

Teste de fuga com minhocas (*Eisenia andrei*) em solo natural tratado com biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* para avaliação da qualidade do solo

Avoidance test with earthworms (*Eisenia andrei*) in natural soil treated with a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide to soil quality evaluation

Prueba de fugas con lombrices de tierra (*Eisenia andrei*) en suelo natural tratado con bioplaguicida a base de *Bacillus thuringiensis* para evaluar la calidad del suelo

Recebido: 18/06/2020 | Revisado: 28/06/2020 | Aceito: 29/06/2020 | Publicado: 11/07/2020

Kanitian Wálery Pereira Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2531-5407>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: kanitianwalery15@gmail.com

Wagner dos Santos Mariano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0225-6889>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: wagnermariano@uft.edu.br

Marcelo Gustavo Paulino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0464-6848>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: marcelopaulino@uft.edu.br

Resumo

Teste de fuga utilizando minhocas é uma importante ferramenta em estudos ecotoxicológicos preliminares da qualidade do solo. O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade do solo contendo *Bacillus thuringiensis* (Bt) como princípio ativo de um biopesticida, utilizando *Eisenia andrei* como bioindicador. O teste de toxicidade de contato em papel filtro foi baseado na norma OECD 207 e o teste de fuga foi baseado na ISO 17512-1, com modificações. Após período de exposição de contato não houve mortalidade, entretanto, excesso de muco liberado, movimentos letárgicos e diminuição dos reflexos aos toque foram observados em 100 mg L⁻¹. Estes resultados levantam a questão para entender se os efeitos subletais são relevantes quando se pensa nos efeitos fisiológicos que prejudicariam o organismo e em suas importantes funções no ecossistema. No teste de fuga, não houve

resposta ao Bt no solo, sugerindo que o biopesticida não altera a qualidade do solo ou apresenta toxicidade alta para *E. andrei*. O uso do Bt em biopesticidas indica poucos efeitos negativos aos anelídeos, o que sugere, pelo menos, uma alternativa viável em relação à grande toxicidade dos inseticidas químicos frequentemente usados na agricultura.

Palavras-chave: Teste de comportamento; Toxicidade; Biossensor; Oligoquetas; Ecotoxicologia terrestre.

Abstract

Tests using earthworms is an important preliminary screening tool in soil ecotoxicology studies. The aim was to evaluate the natural soil quality containing *Bacillus thuringiensis* (Bt) as an agent in a biopesticide using *Eisenia andrei* as bioindicator. The filter contact test was based on OECD 207 guideline and avoidance test based on ISO 17512-1, with modifications. After exposure by contact, no mortality was observed, however, excess mucus released lethargic movements and decreased touch reflexes were observed from 100 mg L⁻¹. These results raise the question of whether sublethal effects are relevant when about the physiological effects that would harm organism and their important functions in the ecosystem. In the avoidance test, there was no response to Bt soil, suggesting that the biopesticide does not alter the soil quality or present high toxicity to *E. andrei*. The use of Bt biopesticides indicates to few negative effects to annelids, what suggests, at least, a viable alternative in relation to the high toxicity of chemical insecticides frequently used in agriculture.

Keywords: Behavior test; toxicity; Biosensor; Oligochaetes; Terrestrial ecotoxicology.

Resumen

La prueba de evitación con lombrices de tierra es una herramienta preliminar importante en los estudios ecotoxicológicos de la calidad del suelo. El objetivo del estudio fue evaluar la calidad del suelo que contiene *Bacillus thuringiensis* (Bt) como ingrediente activo de un bioplaguicida, utilizando *Eisenia andrei* como bioindicador. La prueba de contacto en papel de filtro se basó en el estándar OECD 207 y la prueba de fugas se basó en ISO 17512-1, con modificaciones. Después de un período de exposición por contacto, no hubo mortalidad, sin embargo, se observó un exceso de moco liberado, movimientos letárgicos y disminución de los reflejos al tacto a 100 mg L⁻¹. Estos resultados plantean la cuestión de si los efectos subletales son relevantes al pensar en los efectos fisiológicos que dañarían al organismo y sus funciones importantes en el ecosistema. En la prueba de fuga, no hubo respuesta a Bt en el

suelo, lo que sugiere que el bioplaguicida no altera la calidad del suelo o tiene una alta toxicidad para *E. andrei*. El uso de Bt en bioplaguicidas indica pocos efectos negativos para los anélidos, lo que sugiere, al menos, una alternativa viable en relación con la gran toxicidad de los insecticidas químicos utilizados con frecuencia en la agricultura.

Palabras clave: Prueba de comportamiento; Toxicidad; Biossensor; Oligoquetas; Ecotoxicología terrestre.

1. Introdução

A contaminação de ecossistemas naturais, especialmente quando atribuído à áreas agrícolas, ocorre pela presença de agentes químicos. Uma alternativa para combater danos na produção e evitar produtos químicos é o uso de pesticidas biológicos, pretendidos por serem efetivos e trazer menos riscos para o ambiente e saúde pública (Galzer & Azevedo, 2016). É sabido que inseticidas comerciais derivados de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem sido relatado tendo grande eficácia no controle de insetos praga em lavoura, florestas e contra vetores de doenças (Malajovich, 2012).

Naturalmente encontrado no solo, a Bt é uma bactéria gram-negativa que produz cristais proteicos (proteínas cry) durante a esporulação, na qual tem uma toxicidade seletiva para alguns grupos de insetos (Zhao et al., 2016). O uso da Bt não é apenas limitado às formulações comerciais de pesticidas, também são utilizadas em agricultura transgênicas, onde são inseridos os genes produtores dos cristais, minimizando a necessidade da pulverização do biopesticida (Venter & Bøhn, 2016). A maior preocupação sobre o perfil do biopesticida ou da produção de transgênicos é devido ao fato que ele poderia causar efeitos tóxicos adversos ao meio ambiente e à biota (Gao et al., 2018). Poucos estudos ecotoxicológicos tem relatados os efeitos adversos do Bt ou da sua dinâmica no meio ambiente carregada por dispersão de pólen, exsudação radicular e movimentos pós-colheita, bem como efeitos em organismos não-alvos (Chen et al., 2018).

Testes ecotoxicológicos utilizando compostos químicos ou naturais são estabelecidos por organizações reguladoras, como a ISO (Organização Internacional de Normalização; do inglês *International Organization for Standardization*), a OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico; do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*) e da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Além das normas técnicas, vários estudos demonstraram indicações anteriores sobre os efeitos de poluentes em animais e humanos causados por exposições ambientais (Vampré et al., 2010).

De acordo com a ISO 17512-1 (2008) para testes em solo, o uso de minhocas do gênero *Eisenia* são recomendadas avaliar a qualidade do solo e os efeitos dos produtos químicos. A OCDE 207 (1984) destaca ainda que existem muitos métodos para testar a toxicidade de produtos químicos com minhocas, incluindo aplicação in situ, alimentação forçada, testes de reprodução e outros.

O uso de testes comportamentais são vantajosos, uma vez que a tendência natural das espécies é evitar solos com a presença de certos níveis tóxicos de compostos (García-Santos & Keller-Forrer, 2011), além de ser tão importantes quanto os testes de reprodução e crescimento. Garcia e colaboradores (2008) avaliaram o comportamento de fuga da espécie *Eisenia fetida* a três tipos de pesticidas (benomila, carbendazim e lambdacialotrina) e, analisando os resultados obtidos com o teste de letalidade e reprodução, concluíram que o ensaio de fuga é um dos meios mais confiáveis e reprodutíveis contra alterações ambientais. O uso do teste de fuga tem sido amplamente utilizado para determinar a qualidade do solo e o impacto de ecossistemas, permitindo assim tomar medidas preventivas ou corretivas para essa contaminação, entretanto, são realizados comumente em solo artificial tropical (SAT) (Sisinno et al., 2006; Silva, 2009).

A adaptação do teste de fuga é um grande desafio para complementar a avaliação de áreas contaminadas. Assim, outro tipo de solo a ser utilizado em testes são os naturais, trazidos do campo para o laboratório (Niva & Brown, 2019). Embora não atenda a todos os pedidos da OECD e da ISO como solo natural padrão, é um tipo de solo responsável por grande parte da produção de grãos e, portanto, alvo do uso de pesticidas (Cantelli, 2011).

No entanto, os estudos existentes ainda são realizados com algum tipo de efluente ou produtos químicos sintéticos. Não há relatos de testes ecotoxicológicos que identifiquem potencial de toxicidade em solos naturais contendo esporos de Bt ou suas proteínas-cry. Assim, optou-se por usar um solo natural de uma área rural, distante de qualquer resíduo agrícola, adaptando-o à avaliação de *E. andrei* como modelo biológico por meio de teste de toxicidade e comportamental na presença de Bt. O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade do solo natural contendo Bt como agente ativo de um biopesticida comercial, utilizando *E. andrei* como bioindicador.

2. Metodologia

Organismos teste e biopesticida

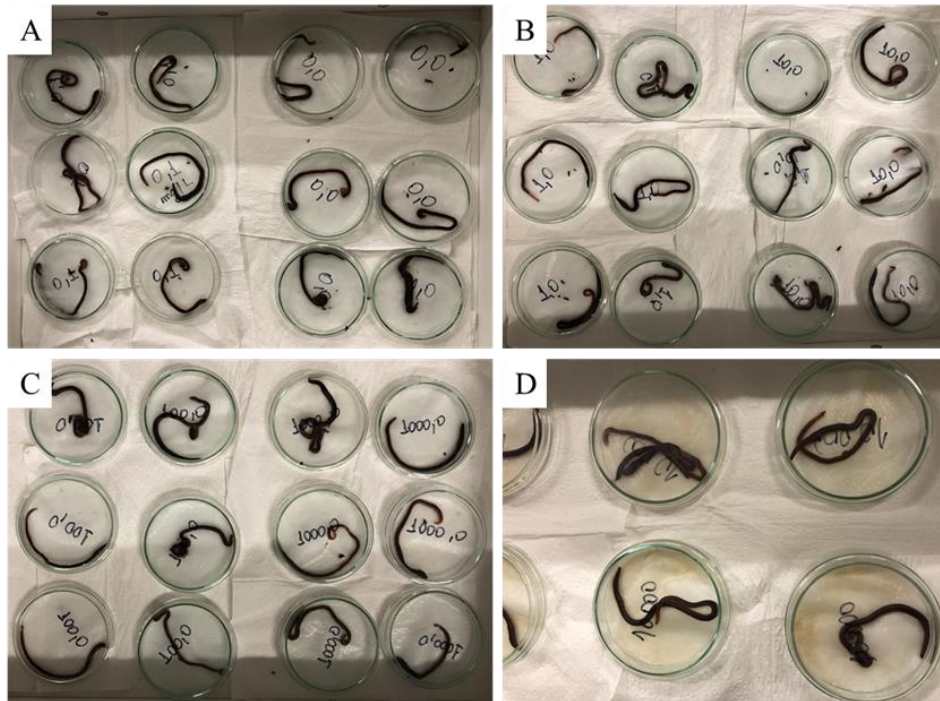
Minhocas da espécie *Eisenia andrei* (massa corpórea = $1,0 \pm 0,05$ g; comprimento total = $14,9 \pm 0,6$ cm) foram adquiridas de um minhocario local em Araguaína, TO. Os animais foram levados ao Laboratório de Morfofisiologia Animal Comparada da Universidade Federal do Tocantins. No processo de aclimação, as minhocas foram mantidas em substrato preparado pelo produtor (esterco de vaca, *Sphagnum* sp; 1:1), onde seguia o seguinte critério: humidade entre 70 – 85%, temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$, pH $6,5 \pm 0,5$, fotoperíodo natural (12:12 claro/escuro) e suplementados com esterco (livre de antibióticos) e produtos orgânicos semi-curados de origem vegetal (livre de fermentação) como sugerido pelo produtor e ISO 17512-1 (2008).

A formulação comercial Dipel® WP foi usada como fonte de esporos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, linhagem DH-1. Este biopesticida é amplamente utilizado em lavouras no Brasil e é registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Pertencente à classe de inseticidas biológicos de ingestão, a formulação contém 16.000 U mg⁻¹ (25 bilhões de esporos viáveis por grama de produto).

Teste de toxicidade de contato

O teste foi realizado com base na norma da OCDE 207 (1984), com adaptações de Klauck (2018). Placas de Petri revestidas com papel de filtro foram umedecidas com 4 mL de água destilada (controle) ou solução de Bt nas concentrações: 0,1; 1; 10; 100; 1.000 e 10.000 mg L⁻¹ (Figura 1). Os organismos foram adicionados individualmente na placa de Petri para cada concentração (n=6). Os recipientes foram fechados para evitar a fuga de organismos e mantidos no escuro a uma temperatura constante de 23°C. A exposição foi de 96 horas e os organismos foram observados a cada 12 horas. Ao final, os indivíduos tratados eram comparados com os animais do grupo controle.

Figura 1. Ensaio de exposição de contato direto com *Eisenia andrei* (n=6) sobre substrato de papel filtro umedecido com as soluções controle (água) e tratadas (solução do biopesticida) por 96 h. (A) grupo controle e concentração de 0,1 mg L⁻¹. (B) concentrações de 1 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹. (C) concentrações de 100 mg L⁻¹ e 1.000 mg L⁻¹. (D) concentração de 10.000 mg L⁻¹.



Fonte: Autores (2020).

Teste de fuga

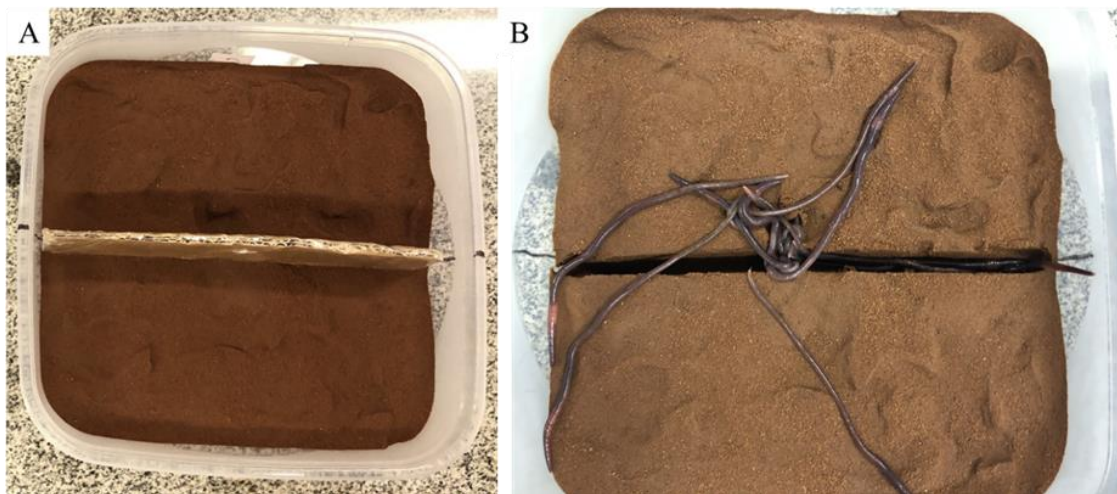
O solo natural (latossolo vermelho) foi coletado em uma área rural (7°18'50.2"S 48°04'05.4"O) livre de pesticidas a 30 km da cidade de Araguaína, TO, Brasil. A coleta foi realizada com a remoção da camada superior do solo, a uma profundidade de 20 a 30 cm da superfície, com a ajuda de uma escavadeira. O solo foi exposto ao sol para secar e depois peneirado em uma malha de 4 mm. As propriedades físicas e químicas do solo foram ajustadas em relação à sua capacidade de retenção de água e pH, seguindo recomendações da ISO 15537/2007.

A capacidade de retenção de água foi calculada ajustando a umidade a 45% da sua capacidade total, de acordo com a necessidade do teste para solo natural (Lima, 2010; Chini, 2014). Para isso, 25 gramas de solos foram adicionados em funil com papel filtro umedecido e uma mangueira interrompendo o fluxo. Em seguida, foi adicionado 20 mL de água destilada, deixando o solo absorver a água por 5 minutos. Após o período, foi liberado o fluxo deixando escoar toda a água em uma proveta. A diferença da água escoada e da adicionada foi

usada para o ajuste em 45% da capacidade de retenção. O pH do solo foi de $6,5 \pm 0,1$ com a leitura realizada através do medidor de pH (Modelo Orion Star A211, Thermo scientific). Para ser aceitável no teste ecotoxicológico, o pH natural do solo deve estar entre 5,5 e 7,0 (Chini, 2014).

Para todos os testes de fuga, terrários de plástico (300 cm²) foram divididos em duas seções iguais (150 cm²) por uma partição inserida verticalmente, onde cada lado do aparato recebeu 700 g de solo natural. O solo teve sua umidade ajustada em 45% de sua capacidade de retenção com água destilada ou solução de exposição (Figura 2A). O protocolo do teste (em triplicata) é iniciada no momento em que a partição foi removida e os animais (n=10) adicionados ao centro do terrário (ISO, 2008) (Figura 2B). Ao final das 96 horas de exposição, a divisória foi recolocada e os indivíduos contados em cada seção do terrário.

Figura 2. Representação do terrário para o ensaio do teste de fuga com *Eisenia andrei* (n=10) em solo natural (latossolo vermelho) umedecido com as soluções controle (água em um compartimento) e tratadas com 1.000 mg L⁻¹ do biopesticida (outro compartimento) por 96 h.



Fonte: Autores (2020).

Os testes tem o proposto de avaliar a qualidade do solo ao determinar a sua função habitável. Para isso, foram realizados exposições de um controle duplo, livre do contaminante (controle negativo), contendo água em cada seção do terrário. Esse teste é essência para observar o comportamento dos animais quanto sua preferência de locomoção e comportamento, pressupondo que os indivíduos devem ser distribuídos homogeneamente nas seções. Concomitantemente, foi realizado um teste com uma substância de referência para verificar a sensibilidade do organismo ao teste. Para isso, o ácido bórico (AB) foi utilizado na

concentração de 750 mg kg⁻¹ de solo. A substância referência em teste ecotoxicológico utilizando AB é recomendada pela OECD (Niemeyer et al., 2018). Nesse trabalho, uma seção continha apenas água destilada (controle individual) e a outra com a solução de AB.

O teste de fuga envolvendo exposição ao Bt seguiu apenas depois da exposição utilizando o controle duplo e controle positivo. A seção controle individual do teste recebeu apenas água destilada, enquanto na seção teste foi adicionada uma solução Bt na concentração de 1000 mg L⁻¹, na qual simulou a concentração média utilizada em algumas culturas (0,005 g cm²). Após a adição das soluções, a partição foi removida e os animais foram colocados no centro do terrário. Após 96 h, a partição foi substituída para contar os indivíduos em cada compartimento.

Análise dos dados

Os dados foram analisados de acordo com Nunes e Espíndola (2012). O teste de controle duplo foi considerado a partir do número de indivíduos em cada lado do terrário. O teste exato de Fisher bicaudal (p<0,05) foi utilizado em software GraphPad Prisma 5.0 para a significância da resposta. A hipótese nula pressupõe uma distribuição igual de indivíduos em ambos os lados do terrário.

No teste com AB e Bt no solo, a resposta foi calculada de acordo com as diretrizes da ISO: a porcentagem de organismos vivos no solo controle em relação ao número de indivíduos vivos no solo teste, é calculada de acordo com a fórmula:

$$E (\%) = [(CT) / N] \times 100$$

Onde, E = porcentagem de evasão; C = soma dos indivíduos observados no controle (somando as repetições); T = soma dos indivíduos observados nos testes (somando as repetições); N = Soma do total de indivíduos inseridos nas repetições. A hipótese nula assumiu que metade dos indivíduos no solo contaminado não tem efeito.

3. Resultados e Discussão

Bioensaios de avaliação de risco ambiental com invertebrados apresentam relevância, uma vez que estes organismos correspondem mais de 95% das espécies animais (Babic et al., 2016). Particularmente os oligoquetos são um importante componente do ecossistema terrestre, uma vez que são decompositores que promovem melhoria ao solo. Devido sua interação com o solo, podem profundamente ser afetadas pela contaminação ou degradação do

mesmo. Essa questão leva ao uso de minhocas como modelos bioindicadores (Klauck, 2018).

O teste de toxicidade de contato utilizando o papel de filtro é considerado um teste de triagem que permite entender melhor as características de produtos químicos potencialmente tóxicos para as minhocas no solo (OECD, 1984). Ao final da exposição, não houve mortalidade em nenhuma das concentrações testadas. A maior concentração subletal de Bt para *E. andrei* foi considerada superior a 10.000 mg L⁻¹. Embora tenha sido observado algum excesso de muco liberado, letargia e diminuição dos reflexos ao toque a partir da concentração de 100 mg L⁻¹, o biopesticida nas concentrações testadas não é letal para os organismos.

Esse tipo de alteração indica uma resposta direta ao contaminante, uma vez que o organismo se restringe à concentração testada. Mesmo que não cause mortalidade, a resposta observada ao contato com Bt pode ser considerada positiva e demonstra que as minhocas podem apresentar outros tipos de alterações, quando expostas a determinados contaminantes, que levariam algum prejuízo morfofisiológico. A liberação de muco pelas minhocas ocorre através dos poros do epitélio e, de acordo com Edwards e Bohlen (1996), o comportamento de aumentar a produção de muco por esses organismos é uma função do sistema excretor e atua como um mecanismo de defesa para proteger substâncias indesejadas. O muco contém celomócitos que são células responsáveis pelo sistema imune que atuam no combate a agentes externos e infecções microbianas (Klauck, 2018).

Em testes toxicológicos realizados com papel de filtro com as espécies *E. andrei*, Pereira et al. (2019) avaliaram o efeito do fungicida Imazalil e relataram que algumas minhocas mostraram letargia e sensibilidade ao toque quando estimuladas com pinças. Além disso, os autores observaram anormalidades morfológicas nos organismos em todas as concentrações testadas, dentre elas, inchaço (causado por edema), estrangulamento nos segmentos corporais e perda de pigmentação. Neste estudo, quando expostas ao Bt, os indivíduos não apresentaram quaisquer alterações morfológicas no corpo. Esse resultado sugere que, mesmo que haja algum tipo de defesa principal, o Bt não causa perda de homeostasia pela parede corpórea.

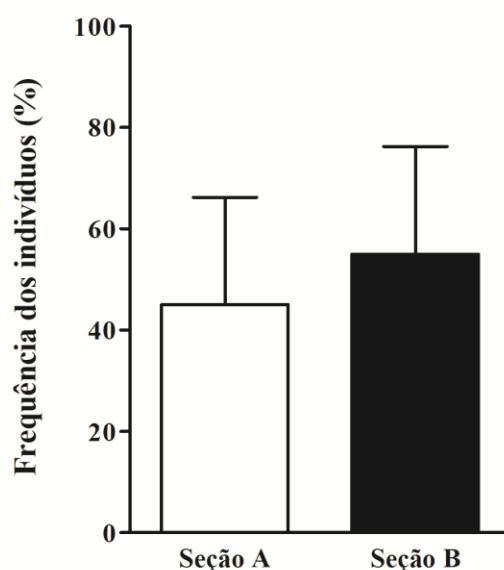
O uso de testes ecotoxicológicos que visam estimar a qualidade do solo, utilizando organismos-testes tem se tornado um importante instrumento na avaliação das características físico-química do solo, além de permitir uma avaliação da toxicidade à biota de grande importância ao solo em questão. Avaliar o nível de alteração que compromete a qualidade do solo pela mensuração de suas características físico-químicas, comparados com propriedades consideradas ideais ao solo natural apresenta certas dificuldades. Adicionados a isso, anos são

necessários para verificar resposta às alterações da propriedade do solo às que interferem os sistemas de manejo e preservação. A qualidade do solo é uma ferramenta no planejamento agrícola, da qual possibilita identificar e aperfeiçoar os sistema de manejo com alta produtividade e preservação ambiental (Amado et al., 2007).

Em seu trabalho, Nunes e Espíndola (2012) relatam que testes ecotoxicológicos usando SAT são ferramentas importantes em uma abordagem em camadas para avaliar o risco de produtos no solo, no entanto, pouco foi descrito sobre esses testes em solos naturais visando na qualidade do solo habitável. Nesse estudo, optou-se por realizar os testes comportamentais com anelídeos em solo natural, seguindo as especificações das normas ISO (2008) e OCDE (1984) para validação do teste de fuga para Bt. Segundo Oliveira et al. (2018), os solos naturais são considerados importantes devido à sua relevância ecológica, especialmente em regiões tropicais, onde há uma quantidade considerável de informações sobre os efeitos de diferentes xenobióticos em espécies nativas. Assim, o uso de solos naturais tornou-se uma ferramenta importante em testes ecotoxicológicos.

É de suma importância, em testes de fuga, realizar o bioensaio do controle duplo e da substância referência. Tais resultados garantem que a distribuição de minhocas nos contêineres não seja influenciada por outros fatores e que verifique a sensibilidade dos organismos cultivados ao longo do tempo (Niemeyer et al., 2018). No controle duplo, ao longo do teste, os organismos se moveram igualmente entre as duas seções (Figura 3), sem mostrar preferência por um lado do recipiente ou pelo restante agrupado.

Figura 3. Porcentagem média (\pm EPM) da frequência do organismo ($n = 10$) em cada lado do terrário no teste de controle duplo para solo natural. Não há diferença significativa ($p > 0,05$) na distribuição do organismo de acordo com o teste exato de Fisher.



Fonte: Autores (2020).

Para o teste AB, a concentração da substância de referência causou uma resposta positiva de fuga após a exposição (Tabela 1). Andreatta (2013) afirma que substâncias de referência são essenciais para testes ecotoxicológicos em laboratórios, porque garantem a qualidade analítica de estudos que realizam testes de toxicidade aguda e avaliam mudanças sazonais na sensibilidade dos organismos.

Tabela 1. Porcentagem de evasão devido à presença de ácido bórico (controle positivo) usado para validar o teste de fuga por *Eisenia andrei* em solo natural.

Disposição dos indivíduos nos compartimentos	Número de organismos
Controle	19
Ácido Bórico (750 mg kg^{-1})	01
Comportamento de fuga	90 %

Fonte: Autores (2020).

Assim, considerando que o resultado obtido nos testes preliminares permaneceram dentro dos padrões estabelecidos pela ISO 17512-1 (2008), o teste pôde ser considerado validado para o estudo com o biopesticida à base de Bt. O princípio do teste é baseado no fato de que as minhocas têm quimiorreceptores em todo o corpo, o que lhes permite detectar a

presença de vários contaminantes no ambiente (Nunes & Espíndola, 2012). Esses órgãos sensoriais, dependendo da concentração de poluentes, podem detectar e prevenir áreas contaminadas (Sousa & Andréa, 2011).

Após a realização do teste de fuga utilizando o biopesticida, a porcentagem de evasão de organismos foi de 0% (Tabela 2). Optou-se por utilizar concentrações de grande relevância ecológica (consideradas concentrações mais baixas) até altas concentrações (não ecologicamente relevantes), a fim de verificar os possíveis efeitos que o Bt poderia causar em contato direto com as minhocas.

Tabela 2. Percentual de evasão devido à presença do biopesticida Dipel® WP no solo natural para teste de evasão aguda por *Eisenia andrei*.

Disposição dos indivíduos nos compartimentos	Número de organismos
Controle	15
Solo natural contendo biopesticida (1000 mg L ⁻¹)	15
Comportamento de fuga	0 %

Fonte: Autores (2020).

As concentrações letais de Bt para esses organismos foram consideradas superiores a 10.000 mg L⁻¹, acima do limite estipulado ao teste, no qual não seria viável continuar testando concentrações maiores em testes ecotoxicológicos como este, pois essa exposição seria inviável, considerando a aplicação desses produtos nas lavouras. De acordo com as diretrizes de aplicação do herbicida, a quantidade de biopesticida na cultura é em média 1000 mg L⁻¹, o que corresponde a uma área de cobertura de 0,005 g de Bt por hectare.

Quando expostos a contaminantes, os anelídeos podem exibir certas respostas comportamentais, sendo o comportamento de fuga o primeiro sinal prontamente demonstrado pelos organismos como mecanismo de defesa (Candello, 2014). Para Lukkari et al. (2005), a principal vantagem dos testes de fuga é a curta duração, visando a avaliação de locais contaminados onde é necessário uma resposta rápida, que é bastante viável, em comparação com testes agudos que levam 14 dias e testes de reprodução de 56 dias.

O teste ecotoxicológico com Bt aplicado neste estudo demonstrou que a espécie *E. andrei* apresenta pouca sensibilidade ao biopesticida, uma vez que, em solo natural não houve comportamento de fuga do solo contaminado, indicando a não interferência do biopesticida nos processos fisiológicos de *E. andrei*. Deve-se considerar que o biopesticida Dipel WP é uma formulação comercial contendo 33,6 g L⁻¹ de esporos ativos de Bt, correspondendo a 3,36% da razão m/v da formulação. Os 96,64% restantes são compostos de ingredientes

inertes pelo fabricante. Por outro lado, não se descarta que o Bt em formulações comerciais poderia sofrer interações com os ingredientes inertes e minimizar possíveis efeitos tóxicos no organismo.

Nunes e Espindola (2012) pontuam que cada vez mais estudos devem ser realizados para entender melhor as respostas das minhocas a alguns produtos e por que as minhocas não conseguem detectar alguns produtos químicos. Em experimentos com organismos não-alvo usando altas concentrações da proteína Cry isolada produzida por Bt, Lima (2010) não observou nenhuma alteração na atividade fisiológica desses organismos invertebrados. Esses resultados sugerem que a espécie *E. andrei* pode pertencer a grupos de animais não-alvo que não são afetados pelo Bt ou seus cristais. Vale ressaltar que, atualmente, muitas espécies de *Bacillus* são utilizadas na produção de antibióticos/metabólitos que contêm efeitos antagonistas contra microrganismos patogênicos, nos quais foram utilizados na medicina e na indústria farmacêutica para controlar várias doenças em humanos, animais e plantas como agente de controle biológico devido à sua capacidade de sintetizar uma grande variedade de metabólitos com atividade antimicrobiana (Kuebutornye et al., 2019).

Apesar de escasso, alguns outros estudos foram realizados com animais não-alvo expostos a várias concentrações de formulações de Bt, como mamíferos e insetos (Berg, 1984; Roe et al., 1991). Nos mamíferos, os cristais de Bt causaram mortes quando injetados diretamente na cavidade abdominal. Isso sugere que a Bt pode ser tóxica para mamíferos, no entanto, quando a exposição ocorre por vias normais (oral, cutânea ou inalatória), o metabolismo ou a eliminação da toxina impedem a toxicodinâmica dos cristais em mamíferos (Roe et al., 1991). Em peixes, o biopesticida mostrou alterações fisiológicas nos parâmetros sanguíneos de *Piaractus mesopotamicus* expostos na água e através da adição de Bt na dieta (Mariano et al., 2019). No entanto, na aquicultura, o *Bacillus* é usado como probiótico e se destaca por ser uma dos gêneros mais utilizadas, por ter melhores propriedades probióticas, fornecer nutrientes e crescimento do hospedeiro, além de melhorar a capacidade do peixe de ser resistente a micróbios patogênicos (Kuebutornye et al., 2019).

Ainda assim, no tratamento de favos de mel com Bt var. Aizawai, nenhum efeito prejudicial foi observado nas abelhas ou no mel produzido (Berg et al., 1984). Embora tenha sido demonstrado que as formulações de Bt são menos prejudiciais ao meio ambiente do que os produtos químicos, ainda existem poucos estudos relacionados às vantagens e desvantagens do uso de compostos contendo Bt. O uso de biopesticidas tem reduzido os problemas de bioacumulação, principalmente em organismos terrestres, devido à sua rápida biodegradação em condições naturais (Pino-Otín et al., 2019). No entanto, é importante

ênfatizar que o uso de minhocas como único representante dos invertebrados do solo não é suficiente para avaliar os riscos de pesticidas no solo (Römbke et al., 2008). Os fatores de riscos que poderiam ser evidentes com o uso de Bt em lavouras é pouco explorado, apesar de ser considerado pouco tóxico. Por outro lado, não se deve relaxar em preocupações com o uso demasiado de qualquer pesticida que possa ser aplicado na lavoura e seus efeitos a organismos não-alvos.

4. Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a adaptação do teste de fuga utilizando solo natural e *E. andrei* como bioindicador, é eficaz para determinar o potencial tóxico de Bt em formulações comerciais quando estes estão presente no solo após aplicações na lavoura. O teste fornece uma ferramenta de triagem para avaliações de risco em locais que sofrem com possíveis contaminações devido à aplicação excessiva desses produtos. Embora a sensibilidade seja diferente para cada espécie, incluindo espécies de oligoquetos, o Bt demonstrou ser inerte para *E. andrei* e sugere promover menor risco ou alterar a qualidade do solo. Embora a mortalidade não tenha ocorrido, em altas concentrações do produto a sensibilidade do organismo à presença direta do biopesticida foi observada, o que demonstra que efeitos prolongados possam comprometer funções vitais como desenvolvimento e reprodução. É importante que após testes de triagem como o de contato direto e fuga, sejam realizados testes como de reprodução e biomarcadores moleculares em células ou tecidos em solos naturais, para que obtenha-se um conhecimento aprofundado dos efeitos do Bt em organismos não-alvos.

Referências

Amado, T. J. C., Conceição, P. C., Bayer, C., & Eltz, F. L. F. (2007). Qualidade do solo avaliada pelo “soil quality kit test” em dois experimentos de longa duração no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31, 109-121. DOI: 10.1590/S0100-06832007000100012

Andreatta, L. F. O. K. M. (2013). *Avaliação de toxicidade de três substâncias de referência ao microcrustáceo Daphnia magna*. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal Tecnológica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Babić, S., Barišić, J., Bielen, A., Bošnjak, I., Klobučar, R. S., Ujević, I., & Strunjak-Perović et al. (2016). Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol A concentrations using the soil invertebrate *Eisenia fetida*. *Journal Hazardous Materials*, 15(318), 477-486. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.017

Berg, G. L. (1984). *Farm chemicals handbook*. Willoughby, OH. 1st ed., Ohio USA: Meister Publishing Company; 1984.

Candello, F. P. (2014). *Comportamento de fuga de minhocas na presença do antimicrobiano sulfadiazina em solo*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Cantelli, K. B. (2011). *Toxicidade aguda de carbofurano e carbendazim a minhocas em solo natural*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Chen, Y., Yang, Y., Zhu, H., Romeis, J., Li, Y., Peng, Y., & Chen, X. (2018). Safety of *Bacillus thuringiensis* Cry1C protein for *Daphnia magna* based on different functional traits. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 631-636. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.08.065

Chini, P. (2014). *Uso de minhocas da espécie Eisenia fetida, como bioindicadores em solos contaminados com agrotóxicos*. Monografia de conclusão de curso. Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, SC.

Edwards, C. A., & Bohlen, P. J. (1996). *Biology and ecology of earthworms*. 3rd ed., London: Chapman & Hall.

Galzer, E. C. W., & Azevedo Filho, W. S. (2016). Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. *Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada -USC*, 01, 13-16.

Gao, Y. J., Zhu, H. J., Chen, Y., Li, Y. H., Peng, Y. F., & Chen, X. P. (2018). Safety assessment of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry1C and Cry2A with a zebrafish

embryotoxicity test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(17), 4336-4344. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b01070

Garcia, M., Römbke, J., Brito, M. T., & Scheffczyk, A. (2008). Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution*, 153(2), 450-456. DOI:10.1016/j.envpol.2007.08.007

García-Santos, G., & Keller-Forrer, K. (2011). Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere*, 84(5), 651-656. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.036

ISO - International Organization for Standardization. (2008). *ISO 17512-1 – Soil quality: Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior – Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*, ISO guideline: Geneva, Switzerland.

Klauck, C. R. (2018). *Tratamento de efluente petroquímico: avaliação da toxicidade*. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Brasil.

Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., & Yishan, L. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 820-828. DOI:10.1016/j.fsi.2019.02.010

Lima, N. C. (2010). *Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.

Lukkari, T., Aatsinki, M., Väisänen, A., & Haimi, J. (2005). Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology*, 30(2), 133-146. DOI: 10.1016/j.apsoil.2005.02.001

Malajovich, M. A. (2012). *Biotecnologia 2011*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT.

Mariano, W. S., Azevedo, S. B., Gomes, F. L., Lima, L. B. D., Moron, S. E., & Tavares-Dias, M. (2019). Physiological parameters of *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) exposed to a biopesticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(2), e20180474. DOI: 10.1590/0001-3765201920180474

Niemeyer, J. C., Carniel, L. S. C., Pech, T. M., Crescencio, L. P., & Klauberg-Filho, O. (2018). Boric acid as a reference substance in avoidance behaviour tests with *Porcellio dilatatus* (Crustacea: Isopoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 392-396. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.058

Niva, C. C., & Brown, G. G. (2019). *Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas*. 1st ed. Brasília: Embrapa.

Nunes, M. E., & Espíndola, E.L. (2012). Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology*, 21(4), 1063-1071. DOI: 10.1007/s10646-012-0859-6.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. (1984). *Guideline N° 207 - Earthworm, Acute Toxicity Tests, Organization for Economic Co-operation and Development*. (OECD): Paris, France.

Oliveira, V. B. M., Bianchi, M. O., & Espíndola, E. L. G. (2018). Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(11), 2919–2924. DOI: 10.1002/etc.4056.

Pereira, P. C. G., Soares, L. O. S., Júnior, S. F. S., Saggiaro, E. M., & Correia, F. V. (2019). Sub-lethal effects of the pesticide imazalil on the earthworm *Eisenia andrei*: reproduction, cytotoxicity, and oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research*

International [published online ahead of print, 2019 May 22]. DOI: 10.1007/s11356-019-05440-3

Pino-Otín, M. R., Val, J., Ballesteros, D., Navarro, E., Sánchez, E., González-Coloma, A., & Mainar, A. M. (2019). Ecotoxicity of a new biopesticide produced by *Lavandula luisieri* on non-target soil organisms from different trophic levels. *Science of the Total Environment*, 671, 83-93. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.293

Roe, R. M., Kallapur, V. L., Dauterman, W. C., & Edens, F.W. (1991). Vertebrate toxicology of the solubilized parasporal crystalline proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. In: Hodgson, E.; Roe, R. M. & Motoyama, N. (Eds.) *Pesticides and the Future: Toxicological Studies of Risks and Benefits*. (pp.384) 1st ed. United States: North Carolina State University Press.

Römbke, J., Waichman, A. V., & Garcia, M. V. B. (2008). Risk assessment of pesticides for soils of the Central Amazon, Brazil: comparing outcomes with temperate and tropical data. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4(1), 94-104. DOI: 10.1897/ieam_2007-052.1.

Silva, M. (2009). Pesticide effects on earthworms: A tropical perspective. Enschede: Ipskamp Drukkers BV.

Sisinno, C. L. S., Bulus, M. R. M., Rizzo, A. C., & Moreira, J. C. (2006). Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1(2), 137-140. DOI: 10.5132/jbse.2006.02.009

Sousa, A. P. A. de, & Andréa, M. M. (2011). Earthworm (*Eisenia andrei*) avoidance of soils treated with cypermethrin. *Sensors*, 11(12), 11056-11063. DOI: 10.3390/s111211056

Vampré, T. M., Fuccillo, R., & Andréa, M. M. (2001). Oligocheta *Eisenia andrei* como bioindicador de contaminação de solo por hexaclorobenzeno. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(1), 59-66. DOI: 10.1590/S0100-06832010000100006.

Hund-Rinke, K., & Wiechering, H. (2001). Earthworm avoidance test for soil assessments. *Journal of Soils and Sediments*, 1, 15–20. DOI: 10.1007/BF02986464

Venter, H. J., & Bøhn, T. (2016). Interactions between Bt crops and aquatic ecosystems: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, 2891–2902. DOI: 10.1002/etc.3583

Zhao, Z.; Li, Y., Xiao, Y., Ali, A., Dhillon, K. H., Chen, W., & Wy, K. (2016). Distribution and metabolism of Bt-Cry1Ac toxin in tissues and organs of the cotton Bollworm, *Helicoverpa armígera*. *Toxins*, 8(7):pii212. DOI: 10.3390/toxins8070212

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Kanitian Wálery Pereira Soares – 50%

Wagner dos Santos Mariano – 20%

Marcelo Gustavo Paulino – 30%