

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE USO DE *PSEUDOMONAS* COMO BIORREMIADOR EM ÁREAS DEGRADADAS DE PASTAGENS

Vera L. de Castro ¹, Cláudio M. Jonsson ² e Aline H. Maia ³

¹ Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, castro@cnpma.embrapa.br

² Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, jonsson@cnpma.embrapa.br

³ Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, ahmaia@cnpma.embrapa.br

Resumo: A integração agricultura pecuária consiste em uma alternativa promissora de produção, pelo aumento da eficiência de utilização de recursos naturais e a preservação do meio ambiente, além de cooperar com a segurança alimentar. Porém, para se obter sucesso em seu uso, a pastagem não deve estar em estágio avançado de degradação. Em áreas já degradadas, pode-se utilizar as *Pseudomonas* que são rizobactérias promotoras de crescimento. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos decorrentes da exposição a *P. putida* em mamíferos e um invertebrado aquático como sistema teste para avaliação de risco da introdução desses agentes microbiológicos nessas áreas. Não foram encontrados sinais de patogenicidade e infectividade desses agentes microbianos utilizados como biorremediadores. Apesar disso, seria interessante a realização de testes adicionais a fim de garantir a inocuidade dos agentes bem como a sua segurança. Os protocolos empregados fornecem subsídios técnicos para gerenciar os possíveis riscos envolvidos na liberação e/ou uso do produto. Os resultados obtidos, além de sua aplicação na identificação de efeitos prejudiciais à saúde ambiental, poderão subsidiar e orientar avaliações *P. putida* por agências reguladoras, quanto ao seu uso comercial para fins de biorremediação.

Palavras chave: áreas degradadas, biorremediadores, pastagens, pseudomonas

Safety evaluation of *pseudomona* use as bioremediator in degraded areas of pasture

Abstract: Integrating livestock farming is a promising alternative for production, increased efficiency of natural resources utilization and environment preservation, beyond food safety. However, to achieve success in its use, the pasture should not be in advanced stage of degradation. In areas already degraded, it can be used *Pseudomonas* that are growth-promoting rhizobacteria. In this study, we studied the effects of *P. putida* exposure in mammals and aquatic invertebrates as a test system for assessing risk of microbiological agents introduction in these areas. There were no signs of infectivity and pathogenicity of microbial agents used as bioremediators. Nevertheless, it would be interesting to conduct additional tests to ensure their safety. The obtained data from the technical protocols used provide technical information to manage the risks involved in the release and / or use of the product. The results, in addition to its application in identification of harmful effects on environmental health, can support and guide *P. putida* evaluations by regulatory agencies as to its commercial use for bioremediation.

Key words: bioremediator, degraded areas, pasturage, pseudomonas

Introdução

As áreas de exploração com agricultura e a pecuária têm apresentado diminuição da sustentabilidade dos recursos naturais. Nesse contexto, a integração agricultura-pecuária é uma alternativa promissora de produção, favorecendo a preservação do meio ambiente e cooperação com a segurança alimentar. Para se obter sucesso no uso desta tecnologia, a pastagem não deve estar em estágio avançado de degradação. Em áreas já degradadas, a fim de corrigir o problema, pode-se utilizar as *Pseudomonas*.

As bactérias *Pseudomonas* são encontradas comumente no solo e no filoplano. Embora algumas espécies de *Pseudomonas* sejam fitopatogênicas, outras podem ser rizobactérias promotoras de crescimento, atuando na prevenção de invasão por patógenos e produzindo metabólitos inibidores de microrganismos deletérios (Fonseca et al., 2001), além de também se mostrarem hábeis na degradação de xenobióticos.

Porém, não é conhecido o efeito dessas bactérias em animais e organismos aquáticos. A avaliação de impacto decorrente do uso desses agentes microbianos requer conhecimento de sua interação com os alvos específicos e com o ambiente, uma vez que podem ocorrer diferentes eventos relacionados a potenciais efeitos prejudiciais como a produção de uma toxina ou a infectividade em um organismo.

No presente trabalho foram avaliados os efeitos decorrentes da exposição a *P. putida* em mamíferos e um invertebrado aquático como sistema teste para avaliação de risco da introdução desses agentes microbiológicos.

Metodologia

1. Características da colônia de *P. putida* e obtenção do isolado - cor amarelo esbranquiçada, gram-negativa, sensível à tetraciclina e canamicina, fluorescente. Após seu crescimento, o isolado foi centrifugado, lavado em solução tampão e ressuspendido.

2. Avaliação da patologia, infectividade e toxicologia da *P. putida* em mamíferos - foram utilizados roedores como sistema-teste em uma série de procedimentos descritos a seguir:

a) animais - ratos Wistar mantidos em condições ambientais padronizadas e alojados em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha. Água e ração foram fornecidas a vontade durante todo o período dos procedimentos.

b) doses e tratamentos - a linhagem testada foi administrada em suspensões de 10^8 células mL^{-1} . Foram utilizados três tratamentos por via oral: bactéria ativa, inativada e controle.

c) observação de sinais e sintomas dos animais - foram observados diariamente quanto ao aparecimento de alterações clínicas (pele e pêlo, olhos e mucosas, aparelho respiratório e sistema circulatório, sistema nervoso periférico e central), padrão comportamental e tempo de morte.

d) observação de patologias na necropsia - os animais foram sacrificados e necropsiados com observação macroscópica dos órgãos em diferentes intervalos após a administração da bactéria. A fim de estudar a sua infectividade, foram semeadas amostras de sangue, fígado, rim, mesentério e pulmão em placas de Petri contendo meio King B com propanil; seguida de incubação e contagem das colônias.

e) quantificação das colônias de *P. putida* - o material analisado foi pesado e homogeneizado e submetido a diluições seriadas. A quantificação de colônias foi realizada sob luz ultravioleta. O número de colônias obtidas por placa é expresso como média de repetições e 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, realizou-se a extração de ácidos graxos da parede celular por meio da identificação dos isolados em cromatografia gasosa.

3. Avaliação de risco de dose máxima da exposição em organismos zooplanctônicos

No experimento com o invertebrado aquático *Daphnia similis* os tratamentos, avaliados em réplicas de seis unidades experimentais, foram: controle, *P. putida* inativada pela autoclavagem (10^6 ufc.mL^{-1}) e *P. putida* ativa (10^6 ufc.mL^{-1}). O período de exposição foi de 21 dias em sistema semi-estático e em condições controladas. As amostragens para se avaliar o número de neonatos/adulto/dia e a taxa de mortalidade foram realizadas antes de cada renovação do meio.

Para cada tratamento, foram estimados os seguintes parâmetros em cada avaliação:

a) Número médio de neonatos produzidos por adulto por dia (NMADIA);

b) Taxa líquida de reprodução (R_0): número médio de neonatos produzidos por adulto, por dia, que chegam à idade adulta;

c) Sobrevivência de adultos ao longo do período de avaliação.

O NMADIA e a taxa líquida de reprodução dos tratamentos foram comparados pelo teste F para contrastes (Montgomery, 1990). As taxas de sobrevivência ao final do período do período de avaliação foram comparadas pelo teste de Wald (Stokes *et al*, 2000).

Resultados e Discussão

1. Avaliação da patologia, infectividade e toxicologia da *P. putida* em mamíferos

a - Observação clínica dos animais e necropsia - Os animais não apresentaram alterações clínicas durante os experimentos, nem a necropsia detectou alterações quando da administração pela via utilizada.

b - Quantificação do microrganismo nas amostras biológicas - não se detectaram células de *P. putida* não cresceu nas amostras biológicas após 3 e 24 h da exposição. Entretanto, nas amostras avaliadas após 16h da exposição foram encontradas colônias em algumas das placas semeadas com amostras de pulmão dos animais tratados com a bactéria ativa (Tabela 1). A presença da *P. putida* foi confirmada no pulmão.

Tabela 1. Presença de *Pseudomonas putida* em tecidos de ratos Wistar machos em ufc.g⁻¹ de tecido, relativa a administração da suspensão com o agente ativo por via oral. Os dados referentes à bactéria inativada e ao controle não foram retratados por não terem sido detectadas colônias nas amostras desse grupo.

Órgão (ufc.g ⁻¹)	Tempo (horas) / diluições								
	3			16			24		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Rim	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0
Pulmão	0,0	0,0	0,0	3,0±1,0	1,7±0,6	0,0	0,00	0,0	0,0
Mesentério	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0
Fígado	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0
Sangue	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0

O monitoramento dos agentes antagônicos liberados em campo é de fundamental importância para a avaliação do impacto destes sobre os demais organismos presentes na área tratada e o estudo do impacto sobre organismos não-alvo é necessário para que a eficiência do agente antagonista seja comprovada em termos de segurança ambiental.

Com a metodologia utilizada para a avaliação da possível toxicidade, patogenicidade e/ou infectividade decorrente da exposição da *P. putida* em roedores foi possível proceder à quantificação temporal do microrganismo nos vários tecidos animais bem como a sua infectividade pela quantificação do número de colônias identificadas nas placas semeadas com amostras dos órgãos retirados durante a necropsia.. Uma vez que após 24 horas da administração, as colônias da bactéria não são mais encontradas, pode-se supor que em mamíferos a *P. putida* é rapidamente eliminada do organismo e que portanto não persista e conseqüentemente não infecte os tecidos. Novos testes em ratos confirmarão esta hipótese. Além disso, não foram encontradas evidências de patogenicidade durante a necropsia dos animais. Esses fatos concordam com a observação clínica dos animais, que não demonstraram sinais e/ou sintomas de prejuízos à sua saúde. O fato de ter-se encontrado células da bactéria nos pulmões possivelmente é decorrente de contaminação durante a exposição por cânula pela via oral apesar de todos os procedimentos de desinfecção adotados durante a realização dos testes.

2. Avaliação de risco de dose máxima da exposição em organismos zooplanctônicos

Constatou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no *NMADIA* nas exposições ao agente biológico inativado ou ativo. Esse aumento foi observado somente para a exposição *P. putida* inativada quando se avaliou a taxa líquida de reprodução (*Ro*).

Com relação à taxa de sobrevivência houve uma redução de aproximadamente 12 % em relação ao controle nos organismos expostos ao agente biológico ativo. Entretanto esta alteração não foi significativa, sendo que o aumento da mortalidade somente foi observado após 48 horas de exposição.

Tabela 2. Influência de *P. putida* sobre a reprodução de *D. similis*: número médio de neonatos produzidas por adulto por dia (*NMADIA*) e taxa líquida de reprodução (*Ro*).

Tratamento	<i>NMADIA</i>	<i>Ro</i>	Contrastes ^a		
			T ₁	T ₂	T ₃
Controle (T ₁)	2,17	1,56	-	0,0268	0,0289
PP inativada (T ₂)	3,11	2,39	0,0070	-	0,9673
PP ativa (T ₃)	3,10	1,83	0,3188	0,0474	-

a) Valores p relativos aos testes F para contrastes entre médias dos tratamentos. Na diagonal superior, os resultados referem-se aos contrastes entre *NMADIA*, na diagonal inferior, são apresentados os valores p relativos ao *Ro*.

As informações referentes a observações de efeitos ambientais em longo prazo decorrentes do uso desses produtos são difíceis de serem obtidas. Contudo, a *P. putida* não parece ocasionar efeitos prejudiciais a organismos não-alvo como os insetos (Schneider e Dorn, 2001).

Infecções bacterianas causadas em outras espécies do gênero *Daphnia*, como por exemplo a ocasionada por *Pasteuria ramosa*, podem levar à alteração dos elementos C, N e P no organismo (Frost et. al., 2008). Uma moderada toxicidade de determinadas cepas da bactéria *Bacillus thuringiensis* em *Daphnia sp* foi relatada pela USEPA (1998). Em vista dos resultados do presente trabalho com *P. putida* e baseado no fato de que a *Daphnia sp* é um organismo filtrador que se alimenta principalmente de algas e de vários tipos de detritos orgânicos, incluindo fungos e bactérias; sugere-se que a bactéria funcione como um suplemento na alimentação de *D. similis*, aumentando a sua fertilidade.

Apesar da inocuidade dos agentes microbianos utilizados como biorremediadores, e considerando-se os resultados do presente trabalho, estudos em outras espécies seriam necessários para se atribuir segurança ao uso desses agentes.

Conclusão

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.

Os resultados obtidos, além de sua aplicação na identificação de efeitos prejudiciais à saúde ambiental, poderão subsidiar e orientar avaliações *P. putida* por agências reguladoras, quanto ao seu uso comercial para fins de biorremediação.

Literatura citada

- FONSECA, M.; ZAGO, V.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N., 2001, Levantamento e Caracterização Morfológica de Isolados de *Pseudomonas* spp. Fluorescentes Presentes em Cultivos do SIPA - Sistema Integrado de Produção Agroecológica, Embrapa Agrobiologia, 35 p. (**Embrapa Agrobiologia. Documentos**, 143).
- FROST, P.C.; EBERT, D.; SMITH, V.H. Bacterial infection changes the elemental composition of *Daphnia magna*. **Journal of Animal Ecology**, v.77, p.1265-1272, 2008.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3.ed. New York: John Wiley, 1991. 672 p.
- SCHNEIDER, M.; DORN, A. Differential infectivity of two *pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.135-140, 2001.
- STOKES, M.E.; DAVIS, C.S.; KOCH, G.G. **Categorical data analysis using the SAS system**. 2.ed. Cary: SAS Institute Inc, 2000. 629 p.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Bacillus thuringiensis subspecies israelensis strain. EG2215 Fact Sheet**. Washington, 1998.