

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Efecto del bioplaguicida *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911), cepa 344, en organismos indicadores del compartimiento acuático.

Claudio Martín Jonsson¹, Aline de Holanda Nunes Maia¹, Deise María Fontana Capalbo¹, Onelio Carballo Hondal².

¹Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, Km 127,5, Jaguariúna, SP, Brasil, CP69, CEP13820-000. jonsson@cnpma.embrapa.br

²Centro de Investigaciones Pesqueras, 5ta Ave y 246. Playa. C.P. 19100. La Habana. Cuba. onelio@cip.telemar.cu

Correspondencia E-mail: jonsson@cnpma.embrapa.br

Resumen

El *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (*Bt*) es una bacteria que contiene endotoxinas con acción insecticida para varias especies. A pesar de la conocida inocuidad de la utilización de *Bt* y otros bioplaguicidas utilizados en la lucha contra las plagas, ha habido algunos informes acerca de las infecciones y los efectos adversos sobre los organismos no blanco, entre estos, especies acuáticas. En este estudio, se evaluó los efectos derivados de la exposición a la cepa 344 del *Bt* (*Bt344*) en algunos organismos de diferentes niveles tróficos de la cadena alimentaria acuática. Los organismos de prueba estuvieron expuestos a concentraciones correspondientes a más de 1.000 veces la tasa de aplicación efectiva para controlar el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*). El *Bt344* no alteró los patrones de crecimiento de las algas *Pseudokirchneriella subcapitata*. Una tasa de mortalidad significativa equivalente a 8,9%, pero menor que el límite aceptable para el control (10%), se registró para el pez *Hyphessobrycon scholzei*. Sin embargo, la exposición al agente biológico disminuyó la supervivencia de *Daphnia similis* en 44,8%, en comparación con el control. Esto sugiere un riesgo para algunas especies acuáticas de invertebrados.

Palabras clave: toxicidad, pez, daphnia, alga, biopesticida

Abstract

Effect of the biopesticide *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911), strain 344, on indicators organisms of the aquatic compartment.

Bacillus thuringiensis (Berliner, 1911) (*Bt*) is a bacterium which contains endotoxins with insecticide action against several insect pests. *Bt* and other 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 344 strain of *Bt* (*Bt344*). The test-organisms were exposed to concentrations corresponding to more than 1,000 fold the application rate of biopesticide which is capable to control the corn worm *Spodoptera frugiperda*. *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.

Key words: toxicity, fish, *Daphnia*, algae, biopesticide

Introducción

Bacillus thuringiensis (Berliner, 1911) (*Bt*) es una bacteria que forma esporas capaces de producir inclusiones cristalinas de delta-endotoxinas responsables por la actividad insecticida, especialmente para las especies pertenecientes a las órdenes de los dípteros, hemípteros, coleópteros, lepidópteros e himenópteros, entre otros (Polanczyk & Alves, 2003) .

A pesar de la conocida inocuidad del uso de *Bt* (OMS, 1999) y otros bioplaguicidas (El-Sayed, 2005, Azevedo *et al.*, 2007) para combatir los problemas causados por las plagas, ahora hay una gran tendencia a analizar con precisión el uso seguro de estos agentes biológicos. Esto se debe a su capacidad de propagación, la supervivencia y la proliferación en otros ambientes donde hay riesgo de infección de los organismos no blanco.

Por lo tanto, la importancia de los estudios sobre el impacto ambiental de los organismos entomopatógenos, con el fin de minimizar los riesgos ambientales, es proporcionar información acerca de la posibilidad de sustituir los insecticidas convencionales, o el uso simultáneo con ellos. Según O'Callaghan *et al.* (2000), las generalizaciones acerca de la seguridad ambiental de *Bt* son difíciles de sostener. Esto es debido a la gran variedad de cepas y diferentes condiciones ambientales a las que el agente biológico y el organismo no blanco están sujetos (Polanczyk & Alves, 2003).

Así, según O'Callaghan *et al.* (2000), evaluaciones de impacto deben realizarse caso por caso. De hecho, ha habido algunos informes acerca de las infecciones y de los efectos adversos sobre los organismos acuáticos no blanco por los bioplaguicidas *Metarhizium anisopliae* (Genthner *et al.*, 1995), *Beauveria bassiana* (Fromtling *et al.*, 1979; Genthner *et al.*, 1994) y *Bt* (Ali, 1981; Grisolia *et al* 2008; Duchet *et al*, 2008) bajo vías de exposición diferentes.

La cepa 344 fue identificada como *Bacillus thuringiensis* var. Tolworth y mostró un crecimiento satisfactorio en un medio alternativo que contiene jarabe de maíz y harina de soja. En condiciones de laboratorio, esta variedad tiene una alta eficiencia en el

control del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Valicente & Zanasi, 2005).

Los estudios de campo realizados con *Bt* var. Tolworth han demostrado que las plantas tratadas con suspensiones que contengan aproximadamente 2×10^6 esporas mL^{-1} son capaces de matar a 100% de las larvas en 2 días de aplicación (Capalbo *et al.*, 2001).

Se observa que en la actualidad hay una falta de datos sobre el riesgo ecotoxicológico de cepas de *Bt* con potencial para su uso en la agricultura. En este contexto, se han propuesto bioensayos con algas, invertebrados acuáticos y peces para la evaluación del riesgo del uso de agentes de control biológico como los plaguicidas (USEPA, 1989; Jonsson & Maia, 1999; Castro *et al.*, 2001). Estos organismos bioindicadores son los mismos utilizados para estudios ecotoxicológicos con plaguicidas químicos.

En el presente estudio se evaluó el efecto sobre algunos organismos de diferentes niveles tróficos de la cadena alimentaria acuática debido a la exposición a la cepa 344 de *Bt* (*Bt* 344).

Materiales y Métodos

Agente biológico. Una cepa de *B. thuringiensis* (Berliner, 1911) cepa 344 (*Bt344*) fue proporcionada amablemente por el Dr. Fernando Valicente, investigador de Embrapa Maíz y Sorgo, Sete Lagoas (MG). Los microorganismos se cultivaron en el medio nutriente Merck (peptona de carne / extracto de carne, 8 g L^{-1}) con la adición de K_2HPO_4 ($0,5 \text{ g L}^{-1}$).

Para obtener el agente activo se hizo la producción en masa de la bacteria de acuerdo con la metodología establecida en el Laboratorio de Productos Biológicos de la Embrapa Medio Ambiente (Capalbo *et al.*, 2001). El método consiste básicamente en una etapa de pre-fermentación, que asegura la fase activa de crecimiento de las células microbianas, seguida por una etapa de la producción efectiva (o fermentación). Como resultado de esta segunda etapa, se obtuvo una biomasa por centrifugación, que luego

se lavó dos veces con agua estéril hasta que el sobrenadante se hizo incoloro y transparente.

La biomasa resultante de esta centrifugación se suspendió en una cantidad de agua de dilución con el fin de proporcionar una suspensión final con una concentración de aproximadamente 10^{10} unidades infecciosas (u.i) por mL. La concentración final de u.i. fue determinada por el recuento de las colonias en las placas de Petri (Thompson & Stevenson, 1984).

Las suspensiones del bioplaguicida, en concentraciones conocidas para la ejecución de las pruebas, consistieron en recipientes conteniendo *Bt344 AA* (Agente activo = biomasa de células viables de *Bt344*) y *AI* (Agente inactivado = *AA* sometido a autoclave a 121 °C durante 20 minutos). Con relación a este último, la confirmación sobre la ausencia de células viables en los recipientes se realizó mediante el conteo de células después de la esterilización en autoclave.

Evaluación del efecto sobre los organismos bioindicadores. Las pruebas con bioindicadores que pertenecen a diferentes niveles tróficos de la cadena alimentaria se basan en la metodología propuesta por Jonsson & Maia (1999) y por USEPA (1989). Según estos autores, el riesgo ambiental puede ser determinado a través del enfoque del "peor caso" usándose una dosis del agente biológico de por lo menos 1000 veces mayor que la recomendada en campo, y que esta dosis encuentre una capa de agua de 15 cm de profundidad. Siendo así, las dosis de prueba en el presente trabajo fueron calculadas con base en esos protocolos experimentales.

Evaluación del riesgo de la dosis máxima de exposición en los organismos del fitoplancton: En el experimento con algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, el agua de dilución consistió en un medio de cultivo preparado de acuerdo con el procedimiento de la OECD (1981). Se evaluaron los siguientes tratamientos en réplicas de cinco unidades (recipientes de 200 mL) por tratamiento: a) control (sin *Bt344*), b) con *Bt344 IA* (10^6 u.i. mL⁻¹ autoclaveadas), y c) con *Bt344 AA* (10^6 u.i. mL⁻¹ no autoclaveadas). Estos dos

últimos tratamientos se prepararon por dilución de una suspensión madre que contiene el agente biológico.

La concentración inicial de algas en la suspensión de prueba fue de aproximadamente 10^4 - 10^5 células por mililitro. Las suspensiones fueron expuestas durante 7 días a una temperatura de 20 ± 2 °C y a la intensidad de luz de aproximadamente 2000 lux. El muestreo en cada recipiente se llevó a cabo periódicamente con el fin de evaluar la tasa de reproducción de las algas en función del tiempo. Alícuotas de la suspensión de algas se fijaron Lugol acético y se almacenaron en el refrigerador para el recuento de células de *P. subcapitata* por microscopía de luz en una cámara Neubauer.

La tasa de crecimiento (TX) se calculó por regresión linear simple de los datos de la biomasa (y) en función del tiempo (x). TX para cada tratamiento corresponde al respectivo coeficiente angular del modelo de regresión ajustado que es expresado en la unidad correspondiente de biomasa (logaritmo neperiano del número de células por mililitro) por unidad de tiempo (días).

Evaluación del riesgo de la dosis máxima de exposición en los organismos del

zooplancton: En el experimento con el invertebrado acuático *Daphnia similis*, el agua de dilución se preparó de acuerdo a los procedimientos de Hosokawa et al. (1991) y Elendt y Bias (1990). El número inicial de organismos en cada unidad experimental conteniendo 500 mL, fue de 12 neonatos. Los tratamientos, evaluados en réplicas de seis unidades experimentales (recipientes de 600 mL) fueron los siguientes: a) control (sin *Bt344*), b) con *Bt344 IA* (10^6 u.i. mL⁻¹ autoclaveadas), y c) con *Bt344 AA* (10^6 u.i. mL⁻¹ no autoclavadas).

El período de exposición de los organismos fue de 21 días en sistema semiestático, es decir, con la renovación del medio a cada 48 horas, 96 y 168 en cada semana. La temperatura de exposición y la luminosidad fueron 20 ± 2 °C y ~ 2.000 lux, respectivamente. El muestreo para evaluar el número de recién nacidos/adulto/ día y la tasa de mortalidad se realizó antes de cada renovación del medio.

Para cada tratamiento, los siguientes parámetros fueron estimados en cada fecha de evaluación: a) promedio de los neonatos producido por recipiente; b) promedio de los neonatos producidos por adulto por día (PNAD); c) tasa neta de reproducción (Ro: número promedio de neonatos producidos por adulto, por día, que sobreviven a la edad adulta); d) la supervivencia de los adultos durante el período de evaluación

Para cada tratamiento, los siguientes parámetros fueron estimados en cada fecha de evaluación: a) promedio de los neonatos producido por recipiente; b) promedio de los neonatos producidos por adulto por día (PNAD); c) tasa neta de reproducción (Ro: número promedio de neonatos producidos por adulto, por día, que sobreviven a la edad adulta); d) la supervivencia de los adultos durante el período de evaluación.

Evaluación del riesgo de la dosis máxima de exposición en vertebrados

acuáticos: Como organismo de prueba, la especie de pez que se utilizó fue *Hyphessobrycon scholzei* (familia Characidae), popularmente como "Lips" o "Tetra-listra-preta". Los animales fueron comprados de un proveedor local y previamente aclimatados a las condiciones de laboratorio en tanques de agua de asbesto-cemento, por un período mínimo de una semana.

La prueba se llevó a cabo en acuarios de vidrio, en un volumen total de 15 L conteniendo agua de la red de abastecimiento público, con las características físico-químicas siguientes: pH 7,2, dureza total de 36 mg / L CaCO₃ y conductividad de 243 μS/cm⁻¹. El agua era declorinizada añadiendo declorinizador a base de tiosulfato de sodio "Aguasafe Tetra". Los tratamientos fueron: a) control (sin *Bt344*), b) con *Bt344 IA* (10⁶ u.i. mL⁻¹ autoclaveadas), y c) con *Bt344 AA* (10⁶ u.i. mL⁻¹ no autoclaveadas). Los acuarios fueron aireados continuamente a través de una piedra porosa y minicompresor de aire. Cada tratamiento se realizó por triplicado y cada acuario con 15 peces adultos pesando un promedio de 0,84 g. Los peces fueron expuestos a una intensidad de luz de ~1.000 lux en una sala a 25 ± 2 °C durante 30 días.

Todos los días, los animales fueron alimentados *ad libitum* con alimento floculado "Nutrafish básica, Nutral Ind. Ltda" y fueron observados en cuanto la aparición de

signos de anormalidad. Semanalmente, la renovación de los tratamientos se realizó a través de la preparación de nuevas suspensiones del bioplaguicida y la colocación de los organismos de prueba en ellas. En ese momento, el recuento se realizaba para calcular la tasa de supervivencia de los peces.

Análisis estadístico. Las tasas de crecimiento de las algas, en la presencia y en la ausencia del agente biológico, fueron comparadas utilizando un ANOVA (Análisis de Varianza) seguido por una comparación múltiple a través del test de "Contraste Múltiple de Rango - LSD de Fisher - Diferencia Significativa Menor".

El PNAD y la tasa neta de reproducción de *D. similis* se compararon mediante el test F para contrastes (Montgomery, 1990). Las tasas de supervivencia de este organismo al final del período de evaluación se compararon mediante el test de Wald (Stokes et al, 2000).

El test exacto de Fisher fue utilizado para evaluar la influencia de los tratamientos sobre las tasas de supervivencia de los peces en cada período (Agresti, 1992).

Resultados

Efecto de *Bt344* en *P. subcapitata*.

Las curvas de crecimiento de algas en los tres tratamientos se muestran en las Figuras 1-3.

Las tasas promedias de crecimiento estimadas con sus respectivos intervalos de confianza de 95% y los resultados de las pruebas de contrastes se presentan en la Tabla 1.

El análisis de contrastes presentó valores de p superiores a 0,05 que indican ausencia de efecto significativo entre los tratamientos conteniendo el *Bt344* (inactivado y activo) y el control. Sin embargo, fue constatada una reducción de la tasa de crecimiento de las algas ($p < 0,05$) en el tratamiento con *Bt344* activo en relación al que contenía la

bacteria inactivada. Pues fue en este último tratamiento que se observó el mayor valor promedio de tasa de crecimiento.

Efecto de *Bt344* sobre *Daphnia similis*.

La variación de los parámetros de la reproducción y la supervivencia durante el período de evaluación se muestra respectivamente en las Figuras 4 - 6 y Figura 7. La Tabla 2 presenta los resultados de los contrastes relacionados con el promedio de los recién nacidos producido por adulto por día (PNAD) y la tasa neta de reproducción (R_0). Los resultados asociados con la supervivencia de *D. similis* se presentan en la Tabla 3. Hubo una reducción significativa del PNAD y de la tasa neta de reproducción (R_0) en las exposiciones al *Bt344* inactivo o activo. Como se observó efecto adverso en la exposición a las esporas inactivas, la alteración en los parámetros de reproducción estaría relacionada a

Otro efecto, y no necesariamente a la infectividad.

En cuanto a la tasa de supervivencia, el *Bt344* inactivado no la alteró, mientras que el *Bt344* activo redujo el porcentaje de supervivencia en aproximadamente la mitad.

Efecto de *Bt344* en los peces.

No hubo mortalidad en los diferentes tratamientos el 7^o día de exposición. Desde la segunda semana, la tasa de mortalidad en los recipientes con el *Bt344* activo comenzó con 2%, mientras que en los otros tratamientos se mantuvo igual a cero. Al final del periodo de experimentación, fue observado efecto del tratamiento sobre la supervivencia de los peces (test exacto de Fisher, $p = 0,03$): la mortalidad para el tratamiento de *Bt344* activo aumentó a cerca de 9% (Tabla 4). Antes del óbito, los peces presentaron nado errático y falta de coordinación con el aumento de la frecuencia de los movimientos operculares. Durante todo el período de exposición, no hubo mortalidad ni síntomas de cambio de comportamiento en los peces que no estaban expuestos al agente biológico. Esto también fue válido para los peces tratados con el agente biológico inactivado.

Discusión

En la actualidad, los impactos ambientales causados por los bioplaguicidas se estiman sobre la base de pruebas que utilizan una "dosis desafío" del agente biológico, considerada de mayor riesgo (de 100 a 1000 veces la dosis utilizada en el campo). Para efectos de estimar el riesgo para los organismos acuáticos, se considera una profundidad de una lámina de agua equivalente a 15 cm para el cálculo de la concentración prevista del agente biológico que queda después de su aplicación en su tasa adecuada (USEPA, 1989).

Según Capalbo *et al.* (2001), el control de *Spodoptera frugiperda* es eficiente mediante la aplicación de una suspensión de *Bt Tolworth*, con una concentración de 2×10^6 u.i. mL⁻¹, en la tasa de 300 L ha⁻¹. Esta aplicación podría dar como resultado una concentración resultante de 4×10^2 u.i. mL⁻¹ en el compartimiento acuático. Por lo tanto, las concentraciones del bioplaguicida evaluadas en este estudio cumplieron con las sugerencias propuestas por el protocolo de la USEPA (1989). Además, este protocolo también propone el uso de la concentración de exposición al agente biológico equivalente a 10^6 u.i. mL⁻¹, para los agentes cuya tasa de aplicación en el campo no está definida todavía.

Existen pocos estudios en la literatura que se refieren al estudio de los efectos de la toxina Bt en los organismos del fitoplancton, sin embargo los datos muestran una ausencia de efectos adversos en estos organismos. Así, en analogía con los resultados de las Figuras 1 – 3 y Tabla 1, Koskella & Stotzky (2002) no observaron cambios en el patrón de crecimiento de las algas del género *Euglena*, *Chlamydomonas* y *Oedogonium*, y cianobacterias (*Oscillatoria sp.*) cuando se expusieron a las toxinas de dos subespecies de *B. thuringiensis*. Según Overmyer *et al.* (2006), la presencia de algas disminuye la eficacia del *Bt* en el control de insectos plaga.

La falta de efecto de *B. thuringiensis* también se observó para la descomposición microbiana de tratamientos realizados hasta con 100 veces la concentración esperada en

el campo (Kreutzweiser et al, 1996). Sin embargo, Tianyun & Mulia (1999) observaron que el crecimiento de algas de los géneros *Chlorella* y *Closterium* se redujo mediante la aplicación de una formulación de *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* de Barjac (*Bti*) y *Bacillus sphaericus* Ncide.

En cuanto a los efectos de la toxina *Bt* en los invertebrados acuáticos, *B. thuringiensis israelensis* es altamente específico para *Nematocera* (Diptera) como *Culicidae*, *Simuliidae* y *Chironomidae* (Boisvert & Boisvert, 2000). Por otro lado, Ephemeroptera, Amphipoda, Cladocera y Copepoda no se ven afectados (Ali, 1981, Miura et al., 1981).

En el presente estudio se observó que la tasa de supervivencia de *D. similis* cambió en la exposición al *Bt344* activo. Este efecto podría estar relacionado con los resultados de Duchet et al. (2008). Estos autores encontraron cambios en el tamaño de la estructura poblacional de *Daphnia pulex* en los 210 días de exposición a *B. thuringiensis israelensis*.

Los resultados de este trabajo también se pueden explicar por la toxicidad moderada atribuida a ciertas cepas de *Bt* en *Daphnia sp* (USEPA, 1998a). También, se explicarían por la presencia de lesiones en tejidos de cladóceros expuestos a *B. thuringiensis israelensis* (Rey et al., 1998). Bohn et al. (2008) mostraron efectos crónicos negativos en el crecimiento y en los patrones reproductivos de *D. magna* después de alimentarla con harina de maíz transgénico que expresa la toxina de *Bt* (*Bt-toxin Cry1Ab*).

La inocuidad del *Bt* de para varias especies de peces, resultante de la exposición a través del agua, ha sido ampliamente reportada en la literatura. Así, por ejemplo, Grisolia et al. (2008) observaron que la exposición de *Oreochromis niloticus* al *Bt israelensis* y *Bt kurstak*, por 30 días, no afectó a su supervivencia. Sin embargo, una mayor frecuencia de necrosis celular se observó después de las 72 h de una aplicación intra-abdominal de una suspensión con 10^8 esporas mL⁻¹.

De acuerdo con Hurst et al. (2007), la exposición a los peces de la especie *Melanotaenia duboulayi* al *Bt israelensis*, en una concentración equivalente a 10 veces

la concentración efectiva usada en campo, ningún efecto fue expresado con relación al patrón normal de locomoción. Una formulación de este bioplaguicida que no afectó la supervivencia del pez *Gambusia affinis* en las pruebas de hasta 100 veces su tasa de aplicación en el campo, durante un período de 5 días (Gunasekaran et al., 2004). De acuerdo con Brown et al. (1998), el valor de la concentración letal media (CL50) de *Bt israelensis* es equivalente a 477 veces la tasa aplicada en campo sobre una lámina de agua con profundidad de 15 cm. Sin embargo, un estudio con *Bt kurstaki* demostró que hubo mortalidad y reducción del crecimiento cuando los peces "bluegill sunfish" fueron expuestos a concentraciones equivalentes a $4,7 \times 10^7$ u.i. mL^{-1} y $3,9 \times 10^7$ u.i. g^{-1} a través del agua y de la dieta, respectivamente (USEPA, 1998b).

Aunque los resultados de este estudio demuestran alguna evidencia de efecto de *Bt344* activo en los peces expuestos, esta manifestación es de baja magnitud, con tasas de mortalidad por debajo del límite aceptable para el control, que es de 10% (OECD, 1984).

Conclusión

El *Bt344* mostró seguridad con respecto a los cambios en el patrón de crecimiento de las algas *P. subcapitata* y un efecto de baja magnitud en la supervivencia de los peces *H. schoelzei* cuando los organismos fueron expuestos a concentraciones que representan a más de 1.000 veces la dosis de aplicación en el control eficiente de *Spodoptera frugiperda*.

Este hecho permitiría su uso como bioplaguicida, de acuerdo a los protocolos experimentales que utilizan estos organismos de prueba.

Sin embargo, en corroboración a algunos datos de la literatura, altas concentraciones del agente biológico afectaron a la supervivencia de *D. similis*, lo que sugiere la posibilidad de riesgo para especies acuáticas de invertebrados. Se sabe que el riesgo se caracteriza cuando hay efectos adversos y también hay posibilidad de exposición. Por lo tanto, según los protocolos nacionales e internacionales, el efecto

adverso manifestado sobre microcrustáceos indica la necesidad de nuevos estudios sobre estos organismos, o de otros invertebrados acuáticos, para inferir acerca de la seguridad de las comunidades acuáticas cuanto al uso del *Bt344* como bioplaguicida.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Fernando Valicente por proporcionar la cepa del microorganismo y al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) por el apoyo financiero.

Tabla 1. Influencia del *Bt344* sobre la tasa de crecimiento (TX) de *P. subcapitata* expresada en logaritmo neperiano de n° células de algas ($\times 10^4$) por mililitro por día.

Tratamiento	TX	Intervalo de confianza (95%)	Contrastes ^a		
			Control	<i>Bt344</i> AI	<i>Bt344</i> AA
Control	0,3389	0,2902 - 0,3876	-	p>0,05	p>0,05
<i>Bt344</i> AI	0,3769	0,3282 - 0,4256	-	-	p<0,05
<i>Bt344</i> AA	0,2555	0,2068 - 0,3042	-	-	-

- a) Valores *p* relativos al test LSD para contrastes entre promedios de los tratamientos.
b) El valor *p* varía entre 0 e 1. Cuanto menor es, mayor es la evidencia contra la hipótesis de ausencia de efecto.

Tabla 2. Influencia del *Bt344* sobre la reproducción de *D. similis*: promedio de neonatos producidos por adulto por día (PNAD) e tasa neta de reproducción (Ro).

Tratamiento	PNAD	Ro	Contrastes ^a		
			Control	<i>Bt344</i> AI	<i>Bt344</i> AA
Control	2,87	2,45	-	0,0022	0,0001
<i>Bt344</i> AI	1,75	1,48	0,0001	-	0,1613
<i>Bt344</i> AA	1,31	0,92	<0,0001	0,01	-

- a) Valores *p* relativos a los tests F para contrastes entre los promedios de los tratamientos. En la diagonal superior, los resultados se refieren a los contrastes entre PNAD. En la diagonal inferior, se presentan los valores *p* referentes al Ro.

Tabla 3. Supervivencia de *D. similis* bajo la exposición al *Bt344* durante 21 días.

Tratamiento	Tasa de supervivencia (%)	Error estándar (%)	Contrastes ^a		
			Control	<i>Bt344</i> AI	<i>Bt344</i> AA
Control	80,55	4,66	-	1,000	0,001
<i>Bt344</i> AI	80,55	4,66	-	-	0,001
<i>Bt344</i> AA	44,44	5,86	-	-	-

- a) Valores *p* relativos a los tests de Wald para contrastes entre las tasas de supervivencia.

Tabla 4. Tasas de supervivencia (%) de *H. scholzei* (\pm desvío estandar, %), en función del tiempo de exposición a los tratamientos con *Bt344*.

Días	Tratamiento		
	Control	<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

Figura 1. Crecimiento de *P. subcapitata* en la ausencia del Bt344 (control). Inactivado (*Bt344* AI).

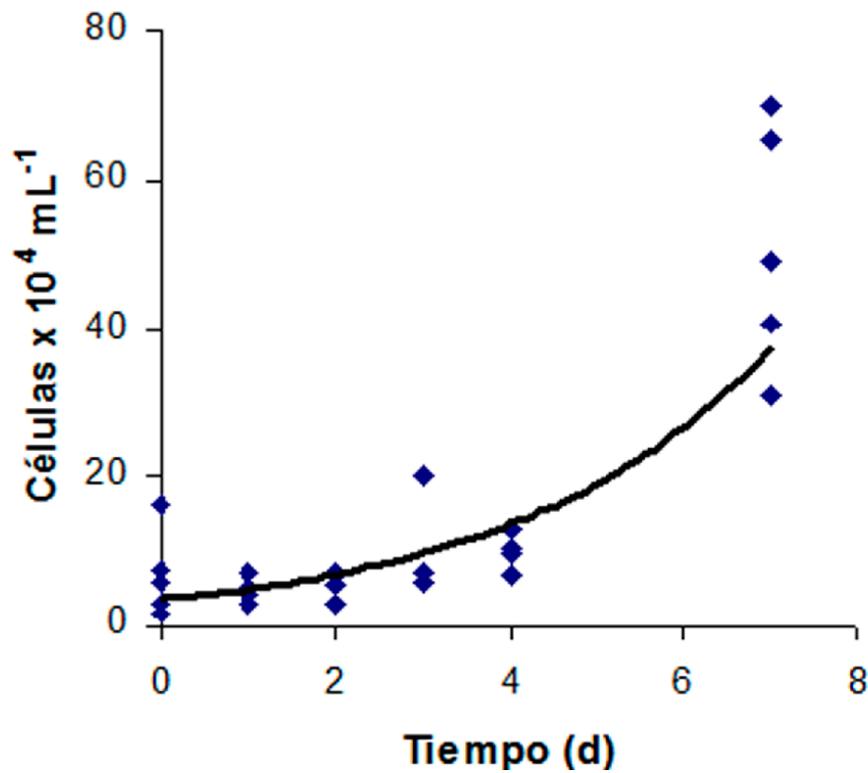


Figura 2. Crecimiento de *P. subcapitata* en presencia del Bt344 -10⁶ u.i. mL⁻¹ inactivado (*Bt344* AI).

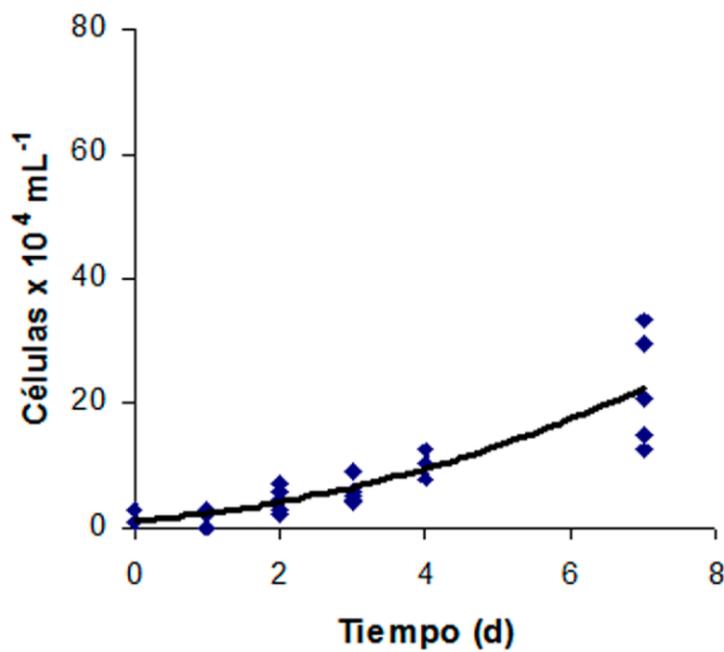


Figura 3: Crecimiento de *P. subcapitata* en presencia del *Bt344* - 10^6 u.i. mL⁻¹- activo (*Bt344* AA).

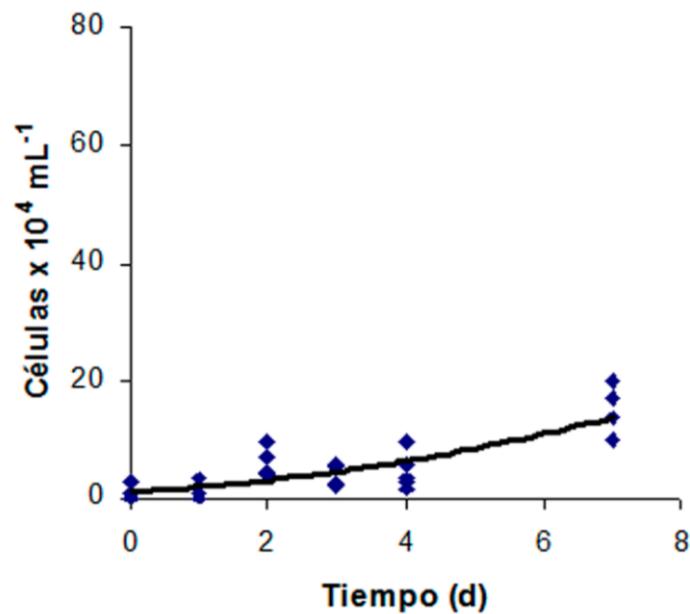


Figura 4. Variación temporal del número de neonatos de *D. similis* producidos por recipiente en la exposición al *Bt344* : - ○ - sin el agente biológico (control), - ● - con el agente biológico - 10^6 u.i. mL⁻¹ - inactivado (*Bt344* AI); - ● - con el agente biológico - 10^6 u.i. mL⁻¹ - activo (*Bt344* AA).

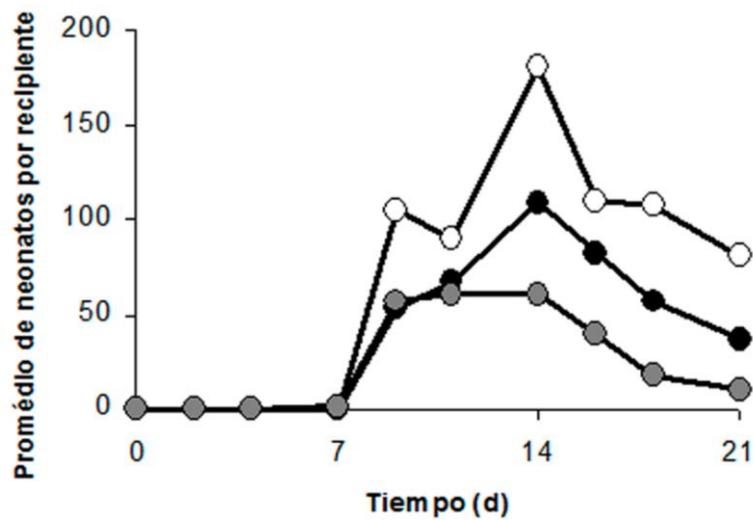


Figura 5. Variación temporal del número de neonatos de *D. similis* producidos por individuo adulto en la exposición al Bt344 : - ○ - sin el agente biológico (control), - ● - con el agente biológico 10^6 u.i. mL⁻¹ - inactivado (*Bt344* AI); - ● - con el agente biológico 10^6 u.i. mL⁻¹ - activo (*Bt344* AA).

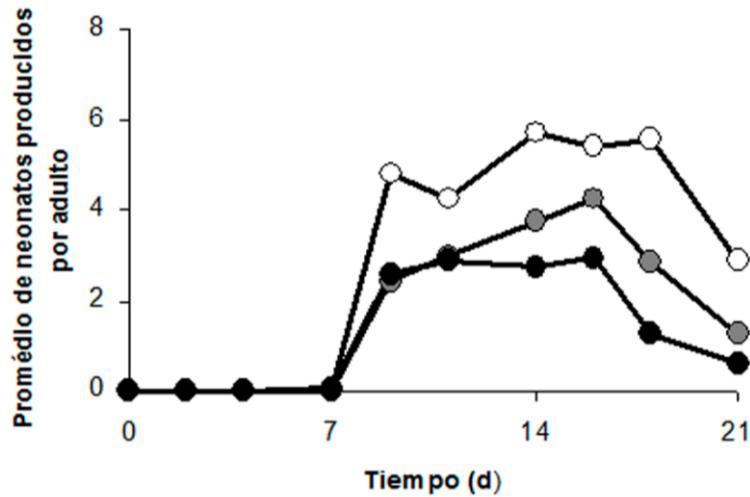
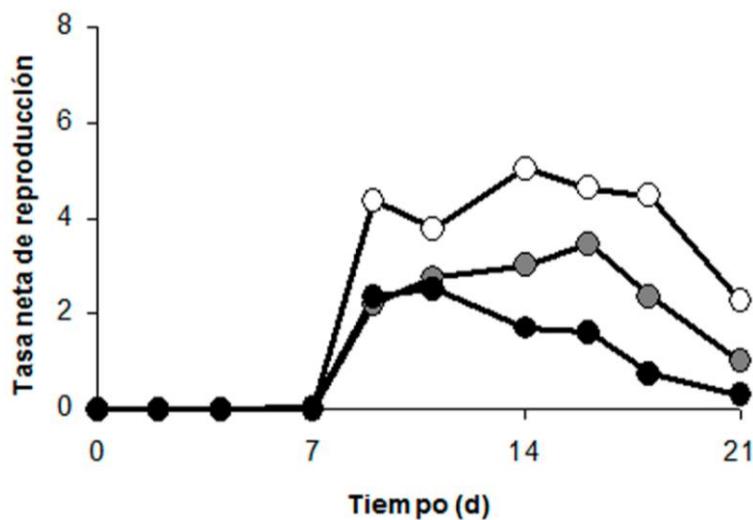
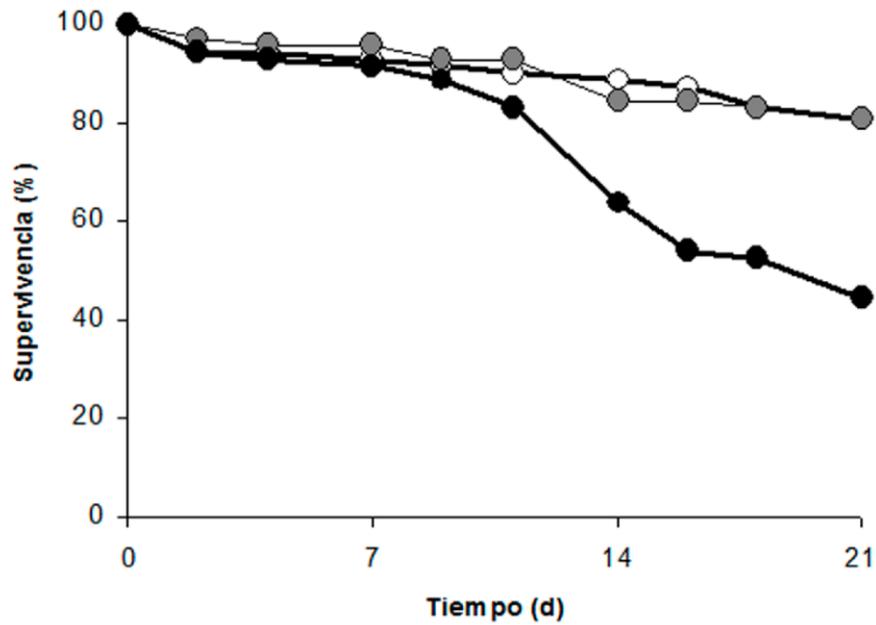


Figura 6. Variación temporal del promedio de neonatos de *D. similis* producidos por adulto, por día, que sobreviven a la edad adulta : - ○ - sin el agente biológico (control), - ● - con el agente biológico 10^6 u.i. mL⁻¹ - inactivado (*Bt344* AI); - ● - con el agente biológico 10^6 u.i. mL⁻¹ - activo (*Bt344* AA).



**Figura 7. Influencia del Bt344 en los patrones de supervivencia de *D. similis* : -
○ sin el agente biológico (control), - ● - con el agente biológico - 10^6 u.i. mL⁻¹ -
inactivado (*Bt344* AI); - ● - con el agente biológico - 10^6 u.i. mL⁻¹ - activo (*Bt344*
AA).**



Referencias

1. Agresti, A. 1992. A survey of exact inference for contingency tables. *Statistical Science* 7(1):131-177.
2. Ali, A. 1981. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (ABG-6108) against chironomids and some nontarget aquatic invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology* 38:264- 272.
3. Azevedo, F.I., L.C. de Souza, C.B. Siqueira, Z.M.A. Ribeiro, M.L. Souza & M.E.B. Castro. 2007. Aumento da atividade do baculovirus AgMNPV-2D com o uso do branqueador óptico Blankophor P167. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 182. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília.12 p.
4. Bøhn, T. , R. Primicerio, D.O. Hessen & T. Traavik. 2008. Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-Transgenic maize variety. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55:584-592.
5. Boisvert, M. & J. Boisvert. 2000. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and non target organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology* 10:517-561.
6. [Brown, M.D.](#) & D. [Thomas,](#) B.H. [Kay.](#) 1998. Acute toxicity of selected pesticides to the Pacific blue-eye, *Pseudomugil signifer* (Pisces). *Journal of the American Mosquito Control Association* 14(4): 463-466.
7. Capalbo, D.M.F., F.H. Valicente, I.O. Moraes & L.H. Pelizer. 2001. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis tolworthi* to control fall armyworm in maize. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 4(2):112-115.
8. Castro, V. L. S., C.M. Jonsson, I.S. Melo & F.V. Nunes. 2001. Avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 4(1):18-24.

9. [Duchet, C.](#), [M. Larroque](#), [T. Caquet](#), [E. Franquet](#), [C. Lagneau](#) & [L. Lagadic](#). 2008. Effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* on a natural population of *Daphnia pulex* in field microcosms. *Chemosphere* 74(1): 70-77.
10. Elendt, B.P. & W.R. Bias. 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9):1152-1167.
11. [El-Sayed W.](#) 2005. Biological control of weeds with pathogens: Current status and future trends. *Journal of Plant Diseases and Protection* 112(3): 209-221.
12. Fromtling, R.A., S.D. Kosnake, J.M. Jensen & G.S. Bulmer. 1979. Fatal *Beauveria bassiana* infection in a captive American alligator. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175: 934 -936.
13. Genthner, F.J., D.P. Middaugh & S.S. Foss. 1995. Validation of embryo tests for determining effects of fungal pest control agents on nontarget aquatic animals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29: 540-544.
14. Genthner, F.J., G.M. Cripe & D.J. Crosby. 1994. Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidaceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26:90-94.
15. Glare, T.R. & M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. John Wiley. Chichester. 350 p.
16. Grisolia, C.K., E. C. Oliveira-Filho, F. R. Ramos, M. C. Lopes, D. H. F. Muniz & R. G. Monnerat. 2009. Acute toxicity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains on fish and mouse bone marrow. *Ecotoxicology* 18: 22-26.
17. Gunasekaran, K., P.S. Boopathi Doss & K. Vaidyanathan. 2004. Laboratory and field evaluation of Teknar HP-D, a biolarvicidal formulation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, against mosquito vectors. *Acta Tropica* 92: 109-118.
18. Hosokawa, M. , G. Endo, K. Kuroda & S. Horiguchi. 1991. Influence of sulfate, Ca and Mg on the acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia similis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 461-465.

- 19.**Hurst, T.P. , B. H. Kay, P. A. Ryan & M. D. Brown. 2007. Sublethal effects of mosquito larvicides on swimming performance of larvivorous fish *Melanotaenia duboulayi* (Atheriniformes: Melanotaeniidae). *Journal of Economic Entomology* 100 (1): 61–65.
- 20.**J. Koskella & G. Stotzky. 2002. 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* 48: 262–267.
- 21.**Jonsson, C. M. & A.H.N. Maia. 1999. *Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. Testes toxicopatológicos em organismos não alvo do ambiente aquático: organismos zooplânctônicos, fitoplânctônicos e vertebrados. Documentos 11.* Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna. 33 p.
- 22.**Kreutzweiser, D.P., J. L. Gringorten, D. R. Thomas & J.T. Butcher. 1996. Effects of the bacterial insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on aquatic microbial communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 33: 271–280.
- 23.**Miura, T., R.M. Takahashi & F.S. Mulligan. 1981. Impact of the use of candidate bacterial mosquito larvicides on some selected aquatic organisms. In: California Mosquito and Vector Control Association, Inc (Eds.). *Proceedings of the Annual Conference of the Californian Mosquito Control Association* 49. California Mosquito and Vector Control Association. Sacramento. pp. 45-48.
- 24.**Montgomery, D. C. 1991. *Design and analysis of experiments.* 3rd Edition. John Wiley. New York. 672 p.
- 25.**OECD. 1981. Alga, growth inhibition test. In: *Guidelines for testing of chemicals.* Organization for Economic Co-operation and Development. Paris. 13 p.
- 26.**OECD. 1984. Fish, prolonged toxicity test: 14-day study. In: *Guidelines for testing of chemicals.* Organization for Economic Co-operation and Development. Paris. 9 p.
- 27.**Overmyer, J.P., M. S. Stephens, E.W. Gray & R. Noblet. 2006. Mitigating the effects of the green alga *Scenedesmus quadricauda* on the efficacy of *Bacillus thuringiensis*

- var. *israelensis* against larval black flies. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22: 135-139.
- 28.** Polanczyk, R. & S. Alves. 2003. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociencia* 7(2):1-10.
- 29.** Rey, D., A. Long, M.P. Pautou & J.C. Meyran. 1998. [Comparative histopathology of some Diptera and Crustacea of aquatic alpine ecosystems, after treatment with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*](#). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88: 255-263.
- 30.** Stokes, M.E., C.S. Davis & G.G. Koch. 2000. *Categorical data analysis using the SAS system*. 2nd Edition. SAS Institute Inc. Cary. 629 p.
- 31.** Thompson, P.J. & K.E. Stevenson, 1984. Mesophilic sporeforming aerobes. In: Speck, M. (Ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association. Washington. pp. 211-220.
- 32.** Tianyun S.U. & M.S. Mulia. 1999. Microbial agents *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* suppress eutrophication, enhance water quality, and control mosquitoes in microcosms. *Environmental Entomology* 28(4): 761-767.
- 33.** USEPA. 1989. *Microbial and Biochemical Pest Control Agents. Subdivision M of the Pesticide Testing Guidelines*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances. Washington. 192 p.
- 34.** USEPA. 1998a. *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* strain. EG2215 (006476) Fact Sheet. Disponible en la página web: http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006476.htm (consultado el 15 de febrero de 2010).
- 35.** USEPA. 1998b. *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* strain M-200 (006452) Fact Sheet. Disponible en la página web http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006452.htm (consultado el 15 de febrero de 2010).

- 36.**Valicente, F.H. & R.F. Zanasi. 2005. *Uso de meios alternativos para produção de bioinseticida a base de Bacillus thuringiensis. Circular Técnica 60.* Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas. 4 p.
- 37.**WHO. 1999. *Environmental Health Criteria 217. Microbial Pest Control Agent Bacillus thuringiensis.* World Health Organization. Geneva.125 p.

Recibido: 19/10/11

Aprobado: 03/11/11