

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PATOGENICIDADE  
E TOXICIDADE DO FUNGO ENTOMOPATÓGENO  
*COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*  
ISOLADO DE *ORTHEZIA* EM DUAS  
ESPÉCIES DE CRUSTÁCEOS**

Claudio M. Jonsson

Fred J. Genthner

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento:  
Arlindo Porto

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**

Presidente: Alberto Duque Portugal  
Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari  
José Roberto Rodrigues Peres  
Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

**Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de  
Impacto Ambiental - CNPMA**

Chefe Geral: Clayton Campanhola  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Ariovaldo Luchiari Júnior  
Chefe Adjunto Administrativo: Rosângela Blotta Abakerli

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa*  
*Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA*  
*Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA*

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PATOGENICIDADE  
E TOXICIDADE DO FUNGO ENTOMOPATÓGENO  
*COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*  
ISOLADO DE *ORTHEZIA* EM DUAS  
ESPÉCIES DE CRUSTÁCEOS**

*Claudio M. Jonsson*

*Fred J. Genthner*

*Jaguariúna, SP*  
*1997*

Embrapa-CNPMA. Boletim de Pesquisa, 1.

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:  
**Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA**

Rodovia SP 340 - km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho  
Caixa Postal 69 Cep. 13820-000 - Jaguariúna, SP  
Fone: (019) 867-8700 Fax: (019) 867-8740  
e.mail: adi@cnpma.embrapa.br

**Comitê de Publicações:** *Ariovaldo Luchiari Junior*

*Claudia C. Medugno*

*João Fernando Marques*

*José Flávio Dynia*

*Raquel Ghini*

*Tarcízio R. Quirino*

*Margarete E. N Crippa*

*Maria Amélia de T. Leme*

**Revisão:** Lígia Abramides Testa

**Editoração:** Regina Lúcia Siewert Rodrigues

**Normatização:** Maria Amélia de Toledo Leme

**Tiragem:** 500 exemplares

JONSSON, C.M.; GENTHNER, F.J. **Avaliação do potencial de patogenicidade e toxicidade do fungo entomopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia* em duas espécies de crustáceos.** Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997. 27 p. (Embrapa-CNPMA. Boletim de Pesquisa, 1).

CDD 632.96

©EMBRAPA-CNPMA, 1997

## SUMÁRIO

	Pag.
1. RESUMO.....	05
2. ABSTRACT .....	06
3. INTRODUÇÃO.....	07
4. METODOLOGIA .....	09
4.1. Estudos com <i>Palaemonetes Pugio</i> .....	09
4.1.1. Preparação do material-teste .....	09
4.1.2. Organismos-teste .....	11
4.1.3. Teste de avaliação do potencial de patogenicidade ...	11
4.2. Estudos com <i>Artemia Salina</i> .....	12
4.2.1. Preparação do material-teste .....	12
4.2.2. Organismos-teste .....	16
4.2.3. Ensaios de toxicidade aguda com o filtrado e com o extrato orgânico seco .....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PATOGENICIDADE E TOXICIDADE DO FUNGO ENTOMOPATÓGENO *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* ISOLADO DE *ORTHEZIA* EM DUAS ESPÉCIES DE CRUSTÁCEOS

Claudio M. Jonsson<sup>1</sup>

Fred J. Gentner<sup>2</sup>

## RESUMO

O micoinseticida *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia* tem recebido especial atenção devido ao seu sucesso no controle de *Orthezia paelonga* em citros. Uma suspensão de esporos ( $10^6$  esporos/ml) desse fungo, crescido em dois diferentes meios, foi avaliada quanto a sua capacidade de causar patogenicidade em embriões do camarão *Palaemonetes pugio*. Testaram-se o filtrado de meio de cultura e o extrato orgânico seco do fungo com a finalidade de avaliar a toxicidade aguda no microcrustáceo *Artemia salina*. Os resultados demonstraram a ausência de efeitos adversos associados à capacidade do fungo em provocar infecção ou exercer efeitos tóxicos agudos.

<sup>1</sup> Farmacêutico Bioquímico, M.Sc., Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69 Cep 13820-000 Jaguariúna, SP.

<sup>2</sup> Microbiologista, Ph.D., U.S. Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Gulf Ecology Division, 1 Sabine Island Drive, Gulf Breeze, FL32561, USA.

**ABSTRACT**

The mycoinsecticide *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from the plant lice, *Orthezia praelonga*, has received special attention due to its success in controlling *O. praelonga* in citrus. Spore suspensions ( $10^6$  spores / ml) of the fungus, produced on two different culture media, were evaluated for pathogenicity to embryos of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. Culture filtrates and dried extracts of the fungus were also evaluated for acute toxicity to the microcrustacean, *Artemia salina*. No pathogenicity or adverse effects were observed in shrimp embryos exposed to *C. gloeosporioides* spores, nor were culture filtrates or dried extracts of *C. gloeosporioides* toxic to *A. salina*.

## INTRODUÇÃO

Em vista do crescente interesse na aplicação dos agentes microbianos de controle biológico, questões relacionadas a sua segurança devem ser examinadas. Apesar da esperada segurança do uso de biopesticidas no combate aos problemas fitossanitários, os possíveis efeitos adversos dessa alternativa nos compartimentos ambientais dos ecossistemas não tem sido suficientemente estudados.

Verifica-se, hoje, uma tendência em se analisar com bastante rigor a segurança do uso dos biopesticidas, visto a capacidade de tais agentes em poder multiplicar-se, sobreviver e ser disseminados para outros ambientes com potencial de infectar organismos não-alvo. Assim, por exemplo, tem sido relatado sobre a infecção de *Beauveria bassiana* (um entomopatógeno de potencial uso nos E.U.A.) sobre o crocodilo americano *Alligator mississippiensis* (FROMTLING et al., 1979) e em insetos benéficos predadores, como *Chrysoperla carnea* (DONEGAN & LIGHTHART, 1989). Por outro lado, trabalhos realizados em condições laboratoriais têm indicado a ausência de efeitos adversos de biopesticidas em organismos não-alvo (HICKS et al., 1981; FOURNIE et al., 1988; JONSSON et al., 1995).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia* tem sido empregado, com sucesso, como inseticida na forma de suspensões aquosas no controle de *Orthezia* sp. em culturas de citros, especialmente na região de Limeira, SP. Aplicações de um litro de uma suspensão de  $1,3 \times 10^6$  esporos / ml por árvore tem demonstrado

considerável eficiência no controle de *Orthezia paeolonga* (CESNIK et al., 1996).

No presente trabalho, avaliou-se a capacidade de *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* manifestar patogenicidade nos estágios embrio-larvais do crustáceo marinho *Palaemonetes pugio*, através da capacidade desse biopesticida penetrar no organismo-teste, provocar infecção e causar efeitos deletérios. Esse crustáceo, pertencente à família Palaemonidae, habita os estuários e enseadas ao longo do Golfo do México e da Costa Atlântica da América do Norte. No seu habitat, *P. pugio* prefere áreas rasas com densa vegetação e salinidade de 1 a 15%, porém pode tolerar salinidade de até 30%. Constitui importante fonte de alimento para peixes e aves predadores que habitam regiões estuarinas (TYLER-SCHROEDER, 1979). Por essas razões, *Palaemonetes pugio* tem sido adotado como organismo-teste em estudos realizados pela U.S.E.P.A. (U.S. Environmental Protection Agency) com o objetivo de avaliar efeitos adversos de agentes químicos e biológicos na biota aquática (TYLER-SCHROEDER, 1979; FISHER.; FOSS, 1993; GENTHNER et al., 1994a).

No presente estudo, avaliou-se, também, a toxicidade aguda do filtrado de meio de cultura e do extrato orgânico seco de *C. gloeosporioides*, com o objetivo de detectar a possível presença de exo ou endotoxinas que exerçam efeitos adversos em invertebrados aquáticos, usando como organismo-teste o crustáceo *Artemia salina*. A recomendação de *A. salina* pela U.S.E.P.A. em ensaios ecotoxicológicos tem se fundamentado na facilidade do seu cultivo laboratorial na

representatividade no ecossistema marinho e na susceptibilidade à presença de xenobióticos (MACRI et al., 1988; WEBER, 1991).

## METODOLOGIA

### ESTUDOS COM *PALAEMONETES PUGIO*.

#### • Preparação do material-teste

Mantiveram-se cepas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de *Orthezia*, em culturas com meio sólido Glicose Yeast Broth (GYB) onde foram repicadas. Após 4 a 7 dias de incubação a 25° C, verificou-se a formação de colônias típicas do fungo, com intensa coloração alaranjada.

Prepararam-se placas de Petri com meio sólido Potato Dextrose (PD) e meio sólido Agar-lagarta (AL), este último contendo 10% de uma suspensão (0,1g/ml) de lagarta triturada. O PD é o meio de cultura rotineiramente utilizado para o cultivo do fungo a aplicar em campo em grande escala. O AL, contendo tecido de inseto, proporcionaria um crescimento eficaz para *C. gloeosporioides* já que este fungo tem propriedades inseticidas.

Inocularam-se esporos crescidos em meio GYB em quantidade suficiente nas placas preparadas de modo a se obter alta produção de esporos em ambos os meios.

Após sete dias de incubação, em tubos homogeneizadores de vidro, prepararam-se suspensões-estoque de esporos do fungo crescido nos meios PD e AL, homogeneizando-se em água destilada esterilizada uma massa de colônias do fungo coletada por raspagem superficial com espátula esterilizada.

A concentração das suspensões-estoque foi ajustada para  $10^8$  esporos / ml após a contagem do número de esporos em hemocitômetro, sendo as suspensões guardadas sob refrigeração a 4°C.

O número de esporos viáveis foi assim determinado por contagem em placa de Petri. Nestas determinações, aliquotas (200  $\mu$ l) de suspensões com concentração de  $10^3$  esporos /ml, obtidas a partir de sucessivas diluições em 0,03% de Triton X -100 (Union Carbide Chemicals & Plastics, Inc) foram transferidas para a superfície de placas de Petri contendo meio sólido GYB e espalhadas homogeneousmente com alça de vidro na superfície do meio de cultura. Após 2-4 dias de incubação a 25°C, procedeu-se à contagem do número de colônias formadas a partir dos esporos aplicados, verificando-se que o número de esporos viáveis era superior a 50% da quantidade aplicada. Essas determinações foram efetuadas para o preparo das suspensões-teste contendo  $10^6$  esporos/ml. A escolha dessa concentração fundamentou-se nas recomendações da U.S.E.P.A.(1989), que considera, pela sua alta concentração de unidades infectantes, como uma dose de risco máxima de exposição.

- **Organismos-teste**

Coletaram-se indivíduos adultos de *P. pugio* na baía de Santa Rosa, nas proximidades do EPA/ Gulf Ecology Division. No laboratório, foram mantidos em aquários de vidro cerca de 80 litros de capacidade, sob sistema de fluxo contínuo em água com salinidade aproximada de 20‰... O fotoperíodo de manutenção foi de 14 h luz : 10 h escuro com intensidade luminosa em torno de 1.500 lux.

Fêmeas grávidas contendo ovos com 2 a 4 dias de idade foram separadas, sacrificadas em banho de gelo, e sua cavidade abdominal dissecada com auxílio de pinça, estilete e estereomicroscópio, para retirar os ovos. Estes foram transferidos para uma placa de Petri contendo água de mar com salinidade de 20‰... Como estavam agregados por uma película gelatinosa, foram separados um por um, com pinça e estilete, e colocados em uma placa de Petri para uso posterior no teste de avaliação do potencial patogenicidade.

- **Teste de avaliação do potencial de patogenicidade**

O ensaio foi realizado em placas-teste de poliestireno (Cell Wells 25820, Corning Glass Works) contendo várias cavidades colocando-se em cada uma destas, um indivíduo. Dois mililitros de água de mar passando por filtro Millipore (0,22 µm) foram adicionados em cada cavidade da placa-teste correspondente ao controle. O mesmo procedimento com suspensões contendo  $10^6$  esporos/ml foi efetuado para preparar as placas-teste referentes aos tratamentos com *C.*

*gloeosporioides*. Adicionalmente, prepararam-se placas-teste nas quais ovos foram expostos a esporos previamente inativados pela esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos (controle negativo). Dessa maneira, o esquema experimental do ensaio gerou cinco tratamentos: um controle, no qual não houve exposição dos organismos ao agente biológico, dois tratamentos de exposição referentes ao fungo crescido nos meios PD e AL e dois referentes aos controles negativos dos tratamentos de exposição. A cada tratamento, corresponderam réplicas de 23 embriões. As placas-teste foram incubadas no escuro à temperatura de 25°  $\pm$  1°C, em câmara com temperatura controlada durante 13 dias. Cada embrião desenvolvido a partir do ovo foi examinado diariamente, através de um microscópio invertido, quanto ao seu estágio de desenvolvimento, viabilidade e ocorrência de infecção. A partir do oitavo dia de exposição, e durante um período subsequente de cinco dias, o número de embriões e larvas sobreviventes foi registrado e a porcentagem de mortalidade, calculada.

#### ESTUDOS COM *ARTEMIA SALINA*.

##### • Preparação do material teste:

Em frascos erlenmeyers de 2.800 ml, adicionaram-se 500 ml de meio líquido Potato Dextrose (PD) e inocularam-se esporos de *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* com idade inferior a 7 dias, crescidos em meio sólido GYB.

Os recipientes foram incubados a 25°  $\pm$  1°C em câmara com

temperatura controlada, sob agitação a 170 rpm. Após 8 dias, obteve-se uma massa de micélios, sendo o conteúdo dos recipientes filtrado em papel Whatman nº 1. Tal massa foi guardada em geladeira e o filtrado obtido, passado através de um sistema de filtragem com porosidade de 0,45  $\mu$ m (Corning Filter System) e dialisado durante 24 horas a 4 °C em membrana de celulose (Spectra POR <sup>®</sup>, Spectrum Medical Industries, MWCO 6-8000), permanecendo em um recipiente contendo água de mar sintética com salinidade de 20‰. O material-teste, pronto para ser usado nos ensaios, foi guardado em geladeira.

A massa de micélios, pesando cerca de 53 g, foi homogeneizada em 100 ml de cloreto de metila (Optima Fischer Scientific) com um homogeneizador de tecido (Kinematica Gm Bh -Brinkman Instruments-) até a obtenção de uma suspensão homogênea. Esta foi transferida para um funil de separação de 2.000 ml no qual se colocou um volume adicional aproximado de 400 ml de cloreto de metila. Movimentos leves foram realizados com o propósito de extrair possíveis compostos intramiceliais, que apresentem toxicidade ao organismo-teste. Após a separação das fases no funil, a fase inferior foi recuperada em balão de fundo redondo de 500 ml.

Os extratos foram evaporados em rotaevaporador à temperatura de 25°C até um volume em torno de 10 ml. O concentrado foi transferido, mediante pipeta Pasteur, para tubos de ensaio com capacidade de 40 ml previamente tarados. O cloreto de metila foi completamente evaporado em corrente de nitrogênio em "N-evaporator"

(The Meyer model 112) e os tubos pesados em balança analítica, obtendo-se um resíduo (extrato orgânico seco) de 0,082 g.

O extrato orgânico seco foi ressuspenso no mesmo tubo em 8,2 ml de cloreto de metila, obtendo-se uma solução de 10 mg/ml. Um mililitro desta foi adicionada em balão de 100 ml e evaporada sob corrente de nitrogênio, e como agente adjuvante de solubilidade, acrescentaram-se 15 ul de trietilenoglicol (TEG). O volume foi completado com água de mar sintética (Instant Ocean Aquarium Systems) com salinidade equivalente a 20‰. Obteve-se, assim, uma solução correspondente ao extrato orgânico seco de *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* com concentração de 0,1 mg/ml. Na Figura 1, é apresentado um esquema com as etapas experimentais sobre o procedimento acima descrito.

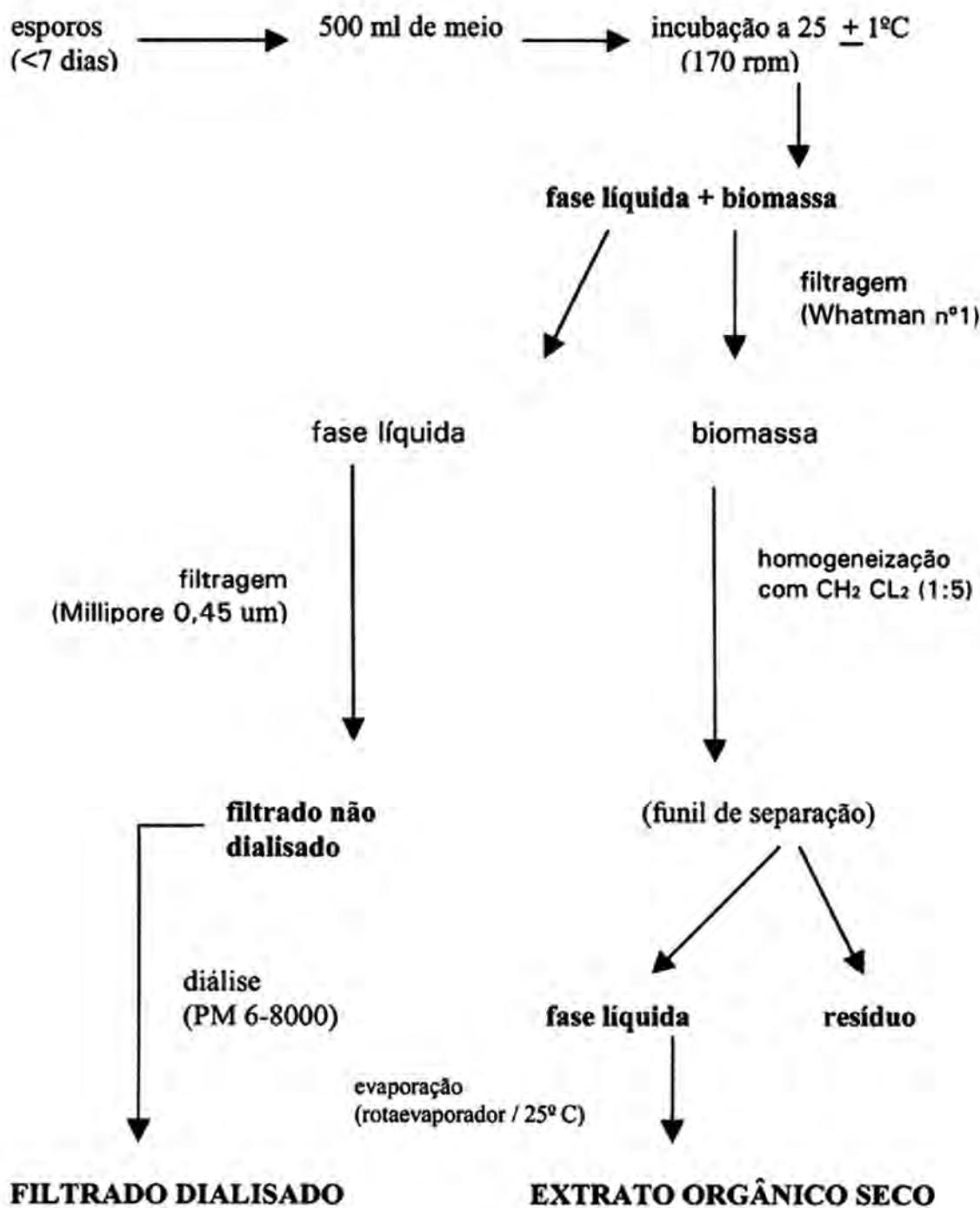


Figura 1 : Etapas para a obtenção do filtrado de meio de cultura e do extrato orgânico seco.

- **Organismo-Teste**

Utilizaram-se, como organismo-teste, indivíduos jovens do crustáceo *Artemia salina* entre o 2º e 3º instar. Cerca de 48 horas antes do início do teste, colocaram-se 300 ml de água de mar sintética em um funil de separação de 500 ml. Neste, adicionaram-se em torno de 50 mg de cistos de *Artemia* (Aquarium Products, Glen Burnie, Maryland). A suspensão de cistos foi mantida sob intensa aeração por meio de uma pedra porosa à temperatura de 25  $\pm$  1°C. Passadas 24 horas, as larvas eclodidas (1º instar) foram transferidas para outro recipiente contendo água de mar sintética, mediante uma micropipeta, e incubadas no escuro à temperatura de 25  $\pm$  1°C por mais 24 horas. Após esse período, as larvas estavam entre o 2º e 3º instar e prontas para serem usadas nos ensaios.

- **Ensaios de toxicidade aguda com o filtrado e com o extrato orgânico seco**

Realizaram-se testes em placas-teste com as mesmas características citadas, prepararam-se soluções-teste do filtrado e do extrato orgânico seco com concentrações de 0,1; 1,0; 10,0 e 100% e mg / L respectivamente. Estas soluções foram preparadas com o propósito de obter resultados preliminares para encontrar a faixa de concentração de trabalho, caso se realizassem testes de avaliação de concentração letal media (CL 50). Segundo U.S.E P.A. (1989), esse parâmetro toxicológico deve ser determinado se a presença de alguma

toxina estiver associada a efeitos adversos do agente biológico sobre o organismo-teste.

Por meio de micropipeta e estereomicroscópio, 24 larvas foram transferidas para cada placa e 1 ml de solução-teste (correspondente ao filtrado ou ao extrato orgânico seco) adicionado em cada cavidade, correspondendo para cada concentração, uma placa - teste com 24 indivíduos.

Prepararam-se, também, placas-teste que serviram como controle, consistindo um deles em uma solução de TEG com concentração de 0,15 ug / ml .

As placas foram cobertas para prevenir evaporação e colocadas em câmara de incubação com temperatura controlada a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro, durante 48 horas. Após este período, o número de organismos móveis foi registrado, sendo a porcentagem de imobilidade calculada tanto para as 24 horas como para as 48 horas de exposição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em alguns estudos cujos efeitos adversos de agentes químicos e biológicos sobre o organismo teste *P. pugio* foram avaliados, assim como no presente trabalho, o desenvolvimento dos estágios embrionares foram acompanhados, já que são essas as fases de desenvolvimento em que o organismo-teste é mais vulnerável a sofrer os efeitos daqueles agentes (FISHER & FOSS, 1993; GENTHNER et al., 1994a).

Os resultados referentes à exposição de embriões de *P. pugio* a esporos de *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* cultivados nos dois diferentes meios de cultura encontram-se na Tabela 1.

Durante as observações no período do teste, de modo geral, a taxa de mortalidade nos tratamentos em que *P. pugio* foi exposto aos esporos ativos foi semelhante ou menor que a dos controles, não sendo evidenciada nenhuma anormalidade dos organismos expostos com relação aos não expostos (controle e controle negativo). Não se constatou infecção decorrente do crescimento do agente biológico em estudo sobre as estruturas embrionárias ou larvais.

Com relação ao tratamento em que o fungo cresceu em meio PD (Cgo-PD (exposição)), observou-se no último dia de exposição, uma taxa de mortalidade ligeiramente superior à do seu controle negativo, porém bem inferior à do controle em que os organismos foram expostos somente em água de mar filtrada.

Tabela 1: Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia* no desenvolvimento embrio-larval de *Palaemonetes pugio* exposto a uma suspensão de  $10^6$  esporos / ml.

PORCENTAGEM DE MORTALIDADE <sup>a</sup>

TRATAMENTO	8 dias			9 dias			10 dias			11 dias			12 dias			13 dias		
	E	L	T	E	L	T	E	L	T	E	L	T	E	L	T	E	L	T
controle (não exposto)	4	0	4	4	0	4	4	0	4	4	0	4	13	4	17	13	17	30
Cgo-PD <sup>b</sup> (controle negativo)	4	0	4	9	0	9	9	0	9	9	0	9	13	0	13	13	0	13
Cgo-PD (exposição)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	8	9	9	18
Cgo-AL <sup>c</sup> (controle negativo)	0	0	0	4	0	4	4	0	4	9	0	9	9	0	9	13	0	13
Cgo-AL (exposição)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	9	13

a) n = 23; b) refere-se ao tratamento em que o *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* cresceu em meio PD; c) refere-se ao tratamento em que o *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* cresceu em meio AL.

E= embrião; L= larva; T=total (refere-se à soma das porcentagens de mortalidade de E e L no período).

A mortalidade na maioria das placas-teste aumentou consideravelmente a partir do 12º dia, período em que ocorre a liberação das larvas. A razão de tal mortalidade pode ser natural, pois segundo BUIKEMA et al. (1980), menos de 50% dos indivíduos jovens de *P. pugio* sobrevivem até a fase de adultos.

Para os organismos-teste expostos ao fungo ativo, a mortalidade só começou a ocorrer a partir do 12º e 13º dia, sendo que, para os controles negativos as taxas de mortalidade já vinham aumentando.

Os dados obtidos indicam, portanto, a ausência de potencial de patogenicidade do fungo entomopatógeno *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* nas condições testadas para as fases iniciais de desenvolvimento de *P. pugio*, mesmo quando cultivado em diferentes meios.

Resultados de estudos preliminares têm sugerido que a qualidade do meio em que o fungo é cultivado pode influenciar a sua capacidade de infectividade, em vista da produção diferenciada de enzimas que atuam no processo de infecção. Considerando o fornecimento de nutrientes presentes no meio AL para *C. gloeosporioides*, o qual possui propriedades inseticidas, o fungo poderia estar sintetizando enzimas fundamentais para que o processo de infecção ocorra. Essas enzimas poderiam diferir qualitativa ou quantitativamente das formadas quando *C. gloeosporioides* cresceu em meio PD.

A falta de efeitos adversos como resultado da exposição de embriões de *Palaemonetes pugio* e do peixe *Menidia beryllina* a suspensões de outra linhagem de *Colletotrichum* foi discutida por GENTHNER et al. (1995) quando submeteram os organismos a uma

suspensão de uma linhagem micoherbicida pós-emergente desse fungo (*C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*), comercializada nos E.U.A sob o nome de Collego®. Este produto tem sido largamente aplicado naquele país, em culturas de arroz e soja, para controlar a erva daninha *Aeschynomene virginica*. No entanto, injeção de esporos de *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* em indivíduos adultos daquelas duas espécies produziu 100% de mortalidade, que foi atribuída à germinação dos conidioesporos e à subsequente infecção sistêmica.

Nas tabelas 2 e 3 encontram-se, os dados correspondentes, respectivamente, aos ensaios de avaliação da toxicidade do filtrado e do extrato orgânico seco no organismo-teste *A. salina*.

No teste com o filtrado, a natureza dos dados, sem mortes parciais, não permitiu o ajuste de curvas dose-resposta. Não foi evidenciado nenhum efeito sobre a mobilidade de *A. salina* mesmo para o tratamento com 100% de filtrado. Isso sugere a ausência de efeitos deletérios a curto prazo de exposição, para o organismo-teste, ocasionados pela presença de alguma toxina no meio de cultura liberada por *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia* durante seu cultivo.

Não foi evidenciada uma correlação concentração-resposta no ensaio com o extrato orgânico seco, sendo mobilidade de 100% nas concentrações de 1,0; 10,0 e 100,0 mg/l. Comparando as porcentagens de imobilidade entre tratamentos, pelo teste exato de Fisher, verifica-se que elas não diferem entre si ( $p = 1,00$ ). Tais resultados sugerem a ausência de endotoxinas em *C. gloeosporioides* isolado de *Orthezia*, passíveis de serem extraídas por um solvente orgânico como o cloreto de metila e que afetem, a curto prazo de exposição, a mobilidade de *A*

*salina* nas condições testadas.

Assim sendo, a ausência de efeitos do filtrado de meio de cultura e do extrato orgânico seco nas concentrações de 100% e 100 mg/l, respectivamente, confere ao material testado uma CL50 superior a 100 % ou 100 mg/L. Desse modo, segundo a classificação da U.S.E.P.A. (1985) quanto à toxicidade aguda em organismos aquáticos, o material testado seria classificado como "praticamente não tóxico" .

Os resultados aqui apresentados concordam, de certa forma, com os relatados por GENTHNER et al. (1994b), em que um extrato orgânico seco de micelios do micoherbicida *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* não afetou a sobrevivência de indivíduos jovens do microcrustáceo *Mysidopsis bahia* na maior concentração testada de 70,4 mg / l. Estes organismos, porém, foram profundamente afetados pelo extrato orgânico seco do fungo bioinseticida *Beauveria bassiana*, que contém a micotoxina beauverecina; esta apresentou valor de CL50-96h equivalente a 0,56 mg/l.

Tabela 2 : Avaliação da toxicidade aguda em *Artemia salina* do filtrado de cultura de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia*.

Porcentagem de filtrado	Porcentagem de imobilidade <sup>1</sup>	
	24 horas	48 horas
controle	0	8,3
0,1	0	0
1,0	0	0
10,0	0	0
100,0	0	0

1) n = 24 organismos por tratamento.

Tabela 3 : Avaliação da toxicidade aguda em *Artemia salina* do extrato orgânico seco de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia*.

concentração do extrato (mg / l)	Porcentagem de imobilidade <sup>1</sup>	
	24 horas	48 horas
0,0 (controle)	0	0
0,0 (controle TEG <sup>2</sup> )	0	0
0,1	0	4,1
1,0	0	0
10,0	0	0
100,0	0	0

1) n = 24 organismos por tratamento.

2) concentração de TEG = 0,15 ug / ml

Os resultados do presente trabalho servem para justificar o potencial de uso do *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia* como bioinseticida, em vista da falta de efeitos relacionados ao comprometimento no desenvolvimento e sobrevivência, demonstrados nos ensaios com os dois organismos-teste. Deve-se observar, porém, que experimentos adicionais com outros invertebrados de água doce e/ou marinhos, assim como com vertebrados, deveriam ser conduzidos de forma a obter maiores subsídios para fazer considerações mais precisas a respeito do emprego desse agente de controle biológico e de seu impacto no compartimento aquático.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUIKEMA JR, A.L.; NIEDERLEHNER, B.R.; CAIRNS JR., J. Use of grass shrimp in toxicity tests. In: BUIKEMA JR., A.L. ; CAIRNS JR., J. ed. **Aquatic invertebrate bioassays**. Philadelphia : American Society for Testing and Materials, 1980. p.155-173. (ASTM Special Technical Publication, 715)
- CESNIK, R. ; FERRAZ, J.M.G.; OLIVEIRA, R.C.A.L., ARELLANO, F.; MAIA, A.H.N. Controle de *Orthezia praelonga* com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia*, na região de Limeira, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO - SINCOBIOL, 5., 1996, Foz de Iguaçu. Anais: Sessão de Pôsteres. Curitiba: EMBRAPA-CNPSO:COBRAFI,1996. p.363

DONEGAN, K.; LIGHTHART, B. Effect of several stress factors on the susceptibility of pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal Invertebrate Pathology**, v.54, p.79-84, 1989.

FISHER, W.S.; FOSS, S.S. A simple test for toxicity of Number 2 fuel oil and oil dispersants to embryos of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Marine Pollution Bulletin**, v.26, n.7, p.385-391, 1993.

FOURNIE, J.W.; FOSS, S.S.; COUCH, J.A. A multispecies system for evaluation of infectivity and pathogenicity of microbial pest control agents in nontarget aquatic species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.5, p.63-70, 1988.

FROMTLING, R.A.; KOSNAKE, S.D.; JENSEN, J.M. ; BULMER, G.S. Fatal *Beauveria bassiana* infection in a captive American alligator. **Journal American Veterinary Medical Association** v.175, p.934 -936, 1979.

GENTHNER, F.J.; FOSS, S.S. ; FISHER, W.S. Testing of the insect pest control fungus the predatory insect *Chrysoperla carnea* (Neuroptera. Crysopidae), to the fungal *Beauveria bassiana* in grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.20, p.49-57, 1994a.

GENTHNER, F.J.; CRIPE, G.M. ; CROSBY, D.J. Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidacea). **Archives**

of Environmental Contamination and Toxicology, v.26, p.90-94, 1994b.

GENTHNER, F.J.; MIDDAUGH, D. P.; FOSS, S.S. Validation of embryo test for determining effects of fungal pest control agents on nontarget aquatic animals. **Archives of Environmental Contamination & Toxicology**, v.29, p.540-544, 1995.

HICKS, B.D.; GERACI, J.R.; CUNNINGHAM, J.C. ; ARIF, B.M. Effects of red-headed pine sawfly, *Neodiprion lecontei*, nuclear polyhedrosis virus on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and *Daphnia pulex*. **Journal of Environmental Science and Health**, v.B16(4), p.493-509, 1981.

JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FERRREIRA, C.J.A. ; COSTA, F.P. Influence of *Baculovirus anticarsia* on the growth rate and survival of some nontarget aquatic organisms. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos. **Abstracts**. São Paulo: Brazilian Society for Microbiology, 1995. p.205

MACRI, A.; STAIZI, A.V.; DOJMI DI DELUPIS, G. Acute toxicity of furazolidone on *Artemia salina*, *Daphnia magna* and *Culex pipens molestus* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.16, p.90-94, 1988.

TYLER-SCHROEDER, D.B. Use of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) in a life - cycle toxicity test. In: MARKING, L. L.; KIMERLE, R.A. , ed. **Aquatic toxicology**. Philadelphia: American Society for Testing and

Materials, 1979. p.159-170. (ASTM Special Technical Publication, 667)

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Microbial and pest control agents: subdivision M of the pesticide testing guidelines.** Washington, DC, 1989.

U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Hazard evaluation division. Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for estuarine and marine organisms.** Washington, D.C., 1985. (EPA-540 / 9-85-009).

WEBER, C.I. , ed. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.** 4.ed. Cincinnati: EPA - Environmental Monitoring Systems Laboratory, 1991. 293p. (EPA-600/4-90-027)



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária***

*Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental*  
*Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

