



SETAC – Brazil

Avaliação Toxicopatológica em Ratos Expostos à *Pseudomonas putida*

V. L. S. S. DE CASTRO* & I. S. DE MELO

Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil

(Received August 15, 2006; Accepted November 22, 2006)

RESUMO

A bactéria *Pseudomonas putida* tem se mostrado hábil na degradação de vários xenobióticos, porém são poucos os estudos a respeito da segurança de seu uso para a saúde humana. A fim de avaliar os possíveis efeitos toxicopatológicos da bactéria, uma linhagem de *P. putida*, envolvida na biodegradação do herbicida propanil, foi administrada a ratos, em suspensões de 10^8 ufc mL⁻¹ via oral. Os animais foram observados diariamente, não havendo alterações clínicas ou quaisquer lesões em órgãos internos após a exposição à bactéria. Os animais também foram submetidos à necropsia em diferentes intervalos após a administração, com a retirada de vários órgãos para verificar a presença da bactéria nesses tecidos. A bactéria não cresceu nas amostras biológicas após 3 e 24 h da exposição, mas sim após 16 h, no pulmão no grupo tratado com a bactéria ativa. A confirmação em nível de espécie das colônias isoladas nos órgãos foi realizada pela análise do perfil dos ácidos graxos de membrana. O protocolo utilizado mostrou-se adequado para analisar a segurança de uso dessa bactéria em mamíferos.

Palavras-chave: efeitos toxicopatológicos, exposição de ratos, *P. putida*, biopesticidas, biorremediação.

ABSTRACT

Toxicopathological evaluation of rats exposed to *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida has been show useful for the bioremediation of various xenobiotics, but there is little information related to its security to human health. It was investigated the effects of *P. putida* involved in the herbicide propanil biodegradation in rats, in order to evaluate possible toxicopathological effects promoted by the bacteria exposure. Rats were exposed at a single oral dose of 10^8 cfu mL⁻¹. The animals were observed daily, not having clinical alterations at different intervals after the exposure. They were sacrificed and necropsied at these intervals and samples of various organs were removed to verify the bacteria presence on them. *P. putida* was not able to grow after 3 and 24 hours after exposure. However it was founded colonies of the agent 16 h after the exposure in lung homogenates. Confirmation of the diversity of bacteria was performed with the fatty acid methyl esters procedure. The protocol utilized showed to properly evaluate the security of this agent to mammals.

Key words: toxicopathological effects, rats exposure, *P. putida*, biopesticides, bioremediation.

INTRODUÇÃO

Uma vez que a sustentabilidade é uma direção a ser seguida, a política agrícola deve envolver ações que contribuam para isso. O interesse pelo uso de alternativas economicamente viáveis e menos agressivas ao ambiente tem crescido consideravelmente de modo a favorecer a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos. Nesse sentido, o uso de microrganismos tem se mostrado uma prática efetiva e adequada tanto em relação ao controle de pragas (biopesticidas) como

na conservação dos recursos biológicos e na recuperação de áreas poluídas e degradadas (biorremediação).

Além de sua eficácia, vários fatores atuam na demanda por esses produtos, tais como: a regulamentação de seu uso, a relação custo-benefício e o manejo adotado pelo agricultor com menor risco de toxicidade (Uri, 1999). Durante a década de 1990, ocorreu significativo incremento em relação ao número de produtos biológicos avaliados no Brasil quanto à segurança ambiental visando ao registro para fins comerciais. Esse aumento pode ser creditado à utilização de protocolos de avaliação e

*Corresponding author: Vera Lúcia S. S. de Castro, e-mail: castro@cnpmembrapa.br.

implementação de leis específicas brasileiras, em harmonia com a regulamentação internacional. Assim, a concessão de registro desses produtos pelos órgãos federais brasileiros está sujeita à prévia apresentação de dados que indiquem conclusivamente que o produto, quando usado de acordo com as prescrições, não causará efeitos significativamente adversos aos seres humanos ou ao ambiente. De forma similar ao controle biológico, a recuperação de áreas poluídas e degradadas pode ser efetuada por meio da biorremediação, com o uso de organismos vivos.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são encontradas comumente no solo e no filoplano. Embora algumas espécies de *Pseudomonas* sejam fitopatogênicas, outras podem ser benéficas para plantas, como *P. fluorescens* e *P. putida*, que são rizobactérias promotoras de crescimento (Fonseca *et al.*, 2001). Elas são apontadas como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas de alto potencial para utilização no controle biológico, tanto por sua grande capacidade de colonização de raízes, rápida e agressiva, prevenindo a invasão de patógenos (O'Sullivan & O'Gara, 1992), como pela produção de metabólitos secundários (sideróforos, β -1,3-glucanase, quitinases, antibióticos e ácido cianídrico) que inibem outros microrganismos deletérios (Leisinger & Margraff, 1978; Thomashow *et al.*, 1990). As *Pseudomonas* também podem se mostrar hábeis na degradação de uma gama de xenobióticos como alquilbenzoatos (Glazer & Nikaido, 1995), bifenis policlorados (PCBs) e nitrofenóis (Guo & Houghton, 1999), além do tolueno (Vercellone-Smith & Herson, 1997; Walia *et al.*, 2002).

Por sua vez, podem ocorrer efeitos adversos diretos e indiretos em organismos não-alvo da comunidade local, decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente. Os efeitos adversos potenciais são a possibilidade de sobrevivência, multiplicação, persistência, disseminação, patogenicidade e toxicidade do microrganismo.

A avaliação de impacto decorrente do uso dos biopesticidas requer conhecimento do produto e de seus metabólitos e de sua interação com os alvos específicos e com o ambiente onde ele será aplicado. Como os agentes microbiológicos são mais complexos do que os produtos químicos convencionais, observam-se diferentes aspectos relacionados a efeitos prejudiciais potenciais, como a produção de toxina ou a infectividade em um organismo.

O esquema de avaliação do risco da introdução desses microrganismos biodegradadores é feito, à semelhança dos agentes de controle biológico, em sistema de fases consecutivas. Dessa forma, se houver evidência de patogenicidade ou toxicidade, procede-se à fase seguinte e assim sucessivamente, visando avaliar o risco à saúde humana. Os impactos ambientais causados por esses microrganismos atualmente são estimados por meio de testes que utilizam uma "dose desafio" (ao redor de 1×10^8 unidades infectantes) do produto na Fase I, considerada de risco máximo (Castro *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2001). Os testes usados para a avaliação desses

microrganismos em relação à saúde humana, no tocante à toxicidade, patogenicidade e infectividade do produto, são baseados na extrapolação de resultados interespecíes entre a espécie utilizada, geralmente um roedor, e o homem.

Diante da escassez de dados a respeito da segurança de uso dessa bactéria, o objetivo do presente trabalho foi verificar os possíveis efeitos toxicopatológicos da *P. putida*, selecionada como biodegradadora do herbicida propanil, em organismos não-alvo, visando determinar a segurança para o ser humano.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para a avaliação toxicopatológica em animais de laboratório seguiram o esquema de Fases (USEPA, 1989; Castro *et al.*, 1999), que estabelece diretrizes para a condução de testes com mamíferos. Esses testes foram conduzidos considerando os aspectos de infectividade, toxicidade e patogenicidade do microrganismo.

Animais – Foram utilizados ratos Wistar, de aproximadamente 230 g, mantidos em condições padronizadas de luz (ciclo claro/escuro 12 h) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno. Foram expostos três animais em cada ponto.

Condições experimentais – Superfícies, material cirúrgico, equipamentos (autoclave, homogeneizador e câmara de fluxo laminar) e outros materiais como recipientes de vidro, cânulas de metal e pipetas sofreram monitoramento quanto ao controle de descontaminação.

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

Obtenção do isolado – O isolado foi inicialmente repicado, ficando armazenado em BOD até seu crescimento. Na fase exponencial, 18 h após o semeio em placa, o isolado foi centrifugado por 15 min em 5000 g, lavado em solução tampão fosfato (pH 7,0) e ressuspensionado no tampão (Chobchuenchom *et al.*, 1996).

Doses e tratamentos – A linhagem testada foi administrada a ratos em suspensões de 10^8 células mL^{-1} via oral em 1,0 mL de suspensão utilizando-se uma cânula metálica adequada. As células bacterianas foram colhidas do meio de cultura, foi preparada uma suspensão concentrada e realizadas várias diluições. A concentração da suspensão administrada foi ajustada com auxílio de espectrofotômetro ($A_{600} = 0,3$) que correspondia a 10^8 ufc mL^{-1} , segundo Lelliott & Stead (1987). Foram utilizados três tratamentos para cada via: bactéria ativa, bactéria inativada e o veículo de administração da bactéria, este como controle. A água e a ração foram retiradas 24 horas antes da administração da suspensão teste.

Observação de sinais e sintomas dos animais – Os animais foram 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.

Observação de patologias durante a necropsia – Os animais foram sacrificados e necropsiados com observação macroscópica dos órgãos 3, 16 e 24 horas 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, foram semeadas amostras de sangue, fígado, rim, mesentério e pulmão em placas de Petri contendo meio King B com propanil (Geels & Schippers, 1983), seguida de incubação e contagem das colônias.

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

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 (Svec *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2005; Bacon *et al.*, 2006). As bactérias a serem identificadas foram coletadas por meio

de alça de metal e colocadas em tubos específicos. Na sequência, foram executadas quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares: saponificação, metilação, extração, em que a fase aquosa (inferior) é descartada, e posterior lavagem. Após agitação e centrifugação, cerca de 75% da fase orgânica é pipetada e repassada para um vial específico para o aparelho da Agilent 6580 e detector Flame Ionization Detector (FID), com injetor automático. O volume de injeção amostral foi de 2 µL, em temperatura inicial de 170°C e final de 310°C durante a corrida de 20:45 minutos. A identificação comparativa foi feita entre o cromatograma obtido e uma biblioteca interna ao aparelho, fornecida pelo software Sherlock (Microbial Identification System versão 4.0), que calcula o índice de similaridade obtido para o isolado. A bactéria foi considerada perfeitamente identificada quando era encontrado índice de similaridade maior que 0,600 e diferença entre a primeira e a segunda identificação de até 0,100 no índice de similaridade.

RESULTADOS

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.

Quantificação do microrganismo nas amostras biológicas – não foram detectadas células de *P. putida*; essa bactéria não cresceu nas amostras biológicas após 3 e 24 h da exposição. Entretanto, nas amostras avaliadas após 16 h 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 à administração da suspensão com o agente ativo via oral. Os dados referentes à bactéria inativada e ao controle não foram retratados por não terem sido detectadas colônias nas amostras desse grupo.

[illegible]

DISCUSSÃO

Os testes pertinentes à legislação, para o registro de microrganismos com perfil biodegradador e biopesticida, têm por objetivo obter informações a respeito desses produtos no sentido de conhecer a possibilidade de prejuízos ambientais, incluindo plantas, animais e homem. As informações disponíveis, em sua maioria, referem-se a biopesticidas, principalmente o *Bacillus thuringiensis* e o Baculovirus. As informações referentes a outras bactérias, fungos e nematóides vêm sendo realizadas a partir do início da década de 1990, embora observações ambientais em longo prazo decorrentes do uso desses produtos sejam mais difíceis de ser obtidas.

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.

Observou-se que a metodologia utilizada para a avaliação da possível toxicidade, patogenicidade e/ou infectividade decorrente da exposição da *P. putida* em roedores foi adequada em relação à quantificação temporal do microrganismo nos vários tecidos animais. Assim, foi possível identificar o intervalo no qual ela permaneceu detectável no organismo. De forma similar, a metodologia utilizada permitiu verificar a possibilidade de infectividade da bactéria no organismo animal por meio do conseqüente aumento do número de colônias identificadas nas placas semeadas com amostras dos órgãos retirados durante a necropsia. Como 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 persiste e assim não infecta os tecidos. A seqüência desses testes em ratos confirmará ou não esta hipótese.

Portanto, com base nos presentes resultados, não houve infectividade da bactéria nos tecidos nem foram encontradas evidências de patogenicidade e toxicidade 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 terem sido encontradas 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. Recomenda-se, assim, especial cuidado e treinamento por parte do analista com a forma de exposição do animal, a manipulação das amostras e a assepsia, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação.

Levando-se em consideração os dados observados no presente trabalho, pôde-se concluir que o protocolo utilizado – observação clínica, observação de lesões na necropsia, quantificação nos tecidos e confirmação das colônias por análise de

perfil de ácidos graxos – mostrou-se adequado para analisar a segurança de uso deste produto para mamífero. De igual forma, em trabalhos anteriores (Castro *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2000), o método mostrou-se adequado à análise da infectividade e persistência do microrganismo nas várias amostras coletadas do organismo animal.

Por sua vez, o estabelecimento de critérios mais específicos para avaliar os possíveis efeitos prejudiciais nesses organismos pode desempenhar importante papel na avaliação de risco, a fim de obter decisões com adequada capacidade de predição, uma vez que em alguns casos os esporos de fungos podem permanecer viáveis nos tecidos (Castro *et al.*, 2001) e os de bactérias, nas fezes ou no ambiente (Castro *et al.*, 2000). Contudo, a *P. putida* não parece ocasionar efeitos prejudiciais a organismos não-alvo como os insetos (Schneider & Dorn, 2001).

Com a execução e o aprimoramento desses protocolos haverá mais subsídios técnicos para gerenciar os possíveis riscos envolvidos na liberação e/ou uso de determinado produto. Os resultados obtidos, além de sua aplicação na identificação de efeitos prejudiciais à saúde ambiental, poderão subsidiar e orientar avaliações de *P. putida* por agências reguladoras quanto ao seu uso comercial para fins de biorremediação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACON, C. W., HINTON, D. M. & HINTON JR., A., 2006, Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 185-194.
- CASTRO, V., CAPALBO, D., MORAES, G., NARDO, E. & OLIVEIRA, M., 1999, *Protocolos de avaliação de agentes microbianos de pragas para registro como biopesticidas*, v. 2 – Testes toxicopatológicos em mamíferos. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna (Embrapa Meio Ambiente, Documentos, 10).
- CASTRO, V., CAPALBO, D., CHAIM, A., LARANJEIRA, A. & SOARES, C., 2000, Métodos para avaliação de risco ambiental e ecotoxicológico de biopesticidas, Pesticidas. *Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente*, 10: 75-86.
- CASTRO, V., JONSSON, C., MELO, I. & NUNES, F., 2001, Avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. *Ecotoxicol. Environ. Restoration*, 4(1): 18-24.
- CHOBCHUENCHOM, W., MONGKOLSUK, S. & BHUMIRATANA, A., 1996, Biodegradation of 3-chlorobenzoate by *Pseudomonas putida* 10.2. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 607-614.
- 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, 35p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos, 143).
- GEELS, F. & SCHIPPERS, B., 1983, Reduction of yield depression in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatment with antagonistic fluorescent, *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. Z.*, 108: 207-214.
- GLAZER, A. N. & NIKAIIDO, H., 1995, Environmental applications. In: W. H. Freeman *et al.* (eds.), *Microbial biotechnology*. New York, p. 561-620.

- GUO, Z. & HOUGHTON, J., 1999, PcaR-mediated activation and Repression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* are Propagated by Binding to both the 35 and the 10 Promoter Elements. *Mol. Microbiol.*, 32: 253-265.
- KAUR, A., CHAUDHARY, A., Kaur, A., CHOUDHARY, R. & KAUSHIK, R., 2005, Phospholipid fatty acid – a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Curr. Sci.*, 89: 1103-1112.
- LEISINGER, I. & MARGRAFF, R., 1978, Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.*, 43: 422.
- LELLIOTT, R. A. & STEAD, D. E., 1987, *Methods for the diagnosis of bacterial plant disease*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 216p.
- O'SULLIVAN, D. & O'GARA, F., 1992, Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.*, 56: 662-674.
- SCHNEIDER, M. & DORN, A., 2001, Differential infectivity of two *pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera). *J. Invert. Pathol.*, 78: 135-140.
- SVEC, P., STEGNEROVA, H., DURNOVA, E. & SEDLACEK, I., 2004, Characterization of esculin-positive *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from an underground brook. *Folia Microbiol.*, 49(6): 725-730.
- THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M., BONSALE, R. F. & PIERSON III, L. S., 1990, Production of the phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 908-912.
- URI, N., 1999, The implications of US Government policy on the development and use of biopesticides. *Int. J. Environ. Poll.*, 11: 117-132.
- USEPA, 1989, *Pesticide Assessment Guidelines*. 192p. Subdivision M. Microbial Pest Control Agents and Biochemical Pest Control Agents, Washington: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances (disponível também em <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/regtools>).
- VERCELLONE-SMITH, P. & HERSON, D., 1997, Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* mt-2 containing the tol plasmid pww0. *Applied and Environ. Microbiol.*, 63(5): 1925-1932.
- WALIA, S., ALI-SADAT, S., BRAR, R. & CHAUDHRY, G., 2002, Identification and mutagenicity of dinitrotoluene metabolites produced by strain *Pseudomonas putida* OU83. *Pest. Biochem. Physiol.*, 73: 131-139.