Irritazione oculare coniglio:	modesta irritazione agli occhi
Sensibilizzazione cutanea cavia:	potenzialmente sensibilizzante

Caratteristiche ecotossicologiche e comportamento nell'ambiente della sostanza attiva

Caratteristiche eco tossicologiche

Trota arcobaleno – <i>Oncorhynchus mykiss</i> (CL ₅₀ , 96 h)	>100 mg/l
Dafnia – <i>Daphnia magna</i> (EC ₅₀ , 48 h)	>100 mg/l

Comportamento nell'ambiente

B. firmus è un batterio Gram-positivo aerobico, appartenente alla famiglia delle *Bacillaceae*, normalmente presente nel terreno, nella rizosfera e nell'ambiente acquatico (Vardavakis, 1989). *B. firmus* I-1582 non presenta alcun rischio per l'ambiente negli usi previsti in agricoltura nelle condizioni di Buona Pratica Agricola, e deve essere considerato privo di effetti avversi a carico degli organismi normalmente presenti negli ecosistemi agricoli, quali uccelli, mammiferi, lombrichi e altri organismi non bersaglio nonché artropodi utili e microrganismi non bersaglio presenti nel suolo.

Attività biologica e meccanismo di azione

Flocter contiene 50 g/kg di *B. firmus* I-1582 sotto forma di spore, che nel terreno in condizioni favorevoli di umidità e temperatura germinano, dando il via allo sviluppo del microorganismo, in presenza di nutrienti. *B. firmus* I-1582, in prove preliminari su pomodoro ha dimostrato un'ottima attività nei confronti dei Nematodi galligeni appartenenti al gen. *Meloidogyne*, e ha inoltre favorito lo sviluppo delle piante, consentendo un miglioramento produttivo (Keren-Zur *et al.*, 2000).

Il meccanismo d'azione di *B. firmus* I-1582 è duplice, sia diretto sulle uova dei Nematodi, essendo dotato di attività ovicida ad opera di enzimi idrolitici che agiscono sull'ovisacco

(Davis, 2006), sia indiretto mediante colonizzazione dell'apice radicale (caliptra) e degradazione degli essudati radicali, che in condizioni normali fungono da attrattivi per i Nematodi, favorendone la penetrazione radicale. Inoltre *B. firmus* I-1582 è in grado di produrre acido indol acetico (IAA), fitormone auxinico che, se presente durante l'accrescimento radicale, ne promuove la crescita e favorisce lo sviluppo della la pianta (Ghosh *et al.*, 2003).

Spettro d'azione

B. firmus I-1582 controlla efficacemente le seguenti specie di Nematodi sulle seguenti colture in serra o a pieno campo:

Coltura in serra o in campo	Parassita
Cetriolo, zucchini, melone, cocomero, pomodoro, peperone, melanzana, lattuga	<i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. hapla</i>
Coltura in campo	Parassita
carota, tabacco	<i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. hapla</i> , <i>Heterodera carotae</i> , <i>Pratylenchus</i> spp., <i>Trichodorus</i> spp., <i>Tylenchorynchus</i> spp.

MATERIALI E METODI

A partire dal 2007 sono state realizzate in Italia e in Europa numerose prove sperimentali con Flocter formulato PB contenente 50 g/kg di spore di *B. firmus* I-1582 contro i Nematodi delle colture orticole (serra e pieno campo), della carota e del tabacco. Le prove sono state impostate secondo uno schema a blocco randomizzato, con 4 ripetizioni, nel rispetto della G.E.P. (Good Efficacy Practice). Per la verifica dell'efficacia sono state seguite le indicazioni riportate sia nelle Linee guida EPPG generali [(PP 135(3), 152(3), 181(3), 214(1)] che specifiche, ove disponibili, [EPPG n. PP 1/48(2)]. Flocter è stato applicato al terreno in localizzazione mediante manichetta di irrigazione oppure, nel caso della carota e del tabacco, tramite barra per trattamenti sull'intera superficie di prova. Flocter è stato distribuito in unica applicazione 5-7 giorni prima del-trapianto (pre-semina su carota) alla dose di 60-80 kg/ha (3000-4000 g m.a./ha) oppure a 40+40 kg/ha (2000+2000 g m.a./ha) in 2 applicazioni, di cui la prima in pre-trapianto (pre-semina su carota) e la seconda dopo circa 1 settimana dal trapianto. Dopo l'applicazione su terreno nudo (pre-semina, pre-trapianto) il terreno è stato sottoposto ad irrigazione al fine di mantenere un buon livello di umidità per favorire la germinazione delle spore di *B. firmus*.

Al fine della valutazione dell'efficacia si è utilizzata la scala 0-10 di valutazione del danno radicale (Zeck, 1971) su tutte le colture, con esclusione della carota dove è stata utilizzata la scala 1-4, più adatta su questa coltura, ed alla raccolta è stata calcolata la percentuale di fittoni non commerciabili, derivanti dalla somma delle carote appartenenti alle classi 3 e 4. Tutti i risultati sono stati sottoposti ad elaborazione statistica mediante analisi della varianza e Test di Student-Neuman-Keuls.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Vengono di seguito riportati alcuni dei risultati ottenuti nelle prove sperimentali effettuate.

Tabella 1. Efficacia di *B. firmus* I-1582 su cetriolo in serra contro *Meloidogyne incognita*. Applicazione in pre-trapianto tramite manichetta d'irrigazione (2 prove 2008-2009). (Indice di attacco % secondo Townsend-Heuberger, Efficacia % secondo Abbott)

Prodotto / Momento di applicazione		g s.a./ha	Zapponeta (FG) - 2008		Bisceglie (BA) – 2009 -	
			Efficacia %		Efficacia %	Produzione q/ha
Flocter 5% PB	A	3000	81,0 b*	68,0 b	-	-
Flocter 5% PB	A	4000	90,5 b	71,0 b	97,5 b	501,8 b
Fenamiphos 240 CS	B	10080	66,7 b	51,0 b	96,6 b	425,0 b
Testimone (Indice di attacco %)			(10,5) a	(17,0) a	(61,1) a	238,5 a
Giorni dall'applicazione A			14	21	58	
Giorni dall'applicazione B			7	14	48	

A = 7 gg prima del trapianto; B = al trapianto

* In tutte le tabelle i valori della stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non differiscono significativamente al test di Student-Neuman-Keuls (p= 0,05)

B. firmus I-1582 già alla dose di 3000 g s.a./ha in unica applicazione in pre-trapianto ha mostrato un'ottima efficacia contro i Nematodi galligeni su cetriolo, risultando nel complesso superiore allo standard in prova. In una delle due prove riportate ha inoltre consentito un evidente incremento produttivo sia rispetto al testimone non trattato che allo standard di confronto.

Tabella 2. Efficacia di *B. firmus* I-1582 su cocomero e zucchino in serra contro *M. incognita*. Applicazione in pre-trapianto e pre/post-trapianto tramite manichetta (2 prove 2009-2010). (Indice di attacco % secondo Townsend-Heuberger, Efficacia % secondo Abbott)

Prodotto / Momento di applicazione		g s.a./ha	Cocomero		Zucchino	
			Zapponeta (FG) - 2009		Terlizzi (BA) –2010	
			Efficacia %		Efficacia %	
Flocter 5% PB	B	4000	96,5 b	52,4 b	69,0 ab	
Flocter 5% PB	BC	2000	-	68,5 b	81,0 b	
Fenamiphos 240 CS	C	10080	96,8 b	-	-	
Oxamyl 10 L	CDE	1000	-	55,6 b	44,0 a	
<i>Paecilomyces lilacinus</i> 1,25% WG	AB	4000	-	56,5 b	41,0 a	
Testimone (Indice di attacco %)			(59,7) a	(3,1) a	(4,4) a	
Giorni dall'applicazione A			54	47	63	
Giorni dall'applicazione B			42	-	-	
Giorni dall'applicazione E			-	6	22	

A = 14 gg prima del trapianto; B = 7 gg prima del trapianto; C = 7 gg dopo il trapianto; D = 14 gg dopo il trapianto; E = 28 gg dopo il trapianto

B. firmus I-1582 al dosaggio di 4000 g s.a./ha in unica applicazione in pre-trapianto ha manifestato una buona efficacia contro *M. incognita* sia su cocomero che su zucchino, equivalente allo standard di confronto. Nella prova su zucchino *B. firmus* I-1582 alla dose di 2000+2000 g s.a./ha (pre-/post-trapianto) ha consentito un evidente incremento della durata della protezione, che è risultata superiore agli standard di confronto.

Tabella 3. Efficacia di *B. firmus* I-1582 su melanzana e peperone in serra contro *M. incognita*. Applicazione in pre-trapianto tramite manichetta d'irrigazione (2 prove 2009). (Indice di attacco % secondo Townsend-Heuberger, Efficacia % secondo Abbott)

Prodotto / Momento di applicazione		g s.a./ha	Peperone		Melanzana	
			Molfetta (BA)		Policoro (MT)	
			Efficacia %	Produzione q/ha	Efficacia %	Produzione q/ha
Flocter 5% PB	A	4000	95,5 b	80,6 b	96,0 a	214,7 b
Fenamiphos 240 CS	B	10080	95,0 b	87,3 b	96,6 b	199,3-b
Testimone (Indice di attacco %)			(95,2) a	40,0 a	(83,5) a	97,1 a
Giorni dall'applicazione A			46		59	73
Giorni dall'applicazione B			35		45	59

A = 5-7 gg prima del trapianto; B = 7 gg dopo il trapianto

B. firmus I-1582 al dosaggio di 4000 g s.a./ha in unica applicazione in pre-trapianto ha manifestato una buona efficacia contro *M. incognita* sia su peperone che su melanzana, dello stesso livello dello standard di confronto. In entrambe le prove *B. firmus* -1582 ha consentito un notevole incremento produttivo, pari allo standard di confronto.

Tabella 4 - Efficacia di *B. firmus* I-1582 su pomodoro in serra contro *M. incognita*. Applicazione in pre-trapianto tramite manichetta d'irrigazione (2 prove 2008-2009). (Indice di attacco % secondo Townsend-Heuberger, Efficacia % secondo Abbott)

Prodotto / Momento di applicazione		g s.a./ha	Bisceglie (BA) - 2008		Bellaria (RN) - 2009 -
			Efficacia %	Produzione q/ha	Efficacia %
Flocter 5% PB	A	3000	56,7 b	933 b	-
Flocter 5% PB	A	4000	74,3 b	1221 b	71,9 b
Fenamiphos 240 CS	B	10080	50,6 b	810 b	69,9 b
Testimone (Indice di attacco %)			(8,2) a	612 a	(2,8) a
Giorni dall'applicazione A			78	99	77
Giorni dall'applicazione B			66	87	66

A = 5-7 gg prima del trapianto; B = 7 gg dopo il trapianto

B. firmus I-1582 a partire dalla dose di 3000 g s.a./ha in unica applicazione in pre-trapianto ha manifestato una buona efficacia contro *M. incognita* su pomodoro, statisticamente non superiore allo standard di confronto. Nella prova del 2008 *B. firmus* I-1582 a 3000-4000 g s.a./ha ha inoltre evidenziato un notevole incremento produttivo, che è risultato superiore allo standard di confronto.

Tabella 5 - Efficacia di *B. firmus* I-1582 su carota contro *Meloidogyne hapla* e *M. incognita*. Applicazione in pre-semina o 2 applicazioni in pre-semina/pre-emergenza con barra per trattamenti (2 prove 2009).

(% di carote non commerciabili, Efficacia % secondo Abbott)

Prodotto / Momento di applicazione		g s.a./ha	<i>M. hapla</i>		<i>M. incognita</i>	
			Fiumicino (RM)		Zapponeta (FG)	
			Efficacia % (Abbott)			
Flocter 5% PB	A	4000	69,0 b	52,9 b	81,6 c	53,6 b
Flocter 5% PB	AB	2000	62,1 b	79,4 b	87,6 c	82,1 b
Oxamyl 5 G	A	2500	55,2 b	50,0 b	-	-
Fenamiphos 240 CS	B	10080	-	-	38,9 b	47,1-b
Testimone (% carote non commerciabili)			(7,3) a	(8,5) a	(7,4) a	(18,8) a
Giorni dall'applicazione A			89	149	42	83
Giorni dall'applicazione B			81	141	32	71

A = 5-7 gg prima della semina; B = dopo la semina, in pre-emergenza della coltura

Bacillus firmus I-1582 al dosaggio di 4000 g s.a./ha in unica applicazione in pre-semina della carota, o in distribuzione frazionata, ha manifestato un'efficacia pari o superiore agli standard commerciali contro *M. incognita* e *M. hapla*.

Tabella 6 - Efficacia di *B. firmus* I-1582 su carota contro *Heterodera carotae* e *M. incognita*. Applicazione in pre-semina, alla semina, o 2 applicazioni in pre-semina/pre-emergenza con barra per trattamenti (2 prove 2010)

(% di carote non commerciabili, Efficacia % secondo Abbott)

Prodotto / Momento di applicazione		g s.a./ha	<i>H. carotae</i>		<i>M. incognita</i>	
			Fiumicino (RM)		Bosco Mesola (FE)	
			Efficacia %		Efficacia %	Produzione q/ha
Flocter 5% PB	B	4000	63,7 b	78,4 b	72,9 a	411 a
Flocter 5% PB	C	4000	46,1 b	55,4 b	80,2 a	479 a
Flocter 5% PB	BD	2000	61,8 b	69,1 b	77,8 a	388 a
Oxamyl 5 G	B	2500	40,2 ab	71,2 b	86,7 b	465 a
<i>Paecilomyces lilacinus</i> 1,25% WG	AD	4000	52,9 b	70,5 b	73,4 a	347 a
Testimone (% carote non commerciabili)			(25,5) a	(34,8) a	(60,5) a	264 a
Giorni dall'applicazione A			105	139	133	73
Giorni dall'applicazione B			-	-	-	59
Giorni dall'applicazione D			84	118	117	-

A = 12-14 gg prima della semina; B = 3-7 gg prima della semina; C = alla semina; D = 4-6 gg dopo la semina

B. firmus I-1582, comunque applicato, ha manifestato nel complesso una buona performance sia nei confronti di *M. incognita* che di *H. carotae* con risultati globalmente equivalenti allo standard chimico e al bioformulato *Paecilomyces lilacinus*.

Fitocompatibilità

La fitocompatibilità di Flocter 5% PB, formulazione a base di *Bacillus firmus* I-1582 utilizzata in queste prove, applicata secondo le modalità descritte, è risultata buona su tutte le colture saggiate.

CONCLUSIONI

B. firmus I-1582 (Flocter 5% PB) possiede un'ottima efficacia contro le specie chiave di Nematodi dannosi alle colture orticole, alla carota e al tabacco. *B. firmus* I-1582, il microrganismo di cui è composto Flocter 5% PB controlla efficacemente *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica* e *H. carotae*. Essendo dotato di un meccanismo di azione completamente diverso da quelli dei nematocidi tradizionali attualmente utilizzati in Italia, non presenta alcuna resistenza incrociata verso le specie testate. Questa caratteristica, unitamente alla flessibilità d'impiego, alla buona persistenza d'azione e alla selettività verso gli artropodi utili, in considerazione della contemporanea riduzione del numero di meccanismi di azione disponibili, in quanto buona parte dei nematocidi, utilizzati con successo in passato, in seguito al processo di revisione Europea sono usciti dal mercato, rendono Flocter un formulato particolarmente interessante sia per l'impiego in strategie di difesa integrata, che per l'impiego in agricoltura biologica sulle più importanti colture orticole dell'area mediterranea.

LAVORI CITATI

- Davis, K. 2006. Product Identity of Chancellor. Project Number: PCD/885/1100. Unpublished study prepared by Regwest. Biopesticides registration action document *Bacillus firmus* I-1582 (PC Code 029072) 119
- Dong, L.Q., Zhang K.Q., 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant and Soil*, 288, 1-2, 31-45.
- Ghosh, S., Penterman, J.N., Little, R.D., Chavez, R., Click, B.R. 2003. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol. Bioch.* 41, 277-281.
- Keren-Zur, M. Anonov, J. Bercovitz, A. Feldmean, K. Husid, A. Kenan, G Markov, N Rebhun M., 2000. *Bacillus firmus* formulations for the safe control of root-knot nematodes, *BCPC Conference – Pests & Diseases* 47-52.
- Vardavakis, E., 1989. Seasonal variation in heterotrophic soil bacteria and some soil enzyme activities in a typical Calcixeroll soil in Greece. *Rev Ecol Biol, Sol*, 26: 233-247.
- Zeck, W. M., 1971. Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 24/1971, 1, 144-147.