

## **AValiação DE RISCO DO BIOPESTICIDA *Bacillus thuringiensis* (CEPA 344) EM ORGANISMOS BIOINDICADORES PRESENTES EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO AQUÍCOLA**

Claudio Martín Jonsson<sup>1</sup>, Aline de Holanda Nunes Maia<sup>2</sup>, Deise Maria Fontana Capalbo<sup>3</sup>, Onelio Carballo Hondal<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, C.P.69, CEP 13820-000, e-mail: jonsson@cnpma.embrapa.br

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, C.P.69, CEP 13820-000, e-mail: ahmaia@cnpma.embrapa.br

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, C.P.69, CEP 13820-000, e-mail: deise@cnpma.embrapa.br

<sup>4</sup> Pesquisador do Centro Nacional de Toxicologia, La Habana, Cuba, C.P. 19219

**Resumo:** A piscicultura e outras atividades aquícolas vêm ganhando importância por contribuir para a produção de alimentos diferenciados e como uma nova alternativa de renda nas propriedades rurais. O uso de agroquímicos nas regiões de entorno dos sistemas de produção aquícola constitui uma ameaça para os organismos presentes nos mesmos e para a saúde do consumidor. Assim, tem-se incentivado o uso de produtos de menor risco a base de agentes biológicos de controle utilizados como biopesticidas. Apesar da conhecida inocuidade do uso de biopesticidas usados no combate a pragas, alguns relatos tem ocorrido sobre infecções e efeitos adversos em organismos não-alvo, entre estes, espécies aquáticas. No presente trabalho foi avaliado o efeito decorrente da exposição à cepa 344 de *Bacillus thuringiensis* (*Bt344*), em organismos de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar do compartimento aquático. Os organismos-teste foram expostos a concentrações correspondentes a mais de 1.000 vezes a dose de aplicação. O *Bt344* não alterou os padrões de crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Uma mortalidade significativa (8,9%), porém inferior ao limite aceitável para o controle (10%), foi constatada para o peixe *Hyphessobrycon scholzei*. Entretanto, a exposição ao agente biológico reduziu a sobrevivência de *Daphnia similis* em 44,8% em relação ao controle, o que sugere um risco para espécies de invertebrados aquáticos.

**Palavras-chave:** agente biológico de controle, alga, *Daphnia*, peixe, piscicultura, toxicidade

### **Risk evaluation of the biopesticide *Bacillus thuringiensis* (strain 344) in bioindicators present in aquaculture production systems**

**Abstract:** Fish farming and other aquaculture activities are new alternatives of economic gains in rural properties. The use of agrochemicals in the surrounding areas of the aquaculture production systems is a threat for organisms inhabiting these systems and for the human health. This fact encouraged the use of biopesticides based on biological control agents. Biopesticides are usually known as innocuous to non-target organisms, although some adverse effects have been described. In this work it was evaluated the effect on aquatic organisms of different trophic levels due to the exposure to the strain 344 of *Bacillus thuringiensis* (*Bt344*). The test-organisms were exposed to concentrations corresponding to more than 1,000 fold the application rate of biopesticide. *Bt344* did not alter the growth patterns of the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. It was observed a significant mortality (8.9%) for the fish *Hyphessobrycon scholzei*, but it is lower than the allowed limit of mortality for the control (10%). Nevertheless, biopesticide exposure reduced the survival of *Daphnia similis* (44.8% less than the control survival), which suggests a risk for aquatic invertebrate species.

**Keywords:** algae, aquaculture, biological control agent, *Daphnia*, fish, toxicity

### **Introdução**

Na última década, a produção agropecuária foi desafiada a buscar novas alternativas para viabilizar econômica e socialmente as propriedades rurais. Dentre as alternativas, a piscicultura vem ganhando importância por contribuir para a produção de alimentos diferenciados e como uma nova alternativa de renda (Lorenzini et al., 2005). Entretanto o uso abusivo e inadequado de agroquímicos nas regiões de entorno dos sistemas de produção aquícola constitui uma ameaça para os organismos da cadeia alimentar pertencentes a esses sistemas, para a qualidade do produto e para a saúde do consumidor.

Os sérios riscos ocasionados pela presença de resíduos de agroquímicos em alimentos e nos diversos compartimentos ambientais tem incentivado o uso de produtos de menor risco a base de agentes biológicos de controle utilizados como biopesticidas.

Apesar da conhecida inocuidade do uso de biopesticidas no combate aos problemas ocasionados por pragas, verifica-se hoje uma tendência em se analisar com bastante rigor a segurança da utilização desses agentes biológicos. Isto devido à sua capacidade de disseminação, sobrevivência e multiplicação em outros ambientes onde há risco de infecção de organismos não-alvo.

No presente trabalho foi avaliado o efeito decorrente da exposição ao biopesticida de *Bacillus thuringiensis* – cepa 344 (Bt344) em organismos de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar presentes em sistemas de produção aquícola.

### Material e Métodos

Agente biológico: *B. thuringiensis* - Cepa 344 (Bt344) foi cultivado em meio caldo nutriente Merck® (peptona de carne / extrato de carne, 8 g/L) com adição de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g/L). Esta cepa, possui alta eficiência no controle da lagarta do cartucho de milho, *Spodoptera frugiperda*. A suspensão com concentração conhecida para execução dos ensaios de avaliação de efeito nos organismos-teste, constou de recipientes contendo Bt344 AA (Agente Ativo = biomassa de células viáveis de Bt344) e AI (Agente Inativado = AA submetido a duas autoclavagens a 121°C por 20 min).

Avaliação de risco de dose máxima da exposição em organismos fitoplanctônicos: No experimento com a alga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*, a água de diluição foi preparada conforme procedimento da OECD (1981). Foram avaliados os seguintes tratamentos, em réplicas de cinco unidades experimentais por tratamento: a) sem Bt344 (controle), b) com Bt344 AI (10<sup>6</sup> u.i. mL<sup>-1</sup> autoclavadas), e c) com Bt344 AA (10<sup>6</sup> u.i. mL<sup>-1</sup>). A concentração inicial algácea das suspensões-teste foi da ordem de 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>. As suspensões foram expostas durante 7 dias à temperatura de 20±2°C e luminosidade de ~2000 lux. A taxa de crescimento (TX) foi calculada.

Avaliação de risco de dose máxima da exposição em organismos zooplanctônicos: No experimento com o invertebrado aquático *Daphnia similis*, os tratamentos avaliados em réplicas de seis unidades experimentais foram os seguintes: sem Bt344 (controle), com Bt344 AI (10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> u.i. mL<sup>-1</sup> autoclavada), e com Bt344 AA (10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> u.i. mL<sup>-1</sup>). O período de exposição dos organismos foi de 21 dias..

Para cada tratamento, foram estimados os seguintes parâmetros em cada data de avaliação:

- Número médio de neonatos produzidos por adulto por dia (NMADIA);
- Taxa líquida de reprodução (Ro): número médio de neonatos produzidos por adulto, por dia, que chegam à idade adulta;
- Sobrevivência de adultos ao longo do período de avaliação.

Avaliação de risco de dose máxima da exposição em vertebrados: Foram utilizados peixes da espécie a *Hyphessobrycon scholzei* (Characidae). O ensaio foi realizado em aquários de vidro em volume total de 15 L utilizando água com as seguintes características físico-químicas: pH 7,2 , dureza total 36 mg/L CaCO<sub>3</sub>, condutividade 243 µS/cm<sup>-1</sup>. A água foi dechlorinizada através da adição de “Aguasafe, Tetra Importadora Ltda.” Os tratamentos foram os seguintes: sem Bt344 (controle), com Bt344 AI (10<sup>6</sup> u.i. mL<sup>-1</sup> autoclavada), e com Bt344 AA (10<sup>6</sup> u.i. mL<sup>-1</sup>). Os aquários foram aerados através de pedra porosa e minicompressor. Cada tratamento foi realizado em triplicata sendo que cada aquário continha 15 peixes pesando em média 0,84g. Os peixes foram expostos a uma intensidade luminosa de ~1000 lux em sala climatizada 25±2°C C durante o período de 30 dias.

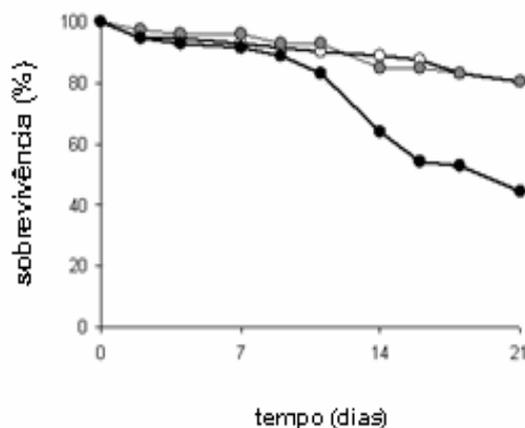
Diariamente, os animais eram observados quanto a sinais de anormalidade. Semanalmente, a renovação do meio nos tratamentos foi realizada pela preparação de novas suspensões do biopesticida e colocação dos organismos-teste nas mesmas. Nessa ocasião se realizava a contagem dos peixes para calcular a percentagem de sobrevivência.

### Resultados e Discussão

Nos estudos com *P. subcapitata*, as estimativas das taxas médias de crescimento algácea para o controle, Bt344 AI e Bt344 AA foram respectivamente iguais a 0,137; 0,140 e 0,175 x 10<sup>4</sup> células.dia<sup>-1</sup>. A análise de contrastes revelou valores de *p* notavelmente superiores a 0,05 indicando ausência de efeito significativo entre os tratamentos.

Constatou-se uma redução significativa no número médio de neonatos de *D. similis* produzidos por adulto por dia (NMADIA) e taxa líquida de reprodução (Ro) nas exposições ao Bt344 inativado ou ativo. O NMADIA foi de 2,87; 1,75 e 1,31 para os tratamentos controle, Bt344 AI e Bt344 AA, respectivamente.

Como foi observado efeito adverso na exposição a esporos inativos, a alteração dos parâmetros de reprodução está relacionada a um outro efeito, e não necessariamente ao de infectividade. Com relação à taxa de sobrevivência, o material *Bt344* inativado não resultou em alteração da taxa enquanto o *Bt344* ativo reduziu a porcentagem de sobrevivência em aproximadamente à metade (Figura 1).



**Figura 1.** Efeito na sobrevivência de *D. similis*: -○- sem *Bt344* (controle), -●- com *Bt344* AI ( $10^4$ - $10^6$  u.i. mL<sup>-1</sup> autoclavadas) e -●- com *Bt344* AA ( $10^4$ - $10^6$  u.i. mL<sup>-1</sup>).

Nenhuma mortalidade de peixes foi constatada até o 7º dia de exposição. A partir da segunda semana, a taxa de mortalidade nos recipientes contendo *Bt* ativo iniciou com 2% enquanto para os demais tratamentos permaneceu nula. No final do período de experimentação, foi observado efeito dos tratamentos na sobrevivência dos peixes (teste exato de Fisher;  $p=0,03$ ): a mortalidade para o tratamento *Bt* ativo aumentou para aproximadamente 9% (Tabela 1). Previamente à mortalidade, os peixes apresentavam nado errático e descoordenado com aumento da frequência dos movimentos operculares. Durante todo o período de exposição, nenhuma mortalidade, nem sintomas de alteração de comportamento, foram observados para os peixes não expostos ao agente biológico, nem para os tratados com o *Bt344* inativado.

**Tabela 1:** Taxas de sobrevivência (%) de *H. scholzei* ( $\pm$  desvio padrão, %), em função do tempo de exposição aos tratamentos na ausência ou na presença de *Bt344*.

Dias	Tratamento		
	Controle	<i>Bt344</i> AI	<i>Bt344</i> AA
0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
7	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
14	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	97,8 $\pm$ 2,20
21	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	95,6 $\pm$ 3,07
30	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	91,1 $\pm$ 4,24

As concentrações do biopesticida avaliadas (mais de 1.000 vezes a dose de aplicação) no presente estudo satisfizeram às sugestões propostas pelo protocolo da USEPA (1989).

Os dados apontam uma ausência de efeito adverso em organismos fitoplânctônicos. Assim sendo, em analogia aos nossos achados, Koskella & Stotzky (2002) não observaram alteração no padrão de crescimento de algas do gênero *Euglena* e *Chlamydomonas* quando expostas a toxinas de duas subespécies de *B. thuringiensis*. Entretanto, outros autores observaram que o crescimento de algas dos gêneros *Closterium* e *Chlorella* foi reduzido pela aplicação de formulações de *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* e *Bacillus sphaericus*.

No presente trabalho foi constatada a alteração da taxa de sobrevivência de *D. similis* nas exposições ao *Bt* ativo, assim, este efeito poderia ser correlacionado a outros achados que verificaram alteração no tamanho da estrutura populacional de *Daphnia pulex* no 21º dia de

exposição a *B. thuringiensis israelensis*. Os resultados do presente trabalho podem também ser explicados pela moderada toxicidade atribuída para determinadas cepas de *Bt* em *Daphnia* sp. (USEPA, 1998).

A inocuidade *Bt* para varias espécies de peixes, resultante da exposição ao agente biológico através da água, tem sido relatada. Assim por exemplo, Grisolia et al. (2009) observaram que a exposição durante 30 dias do peixe *Oreochromis niloticus* a *Bt israelensis* e *Bt kurstaki*, não afetou a sua sobrevivência. Entretanto, um aumento na frequência de necrose celular foi observado após 72 h de aplicação intra abdominal de uma suspensão de  $10^8$  esporos mL<sup>-1</sup>.

De acordo com um trabalho realizado em 2007, a exposição de peixes da espécie *Melanotaenia duboulayi* a *Bt. israelensis*, sob 10 vezes a concentração de efetiva, não manifestou efeito no padrão normal de locomoção. Entretanto, um estudo relatado pela USEPA com *Bt kurstaki* demonstrou que houve mortalidade e redução de crescimento quando peixes “bluegill sunfish” foram expostos a concentrações equivalentes a  $4,7 \times 10^7$  u.i. mL<sup>-1</sup>.

Apesar dos resultados do presente estudo demonstrarem evidências de efeito do *Bt344* ativo nos peixes expostos, essa alteração é de baixa magnitude, com mortalidade inferior ao limite aceitável para o controle, que é de 10 % segundo protocolos de estudos ecotoxicológicos..

### Conclusões

*Bt344* apresentou inocuidade com respeito à alteração do padrão de crescimento da alga *P. subcapitata* e um efeito de baixa magnitude na sobrevivência do peixe *H. schoelzei* quando os organismos-teste foram expostos a concentrações remanescentes, estimadas no corpo de água, que correspondem a mais de 1.000 vezes a dose de aplicação eficiente no controle de *Spodoptera frugiperda*. Tal fato permitiria seu uso como biopesticida, conforme protocolos experimentais que utilizam esses organismos-teste.

Entretanto, altas concentrações do agente biológico afetaram a sobrevivência de *D. similis*, o que sugere a possibilidade de risco para espécies de invertebrados aquáticos. Sabe-se que o risco se caracteriza quando há efeito adverso e também há possibilidade de exposição. Por esse motivo, o efeito adverso manifestado em microcrustáceos, nesse trabalho, indicariam a necessidade de estudos complementares nestes organismos, ou em outros invertebrados aquáticos, segundo protocolos nacionais e internacionais para se inferir sobre segurança relativa às comunidades presentes em sistemas de produção aquícola.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Fernando Valicente (Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG) pelo fornecimento da cepa do microorganismo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

### Literatura citada

- GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA-FILHO, E.C.; RAMOS, F.R.; LOPES, M.C.; MUNIZ, D.H.F. ; MONNERAT, R.G. Acute toxicity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains on fish and mouse bone marrow. **Ecotoxicology** v.18, p.22-26, 2009.
- KOSKELLA, J.; STOTZKY, G. Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *morrisoni* (strain *tenebrionis*), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi, and algae in vitro. **Canadian Journal of Microbiology** v.48, p.262–267, 2002.
- LORENZINI, L.M.; CALEGARI, O. A.; ECHHARDT, G.; LIMA, M.S. [2005]. Piscicultura: Importância socioeconômica no espaço agrário de Assis Chateaubriand/Pr. In: VI Semana de Iniciação Científica da FECILCAM, Campo Mourão, 2007. **Anais eletrônicos**. Campo Mourão: Faculdade Estadual de Ciências e Letras de Campo Mourão, 2005. Disponível em: <http://www.unimeo.com.br>. Acesso em : 23/10/2007.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guidelines for testing chemical**. Paris, 1981.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. **Microbial and biochemical pest control agents. Subdivision M of the pesticide testing guidelines**. Washington, 1989.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Bacillus thuringiensis subspecies israelensis strain**. EG2215 Fact Sheet. Washington, 1998.