

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

EFEITOS DOS COMPOSTOS A BASE DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *BEAUVERIA BASSIANA* (IBCB 170) E *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (IBCB 383) EM LARVAS DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* (SHAW, 1802)

¹GABRIEL H. L. RODRIGUES, ²RODRIGO Y. CAMILO, ³SERGIO V. OLIVEIRA,
²RODRIGO ZIERI

¹ Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas – IFSP Barretos, Bolsista PIBITI – CNPq - Laboratório de Ensaios Ecotoxicológicos de Animais Aquáticos. lopes.henrique@aluno.ifsp.edu.br

² Docente IFSP Barretos - Laboratório de Ensaios Ecotoxicológicos de Animais Aquáticos - IFSP Barretos

³ Docente IFSP Barretos – Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Microbiologia Agrícola – IFSP Barretos

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.02.02.00-7 Morfologia dos Grupos Recentes

RESUMO: O presente estudo analisou os efeitos letais e subletais das estirpes de fungos entomopatogênicos *Beuveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Lithobates catesbeianus*. Os resultados mostraram que *B. bassiana* não é tóxico para as larvas, enquanto *M. anisopliae* apresenta toxicidade apenas em altas concentrações (CL50% de cerca de 47,73 ml/l). Ambos os fungos não afetaram o comportamento de nado das larvas, mas o perfil sanguíneo revelou uma maior quantidade de eritrócitos anucleados em relação as outras anormalidades encontradas, principalmente nos grupos controle, possivelmente devido à problemas de oxigenação dos tanques durante os testes subletais. Conclui-se que *B. bassiana* é praticamente não tóxico para larvas de *L. catesbeianus*, enquanto *M. anisopliae* só é tóxico em concentrações elevadas, no entanto ambos não apresentam efeitos subletais.

PALAVRAS-CHAVE: *Beuveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*; fungos entomopatogênicos, ecotoxicologia, Rã-touro.

EFFECTS OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI-BASED COMPOUNDS *BEAUVERIA BASSIANA* (IBCB 170) AND *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (IBCB 383) ON LARVAE OF *LITHOBATES CATESBEIANUS* (SHAW, 1802)

ABSTRACT: The present study analyzed the lethal and sublethal effects of the entomopathogenic fungal strains IBCB 170 of *Beuveria bassiana* and IBCB 383 of *Metarhizium anisopliae* on tadpoles of *Lithobates catesbeianus*. The results showed that *B. bassiana* is not toxic to the larvae, whereas *M. anisopliae* exhibits toxicity only at high concentrations (LC50 of approximately 47.73 ml/l). Neither fungus affected the swimming behavior of the larvae, but the blood profile revealed a higher number of nucleated red blood cells compared to other abnormalities, primarily in the control groups, possibly due to oxygenation issues in the tanks during the sublethal tests. It is concluded that *B. bassiana* is practically non-toxic to *L. catesbeianus* larvae, while *M. anisopliae* is only toxic at elevated concentrations; however, both compounds did not show sublethal effects.

KEYWORDS: *Beuveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*; Entomopathogenic fungi; ecotoxicology; bullfrog.

INTRODUÇÃO

A Agenda 2030 das Nações Unidas reflete uma mobilização internacional em busca de práticas mais responsáveis nos âmbitos econômico, social e ambiental (ODS, 2015). Nesse contexto, a substituição e diminuição do uso de agrotóxicos é essencial, uma vez que contribui para a realização de alguns desses objetivos: como a erradicação da pobreza e a produção responsável (Carneiro *et al*, 2015). Entre as práticas voltadas para esse processo de modificação e contestação do modelo agrícola vigente, advindo da Revolução Verde (Lazzari; Souza, 2017), destaca-se a utilização de microrganismos benéficos que atendam as demandas agrícolas, diminuindo a dependência por produtos industrializados (Graças *et al*, 2015).

Os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* ocupam posição de destaque entre os microrganismos que atuam no controle de insetos-pragas agrícolas (Rehner; Buckley, 2005; Roberts; Stleger, 2004). Sendo assim, com o intuito de contribuir para a produção de alternativas aos agroquímicos, realizamos ensaios ecotoxicológicos com bioprodutos a base das estirpes IBCB 383 de *Metarhizium anisopliae* e IBCB 170 de *Beauveria bassiana* isoladas pelo Instituto Biológico de Campinas, em larvas de *Lithobates catesbeianus* (Rã-touro americana).

A contaminação de corpos d'água por essas substâncias afeta diretamente a biodiversidade local, sendo os anfíbios um dos grupos mais vulneráveis a essa contaminação devido à alta permeabilidade cutânea e ao ciclo de vida bimodal (Gonçalves *et al.*, 2019; Agostini *et al.*, 2020). Neste contexto, o presente projeto buscou a realização de ensaios toxicológicos para avaliar a concentração letal (CL50) dos bioprodutos, bem como os potenciais impactos dos compostos no comportamento natatório e seus efeitos genotóxicos por meio de análises das anormalidades nucleares eritrocitárias em larvas *L. catesbeianus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 236 indivíduos em fase larval de *L. catesbeianus*, adquiridos no ranário RANAMAT, localizado em Matão-SP e trazidos ao Laboratório de Ensaios Ecotoxicológicos de Animais Aquáticos do IFSP Campus Barretos, os quais foram aclimatados por 15 dias, distribuídos em seis tanques com capacidade de 50 litros cada. As larvas foram mantidas em temperatura ambiente ($\pm 27^\circ\text{C}$), fotoperíodo natural, aeração constante e alimentação com ração floculada de peixe *ad libitum*. Além disso, limpeza diária foi realizada com a renovação de um 1/3 do volume de água de cada tanque, com água declorada, evitando assim o acúmulo de matéria orgânica e amônia.

Realizamos um teste preliminar de toxicidade para determinar as concentrações que seriam utilizadas nos ensaios letais. Para isso, dois tanques com capacidade de aproximadamente 10 litros foram preenchidos com 5 litros de água e 5 girinos cada. Em um dos tanques as larvas de *L. catesbeianus* foram expostas à uma concentração de 2×10^6 conidiósporos/ml (0,082 ml/l) do bioproduto à base do fungo entomopatogênico *B. bassiana* (IBCB 170), durante 96h, baseado no trabalho de Genthner e Middaugh (1992) em embriões do peixe *Menidia beryllina*. Em outro tanque, os indivíduos foram expostos a uma concentração cem vezes maior (8,2 ml/l) do mesmo bioproduto.

Para o cálculo da concentração letal, 60 girinos foram distribuídos equitativamente em doze caixas plásticas, havendo duas para cada concentração, totalizando cinco concentrações: 20 ml/l, 10 ml/l, 1 ml/l, 10 microlitros/l, 1 microlitro/l do bioproduto à base do fungo *B. bassiana* (IBCB170) e o controle. O teste com o biopesticida à base do fungo *M. anisopliae* (IBCB383), foi utilizado o mesmo delineamento experimental descrito acima, no entanto com concentrações distintas: 40 ml/l, 20 ml/l, 15 ml/l, 10 ml/l e 1 ml/l, além do controle.

O teste subletal contou com nove tanques com cinco litros cada, havendo três tanques para cada concentração (1 e 10 ml/l) e para o controle. Em cada um dos recipientes foram colocados seis indivíduos em fase larval de *L. catesbeianus*. Assim, 54 girinos foram expostos por 96 horas ao bioproduto à base do fungo *B. bassiana* (IBCB170) e, o mesmo montante, ao bioproduto à base do fungo *M. anisopliae* (IBCB383); totalizando 106 girinos.

Após o período de 96 horas as larvas foram anestesiadas com lidocaína (50 mg/g) e tiveram uma fração do sangue retirada por meio de punção cardíaca com seringas de 1ml e agulhas (G30) descartáveis, as quais foram lavadas com o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 3%. Posteriormente, realizamos a técnica de extensão sanguínea em lâmina de vidro, as quais foram secadas naturalmente e fixadas em metanol PA gelado por 20 minutos. Após, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% (Newprov), e com o auxílio de microscópio de luz Leica DM500 com câmera digital acoplada (ICC50W), foram contados 1.000 eritrócitos de cada indivíduo, sendo analisadas as seguintes anomalias nucleares: ausência de núcleo, núcleo segmentado, micronúcleo, eritrócitos com dois núcleos,

'bud', núcleo entalhado, núcleo lobado, eritrócito em apoptose, núcleo frouxo, riniforme e com padrão circular. Os critérios utilizados para a classificação das anomalias foram de acordo com Benvindo-Souza *et al.*, (2020) e Assis *et al.*, (2021).

Para o teste de comportamento natatório, as larvas de cada tratamento foram realocadas, individualmente e aleatoriamente para um recipiente redondo e transparente de 25,5 centímetros de diâmetro e 5 centímetros de profundidade e filmados com o celular (Samsung Galaxy M54). Após um breve período de aclimação de 15 segundos, a atividade natatória de cada girino foi registrada por 90 segundos, realizando estímulos com pipeta Pasteur estéril, sempre próximo à cauda do indivíduo, simulando aproximação de predadores, nos seguintes momentos: 15, 30, 45, 60 e 75 segundos após o início da observação, baseado no trabalho de Girotto *et al.*, 2020. Posteriormente, as filmagens foram analisadas por meio do software Kinovea, possibilitando a medição da distância total percorrida, velocidade máxima e velocidade média de cada girino.

Para as análises estatísticas foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk, transformação logarítmica dos dados, seguido da verificação da homocedasticidade através do teste de Levene. Utilizamos a análise de variância ANOVA-one-way com nível de significância p.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

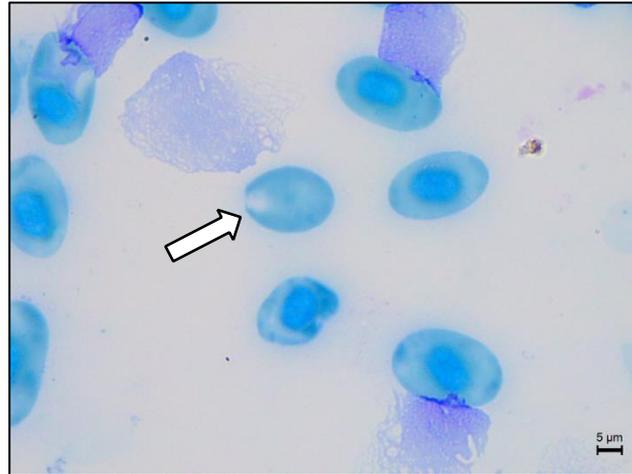
Para os testes preliminares, nos quais as larvas de *L. catesbeianus* foram expostas por 96h aos compostos à base de *B. bassiana* (IBCB170) e posteriormente ao *M. anisopliae* (IBCB383) nas concentrações de 0,082 ml e 8,2 ml/l. Essas concentrações foram utilizadas por Genthner e Middaugh, 1992, as quais promoveram ruptura das células embrionárias. Entretanto, não observamos efeitos comportamentais, estruturais e letais nas larvas de *L. catesbeianus*. Dessa maneira, para o teste definitivo da LC50, utilizamos os valores limites de toxicidade para organismos aquáticos determinados pela U.S. Environmental Protection Agency (EPA). No fim das 96 horas, não observamos letalidade de animais expostos a *B. bassiana* (IBCB170), entretanto, para o composto à base de *M. anisopliae* (IBCB383), obtivemos um valor estimado de 47,73 ml/l para CL50, assim como, por meio do coeficiente angular, detectamos que a mortalidade dos organismos aumenta com o aumento da concentração do biopesticida (Figura 1), evidenciando uma maior toxicidade em doses mais elevadas, quando comparado a *B. bassiana*, embora os mecanismos que atuam sejam desconhecidos para vertebrados e carecem de mais investigações.

FIGURA 1. Taxa de mortalidade dos girinos de rã-touro expostos ao *M. anisopliae*, partir do coeficiente angular.



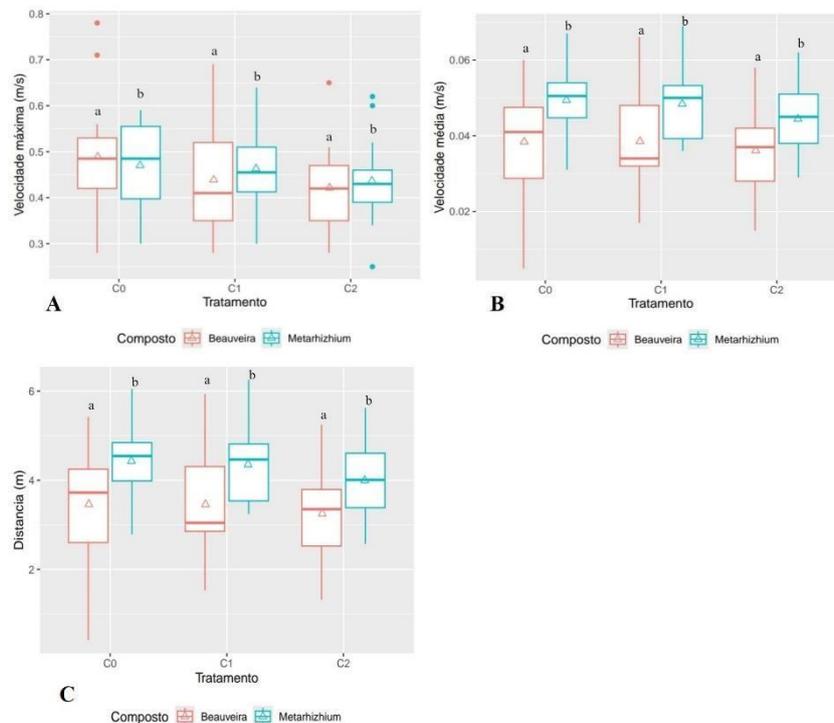
As análises de anomalias nucleares eritrocitárias revelaram que, tanto as larvas de *L. catesbeianus* expostas à *B. bassiana* (IBCB170) quanto para aqueles expostos à *M. anisopliae* (IBCB383), apresentaram um predomínio de eritrócitos anucleados (Figura 2) quando comparados com outras anormalidades, entretanto, essa anomalia foi maior no grupo controle em ambos os tratamentos. De acordo com Fijan, 2002, eritrócitos anucleados podem ser resultantes de situações de estresse como alterações na dieta, doenças, danos metabólicos. Além disso, a presença de eritrócitos anucleados também pode indicar um aumento da eficiência do transporte de oxigênio, melhorando a relação superfície/volume celular (Barni *et al.*, 2007) particularmente em condições de poluição da água. Em nosso trabalho, apesar de observarmos um grande número de eritrócitos anucleados (eritroblastos), a ocorrência foi observada principalmente no grupo controle, o que afasta a hipótese de o composto estar promovendo tal condição, podendo, portanto, ser atribuída à condição metabólica do animal ou a uma baixa oxigenação nos recipientes os quais os grupos controles estavam presentes.

FIGURA 2. Eritrócito anucleado (seta) de girino de *L. catesbeianus*.



Finalmente, para os testes de comportamento de natação das larvas de *L. catesbeianus* expostos separadamente aos produtos à base de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, não mostraram diferenças entre o grupo controle (C0) e os grupos tratados (C1 e C2) para ambos os compostos em relação aos parâmetros velocidade máxima, velocidade média e distância total percorrida (figura 3). Esses mesmos parâmetros foram utilizados por Giroto *et al*, 2020, para avaliar a toxicidade no comportamento de fuga de *L. catesbeianus* expostos a diferentes diluições do rejeito da atividade mineradora provenientes do rompimento da barragem de Mariana-MG, onde as diluições não promoveram letalidade em exposição aguda e crônica, entretanto, em ambas as condições, houve diminuição da velocidade do nado e da distância percorrida nas maiores concentrações às quais os animais foram submetidos.

FIGURA 3- Gráfico em caixa comparando a distância entre os girinos expostos a *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Letras iguais indicam, para o mesmo composto, ausência de diferenças estatísticas ($p < 0,05$).



CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que o bioproduto à base de *B. bassiana* é praticamente não tóxico para girinos de *L. catesbeianus*, não havendo mortes durante o teste para CL50, corroborando com Zimmermann (2007). No entanto, para *M. anisopliae* a CL50 foi estimada em 47,7 ml/l, havendo um aumento de mortes conforme o aumento de concentração do bioproduto, mostrando que o produto pode ser tóxico em altas concentrações. Em relação a análise de perfil eritrocitário, os eritrócitos anucleados foram predominantes dentre as demais anormalidades nucleares, não havendo diferença entre o controle e tratados de *B. bassiana*. No entanto, os girinos tratados com *M. anisopliae* com 1ml/l (C1) e 10ml/l (C2) apresentaram um menor número de células com anomalias em comparação com controle, podendo refletir as condições metabólicas dos indivíduos ou uma baixa aeração em seus tanques. Finalmente, para o teste de comportamento de nado, analisando os produtos individualmente, tanto para *B. bassiana*, quanto para *M. anisopliae*, não houve diferença entre controle e os tratamentos.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

G.H.L.R. realizou a aclimação, manejo dos girinos e na execução da metodologia. R.Y.C auxiliou no cálculo das concentrações e coorientação; S.V.A. cedeu os compostos, os equipamentos para fotodocumentação e coorientação. L.F.B. contribuiu com as análises estatísticas e interpretação dos dados. R.Z. contribuiu na orientação, auxiliando na metodologia, no preparo do experimento e na revisão do conteúdo. Todos os autores contribuíram com a revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado, especialmente aos servidores técnicos de laboratório, ao IFSP Barretos e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - PIBITI - CNPq - Edital 213/2023.

REFERÊNCIAS

- AGENDA 2030. (2015). ODS – **Objetivos de desenvolvimento sustentável**. Disponível em: <http://www.agenda2030.com.br/>. Acesso em: 10 jan. 2024. BARNI, Sergio *et al.* Evaluation of *Rana snk* esculenta blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, v. 81, n. 1, p. 45-54, 2007.
- AGOSTINI, M. G. *et al.* Pesticides in the real world: The consequences of GMO - based intensive agriculture on native amphibians. **Biological Conservation**, v. 241, n. 108355, p.1-8, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006320719309905>. Acesso em: 30 nov. 2023.
- ASSIS, Rhayane Alves *et al.* Habitat differences affect the nuclear morphology of the erythrocytes and the hepatic melanin in *Leptodactylus fuscus* (Anura) in the Brazilian Cerrado savanna. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 43, p. 60741-60752, 2021.
- BARNI, Sergio *et al.* Evaluation of *Rana snk* esculenta blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 45-54, 2007.
- BENVINDO-SOUZA, Marcelino *et al.* Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. **Chemosphere**, v. 240, p. 124910, 2020.
- CARNEIRO, F. F. *et al.* Segurança Alimentar e nutricional e saúde. Parte 1. In CARNEIRO, Fernando Ferreira *et al.* (org.) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Disponível em: Acesso: 15 ago. 2017.
- FIJAN, N. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. **Journal of fish biology**, v. 60, n. 4, p. 999-1014, 2002.

GENTHNER, FRED J.; MIDDGAUGH, DOUGLAS P. Effects of *Beauveria bassiana* on embryos of the inland silverside fish (*Menidia beryllina*). **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2840-2845, 1992.

GONÇALVES, M. W. et al. Assessing Genotoxicity and Mutagenicity of Three Common Amphibian Species Inhabiting Agroecosystem Environment. **Archives Of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 409-420, 2019.

GIROTTO, L. *et al.* Acute and Chronic Effects on Tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) Exposed to Mining Tailings from the Dam Rupture in Mariana, MG (Brazil). **Water Air Soil Pollut**, 2020.

GRAÇAS, J. P. RIBEIRO, C., COELHO, F. A. A., CARVALHO, M. E. A., CASTRO, P. R. de C. e., **Microrganismos estimulantes na agricultura**, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Série Produtor Rural, No 59, Piracicaba, 2015.

LAZZARI, F.M., SOUZA, S.A., **Revolução Verde: impactos sobre os conhecimentos tradicionais**. Trabalho apresentado no 4 congresso internacional de direito e contemporaneidade, Santa Maria-RS 8 a 10 de novembro de 2017.

REHNER SA, BUCKLEY E, A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia** 97:84–98 (2005)

ROBERTS DW, ST LEGER RJ, **Metarhizium spp., cosmopolitan insectpathogenic fungi: mycological aspects**, in **Advances in Applied Microbiology**, ed. by Laskin AI, Bennet JW and Gadd GM. Elsevier Academic Press Inc, Cambridge, MA, pp. 1-70. 2004.