

EFEITOS DO *Bacillus thuringiensis* VARIEDADE *israelensis* (BTI) SOBRE NOTONECTIDAE (INSECTA: HETEROPTERA) ATRAVÉS DE ALIMENTAÇÃO INDIRETA

Dayana Andrade de LIMA¹; Raquel Telles de Moreira SAMPAIO²; Iléa Brandão RODRIGUES³

¹Graduanda em Ciências Biológicas – UNINORTE/Bolsista PIBIC/CNPq-INPA; ²MSc. Orientadora – Laboratório de Malária e Dengue – CSAS/INPA; ³Dra. Coorientadora–Laboratório de Malária e Dengue – CSAS/INPA

1. Introdução

Dengue, doença causada pelo vírus do gênero *Flavivirus* é a segunda arbovirose mais importante no mundo em relação ao número de pessoas infectadas (Gluber 1994). O vetor da dengue, mosquito *Aedes aegypti* se desenvolve em ambientes aquáticos na sua forma imatura, dividindo este ambiente com outros insetos benéficos, denominados entomofauna acompanhante ou entomofauna não alvo. Alguns insetos aquáticos exercem pressão regulatória aos vetores por se alimentarem dos mesmos. Além disso, os insetos não-alvo têm importante papel na ciclagem de nutrientes e alguns são utilizados como bioindicadores de impacto ambiental (De Barjac 1990; Silva 2001; Cáuper 2003). A segurança dessa entomofauna não alvo é considerada pela Organização Mundial de Saúde como um dado importante na aplicação de qualquer inseticida, uma vez que a mesma contribui para o equilíbrio ali existente.

O combate ao vetor, *Aedes aegypti*, vem sendo uma estratégia de controle aplicada. Uma das melhores formas de combate consiste em prevenir o seu desenvolvimento enquanto larva, atacando os criadouros em potenciais (Gluber 1994). A utilização de um organismo vivo, nesse caso, bactérias entomopatogênicas - *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*)- para controlar outro organismo - os vetores- é o princípio do controle biológico. Ressalta-se sua importância devido à segurança para a saúde humana e segurança da fauna acompanhante (Alves 1986; Frederici 1995; Rodrigues 2006).

Estudos pioneiros na Amazônia relacionando larvicidas com a entomofauna não-alvo vêm sendo desenvolvidos em campo e laboratório há cerca de cinco anos. Mas a maioria destes estudos é realizada verificando o efeito do larvicida na entomofauna com hábito alimentar filtrador, ingerindo diretamente as bactérias. Sobre ingestão indireta apenas recentemente vem sendo estudado por este mesmo laboratório. Este trabalho tem como objetivo geral: conhecer os efeitos do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. sobre Notonectidae (Hemiptera) através da ingestão de larvas expostas ao formulado de *Bti*. E como objetivos específicos: coletar ovos de *Aedes aegypti* e Notonectidae em campo; alimentar larvas de *A. aegypti* com *Bti* em condições de laboratório; realizar bioensaios com Notonectidae e larvas de *Aedes* infectadas com *Bti* e divulgar os resultados do projeto.

2. Material e Métodos

Os Notonectídeos foram coletados nos tanques de piscicultura do INPA-Campus V-8. Os ovos de *Aedes aegypti* obtidos para a criação da ovoteca foram doados pelo Lab. de Malária e Dengue do INPA. Para a coleta dos Notonectidae foi utilizada rede entomológica do tipo rapiché, passadas na superfície da água para a obtenção dos indivíduos. Os indivíduos foram coletados em oito excursões e levados para o laboratório em bandeja de polietileno para a realização dos bioensaios, ou seja, exposição indireta ao larvicida.

Para a realização dos bioensaios foi criada a ovoteca a fim de se obter os ovos de *A. aegypti* e um insetário para os adultos com a finalidade de obtenção de ovos. Os ovos obtidos na ovoteca eram colocados para eclodir em cubas de esmalte com água, segundo as condições do Laboratório de Malária e Dengue do INPA. As larvas para a realização dos bioensaios foram obtidas a partir dos ovos da ovoteca acima mencionada. Foram alimentadas com ração para gato macerada até o terceiro estágio quando eram separadas para realizar a infecção com o larvicida.

Para a criação do insetário, foram separados ovos e colocados nas condições adequadas para eclodir. Quando as larvas atingiam o estágio de pupa, eram transferidas nas próprias cubas para gaiolas de madeira com tela, onde se transformavam em adultos. Nas gaiolas, a alimentação era realizada com solução açucarada (água e açúcar) e repastos sanguíneos semanalmente, utilizando hamster. Com os adultos alimentados, ocorria a oviposição em papéis filtro imersos em recipientes de plástico com água, para nova eclosão de larvas quando era necessário. Enquanto aguardavam para serem utilizados, os ovos eram mantidos no papel filtro. A ovoteca foi mantida e com isso a obtenção das larvas para os bioensaios.

O larvicida utilizado neste trabalho foi o *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis* (*Bti*), formulado em pó à base de uma bactéria esporulante encontrada no solo que causa mortalidade em larvas de Diptera, especialmente em *Aedes Aegypti*. A dosagem utilizada foi baseada em trabalho realizado por Espindola et al. (2008) verificando a eficácia do *Bti* no controle das formas imaturas de *Aedes aegypti*. No trabalho de Espindola foi utilizado 5mg de *Bti* para cada 100 ml de água, que mostrou importante eficiência contra larvas de *Aedes aegypti*. Sendo assim, nesse atual trabalho foram utilizados 50mg de larvicida (*Bti*) para

1L de água. O larvicida foi pesado em balança analítica, com a utilização de papel alumínio para que não ocorresse desperdício de material na retirada da balança.

Para a infecção, inúmeras larvas de 3º estágio foram separadas e colocadas em um litro de água. O larvicida *Bti* foi oferecido às larvas e quando não apresentavam movimento algum ao serem incomodadas pelo toque de uma pinça, ou estilete ou pipeta indicando que estavam mortas, eram assim separadas para a realização dos bioensaios.

Os bioensaios foram realizados em aquários medindo 20X20 cm. Cada bioensaio foi composto por cinco aquários onde três foram utilizados para os testes e dois para os controles. Eram compostos por larvas de *A. aegypti* mortas por ingestão de *Bti* e Notonectidae, sempre na proporção de três larvas para cada indivíduo de Notonectidae. Leituras de mortalidade dos Notonectidae foram realizadas 24h, 48h, 72h, 96h e 120h após o início do bioensaio. Os aquários considerados como controle não receberam o larvicida. Os índices de mortalidade no controle (30%) são os estabelecidos por Dulmage (1990) modificados para bioensaios no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Observou-se também a predação de larvas de *A. aegypti* vivas em 04 bioensaios e mortas em 04 bioensaios para verificar se há preferência alimentar (Maia 2012). Os dados foram tabelados e gráficos foram realizados através do programa Excel Microsoft para análise dos resultados.

3. Resultados e Discussão

A criação da ovoteca foi realizada com sucesso e a mesma demorou aproximadamente dois meses para estar em condições de uso no projeto. Após o qual, fora mantida durante todo o período de realização dos bioensaios fornecendo os ovos necessários para os experimentos.

Inúmeras larvas foram infectadas com sucesso, porém apenas 576 foram utilizadas para compor os testes com *Bti*. No total foram realizados 12 bioensaios.

Ao todo foram 60 aquários contendo 320 indivíduos de Notonectidae e 960 larvas de *A. aegypti*. Cada bioensaio possuía de 45 a 54 larvas de *A. aegypti* mortas por *Bti* e de 15 a 18 Notonectidae (cada bioensaio na proporção de 3 larvas de *A. aegypti* :1 Notonectidae).

Os aquários considerados como controle não receberam o larvicida. A taxa de mortalidade dos Notonectidae nos controles (13%) confere segurança aos dados, pois está dentro dos critérios descritos por Dulmage (1990) com modificações (30%) para bioensaios no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

A média de ingestão de larvas mortas com *Bti* pelos Notonectidae foi de 29 larvas por bioensaio e a média de Notonectidae mortos indiretamente por *Bti* nos bioensaios foi de 11 indivíduos. Em todos os bioensaios ao final dos 5 dias de leitura, ainda haviam larvas disponíveis em número suficiente para os Notonectidae se alimentarem.

As larvas infectadas e mortas foram ingeridas pelos Notonectidae em 24h de exposição, isto é, no início do bioensaio. A mortalidade dos Notonectidae começou nas 24h após a exposição, portanto no mesmo período em que acontecia a ingestão das primeiras larvas infectadas. Os mais altos índices de ingestão de larvas de *A. aegypti* ocorreram de 48h a 72h após a exposição e a maior quantidade de Notonectidae mortos ocorreu em 96h e 120h após a exposição às larvas, ou seja, 24h e 48h, respectivamente após a ingestão da maior quantidade de larvas infectadas com *Bti* (Figura 1).

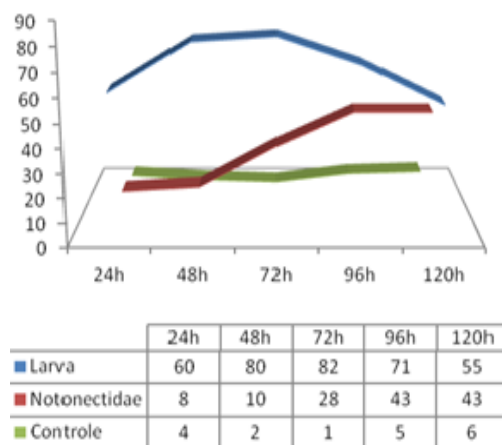


Figura 1: Total de ingestão de larvas de *Aedes aegypti* infectadas e Mortalidade de Notonectidae por ingestão indireta de *Bti* observada nos bioensaios.

Para confirmar os resultados obtidos por Maia, 2012, onde demonstra que Notonectidae não ingere larvas mortas de *Aedes* sp., realizou-se testes onde foram oferecidas larvas mortas de *Aedes aegypti* como também larvas vivas para os Notonectidae. Neste trabalho observamos que os Notonectidae tanto ingeriram larvas mortas quanto larvas vivas. Apenas a ingestão foi mais rápida em larvas vivas que mortas (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 – Ingestão de larvas mortas.

Bioensaios/Leituras	Bio 1 – L=30	Bio 2- L = 30	Bio 3- L = 36	Bio4- L = 36
24 hs	2	1	6	5
48 hs	3	5	5	4
72 hs	7	9	6	3
96 hs	3	0	7	6
120 hs	2	3	7	3
%	56%	60%	86%	58%

Houve ingestão de larvas em ambos os testes realizados, tanto com larvas vivas quanto com larvas mortas, porém a intensidade da alimentação foi diferente. Nos testes realizados com larvas mortas ocorreu ingestão em todas as leituras, e no final das 120 horas, foram ingeridas 65% das larvas, restando ainda larvas disponíveis para a ingestão. Enquanto nos testes com larvas vivas, em 72hs, 100% das larvas já haviam sido ingeridas, onde a maioria foi ingerida em 24h (Tabela 1 e 2).

Tabela 2 - Ingestão de larvas vivas.

Bioensaios/Leituras	Bio 5- L = 54	Bio 6- L = 54	Bio 7- L = 36	Bio8- L = 36
24 hs	23	35	26	19
48 hs	3	1	4	11
72 hs	2	-	-	-
96 hs	-	-	-	-
120 hs	-	-	-	-
%	100%	100%	100%	100%

Quanto às leituras de mortalidade, estes resultados discordam com experimentos realizados por Maia (2012) para a região Amazônica, testando os efeitos de ingestão indireta de *Bs* através de larvas de *Culex* sp., *Aedes* sp. e *Anopheles* sp. infectadas por indivíduos da família Notonectidae. Maia (2012) observou a ingestão de larvas à partir das primeiras 24h de exposição e mortalidade de Notonectidae à partir de 48h após o início da ingestão. Isto indica que o efeito da bactéria utilizada levou pelo menos 24h para desencadear. Neste estudo, a mortalidade dos Notonectidae ocorreu dentro das primeiras 24h de exposição, apesar de neste intervalo de tempo, ter sido registrada a menor taxa de mortalidade de todos os bioensaios. As maiores taxas de mortalidade de Notonectidae (96h e 120h) realmente ocorreram 48h após as maiores taxas de ingestão de larvas de *A. aegypti* (48h e 72h).

Também discordam de resultados obtidos por Maia (2012) onde os notonectídeos não se alimentaram de *Aedes* sp. infectados, sugerindo, a exemplo de outros Hemiptera aquáticos, necessidade de comportamento predador ativo capturando a presa indefesa. No atual estudo, os Notonectidae alimentaram-se sem dificuldade de larvas de *Aedes* mortas, inclusive no controle, onde a mortalidade de Notonectidae esteve dentro dos critérios aceitos por Dulmage (1990) com modificações.

Maia (2012) relatou preferência alimentar de Notonectidae por *Culex* sp. quando ofereceu-se larvas mortas de *Culex* sp., *Anopheles* sp e *Aedes* sp. Os Notonectidae preferiram o comportamento predador ao alimento morto. Porém no atual estudo os Notonectidae se alimentaram de larvas de *Aedes* sp. mortas, discordando de Maia (2012) e Andrade e Santos (2004) e não ocorreram episódios de canibalismo.

Observou-se porém no atual estudo que ao oferecer alimento vivo (*Aedes* sp.) era consumido em apenas dois ou três dias, enquanto o alimento morto demorava todo o bioensaio (120h) inclusive restavam larvas mortas para serem ingeridas. Resultado este que concorda com Wipfli e Merritt (1994), onde Plecoptera ingeriu significativamente menos larvas de mosquitos mortas do que vivas.

Estes resultados concordam com Wipfli e Merritt (1994) que estudaram em longo prazo, efeitos do *Bti* ingerido indiretamente por diferentes insetos aquáticos. Demonstraram que insetos aquáticos podem até alterar sua preferência por presa quando sob stress alimentar, afetando as relações tróficas no ambiente aquático. Podem também, ter diferentes formas de sensibilidade ao *Bti* e possuir uma ação no organismo um pouco mais lenta que outras espécies.

Em sistemas aquáticos onde *A. aegypti* são um componente importante de alimentos na cadeia alimentar, os predadores dependentes de *A.aegypti* vão sofrer ou emigrar. Por outro lado, se os níveis tróficos mais elevados não são dependentes de *A. aegypti* o impacto negativo nas comunidades de fluxo será provavelmente mínima. Porém pode ocorrer que o predador escolha outra presa o que, a longo prazo pode afetar negativamente outro taxa e venha desequilibrar a cadeia trófica naquele sistema aquático (Wipfli e Merritt 1994).

Estudos a longo prazo dos efeitos indiretos de patógenos como *Bti* são necessários para se entender as consequências associadas a outros membros da cadeia alimentar. O efeito de repetidas aplicações de patógenos como *Bacillus* na estrutura do ecossistema e biodiversidade exige mais atenção. Se uma população é severamente suprimida continuamente e seu papel é significativo no ecossistema, pode resultar em redução de espécies que dependam delas como principal fonte alimentar (Lacey e Merritt 2003).

4. Conclusão

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que a família de Hemiptera aquática Notonectidae pode se alimentar em laboratório também de larvas de *Aedes aegypti* e que o larvicida bacteriano *Bti* possui efeito tóxico em Notonectidae mesmo quando ingerido indiretamente, ou seja, através da ingestão de uma larva infectada, em condições de laboratório.

5. Referências Bibliográficas

- Alves, S.B. 1986. *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo: Manole, 407p.
- Andrade, C.F.S.; Santos, L.U. 2004. O uso de predadores no controle biológico de mosquitos, com destaque aos *Aedes*. Disponível em: http://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos/C%20B%20de%20mosquitos%20eu+lu%202004.pdf Acesso em: 15/ 06/ 2012.
- Cáuper, F.R.M. 2003. Avaliação do efeito do *Bacillus sphaericus* 2362 (Neide, 1904) contra a entomofauna não alvo em criadouros de vetores da malária (Culicidae: *Anopheles* Meigen, 1818) no Puraquequara/AM. *Anais da XVII Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA*.
- De Barjac, H. 1990. Classification of *Bacillus sphaericus* strains and comparative toxicity to mosquito larvae. In: De Barjac, H.; Surtherland, D.J. (eds.) *The use of B.t.i. against Mosquitoes, in Bacterial control of mosquitoes and Black flies: Biochemistry, genetics and applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. New Jersey: Rutgers University Press, p. 135-157.
- Dulmage, H.T.; Yousten, A.A.; Singer, S.; Lacey, L. 1990. A Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis*/ H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO. Steering Committee to Biological Control of Vetores, Geneva. 59p.
- Espindola, C.B; Guedes, R.N; Souza, R.C.P. 2008. Avaliação da Eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no Controle de Formas Imaturas do *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em Ambiente de Laboratório. *EntomoBrasilis*, 1(1):10-13.
- Frederici, B.A. 1995. The future of microbial insecticides as vector control agents. *American Mosquito Control Association*, 11(2): 260-268.
- Gluber, D.J. 1994. Vigilância active del dengue e la fiebre hemorragica del dengue. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 107(1): 22-30.
- Lacey, L.A.; Merritt, R.W. 2003. The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito control in aquatic environments. In: *Environmental Impacts of Microbial Insecticides*. Kluwer DORDRECHT, 151-168. Netherlands. H.M.T. Hokkanen, A.E. Hajekeds.
- Maia, N.S.G. 2012. Efeito do *Bacillus sphaericus* sobre Notonectidae (Insecta: Heteroptera) através de alimentação e exposição indireta. *Anais do I Congresso de Iniciação Científica, INPA, Manaus-AM*.
- Rodrigues, I.B. 2006. *Controle da Malária: Avaliação da efetividade em laboratório e em campo de formulados de Bacillus sphaericus* 2362 nos municípios de Manaus, Iranduba e Novo Airão. Tese Doutorado-Universidade Federal do Amazonas. 171 p.
- Silva, P.C.; Guimarães, F.L.; Ferreira, R.N.C. 2001. *Controle de vetores – Procedimentos de Segurança: Manual do Supervisor de Campo*. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 124p.
- Wipfli, M.S.; Merritt, R.W. 1994. Disturbance to a stream food web by a bacterial larvicide specific to black flies: feeding responses of predatory macroinvertebrates. *Freshwater Biology*, 32: 91-103.