

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança, Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, Jaguariuna, SP, Brasil, 13820-000; e-mail: castro@cnpmma.embrapa.br.

RESUMO. Os protocolos sobre os testes com biopesticidas fornecem subsídios e dados a serem enviados para o processo de registro de agentes microbianos. O objetivo deles é avaliar a segurança dos biopesticidas. Tais testes são realizados visando estabelecer os possíveis efeitos em seres humanos e animais domésticos em três fases sucessivas, quando as análises microbiológicas são realizadas em vários tecidos, órgãos e fluidos corporais. Entretanto, a abordagem desenvolvida para as análises químicas, em relação a estimativa da incerteza e validação do método, não é diretamente aplicável a microbiologia e não há um método geral específico descrito para biopesticidas. Também, a estimativa da incerteza quanto a contagem do número de colônias viáveis é difícil devido a grande variabilidade do número de colônias que determina uma grande parte da incerteza. Dado o crescente interesse nas análises microbiológicas de pesticidas, em particular com a finalidade de acreditação de laboratórios, o presente trabalho foca a estimativa da incerteza no contexto da validação dos testes com mamíferos. Para tanto, é discutido um procedimento baseado na ISO/TS 19036 para determinações quantitativas. A seguir, será determinada a viabilidade da adoção deste procedimento. A validação do método ajudará na avaliação comparativa das análises dos biopesticidas em mamíferos realizadas em diferentes laboratórios.

1.- Introdução

Uma vez que a sustentabilidade ambiental é um tema abrangente a ser seguido, a política agrícola deve envolver ações que contribuam neste sentido. Porém, o uso de insumos agrícolas pode levar a um desequilíbrio ambiental desde que o homem através de suas ações pode frequentemente transformar um certo agro-ecossistema. O interesse no uso de alternativas mais economicamente viáveis e menos agressivas tem crescido consideravelmente em resposta aos efeitos destas ações e ao uso dos insumos agrícolas como também reflete o interesse crescente na conservação dos recursos biológicos e seu uso sustentável. Neste sentido, o uso de agentes microbianos de controle de pragas agrícolas tem sido uma prática efetiva e apropriada para estes propósitos.

No início da década de 90, foi observado no Brasil, um aumento significativo no número de produtos para controle biológico. Este aumento pode ser creditado ao uso de

diretrizes e a implementação de leis específicas brasileiras, compatíveis com o regulamento internacional. Desde 1994, a Embrapa Meio Ambiente vem trabalhando com essas questões, estabelecendo uma abordagem do potencial de risco ambiental envolvido com a prática do uso desses agentes em ações da área de pesquisa e de políticas públicas (Castro et al., 1999, 2000, 2001), inicialmente com a colaboração de pesquisadores da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA. Baseada nesta colaboração, foram propostas na ocasião diretrizes que subsidiam as agências regulatórias no Brasil.

Além do uso de agentes microbianos de controle biológico, e de forma semelhante, a recuperação de áreas poluídas e degradadas pode ser feita pelo bioremediação com o uso de agentes microbianos. Este processo introduz processos biológicos para a decomposição dos resíduos que favorecerão e aumentarão a velocidade do processo de degradação natural. A legislação para os agentes bioremediadores está na fase final de análise mas é semelhante a dos biopesticidas.

Os possíveis efeitos adversos produzidos pela introdução de um microrganismo, biopesticida ou bioremediador, podem ser resumidos em danos diretos e indiretos em organismos não-alvo da comunidade local, inclusive a flora e representantes de fauna de importância econômica, ecológica e ou social. Os possíveis efeitos adversos, produzidos pela introdução de um microrganismo, podem ocorrer direta e indiretamente sobre organismos não-alvo da comunidade local. A possibilidade de sobrevivência, multiplicação, persistência, disseminação e estabelecimento de patogenicidade e toxicidade estão envolvidas no risco que um microrganismo pode apresentar para o ambiente. Assim, a análise de risco do uso desses agentes envolve a obtenção de medidas em laboratório antes de sua liberação, por exemplo, sobre a saúde, sobrevivência e reprodução dos organismos não-alvo.

2.- Material e Métodos

2.1 Biopesticidas e protocolos experimentais

A grande maioria dos agentes microbianos usados como biopesticidas, uma vez que ocorrem naturalmente e geralmente são específicos para a espécie-alvo, são supostamente seguros. Apesar disso, a avaliação de risco destes agentes tem crescido de importância. Estes agentes biopesticidas, diferentemente de químicos, podem sobreviver e reproduzir no ambiente, e infectar ou ocasionar

doença em outros organismos vivos. Os agentes biológicos são mais apropriadamente caracterizados quanto a saúde e segurança ambiental por testes que levem suas características em conta. Deste modo, os protocolos de teste são especificamente projetados para descobrir quaisquer destas características (USEPA, 1996a).

Devido a isto, existe uma necessidade de protocolos experimentais a fim de determinar o potencial de efeitos prejudiciais para seres humanos e animais domésticos causados por estes agentes em três vértices relativos aos efeitos patogênicos e tóxicos além do potencial de infectividade (USEPA, 1996a):

(1) Patogenicidade dos agentes microbianos e de seus contaminantes.

(2) Persistência não usual e/ou Infectividade dos agentes microbianos e de seus contaminantes.

(3) Toxicidade dos agentes microbianos, de seus contaminantes, e de subprodutos de preparação.

O atual esquema de avaliação dos agentes microbianos foi adaptado da legislação internacional, seguindo o esquema de fases. Neste sistema, os organismos teste são submetidos na fase I a uma dose desafio do agente em uma bateria de testes de curta duração, que oferece a máxima oportunidade para os efeitos negativos se expressarem. Caso seja encontrado um efeito significativo na fase I, então se procede aos testes da fase II e assim sucessivamente. Assim, se houver evidência de patogenicidade e/ou toxicidade, procede-se aos testes da fase seguinte até um máximo de três fases para testes referentes à saúde humana em roedores e quatro fases para organismos aquáticos e outros não-alvo (aves, abelhas). No caso dos estudos em mamíferos, na Fase II é avaliada uma situação particular quando se observa toxicidade ou infectividade na fase I porém não há evidência de patogenicidade. Já a fase III contém testes para avaliar a patogenicidade detectada na Fase I, e detecção de efeitos de parasitas intracelulares de células de mamíferos. Esta última fase inclui testes específicos - reprodução e fertilidade, oncogenicidade, imunodeficiência e patogenicidade/infectividade em primatas (USEPA, 1996a, Castro et al., 2000).

Contudo, não existe nenhum período mínimo de tempo para definir a infectividade ou persistência incomum de um agente em um animal teste. Acredita-se que estas condições são melhores definidas no contexto de dados que são obtidos na bateria de estudos, segundo o tipo de microrganismo e a via de exposição. Os dados são interpretados levando em conta as curvas de declínio gerado, e também considerando qualquer evidência que o agente microbiano se reproduz no animal teste (USEPA, 1996a,b). Para avaliar a infectividade e eliminação do organismo, o agente deve ser quantificado em tecidos, órgãos, e fluidos corporais de animais de ambos os sexos, sacrificados em diferentes intervalos após a exposição. O número de períodos de sacrifício exigidos dependerá da natureza do microrganismo de teste, e deve ser suficiente para estabelecer um padrão de liberação adequado (USEPA, 1996a,b, Castro et al., 1999). Isto, métodos analíticos são exigidos para a determinação dos agentes microbianos.

Para a avaliação estatística dos estudos ecotoxicológicos com animais ou plantas, podem ser usados modelos que avaliam o significado de diferenças expressas em dados obtidos de diferentes grupos de testes. Nos testes de toxicidade/patogenicidade/infectividade em mamíferos, é possível estabelecer curvas de declínio do agente microbiano quando exposto por via oral (*clearance*) mas não existe nenhuma comparação estatística possível em relação ao controle. Na fase I, é recomendado testar uma dose de pelo menos 10^8 unidades do agente microbiano por animal teste, em volumes diferentes de acordo com a via de exposição. O problema é aquele em roedores o volume máximo possível é pequeno, como 2 g.Kg^{-1} peso corporal por gavagem (oral). Por sua vez, o volume no teste pulmonar agudo em roedores normalmente não deve exceder $0.3 \text{ mL.100 g}^{-1}$ peso corporal.

2.2 Métodos analíticos

Há, porém, uma crescente demanda pela implantação de sistemas de qualidade e por programas de credenciamento de laboratório perante os órgãos oficiais para subsidiar a confecção de laudos emitidos pelos laboratórios, quer para testes de substâncias químicas quer para produtos biológicos. Os princípios de qualidade que são exigidos para testes de substâncias químicas também são exigidos para produtos biológicos.

Os laboratórios de microbiologia, assim como a comunidade analítica em geral, estão cada vez mais se preocupando com a estimativa da incerteza de medida dos resultados produzidos. A principal razão para esta tendência é certamente o credenciamento de laboratório na ISO 17025 que exige dos laboratórios a estimativa da incerteza associada aos seus resultados. Caso o cálculo válido de incerteza não seja possível, os componentes de incerteza devem ser identificados e razoavelmente estimados. Porém, a variabilidade associada com muitos métodos para a quantificação de colônia na microbiologia é grande (Lombard, 2006).

A incerteza pode ser definida como um parâmetro associado ao resultado de uma medida, que caracteriza a dispersão dos valores que razoavelmente podem ser atribuídos ao measurando (Eurachem / Citac Guia CG 4, 2000). As abordagens desenvolvidas para análises química em relação a estimativa de incerteza e validação de método não são diretamente aplicáveis para microbiologia e não existe nenhuma descrição de um método específico para biopesticidas.

A validação de procedimentos analíticos é um aspecto vital para propósitos regulatórios. Em geral, a validação de métodos microbiológicos deveria refletir condições de teste reais. Em alimentos, isto pode ser alcançado naturalmente usando produtos contaminados ou amostras de produtos com um nível predeterminado de contaminação; embora a contaminação de uma matriz só imita de modo superficial a presença de contaminantes naturais. Porém, é frequentemente a melhor solução disponível.

O padrão adotado para estimar a incerteza para qualquer tipo de medida é descrito pelo Guia EURACHEM/CITAC

para química analítica (Ellison et al., 2000) e pode ser aplicado também para microbiologia quantitativa onde a matriz é relativamente simples e homogênea. Porém, esta abordagem não foi recomendada por ISO/TC 34/SC 9 para microbiologia de alimentos. É considerado que tal processo poderia menosprezar o valor da incerteza real no caso do análise microbiológica; cujo modelo abrangente do processo de estimativa é difícil de estabelecer (Lombard, 2006).

No Guia Eurachem EA 04/10, os métodos microbiológicos qualitativos deveriam ser validados determinando, se apropriado, valores relativos a repetibilidade e reprodutibilidade. O conceito de incerteza não pode ser diretamente aplicado para testes qualitativos. Porém, fontes individuais de variabilidade, como por exemplo a interpretação do analista, deveriam ser identificadas e demonstradas estar sob controle. Para métodos microbiológicos quantitativos, a especificidade, sensibilidade, repetibilidade, reprodutibilidade entre outros devem ser considerados e, se necessário, quantitativamente determinados em ensaios. As diferenças devido às matrizes devem ser levadas em conta.

A respeito da estimativa de incerteza, o Guia Eurachem EA 04/10 coloca que os testes microbiológicos estão geralmente na categoria daqueles que impedem o cálculo rigoroso, metrologicamente e por estatisticamente válido da estimativa de incerteza. Geralmente é adequado estimar a incerteza com base na reprodutibilidade e repetibilidade, mas de preferência incluindo os dados de resultados de testes de proficiência. Os componentes individuais de incerteza devem ser identificados e demonstrados estar sob controle bem como terem a sua contribuição avaliada para a variabilidade de resultados. Alguns componentes (por exemplo pipetagem, pesagem e diluição) podem ser medidos e avaliados, mas geralmente demonstram uma contribuição desprezível para a incerteza geral. Outros componentes (por exemplo estabilidade da solução e preparo de amostra) não podem ser diretamente medidos e sua contribuição não pode ser avaliada de forma estatística mas a sua importância deve ser também considerada para a variabilidade de resultados.

O mesmo processo parece também ser apropriado para biopesticidas. O processo de quantificação de colônias- é complexo e inclui vários passos, sendo os mais importantes: amostragem da porção de teste, preparação da suspensão inicial e das diluições decimais consecutivas, isolamento, incubação, quantificação de colônias. Então, parece difícil estabelecer com precisão a contribuição de cada passo individual do processo analítico desde que o analito é um microrganismo vivo, cujo estado fisiológico pode ser largamente variável.

2.3 Estimativa da incerteza

Os diferentes meios, as condições de incubação e os testes de identificação oferecem a versatilidade precisa para a quantificação de diferentes organismos. Porém, esta versatilidade não é refletida nos princípios da estimativa de incerteza desde que parâmetros como reprodutibilidade e

repetibilidade não são geralmente aplicáveis em microbiologia (Niemi e Niemelä, 2001).

Devido à necessidade de obtenção de documentos de referência harmonizados em particular para propósitos de credenciamento de laboratório em microbiologia de alimento, está sendo estabelecida uma especificação de ISO Técnica (ISO/TS 19036) relativa a estimativa de incerteza para determinações quantitativas. Uma abordagem geral foi escolhida, baseada no desvio padrão de reprodutibilidade do resultado de final do processo de medida (Lombard, 2006).

Em análise microbiológica de alimento, uma estratégia de amostragem significa um procedimento planejado para selecionar amostras de uma população e para conduzir a amostragem para obter as informações necessárias. Este plano determina como os resultados podem ser interpretados e se as informações de sistemas diferentes são comparáveis ou não. Para a estimativa da incerteza, o protocolo descrito na ISO deve ser repetido para pelo menos 10 amostras para uma dada combinação de fatores. O número de tipos de matrizes para ser testado depende da diversidade das matrizes analisadas em rotina pelo laboratório.

Ao contrário da análise microbiológica em alimento, não existe escolha sobre amostragem em análise de biopesticidas. Além disso, o protocolo fica menos praticável quando os laboratórios analisam uma grande variedade de matrizes – cada órgão é uma matriz diferente e exige uma avaliação de incerteza separada.

Desde que habitualmente não existe prova de proficiência inter-laboratorial, o laboratório que realiza testes de biopesticidas pode usar o desvio padrão de reprodutibilidade do método para estimar a sua própria incerteza. Neste caso, o método usado habitualmente pelo laboratório tem que ser submetido para estudo de validação. No contexto de biopesticidas, o resultado aceitável deve ser considerado cuidadosamente em uma avaliação caso-a-caso.

Um protocolo experimental, adaptado daquele descrito na ISO/TS 19036, pode ser então usado para validação do método. Neste caso, dois técnicos diferentes podem apresentar o mesmo teste e na mesma dose (10^8 unidades.mL⁻¹) separadamente em pelo menos duas condições de laboratório diferentes como meio de cultura e reagentes, pHmetro, incubadoras, tempo de análise, etc.. Como em análise de alimento, o objetivo é refletir o limite provável de resultados individuais a ser obtido no mesmo laboratório.

O estudo intra-laboratorial para validação deve incluir animais expostos ao agente microbiano, animais de grupo de controle e um grupo dosado com agente microbiano inativado a fim de avaliar as propriedades tóxicas do agente microbiano. A inativação deve ser feita através de um meio que permite a manutenção razoável da integridade estrutural do agente microbiano (Castro et al., 1999, USEPA, 1996a,b).

A fim de estimar a incerteza geral, é necessário tratar cada fonte de incerteza separadamente para obter a contribuição total. É importante reconhecer que nem todos os

componentes farão uma contribuição significativa para a incerteza combinada, realmente, na prática é provável que só o faça um pequeno número (Ellison et al., 2000).

Embora seja considerado que é difícil construir um modelo completo do processo de estimativa de incerteza em análise microbiológica, é apresentado aqui um exercício para avaliar os fatores que podem contribuir para a variabilidade de resultados na análise de biopesticidas.

2.4 Exemplo da estimativa de incerteza em um teste com biopestida

Atualmente, a biotecnologia está buscando o isolamento e/ou a melhoria de microrganismos especializados para a degradação de eficiente de poluentes. Baseadas nestas observações, a *Pseudomonas* possui potencial para a degradação de grande variedade xenobióticos (Castro e Melo, 2007).

Para tal estudo é realizada uma série de procedimentos descritos a seguir:

a) características da colônia de *P. putida* - a colônia é de cor amarelo esbranquiçada, gram negativa, sensível à tetraciclina e canamicina, apresentando fluorescência. Ela foi identificada por métodos moleculares (seqüenciamento da subunidade 16S rDNA) com similaridade de 98% e confirmado pelo método de identificação por cromatografia gasosa dos ácidos graxos da membrana celular.

b) obtenção do isolado - O isolado é inicialmente repicado, ficando armazenado em BOD até aguardar seu crescimento. Na fase exponencial 18 h após o semeio em placa, o isolado é centrifugado por 15 min em 5000 g, lavado em solução tampão fosfato (pH 7,0) e ressuspenso no tampão (Chobhuenchom et al., 1996).

c) doses e tratamentos - A linhagem testada é administrada a ratos, em suspensões de 10^8 células mL⁻¹. É preparada uma suspensão concentrada e são realizadas várias diluições com as células bacterianas que são colhidas do meio de cultura. A concentração da suspensão administrada é ajustada com auxílio de espectrofotômetro ($A_{600} = 0,3$) que corresponde a 10^8 ufc.mL⁻¹, segundo Lelliott e Stead (1987). São utilizados três tratamentos para cada via: bactéria ativa, bactéria inativada e o veículo de administração da bactéria, como controle.

d) observação de sinais e sintomas dos animais - Os animais são observados diariamente com relação ao aparecimento de alterações clínicas. Foram verificados os seguintes itens: pele e pêlo; olhos e mucosas; aparelho respiratório e sistema circulatório; sistema nervoso periférico e central (tremor, diarreias, convulsão, letargia e salivação); padrão comportamental e tempo de morte.

e) observação de patologias durante a necropsia - Os animais são sacrificados e necropsiados com observação macroscópica dos órgãos em diferentes intervalos após a administração da bactéria. A necropsia foi realizada dentro de uma câmara de fluxo laminar. A fim de estudar infectividade da bactéria no organismo animal, são semeadas amostras de sangue, fígado, rim, mesentério e pulmão em placas de Petri contendo meio King B com propanil (Geels e Schippers, 1983), seguida de incubação e

contagem das colônias.

f) quantificação das colônias de *P. putida* - O material sob análise, devidamente pesado e homogeneizado em solução salina (NaCl 0,9%), é submetido a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), em triplicatas para cada diluição. A quantificação de colônias é realizada sob luz ultra-violeta uma vez que a bactéria emite fluorescência. O número de colônias obtidas por placa é anotado e o resultado expresso como média de repetições, transformando segundo cálculo de diluições, pesos e volumes, apresentado como unidades formadoras de colônias (ufc.mL⁻¹).

g) identificação das colônias de *P. putida* - A fim de confirmar a espécie das bactérias recuperadas dos órgãos necropsiados, realiza-se a extração de ácidos graxos da parede celular por meio da identificação dos isolados em cromatografia gasosa (Svec et al., 2004; Kaur et al., 2005; Bacon et al., 2006). As bactérias a serem identificadas são coletadas por meio de uma alça de metal e colocadas em tubos específicos. Na seqüência, são executadas quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares, sendo elas: saponificação, metilação, extração, onde a fase aquosa (inferior) é descartada e posterior lavagem. Após agitação e centrifugação, cerca de 75% da fase orgânica são pipetados e repassados para um vial específico para o aparelho da Agilent 6580 e detector Flame Ionization Detector (FID), com injetor automático. A identificação comparativa é feita entre o cromatograma obtido e uma biblioteca interna ao aparelho, fornecida pelo software Sherlock (Microbial Identification System), que calcula o índice de similaridade obtido para o isolado. A bactéria é considerada como perfeitamente identificada quando é encontrado um índice de similaridade maior que 0,600 e a diferença entre a primeira e a segunda identificações é de até 0,100 no índice de similaridade.

A fim de estudar os efeitos de agente microbianos como a *P.putida* em ratos em condições laboratoriais visando o credenciamento na norma ISO, deve ser examinada a lista de fontes de incerteza. A lista é baseada na descrição acima, com exceção da identificação de colônias que é dependente da bactéria. Uma vez que os componentes da incerteza tendem a ser independentes em medidas microbiológicas (Niemi e Niemelä, 2001), a incerteza combinada é composta da soma das incertezas relativas que contribuem para os dados, como apresenta como segue:

I - Para o preparo da suspensão: 1) Preparação do meio de cultura e crescimento das colônias de bactéria, 2) pesagem de tubos contendo solução salina 0.9 % e inclusão neles de uma pequena quantidade de bactéria seguida de agitação, 3) tomada de um volume pequeno desta suspensão e realização de leitura no espectrofotômetro (A_{600}) e 4) diluição da suspensão até 10^8 ufc.mL⁻¹ (Lelliott e Lugar, 1987).

II - Para quantificação de agente microbiano em tecidos, órgãos, e fluidos corporais para determinar a infectividade e a eliminação: 1) Pesagem do tecido, órgão ou fluido corporal, 2) homogeneização em solução salina 0.9%, 3) prosseguimento da diluição decimal (10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1}), 4) plaqueamento em triplicata, 5) incubação e 6) contagem as colônias nas placas.

Baseada nesta lista, a incerteza combinada pode ser proposta como resultante da leitura no espectrofotômetro, da diluição para o plaqueamento por pipetagem, da temperatura de incubação e da contagem de colônia do agente considerando técnicas diferentes. Como o resultado é feito em "ufc.g⁻¹ tecido", também é necessário para incluir a incerteza da pesagem da matriz.

Existem alguns pontos adicionais para considerar em testes de biopesticidas em mamíferos. O comportamento dos organismos depende de condições ambientais no laboratório (Morel et al., 2006). Pode ser avaliar se as condições de instalações como temperatura e luminosidade do biotério podem afetar os resultados e contribuir para a incerteza. Parece que a variação na temperatura ambiental, mantida em 22.0±2°C, não é suficiente para afetar a resposta de organismo para o agente microbiano. O mesmo é válido para um ciclo 12-h claro/escuro mantido com a fase leve começando às 7:30 da manhã. Também, a influência do peso corporal dos animais pode ser avaliada. Como o protocolo recomenda que a variação de peso de animais adultos usados no teste não deva exceder ± 20 % do peso médio para cada sexo, a sua influência pode não ser considerada em princípio.

3.- Conclusão

A validação do método ajudará a comparação dos dados obtidos das análises da toxicidade/patogenicidade/infectividade de biopesticidas em mamíferos realizada em diferentes laboratórios. Em resumo, o estudo intra-laboratorial para validação pode ser feito por dois técnicos diferentes com a mesma dose (10⁸ unids.mL⁻¹) separadamente em pelo menos duas condições diferentes de laboratório como meio de cultura, equipamentos e condições de análise. Este procedimento deve ser feito para animais expostos ao agente microbiano, animais de grupo de controle e animais expostos ao agente microbiano inativado. Durante a validação, os tecidos, órgãos e fluidos corporais devem sofrer análise quantitativa e onde cada um pode ser interpretado como uma matriz diferente e limitado em número, como sangue, fígado, pulmão, baço e/ou rim. Outros tecidos ou órgãos como linfonodos representativos podem ser feitas apenas durante o teste de um novo agente microbiano. Estes procedimentos podem ser feitos em três animais de um só sexo, sacrificado em um intervalo depois da exposição.

Embora a estimativa da incerteza microbiológica contribua para a identificação da fonte principal de erro no procedimento analítico, a variação em número de microorganismos nas fontes de amostra pode ser muito grande (Niemi e Niemelä, 2001). A incerteza adicional devido a variações quanto a estabilidade da preparação é um grande desafio para o microbiologista.

Usando o modelo descrito neste estudo, a validação do método de biopesticidas pode ser mais facilmente avaliada. O passo seguinte deste estudo será determinar a viabilidade de adoção destes procedimentos, dependendo dos dados facilmente disponível para a estimativa de incerteza e as

informações adicionais exigidas.

Com a execução e aprimoramento destes protocolos haverá maiores subsídios técnicos para gerenciar os possíveis riscos envolvidos na liberação e/ou uso de um determinado produto. A cadeia produtiva agrícola será beneficiada desde a produção até os processos de exportação devido à menor contaminação do ambiente e dos produtos agrícolas bem como menor exposição dos trabalhadores. No caso dos biopesticidas, as informações garantirão o registro de produtos biológicos mais seguros, favorecendo a oferta desses agentes, o que por sua vez poderá auxiliar o processo de exportação pois estará reduzida a contaminação por produtos agroquímicos. Também o uso seguro de biorremediadores para recuperação das áreas contaminadas beneficiará a saúde ambiental da área tratada.

Agradecimentos. A autora deseja agradecer ao Dr Pierre Morel pelas sugestões.

Referências

- Bacon, C.W.; Hinton, D.M.; Hinton J.R., A., 2006. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus thuringiensis* and other biocontrol *Bacillus* species, *Journal of Applied Microbiology*, 100: 185-194.
- Castro, V. and Melo, I., 2007. Avaliação toxicopatológica em ratos expostos a *Pseudomonas putida*, *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2(1), 1-5.
- Castro, V., Capalbo, D., Chaim, A., Laranjeira, A., Soares, C., 2000. Métodos para avaliação de risco ambiental e ecotoxicológico de biopesticidas. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente*, 10, 75-86.
- Castro, V., Capalbo, D., Moraes, G., Nardo, F., Oliveira, M. 1999. *Protocolos de avaliação de agentes microbianos de pragas para registro como biopesticidas*, v. 2 - *Testes toxicopatológicos em mamíferos*, Jaguaruá: Embrapa Meio Ambiente, (Embrapa Meio Ambiente, Documentos, 10).
- Castro, V., Jonsson, C., Melo, I., Nunes, F., 2001. Avaliação de risco ecotoxicológico de *trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 4(1), 18-24.
- Chobchuenchom, W., Mongkolsuk, S., Bhumiratana, A. 1996. Biodegradation of 3-chlorobenzoate by *Pseudomonas putida* 10.2, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12: 607-614.
- Elhson, S., Rosslein, M., Williams, A., 2000. EURACHEM/CITAC guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2nd edn. EURACHEM/CITAC, QUAM:PI
- EURACHEM EA Guide 04/10, 2002. Accreditation for microbiological laboratories, European co-operation for Accreditation, Guide EA-04/10 rev.02
- GEELS, F. & SCHIPPERS, B., 1983. Reduction of yield depression in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatment with antagonistic fluorescent, *Pseudomonas* spp. *Phytopathology Z.*, 108: 207-214.
- Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R., Kaushik, R., 2005. Phospholipid fatty acid - a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, 89: 1103-1112.
- Lelliott, R.A. and Stead, D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial plant disease*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 216 p.
- Lombard, B., 2006. Estimation of measurement uncertainty in food microbiology: The ISO approach. *Accreditation and Quality Assurance*, 17, 94-100.
- Morel, P., Arruda, T., Bohrer-Morel, M.B., 2006. Calculation of Uncertainties in Influence Quantities in Biological Essays. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 97-99.
- Niemi, R. and Niemelä, S., 2001. Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. *Accreditation and Quality*

V. L. Castro. Validação de testes em mamíferos expostos a biopesticidas.

Assurance. 6. 372-375.

Svec, P.; Stegnerova, H.; Durnova, E.; Sedlacek, I., 2004, Characterization of esculin-positive *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from an underground brook, *Folia Microbiologica* (Praha), 49(6):725-30.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. 1996a. Microbial Pesticide Test Guidelines - OPPTS 885.3000. Background—Mammalian Toxicity / Pathogenicity / Infectivity

USEPA. United States Environmental Protection Agency. 1996b. Microbial Pesticide Test Guidelines - OPPTS 885.3050. Acute Oral Toxicity/Pathogenicity.