



**ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE RISCO DE 19 BIOPESTICIDAS SOBRE O
MICROCRUSTÁCEO *Daphnia Similis***

MARJORIE GUIMARÃES¹; MARINA DAL'BÓ PELEGRINI²; VERONICA J. DE
PAULA³; VERA L. CASTRO⁴; CLAUDIO M. JONSSON⁵

Nº 12418

RESUMO

Nas últimas décadas tem se manifestado a preocupação e se incentivado o desenvolvimento de produtos de menor risco para o meio ambiente. Isto pelo fato de se constatar os sérios riscos ocasionados pela presença de resíduos de agroquímicos em alimentos e nos diversos compartimentos ambientais. Como alternativa para os agrotóxicos, avanços significativos têm sido conseguidos no desenvolvimento de biopesticidas utilizados como agentes microbianos de controle de pragas. Sendo os sistemas aquáticos um dos principais compartimentos ambientais vulneráveis à entrada dos agentes microbianos de controle biológico, uma das preocupações é de se avaliar o risco destes agentes em organismos aquáticos não alvo. O microcrustáceo *Daphnia* sp., é comumente utilizado na avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos e agentes microbianos de controle biológico de pragas conforme recomendações de protocolos nacionais e internacionais. O presente trabalho avaliou o risco ecotoxicológico de 19 agentes microbianos de controle biológicos usados como biopesticidas para *Daphnia similis*. Para todos os biopesticidas testados foram atribuídos valores de CE50-24h superiores a 100 mg L⁻¹. Segundo a classificação da EPA, materiais-teste com valores de CE50 \geq 100 mg L⁻¹ são considerados como “praticamente não tóxicos”. Dada a alta concentração dos biopesticidas utilizada conclui-se que os agentes testados não possuem potencial em ocasionar efeitos adversos em invertebrados aquáticos decorrente da presença de toxinas. Entretanto seria conveniente a realização de estudos a longo prazo de exposição de modo a se avaliar o potencial de infectividade.

¹ Bolsista EMBRAPA: Graduação em Biomedicina, Metrocamp, Campinas-SP.

✉ marjorieguimaraes@yahoo.com.br.

² Colaboradora: Graduada em Biologia, Unicamp, Campinas - SP

³ Bolsista Treinamento Técnico 3 FAPESP: Graduada em Biomedicina, Metrocamp, Campinas – SP.

⁴ Colaborador: Pesquisadora, LEB/EMBRAPA, Jaguariúna-SP. (castro.cnpma@embrapa.com.br)

⁵ Orientador: Pesquisador, LEB/EMBRAPA, Jaguariúna-SP (jonsson.cnpma@embrapa.com.br)



ABSTRACT

In recent decades has expressed concern and encouraged the development of products with lower risk to the environment. This fact was noted by the serious risks caused by the presence of pesticide residues in foods and in different environmental compartments. As an alternative to pesticides, significant advances have been achieved in the development of biopesticides such as microbial agents used for pest control. Aquatic system is one of the a major environmental compartment vulnerable to the entry of microbial biological control agents, one concern is to assess the risk of these agents in non-target aquatic organisms. The microcrustacean *Daphnia similis*, is commonly used to assess the ecotoxicity of chemical and microbial agents for biological pest control as recommended by national and international protocols. This study evaluated, in *Daphnia similis*, the ecotoxicological risk of 19 microbial biological control agents used as biopesticides. For all tested biopesticides, EC50-24h values were greater than 100 mg L⁻¹. According to the EPA classification, materials-testing with EC50 values \geq 100 mg L⁻¹ are considered as "practically nontoxic". Due to the high concentration used of the biopesticide, is concluded that the tested agents have no potential to cause adverse effects to aquatic invertebrates because the presence of toxins. However it would be appropriate studies of long term exposure in order to evaluate a potential infectivity.

INTRODUÇÃO

O comprometimento da qualidade dos produtos, do solo, dos recursos hídricos, bem com a preservação da flora, dos animais e microrganismos, são os maiores desafios da agricultura moderna juntamente com o aumento da produtividade agrícola.

Nas últimas décadas tem se manifestado a preocupação da população e se incentivado o desenvolvimento de produtos de menor risco para o meio ambiente. Isto pelo fato de se constatar os sérios riscos ocasionados pela presença de resíduos de agroquímicos em alimentos e nos diversos compartimentos ambientais, e também pela resistência dos organismos praga a esse produtos

É de amplo conhecimento que desequilíbrios nos ecossistemas de entorno podem ser originados no uso intensivo de insumos agrícolas, e que isto tem uma grande importância em países em desenvolvimento onde a economia é extremamente dependente da atividade agrícola, como é o caso do Brasil (JONSSON; MAIA, 1999)



Como alternativa para os agrotóxicos, outras possibilidades vêm sendo estudadas, incluindo-se o uso de inimigos naturais, principalmente os microrganismos entomopatogênicos, que também não devem ser utilizados indiscriminadamente, mas seguindo princípios ecológicos (ALVES et al., 2008)

Avanços significativos neste sentido têm sido conseguidos no desenvolvimento de biopesticidas utilizados como agentes microbianos de controle de pragas. O termo biopesticida ou pesticida biológico refere-se a qualquer organismo empregado em larga escala para o controle de pragas, de fitopatógenos ou de plantas invasoras, cujo efeito previsto admite a necessidade de que seja aplicado periodicamente. A maior parte dos biopesticidas refere-se a microrganismos, especialmente fungos, bactérias e vírus.

Sendo os sistemas aquáticos um dos principais compartimentos ambientais vulneráveis à entrada dos agentes microbianos de controle biológico, uma das preocupações é de se avaliar o risco destes agentes em organismos aquáticos não alvo. Cabe ressaltar que no caso, “risco”, pode ser definido como uma estimativa da probabilidade que o agente de controle biológico tem em ocasionar um dano (JONSSON; MAIA, 1999)

O invertebrado aquático *Daphnia* sp., microcrustáceo bioindicador, é comumente utilizado na avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos (SEMA, 1988) e agentes microbianos de controle biológico de pragas (USEPA, 1989; CASTRO et al., 2001) conforme recomendações de protocolos nacionais e internacionais.

No presente trabalho foi avaliado o efeito toxicológico de 19 agentes biológicos usados como biopesticidas sobre organismos zooplancctônicos, representado pela *Daphnia similis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Princípio metodológico:

Após a realização de estudo preliminar a alta dose de exposição, os ensaios consistem na exposição do microcrustáceo *Daphnia similis* a diferentes concentrações do material-teste por um período de 24 horas, em água doce, com características físico-químicas definidas. Este procedimento permite calcular a CE50-24h, ou seja, a concentração que imobiliza 50% de organismos da população.



Biopesticidas:

Os organismos foram fornecidos em meio de cultura sólido, específico para cada agente biológico, contido em placa de Petri.

Diferentemente dos outros biopesticidas, o *Bacillus thuringiensis* cepa 15SP, foi fornecido em suspensão contendo 10^9 u.f.c. (unidades formadoras de colônia) por mililitro. Na Tabela 1 estão apresentadas algumas características dos agentes microbianos de controle biológico avaliados.

Organismo-teste:

Neonatos de *Daphnia similis* (Cladocera, crustácea), com idade inferior a 24 horas, obtidas a partir de culturas mantidas em sala aclimatizada ($20\pm 2^\circ\text{C}$), alimentadas 3 vezes por semana com 200 mL suspensão de algas clorofíceas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), sob luminosidade de aproximadamente 1.200 lux.

Sala-teste:

Os testes foram realizados em sala especificamente designada, com temperatura controlada em $20\pm 2^\circ\text{C}$, sob luminosidade contínua de aproximadamente 1.200 lux.

Água de diluição:

Foi utilizada água da rede de abastecimento, proveniente de poço artesiano, previamente aerada através de pedra porosa em por um período superior a 24 horas, com as seguintes características: dureza = $53,58 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, pH = 7,5 e condutividade = $111,4 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$.

Procedimento e preparação das doses de exposição:

Para a preparação das suspensões contendo o agente biológico, este, estando em placas de Petri, foi colhido através de raspagem utilizando alça de platina esterilizada. Assim sendo, 8 mg da biomassa microbiana foram suspensas em 1 mL água de diluição de modo a se obter uma suspensão estoque. A partir desta foram



preparadas a suspensões-teste com concentração de 100 mg L^{-1} , pipetando-se 0,25 mL e diluindo-se para um volume final de 20 mL em frascos de 50 mL.

Para a preparação das suspensões contendo o agente biológico fornecido na forma de suspensão, pipetou-se 1ml de material-teste e diluiu-se para 100 mL de água de diluição. Pipetou-se 2ml desta suspensão para frascos com capacidade de 50 mL. O volume final da suspensão-teste foi de 20 mL. Assim sendo, a concentração do material-teste resultante foi de 1 g/L com 10^6 u.f.c./mL de suspensão-teste.

Paralelamente às exposições ao agente biológico, foi avaliada a mobilidade dos crustáceos em água sem o material-teste, o que serviu como controle.

Os recipientes foram cobertos com filme de PVC na sua parte superior, permanecendo nas condições ambientais anteriormente citadas por um período de 24 horas. Após este, foi avaliada a porcentagem de mobilidade dos organismos-teste em cada recipiente.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur foram adicionados 10 organismos em cada recipiente, sendo que o ensaio foi realizado em triplicata.

De modo a se conhecer os padrões de sensibilidade dos organismos-teste, frente a uma substância de referência, foi conduzido um ensaio em que se avaliou a toxicidade ao dicromato de potássio. Obteve-se valores de CE50-24h (intervalo de confiança 95%), referente a este composto, da ordem de 0,14 (0,12 – 0,17) mg L^{-1} , o que está de acordo com o descrito pelo protocolo da SEMA (1988).

Os recipientes foram cobertos com filme de PVC na sua parte superior, permanecendo nas condições ambientais anteriormente citadas por um período de 24 horas. Após este, foi avaliada a porcentagem de mobilidade dos organismos-teste em cada recipiente.

Análise estatística:

Os dados foram analisados pelo módulo “Two-sample comparison”, através do “t-test”, contido no programa Statgraphics Plus Version 5.1. Foi adotado um nível de significância de 5% para efeito de comparação da mobilidade entre os organismos expostos e não expostos ao agente biológico.

TABELA 1: Características dos biopesticidas avaliados quanto à sua toxicidade para *Daphnia similis*.



6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012
13 a 15 de agosto de 2012 – Jaguariúna, SP

ESPÉCIE	ISOLADO	AGENTE BIOLÓGICO	CATEGORIA	CONCENTRAÇÃO AVALIADA (mg L ⁻¹)
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>	SGS01	Bactéria	Inseticida	100 (biomassa)
<i>Bacillus subtilis</i>	BS01	Bacteria	Inseticida/ Nematicida	100 (biomassa)
<i>Bacillus subtilis</i>	17SP	Bactéria	Inseticida/ Nematicida	100 (biomassa)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	15SP	Bacteria	Inseticida	1000 (suspensão 10 ⁶ ufc mL ⁻¹)
<i>Beauveria bassiana</i>	BB01AGVL	Fungo	Inseticida	100 (biomassa)
<i>Trichoderma harzianum</i>	CTT 1202	Fungo	Fungicida	100 (biomassa)
<i>Trichoderma harzianum</i>	CCT 4293	Fungo	Fungicida	100 (biomassa)
<i>Bacillus pumilus</i>	-	Bacteria	Fungicida	100 (biomassa)
<i>Isaria fumosoroseus</i>	IBCB 638	Fungo	Inseticida/ Acaricida	100 (biomassa)
<i>Beauveria bassiana</i>	IBCB 66	Fungo	Inseticida	100 (biomassa)
<i>Clonostachys rosea</i>	CR01-AGVL	Fungo	Fungicida	100 (biomassa)
<i>Trichoderma asperellum</i>	-	Fungo	Fungicida	100 (biomassa)
<i>Clonostachys roseum</i>	-	Fungo	Fungicida	100 (biomassa)
<i>Isaria lilacinum</i>	IBCB 236	Fungo	Inseticida/ Acaricida	100 (biomassa)
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	PC-10	Fungo	Nematicida	100 (biomassa)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	CCT 2146	Fungo	Nematicida	100 (biomassa)
<i>Lecanicillium lecanii</i>	IBCB 619	Fungo	Inseticida	100 (biomassa)
<i>Clonostachys rosea</i>	GF04	Fungo	Fungicida	100 (biomassa)

<i>Paecilomyces lilacinus</i> , + <i>Arthrobotrys oligospora</i> , + <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus liqueniformis</i>	Fungo + Fungo + Bactéria+ Bacteria	Nematicida / Inseticida	100 (biomassa)
--	---	----------------------------	----------------

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 são apresentados os resultados referentes aos efeitos dos agentes microbianos de controle biológico sobre o organismo-teste.

TABELA 2: Toxicidade de biopesticidas sobre *D. similis*.

ESPÉCIE	ISOLADO	% MÉDIA DE MOBILIDADE (controle)	% MÉDIA DE MOBILIDADE (exposto)	CE50-24h (mg L ⁻¹)	VALOR P (teste-t)
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>	SGS01	86,66	86,66	>100	1
<i>Bacillus subtilis</i>	BS01	100	93,33	>100	0,374
<i>Bacillus subtilis</i>	17SP	90	93,3	>100	0,725
<i>Bacillus thuringiensis</i>	15SP	96,66	93,33	>1000 (suspensão)	0,518
<i>Beauveria bassiana</i>	BB01AGVL	83,33	83,33	>100	1
<i>Trichoderma harzianum</i>	CTT 1202	90	73,33	>100	0,067
<i>Trichoderma harzianum</i>	CCT 4293	93,33	83,33	>100	0,101
<i>Bacillus pumilus</i>	-	83,33	83,33	>100	1
<i>Isaria fumosoroseus</i>	IBCB 638	86,66	90	>100	0,643
<i>Beauveria bassiana</i>	IBCB 66	93,33	86,66	>100	0,23
<i>Clonostachys rosea</i>	CR01-AGVL	86,66	73,33	>100	0,148
<i>Trichoderma asperellum</i>	-	83,33	93,33	>100	0,101



<i>Clonostachys roseum</i>	-	96,66	96,66	>100	1
<i>Isaria lilacinum</i>	IBCB 236	96,66	90	>100	0,116
<i>Pochonia chlamydosporia</i> ,	PC-10	96,66	93,33	>100	0,518
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	CCT 2146	100	93,33	>100	0,116
<i>Lecanicillium lecanii</i>	IBCB 619	93,33	96,66	>100	0,518
<i>Clonostachys rosea</i>	GF04	96,66	93,33	>100	0,518
<i>Paecilomyces lilacinus</i> , + <i>Arthrobotrys oligospora</i> , + <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus liqueniformis</i>	-	96,66	83,33	>100	0,345

No presente trabalho foram testadas altas concentrações (100 mg L⁻¹ ou 1000 mg L⁻¹) como estudos preliminares para tentar se estabelecer uma faixa de concentração para o cálculo da CE50-24h. A não constatação de efeito adverso em tais concentrações não permitiu estabelecer uma relação dose-resposta, necessária para calcular a CE50-24h.

Para todos os biopesticidas testados não se constatou diferença significativa no nível de 95% de certeza (P>0,05), quanto à mobilidade dos organismos expostos aos agentes biológicos, comparativamente aos não expostos.

Assim sendo, foram atribuídos valores de CE50-24h superiores a 100 mg L⁻¹. Segundo a classificação da EPA, materiais-teste com valores de CE50 \geq 100 mg L⁻¹ são considerados como “praticamente não tóxicos” (USEPA, 1985).

Apesar da inocuidade relatada, e da esperada segurança do uso de biopesticidas no combate aos problemas fitossanitários, a literatura tem descrito a respeito de alguns trabalhos onde se constataram efeitos adversos em organismos aquáticos (GENTHNER et al., 1994; GENTHNER et al., 1998). Assim por exemplo, bactérias do gênero *Pasteuria*, ao qual pertencem espécies nematicidas, são capazes de alterar os níveis de C, N e P em dafnídeos (FROST et al., 2008). Uma toxicidade moderada para *Daphnia* sp. foi atribuída a algumas cepas de *B. thuringiensis* (ESTADOS UNIDOS, 1998).



CONCLUSÃO

Dada a alta concentração dos biopesticidas utilizada conclui-se que os agentes testados não possuem potencial em ocasionar efeitos adversos em invertebrados aquáticos decorrente da presença de toxinas. Entretanto seria conveniente a realização de estudos em longo prazo de exposição de modo a se avaliar o potencial de infectividade.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Meio Ambiente, pela bolsa concedida e oportunidade de estágio.
Ao CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro oferecido.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L.F.; ALVES, S.B. ; OLIVEIRA, L.G. ; JONSSON, C. M. . Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycetes) para *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: characidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, p. 471-479, 2008.
- CASTRO, V.L.S.; JONSSON, C.M.; MELO, I.S.; NUNES, F.V. Avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, Coimbra, v.4, n.1, p.18-24, 2001.
- ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Bacillus thuringiensis Subspecies Israelensis Strain**. EG2215 (006476) Fact Sheet. Washington, DC. 1998. <http://www.epa.gov/opppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006476.htm>. Acesso em: 05 Junho de 2012.
- FROST, P. C.; EBERT, D.; SMITH, V. H. Bacterial infection changes the elemental composition of *Daphnia magna*. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 77, p. 1265-1272, 2008.
- GENTHNER, F.J.; CRIPE, G.M.; CROSBY, D.J. Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidacea). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, p. 90–94, 1994.
- GENTHNER, F.J.; CHANCY, C.A.; COUCH, J.A.; FOSS, S.S.; MIDDGAUGH, D.P.; GEORGE, S.E. ; WARREN, M.A. ; BANTLE, J.A. Toxicity and pathogenicity testing



of the insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 317–324, 1998.

JONSSON, C. M. ; MAIA, A. H. N. . **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. Testes toxicopatológicos em organismos não alvo do ambiente aquático: organismos zooplanctônicos, fitoplanctônicos e vertebrados.** Embrapa Meio Ambiente. Documentos, Brasil, v. 11, p. 1-33, 1999.

MANUGISTICS Statgraphics Plus. Version 5.1 for Windows. Rockville: Manugistics Group, 2001.

SEMA. **Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agente químicos.** Secretaria Especial do Meio Ambiente, Brasília, 1988.

USEPA. United States Environmental Protection Agency.. Hazard Evaluation Division. **Standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater invertebrates.** Washington, D.C., 1985.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Subdivision M of the Pesticide Testing Guidelines. **Microbial and biochemical pest control agents.** Washington, D.C. 1989.