

Ministério do Meio Ambiente

**IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS
NATURAIS RENOVÁVEIS**

**INTRODUÇÃO INTENCIONAL DE MICRORGANISMOS EXÓTICOS EM
TERRITÓRIO NACIONAL PARA UTILIZAÇÃO COMO AGROTÓXICOS
BIOLÓGICOS OU BIORREMEDIADORES**

PRODUTO IV – PROPOSTA DE CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL PARA O CONTROLE DA INTRODUÇÃO, NO BRASIL, DE ESPÉCIES EXÓTICAS DE MICRORGANISMOS DESTINADOS AO USO COMO AGENTES BIOLÓGICOS DE CONTROLE DE PRAGAS E DOENÇAS DE PLANTAS OU COMO AGENTES BIORREMEDIADORES

Consultor(a): Aline Daniela Lopes Júlio

Novembro/2019

ÍNDICE

IV.1 Discussão sobre eventuais riscos e impactos da ausência de avaliação de risco da entrada de microrganismos exóticos no país e discutir sobre a viabilidade de realização do procedimento de avaliação de risco	1
IV.2 Proposta de critérios e procedimentos que poderiam ser adotados pelo Ibama para o controle da introdução intencional de espécies exóticas de microrganismos destinados ao uso como agentes biológicos de controle de pragas e doenças de plantas cultivadas ou como agentes biorremediadores.	6
IV.3 Proposta de critérios e procedimentos para a contenção de espécies exóticas de microrganismos destinados ao uso como agentes biológicos de controle de pragas e doenças de plantas cultivadas ou como agentes biorremediadores.....	15
IV.4 Proposta de critérios e procedimentos para o monitoramento de espécies exóticas de microrganismos destinados ao uso como agentes biológicos de controle de pragas e doenças de plantas cultivadas ou como agentes biorremediadores.	17
Referências.....	21

IV.1 Discussão sobre eventuais riscos e impactos da ausência de avaliação de risco da entrada de microrganismos exóticos no país e discutir sobre a viabilidade de realização do procedimento de avaliação de risco

Antes da discussão dos riscos e impactos da ausência da avaliação de risco da entrada de microrganismos exóticos no país é necessário tentar conceituar de forma mais precisa a definição de microrganismo exótico. Conforme discutido no produto II, para macrorganismos, apesar de não haver um conceito científico de espécie exótica que seja consenso entre os pesquisadores, as premissas são muito bem estabelecidas. Pode-se dizer que, de modo geral, espécie exótica corresponde à espécie que vive fora da sua área de distribuição e ocorrência natural, tendo sido introduzida nesse ambiente como resultado direto ou indireto da atividade humana (Coblentz, 1990; Sala et al., 2000; Montgomery, 2011; Sagoff, 2018). Quando se trata de microrganismos não existe um conceito diferenciado de espécie exótica. Na verdade, para microrganismos em geral, devido às dificuldades de quantificar ou diferenciar as características morfológicas e a alta frequência de transferência horizontal de genes, o conceito de espécie em si já representa um desafio (Hanage et al., 2005). Adicionalmente, para microrganismos também são definidos alguns níveis abaixo de espécie, como o termo tipo (ou Type) que se refere a um conjunto de linhagens dentro de uma espécie, podendo ser chamado também de biótipos ou sorotipos e o termo estirpe que se refere a uma linhagem ou um único isolado de uma dada espécie (Sandle, 2016).

Pelo fato dessas descrições abaixo do nível de espécie serem importantes apenas em algumas situações específicas e na maioria das vezes a identificação no nível de espécie ser suficiente, acredita-se que o nível taxonômico de espécie seja adequado para a resolução taxonômica do conceito de microrganismo exótico. Assim, extrapolando os conceitos gerais de espécie exótica, propõe-se que uma espécie microbiana seja considerada como exótica quando ainda não tiver sua ocorrência natural registrada no território o qual se pretende introduzi-la.

Uma questão muito importante é que essa definição precisa do que venha a ser uma espécie exótica deve ser clara e não ser passível de gerar interpretações diversas. Pelas Legislações nacionais atualmente vigentes, esse conceito parece não se ater ao nível de espécie exótica, mas sim de linhagens exóticas, entretanto a informação não é passada de forma clara. No parágrafo único do 2º artigo da Lei 13.123, de 20 de maio de 2015, considera-se como “parte do patrimônio genético existente no território nacional o microrganismo que tenha sido isolado a partir de substratos do território nacional, do mar territorial, da zona econômica exclusiva ou da plataforma continental”. Já no Decreto Nº 8.772, de 11 de maio de 2016, define-se que o microrganismo não será considerado patrimônio genético nacional, quando for comprovado que “foi isolado a partir de substratos que não sejam do território nacional, do mar territorial, da zona econômica exclusiva ou da plataforma continental”. Da forma como essas Legislações foram redigidas, uma interpretação é

a de que qualquer espécie de microrganismo isolada de um substrato que não seja do território nacional e, independente de sua ocorrência nacional já ter sido comprovada, seria considerada exótica. Considerando ainda esse conceito qualquer espécie de microrganismo trazido de outro país seria exótica, mesmo que essa mesma espécie já tenha sido encontrada no território nacional. Sugerem-se retificações para que essa informação fique mais clara e detalhada e, ainda, conforme já discutido, que sejam consideradas duas propostas: 1. o nível taxonômico de espécie e não de estirpe/linhagem para a definição dos microrganismos exóticos e 2. ser considerado exótica tal espécie de microrganismo que não tenha sido identificada no território brasileiro. Os demais microrganismos importados poderiam ser definidos, por exemplo, apenas como microrganismos exógenos (membros de uma espécie indígena do território nacional, mas isolados de locais distintos daquele que se pretende introduzir).

Quanto aos critérios para a definição da ocorrência natural de microrganismos, novamente também não é uma questão simples e eles ainda não são bem estabelecidos. Devido à dificuldade de cultivo desses organismos apenas uma pequena fração da diversidade microbiana existente é conhecida, o que impossibilita definir com precisão se eles realmente ocorrem ou não em determinado território (Ogunseitan, 2005; Amann et al., 1995; Mocali & Benedetti, 2010; Sierra-García et al., 2014). Entretanto, o desenvolvimento de novas técnicas, principalmente aquelas baseadas no estudo de DNA, tem grande potencial de tornar o processo menos desafiador e esse avanço deve ser considerado.

Propõe-se que para a determinação da ocorrência natural de microrganismos em determinado território seja considerado como principal critério a existência de pelo menos um registro que comprove sua presença no território em questão. Para essa comprovação sugere-se que sejam consideradas publicações científicas, dados de depósitos em coleção que indiquem o local de coleta desses microrganismos e bancos de dados de acesso ao patrimônio genético como os dados do SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), criado desde 2016 com o objetivo de gerir o patrimônio genético, ou seja, “informação de origem genética de espécies vegetais, animais, microbianas ou espécies de outra natureza, incluindo substâncias oriundas do metabolismo destes seres vivos”. Propõe-se ainda, considerando as dificuldades de cultivo de microrganismo já mencionadas, que sejam aceitas publicações nas quais as espécies tenham sido identificadas apenas com a utilização de técnicas baseadas nos ácidos nucleicos, sem a realização de cultivo. Entretanto, é importante destacar a necessidade de que a identificação microbiana em nível de espécie baseada nos ácidos nucleicos, independente da fonte desse registro, tenha sido realizada com o uso de técnicas sólidas, amplamente reconhecidas e aceitas pela comunidade científica. Contudo, tendo em vista o rigor diferenciado entre os métodos polifásicos, baseados em características fenotípicas e genotípicas, e aqueles baseados apenas no

sequenciamento de ácidos nucleicos, sugere-se que quando a ocorrência registrada se basear na abordagem polifásica de identificação apenas um registro/notificação da espécie seja suficiente para comprovar a sua ocorrência natural no país e quando o registro for baseado apenas na análise das sequências de ácidos nucleicos, seja necessário pelo menos dois registros/notificações para comprovar a sua ocorrência natural no país. Essa sugestão é importante porque além da abordagem independente de cultivo se basear apenas em um tipo de característica, no caso gênica, erros de atribuição de taxonomia quando se utiliza banco de dados como referência para comparação podem ocorrer. Para otimizar o acesso a essas informações de ocorrências de espécie propõe-se a criação de um banco de dados nacional destinado à auxiliar na consulta de espécies indígenas do país.

Outra importante questão que precisa ser resolvida é a definição de quais métodos serão aceitos para a identificação da espécie exótica que se pretende utilizar. Para tanto, primeiro se recomenda a análise dos genes marcadores filogenéticos, como o gene rRNA 16S para bactérias e arqueas e o gene rRNA 18S e 28S, além da região espaçadora interna transcrita (ITS), para os fungos. Porém, como para muitos gêneros o uso desses marcadores não permite uma resolução taxonômica em nível de espécie, é importante o uso dos genes *housekeeping* para melhorar essa resolução. Nesses casos, para cada gênero de microrganismos de interesse, deve-se escolher os genes mais adequados para identificação taxonômica em nível de espécie com base na literatura científica. Essa, portanto, é uma abordagem de multilocus que pode ser obtida via amplificação e sequenciamento dos genes individuais ou via a análise desses genes dentro do sequenciamento do genoma da espécie em questão. Considerando os desafios experimentais e os custos de cada um desses métodos, sugere-se o sequenciamento do genoma por ser uma técnica mais rápida e, nos dias atuais, com custo-benefício satisfatório. Existem atualmente, por exemplo, empresas brasileiras prestadoras de serviço de sequenciamento bacteriano que fazem o sequenciamento, montagem e anotação do genoma com custo menor do que seria gasto em construção de primers, enzimas e kits de sequenciamento para o caso do uso da abordagem multilocus de amplificação dos genes individualmente. Num segundo momento, sugerimos que quando já existirem métodos de avaliação fenotípica para a espécie identificada, esses devem ser feitos como forma de validação da identificação em nível de espécie. Nesse caso, outra técnica que pode ser bastante útil para a validação da identificação da espécie realizada pela investigação dos genes, é o sequenciamento das proteínas ribossomais via técnicas de cromatografia/espectrometria, como a espectrometria de massa baseada em MALDI-TOF.

Nos produtos anteriores, discutiu-se sobre os principais possíveis riscos e impactos decorrentes da introdução ambiental de microrganismos exóticos. Dentre os principais, podemos listar: Desencadear processos alérgicos em humanos e animais pelo contato; Produção de antibióticos ou outros metabólitos ativos tóxicos; Patogenicidade para organismos não alvo;

Potencial de recombinação gênica; Disseminação para além da área de interesse; Colonização permanente do ambiente no qual foi introduzido; Alteração da composição da comunidade microbiana indígena, causando desequilíbrios do ecossistema, inclusive, nos ciclos biogeoquímicos; Interferência na eficácia de inimigos naturais de pragas por meio de deslocamentos competitivos; Se tornarem invasores, provocando extinção local ou global de uma espécie nativa (alvo ou não) ou redução da distribuição e abundância de organismos nativos. Mas reforça-se, que praticamente todos esses impactos podem decorrer da introdução de qualquer microrganismo, mesmo ele sendo nativo. Apenas a possibilidade de redução da abundância, distribuição ou extinção de espécies nativas poderia ser considerado como um risco específico de espécies exóticas. Adicionalmente, destaca-se que, conforme exposto no produto II, foram poucos os efeitos ambientais negativos encontrados em decorrência da liberação de microrganismos exóticos como Agentes de Controle Biológicos (ACB). Já para agentes de biorremediação, não se encontraram relatos do uso de microrganismos exóticos, mas nenhum dano ambiental em decorrência da utilização de microrganismos em geral foi localizado também.

Por outro lado, os benefícios do uso desses microrganismos são extensos, sendo alguns dos principais para os ACB: Uso para o controle de espécies exóticas invasoras, permitindo o retorno das condições ecológicas de uma área que sofreu dano pela praga invasora e redução no uso de agrotóxicos químicos, o que diminui os gastos do sistema de saúde decorrente da exposição e redução da contaminação de águas, solos e alimentos. E para os agentes de biorremediação: Utilização para degradação de contaminantes de interesse, principalmente recalcitrantes, para os quais não se identificou nenhum microrganismo nativo capaz de degradá-lo e melhor custo-benefício, simplicidade, baixo impacto ambiental e aceitação pública se comparado às técnicas físico-químicas. Assim, com base nos levantamentos realizados e mensurando-se os riscos e benefícios, considera-se a introdução e uso de microrganismos exóticos em território nacional benéfica, principalmente para uso como ACB. Como agentes de biorremediação esse uso também pode ser benéfico, entretanto sob condições mais específicas. Um exemplo seria contra poluentes recalcitrantes ou emergentes para os quais não se tenham identificado ainda microrganismos nativos capazes de degradá-los com a mesma eficiência, já que estudos demonstram que a comunidade do local impactado pelo poluente costuma ter um desempenho melhor do que qualquer outro microrganismo introduzido (OECD, 2015).

É claro que, por não ser um processo isento de riscos, é necessário que essa introdução seja precedida por uma avaliação de risco e só seja autorizada se ficar comprovada a segurança da utilização do microrganismo exótico. Não há uma única metodologia ou protocolo universal de avaliação de risco da introdução ambiental de microrganismos, sejam eles exóticos ou não. Encontram-se na literatura códigos e normativas que tratam da importação e liberação ambiental de

microrganismos, inclusive exóticos, os quais foram levantados e consultados para a elaboração do produto I, e é neles que cada país estabelece em detalhes os procedimentos para a avaliação de risco de microrganismos que se deseja importar.

Em geral, uma avaliação de risco requer o fornecimento do máximo de informações possíveis sobre a espécie que se pretende introduzir no ambiente, a vulnerabilidade do ambiente que receberá essa espécie, o seu potencial de se estabelecer no ambiente e de alcançar novas áreas, bem como suas formas de dispersão, presença de inimigos naturais, predadores ou parasitas, além dos custos associados aos processos de contenção dessa espécie (Andersen et al., 2004; Stohlgren et al., 2006). Geralmente essa avaliação de risco está associada a um relatório de manejo de risco, o qual tem por objetivo selecionar e implementar ações que impeçam ou reduzam a chance de ocorrência de determinado risco ambiental (Andersen et al., 2004).

É necessário avaliar também em termos quantitativos e qualitativos a disponibilidade de recursos ambientais e a vulnerabilidade do ecossistema, conhecer a abundância e distribuição das espécies nativas e as relações ecológicas que estabelecem umas com as outras, bem como características abióticas que compõem o ecossistema como temperatura, clima, altitude, precipitação, pH, dentre outros (Stohlgren et al., 2006). Em relação ao ambiente que receberá uma espécie não nativa, para que os estudos de avaliação de risco adquiram real confiabilidade, todos os parâmetros descritos anteriormente também devem ser analisados em épocas diferentes, tais quais como verão e inverno, período seco e chuvoso, e por diversas vezes (Stohlgren et al., 2006).

Após avaliação dos resultados e dados obtidos com os testes realizados é preciso definir o nível de risco da utilização do microrganismo. Em geral, após a avaliação de risco, pode-se categorizá-lo de acordo com o que é proposto pela OECD, 2015:

- Alto risco: Implica que riscos severos, duradouros ou efeitos adversos generalizados são prováveis para cenários de exposição previstos, usos conhecidos, previsíveis ou pretendidos para o microrganismo.
- Risco médio: Implica que efeitos adversos moderados são prováveis para cenários de exposição previstos, usos conhecidos, previsíveis ou pretendidos para o microrganismo.
- Baixo risco: Implica que quaisquer efeitos adversos previstos para cenários de exposição provável do microrganismo são raros ou leves e com resolução natural.

Sugere-se que espécies exóticas de microrganismos só possam ser utilizadas se puder ser concluído que apresentem baixo risco de utilização.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é quem estabelece as normas e procedimentos para a importação de microrganismos destinados ao uso como agrotóxicos biológicos. Com relação a microrganismos exóticos não há legislações que os regule ou normas brasileiras diferenciadas que discorram sobre a avaliação de seus riscos. No

tópico seguinte as principais normas brasileiras para a introdução de microrganismos em geral e que são úteis serão discutidas, assim como propostas específicas a serem aplicadas para microrganismos exóticos.

IV.2 Proposta de critérios e procedimentos que poderiam ser adotados pelo Ibama para o controle da introdução intencional de espécies exóticas de microrganismos destinados ao uso como agentes biológicos de controle de pragas e doenças de plantas cultivadas ou como agentes biorremediadores.

A respeito dos critérios e procedimentos que poderiam ser adotados pelo IBAMA para o controle da introdução intencional de espécies exóticas de microrganismos, optou-se por categorizar tais sugestões de procedimentos em duas abordagens: 1. Medidas de controle da introdução intencional de espécies exóticas de microrganismos relacionadas ao controle do processo de realização dessa introdução, que passa pelas etapas de Registro Especial Temporário (RET) para experimentação, importação, quarentena e testes de aplicação em campo e 2. Medidas de controle da introdução intencional de microrganismos exóticos relacionadas à avaliação de risco para autorização de seu registro definitivo e utilização no ambiente.

Uma estratégia que pode ser interessante para normatizar a importação e uso do microrganismo exótico no Brasil é considerar os procedimentos e normas de avaliação de risco que estão listadas nas legislações vigentes no país para o registro de produtos correlatos e que já são aplicadas tanto para os produtos de origem nacional quanto internacional, acrescentando-se mais alguns procedimentos que propõe-se serem adotados devido às características da condição de exótico. Além das legislações brasileiras, sugere-se o uso de publicações de órgãos internacionais como da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). Dessa forma, inicialmente serão descritos abaixo, de forma simplificada, os procedimentos das legislações brasileiras vigentes para a importação de microrganismos destinados ao uso como ACB que propõe-se serem mantidos e utilizados também para o controle da introdução intencional tanto de ACB quanto de biorremediadores exóticos.

Para importação de microrganismos destinados ao controle biológico, inicialmente é necessário solicitar o RET para que possam ser realizados testes em campo para avaliar a eficácia e segurança do produto. A Instrução Normativa Conjunta MAPA/ANVISA/IBAMA N° 25, de 14 de setembro de 2005, estabelece os procedimentos a serem adotados para efeito das avaliações preliminares para obtenção desse registro. O pedido inclui um relatório preliminar contendo informações disponíveis na literatura sobre a classificação taxonômica e biologia do microrganismo, tais como sua variedade de hospedeiros e pragas alvo. Inclui também análises de informações sobre sua toxicidade, ecotoxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, além de

medidas quarentenárias aplicáveis. Devem ser fornecidas informações do tipo de pesquisa que será realizada (se em laboratórios, estufa, casa de vegetação, estação experimental ou campo), detalhes do projeto experimental e dados necessários à avaliação toxicológica e ambiental preliminar. Se, após a avaliação do IBAMA, ANVISA e MAPA, o pedido de RET for aceito o interessado pode solicitar uma licença para importar o microrganismo de interesse, justificando a razão para fazê-lo. Outras informações que também devem ser informadas incluem: o número de importações, os organismos que serão recebidos, os possíveis fornecedores e locais onde os organismos a serem introduzidos serão coletados. Sugere-se que no caso de espécies exóticas de microrganismos seja claramente justificada pelo interessado em importá-lo a razão da necessidade e importância da utilização desse tipo de microrganismo.

Em seguida, a parte interessada deve contactar a instalação de quarentena responsável para receber o microrganismo, a qual deve emitir um documento escrito concordando com a importação e seu processamento. O Laboratório "Costa Lima" (LQC) situado na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP e credenciado pela Portaria Nº 106, de 14 de Novembro de 1991, atualmente é o responsável pela quarentena de ACBs microbianos, mas para os microrganismos agentes de biorremediação não há um direcionamento claro a respeito do laboratório responsável por essa quarentena. Sugere-se que seja apontado e direcionado de forma clara, qual o laboratório será responsável pela quarentena de microrganismos exóticos, sejam eles destinados ao uso como ACB ou biorremediadores.

As principais atividades do laboratório de quarentena que recebe o microrganismo são: Avaliação técnica de cada solicitação de introdução de organismos-benéficos no país; Encaminhamento dos processos ao MAPA; Desembarço dos organismos nos portos de entrada; Quarentena e avaliação dos organismos em laboratório quanto à segurança de sua liberação no campo; Repasse dos organismos aos interessados; Acompanhamento do andamento do processo após a liberação do organismo no campo por um período de 24 meses. Em relação aos testes para avaliação do risco do uso desses organismos realizados nas instalações do Laboratório determina-se que eles devem permanecer em quarentena até que tenham sua identificação taxonômica comprovada, estejam livres de parasitas, patógenos e outros organismos indesejáveis, e que tenham sido testados quanto à segurança através de especificidade ao hospedeiro, para só então serem liberados. As avaliações técnicas devem ser feitas por especialistas de reconhecida capacitação científica no assunto e garantir que somente sejam permitidas liberações em campo de organismos reconhecidamente eficazes e que não apresentem riscos ambientais. Dada a importância desse processo de quarentena para a segurança das importações, sugere-se que, se comprovado que o pedido de introdução é para microrganismo exótico, após a chegada ao Brasil, esses microrganismos sejam necessariamente encaminhados aos laboratórios de quarentena. Neles serão

submetidos a todos os procedimentos descritos anteriormente. Sugere-se também que este microrganismo deve ser importado sob contenção, com uso de embalagens resistentes e de preferência, mediante células liofilizadas.

Após a liberação da quarentena, pode-se realizar a pesquisa e experimentação que possibilite atestar a eficiência e praticabilidade agrônômica do produto e avaliar se ele apresenta fitotoxicidade, de forma a comprovar a segurança de seu uso. As diretrizes e exigências para a realização dessa pesquisa e experimentação estão descritas na Instrução Normativa MAPA Nº 36, de 24 de novembro de 2009, a qual sofreu alterações, inclusões e revogações previstas na Instrução Normativa SDA Nº 42, de 5 de dezembro de 2011 e Instrução Normativa SDA Nº 15, de 7 de julho de 2016. Antes da experimentação é necessário informar dados gerais da área de estudo: área total, área disponível para a pesquisa, a situação da conservação do solo, localização de corpos d'água, áreas destinadas à preservação ambiental e áreas do entorno da estação. Em geral os ensaios são realizados em casa de vegetação ou em condições de campo e em região representativa da cultura de interesse no território nacional. A entidade credenciada para realizar os ensaios deve enviar relatório dos ensaios experimentais e resultados obtidos relativos à eficiência e praticabilidade agrônômica, de fitotoxicidade e de resíduos, conforme o caso, até o décimo dia útil de cada mês para a representação do MAPA. Durante a experimentação é preciso que a área seja demarcada com avisos de advertência e todas as culturas sejam destruídas ao fim. Para novos produtos é necessário realizar 3 (três) testes de eficiência e praticabilidade agrônômica, para cada cultura e alvo biológico, sendo conduzidos em regiões diferentes e representativas do cultivo da cultura ou na mesma região, mas em safras diferentes e um relatório técnico atestando a não-fitotoxicidade do produto nas suas indicações de uso. É com base nesses resultados que se define a indicação da cultura e alvo biológico recomendado e informações como dose do produto, época de aplicação, intervalo entre as aplicações e intervalo de segurança proposto.

Seguindo o mesmo raciocínio das propostas apresentadas até então e para tornar viável o processo da introdução segura e controlada de microrganismos exóticos, propõe-se que para esses microrganismos, tanto os destinados ao uso como ACB como os biorremediadores, seja exigida essa experimentação, em casa de vegetação ou em campo, e que os ensaios sejam focados na segurança de seu uso, além da eficiência agrônômica. Esses testes poderiam ser conduzidos com as mesmas diretrizes gerais já utilizadas atualmente em relação a área, forma de aplicação do produto, etc. Sugere-se adicionar normas relacionados ao rigor do planejamento experimental e número de controles, além do monitoramento do processo, para que se forneça além de resultados que atestem a não fitotoxicidade do produtos, resultados que atestem que esse microrganismo não provocou graves desequilíbrios na comunidade nativa e nem afetou a qualidade do solo ou outros organismos não alvo. Sendo o seu uso permitido apenas nessas condições.

Com relação à abordagem 2, que se refere às medidas de controle da introdução intencional de microrganismos exóticos relacionadas à avaliação de risco para autorização de seu registro definitivo e utilização, também serão descritas abaixo as exigências das legislações brasileiras vigentes que propõe-se serem utilizadas para o controle da introdução intencional tanto de ACB quanto de biorremediadores exóticos, especialmente para a avaliação de risco à saúde humana e ambiental.

A respeito dos microrganismos destinados ao controle biológico, a Instrução Normativa N° 3, de 10 de março de 2006, deixa claro que para a avaliação da segurança do uso do ACB, algumas informações de testes são requeridas. Para produtos importados esses testes podem ser realizados no país de origem desde que os laboratórios possuam certificados de “Boas Práticas Laboratoriais” Dentre essas informações requeridas se encontram testes de especificidade e efeitos sobre organismos não alvo, testes de toxicidade e patogenicidade do ACB à saúde humana; testes para avaliação da pureza da cultura estoque do microrganismo contendo sua identificação e quantificação precisa, testes que detectem contaminações químicas ou biológicas que podem estar presentes no produto final, além da avaliação dos riscos ao ambiente e potencial corrosivo dos materiais de acondicionamento do produto.

Em relação aos riscos ao ambiente, deve ser enviada junto ao pedido de registro dos ACB a avaliação de danos sobre organismos não alvo e comportamento ambiental do agente microbiológico. Essas informações deverão ser encaminhadas ao IBAMA. Esta avaliação é feita através de testes estabelecidos em quatro Fases. Os testes da fase I incluem testes de patogenicidade para aves por via oral ou inalatória, mamíferos silvestres, peixes de água doce e invertebrados de água doce, plantas não alvo, insetos não alvo, abelhas, minhocas, além de animais de estuários marinhos quando o uso for direto em estuário e ambientes marinhos, ou com expectativa de atingir tais ambientes em concentrações significativas. Quando forem observados efeitos tóxicos ou patogênicos em qualquer dos estudos da Fase I, serão exigidos testes de comportamento no ambiente em que o ACB será destinado (Fase II). Quando efeitos tóxicos sobre organismos não alvo selvagens, terrestres ou aquáticos forem observados em um ou mais testes da Fase I e os resultados da Fase II indicarem que pode haver exposição de tais organismos ao agente microbiológico serão realizados testes mais completos de exposição a esses organismos (Fase III). Na fase III pode-se avaliar também a patogenicidade crônica do ACB à organismos não alvo, efeitos sobre reprodução de aves e ciclos biológicos de peixes, especificidade do ACB a invertebrados aquáticos, estudos de perturbação do ecossistema aquático, além do efeito sobre plantas não-alvo. Por fim, na fase IV serão feitos testes sob condições ambientais controladas ou no ambiente real de campo para avaliar efeitos em organismos que foram afetados de acordo com as fases anteriores, como aves e mamíferos, organismos aquáticos, insetos predadores e parasitóides e insetos polinizadores.

Além desses testes, são exigidas informações a respeito da toxicidade e patogenicidade do ACB à saúde humana mediante três fases: Fase I: consiste em uma bateria de testes de curta duração, onde o organismo teste (mamífero) recebe uma dose máxima única do agente de controle com o objetivo de se obter a máxima chance do agente de controle causar toxicidade, infectividade e patogenicidade. Se nenhum efeito adverso for observado na Fase I, não há necessidade de se realizar nenhum dos testes da Fase II e Fase III. Fase II: avalia uma situação particular, quando se observa toxicidade ou infectividade na Fase I, sem evidências de patogenicidade. Quando for observada a patogenicidade na Fase I, devem ser realizados os estudos já na Fase III.

Para os agentes biorremediadores, a instrução Normativa do IBAMA Nº 5, de 17 de maio de 2010, estabelece os procedimentos e exigências a serem adotados para o seu registro. Neste documento são descritos alguns critérios que devem ser seguidos para a segurança do produto. Dentre as informações requeridas, está a identificação precisa dos microrganismos e ingredientes ativos dos produtos. Deve-se informar a classificação taxonômica, local de origem, coleções de cultura nas quais se encontram, quando for o caso, e metodologias utilizadas para a identificação. Além das informações sobre as propriedades físico-químicas do produto formulado e comportamento ambiental, informações técnicas sobre possíveis impactos ambientais indesejáveis decorrentes da aplicação do remediador, assim como descrição dos procedimentos a serem adotados para fins de desativação do produto, recomendações sobre o destino final das embalagens, medidas a serem adotadas em caso de derramamento acidental do produto e primeiros socorros em caso exposição humana acidental, além de indicação e descrição dos Equipamentos de Proteção Individual - EPI's necessários para aplicação.

Informações técnicas sobre potencial tóxico e patogênico dos ingredientes ativos dos produtos da biorremediação também são requeridas, com indicação das fontes bibliográficas consultadas e estudos, testes ou publicações técnico-científicas que fundamentam tais informações. Além disso, dependendo das características dos microrganismos que compõem o produto e do conhecimento disponível, poderão ser solicitados testes comprobatórios sobre seu potencial tóxico e patogênico. Estabelece-se também que não será concedido registro de produto que contenha microrganismos potencialmente patogênicos, além de qualquer outro produto cuja composição ou forma de aplicação ofereça riscos de efeitos danosos.

Propõe-se, inicialmente, que esses testes e condições sejam aplicados a todos os microrganismos exóticos, sejam eles destinados ao controle biológico ou à biorremediação. Esses testes são bastante completos, aceitos mundialmente e considerados pela comunidade científica como eficazes e suficientemente projetados para detectar a patogenicidade, toxicidade aguda de componentes tóxicos dos agentes microbianos e também a possibilidade de efeitos adversos contra não alvos (OECD, 2017), alguns dos principais riscos relacionados ao uso desses microrganismos,

como já mencionado. Por isso, adicionalmente a esses testes, sugere-se apenas alguns procedimentos que podem aumentar o controle da introdução intencional de microrganismos exóticos, visando a obtenção de uma maior segurança na utilização desses organismos. Caso esses testes ou algum dos procedimentos que serão propostos a seguir demonstrarem que a utilização do microrganismo exótico pode vir a representar algum risco sugere-se, tal qual já é realizado para os demais microrganismos atualmente, que seu uso não seja autorizado.

Uma adição interessante aos testes mencionados e que pode ser considerada é a avaliação de efeitos tóxicos/antagônicos também contra outros microrganismos não alvo, as quais poderiam ser realizadas por meio de testes de antagonismo e são importantes para avaliar os riscos do microrganismo exótico alterar a comunidade microbiana indígena, causando desequilíbrios, ou se tornar uma espécie invasora. Outra medida sugerida para aumentar o rigor na avaliação do risco de patogenicidade/virulência e toxicidade do microrganismo exótico é a investigação gênica. O uso de técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento total do genoma, tem sido considerado como uma ferramenta poderosa para a avaliação de riscos de microrganismos. A análise do genoma completo (DNA cromossomal e plasmidial), por exemplo, tem sido usada para a identificação de patógenos microbianos de origem alimentar pela EFSA (European Food Safety Authority). Neste caso, as informações dos genomas são utilizadas com intuito de detectar genes que codificam enterotoxinas e cereulida sintase, por exemplo.

Para os microrganismos exóticos destinados ao uso como ACBs ou biorremediadores sugere-se a avaliação de genes relacionados à patogenicidade aos humanos e às plantas no genoma do microrganismo que se pretende introduzir. Dentre as características relacionadas a esse potencial pode-se citar a presença do sistema de secreção de proteínas do tipo III, que é responsável pela injeção de proteínas bacterianas específicas nas células eucarióticas, a presença de bombas de efluxo que são capazes de bombear para fora das células vários tipos de antibióticos (Fernandes et al., 2003; Davison, 2005). Além da presença de genes relacionados à expressão de toxinas, exotoxinas ou endotoxinas, adesinas, receptores para interações com células de mamíferos, hemaglutininas, fimbrias, pilus tipo I e tipo IV, proteínas relacionadas à invasão da célula hospedeira (invasivinas) e ilhas de patogenicidade, dentre outros (OECD, 2016). Para acessar as características genéticas de patogenicidade de fungos, pode ser realizada a busca de genes relacionados a inúmeras doenças fúngicas pelo banco de dados DFVF (database of fungal virulence factors), como por exemplo para alergias, infecções cutâneas, criptococoses, além de manchas de folha, antracnose, dermatofitoses, dentre outras (Lu et al, 2012). Para os vírus, características genéticas relacionadas ao seu potencial de modificar as defesas do hospedeiro, elevada capacidade de multiplicação dentro do hospedeiro e toxicidade ao hospedeiro devem ser avaliadas (Flint et al., 2009). Quando forem detectados genes com homologia para essas características sugere-se que

sejam requeridos testes que demonstrem a não funcionalidade desses genes da estirpe em questão para constatar sua segurança (OECD, 2017).

Outro ponto, como já discutido no tópico IV.1, é a importância de garantir que a identificação em nível de espécie do produto a ser introduzido seja precisa. Atualmente, na legislação para registro dos produtos de controle biológico, a exigência para a identificação do organismo é de que ela seja feita por instituições de pesquisa e ensino, mas não deixa claro o nível de confiabilidade aceitável para os métodos que serão utilizados nestas instituições. Neste documento sugere-se que a identificação do microrganismo à nível de espécie seja feita mediante a abordagem polifásica, que inclui características moleculares e fenotípicas e com o uso das técnicas mencionadas no tópico IV.1.

Outra questão importante que sugere-se ser avaliada é a confirmação da identificação do microrganismo exótico no estoque de uso em nível de linhagem antes da realização de novas introduções no ambiente, dado que é muito comum ocorrerem contaminações com outros microrganismos. Para tanto, sugere-se utilizar uma técnica de *fingerprint* do genoma, o GTG5. Esse método consiste na amplificação via PCR de uma região repetitiva e palindrômica de GTG que se estende por todo o genoma do microrganismo, sendo que cada microrganismo terá um perfil genômico característico da estirpe (Kathleen et al., 2014). Neste caso, será necessário fazer uma amplificação do estoque de microrganismo antes da primeira introdução para servir como controle para as próximas amplificações. Assim, antes das novas aplicações do microrganismo deve-se comparar o perfil de bandas para verificação de que se trata do mesmo organismo.

Esse procedimento será importante também para verificar possíveis adições de regiões no genoma do microrganismo via recombinação, o que pode ser um alerta para o risco do uso do microrganismo e demandará mais investigações. Entretanto, é importante ter em vista que mesmo no ambiente as recombinações gênicas são eventos naturais e sua frequência, além de ser baixa, depende muito do genótipo do organismo (OECD, 2014). Além disso, com as análises de risco que são propostas neste documento, muitos caracteres de patogenicidade/virulência do microrganismo, independentemente de estarem presente no cromossomo ou em elementos móveis, já terão sido detectados nos testes enviados com o pedido de liberação de importação do microrganismo, sendo possível, portanto, impedir a introdução no país de microrganismos que apresentem patogenicidade/virulência em elementos genéticos móveis.

Observa-se que medidas para a aplicação controlada do microrganismo exótico no ambiente, após sua segurança ser atestada com base experimental e, conseqüentemente, ser emitida sua autorização de uso, são as mais escassas tanto nas legislações nacionais e internacionais que tratam da liberação do uso de ACB ou biorremediadores como nos trabalhos científicos. Parte dessa dificuldade de se encontrar apontamentos de como fazer o controle da introdução no ambiente se dá

pelo fato de que propostas gerais podem ser muito vagas e as medidas de controle mais efetivas precisam ser analisadas caso a caso, pois dependem do grupo de microrganismo que será introduzido (fungo, bactéria, protozoário ou vírus), de características próprias da espécie e dos aspectos físicos do ambiente em que será realizada a introdução. Todavia, sugere-se algumas medidas gerais que merecem a atenção para que, após serem obtidas as autorizações de uso com base nos resultados dos testes anteriores, a introdução e aplicação desses microrganismos no ambiente também ocorra de forma controlada. Dentre elas, o estabelecimento de uma zona de amortecimento, também chamada de zona tampão, adjacente à zona onde os microrganismos serão introduzidos. Essa zona tampão precisa ter uma extensão adequada para evitar que o microrganismo se propague para fora da zona de introdução. Outro ponto importante é a aplicação do produto microbiano em zonas alternadas para que o microrganismo não espalhe de modo exacerbado na área e depois seja difícil a sua contenção. Caso os testes apresentados indiquem toxicidade do produto para abelhas deve-se reforçar a proibição já existente atualmente para que a aplicação aérea não seja permitida, assim como a aplicação em época de floração, em período imediatamente antes do florescimento ou quando for observada visitação de abelhas na cultura, para evitar exposição dos polinizadores.

A introdução do microrganismo exótico, inicialmente, numa área de tamanho menor do que a área total que se pretende introduzi-lo também é uma sugestão que pode auxiliar no controle do processo de sua aplicação no ambiente. Essa medida permitirá a observação do comportamento inicial do ACB ou biorremediador para dar mais segurança de que a introdução na área total não irá causar danos/desequilíbrios ao ambiente. Entretanto, essa medida não exclui a necessidade de que sejam apresentados durante a avaliação de risco, testes com o produto a ser introduzido que tenham sido feitos em condições simuladas de campo, como já é previsto nas legislações citadas anteriormente. Adicionalmente, padronizar o intervalo de tempo e as técnicas possíveis de serem utilizadas para o monitoramento pós introdução, cuja proposta será abordada no tópico IV, é muito importante para detectar possíveis efeitos adversos que o microrganismo exótico está causando no ambiente, mesmo que todas as etapas anteriores tenham sido realizadas com rigor.

Outra sugestão que pode contribuir para uma melhor análise de risco da introdução intencional do microrganismo exótico é a criação de um comitê de análise de risco formado por especialistas nas diferentes áreas de controle biológico microbiano ou nas áreas de biorremediação, como foi descrito no produto I na Universidade da Flórida (UF) em parceria com o Instituto de Alimentos e Ciências Agrárias (IFAS). Esse referido comitê é responsável por conduzir a revisão de todos os agentes antes que eles sejam liberados e antes que o pedido de liberação tenha sido enviado aos órgãos de autorização. Dessa forma, dentre os objetivos deste processo de revisão inclui-se o fornecimento de revisão científica interna e avaliação da solicitação de permissão para liberação

visando a ajudar a melhorar a aplicação das licenças de introdução intencional no país. Além disso, o comitê fornece uma triagem adicional com a avaliação das possíveis preocupações não cobertas em outras revisões. Sendo assim, mediante o trabalho do comitê proposto, medidas de introdução controlada poderão ser sugeridas para cada caso de introdução de microrganismo exótico. Além disso, a atuação desse comitê poderá ser utilizada para a construção de guias de aplicação segura de espécies microbianas exóticas no ambiente, levando em consideração os diferentes modelos em que esta introdução pode ocorrer.

É muito importante que no pedido de importação e registro de produtos contendo o microrganismo exótico sejam acrescentadas também possíveis medidas de mitigação gerais caso, mesmo que todo o processo tenha sido realizado de forma segura e controlada, algum impacto negativo em decorrência da introdução ambiental desse microrganismo venha a ocorrer. Entretanto, caso algum dano realmente ocorra, medidas de mitigação mais detalhadas deverão ser elaboradas caso a caso, considerando o dano que está sendo causado e as características do microrganismo que foi introduzido.

Apesar de não ser possível propor planos universais de mitigação de impactos alguns princípios gerais devem ser seguidos. Independente de qual impacto negativo, dentre os já mencionados, o microrganismo exótico esteja causando, deve-se sempre priorizar medidas que possibilitem sua erradicação, principalmente se ele estiver se mostrando um microrganismo invasor já que é mais fácil erradicar espécies exóticas e invasoras no início do estágio de invasão, quando a sua população é menor e está menos dispersa pelo ambiente. O uso de procedimentos de rastreamento e modelagem pode ser útil para o controle desses microrganismos invasores, pois ajudam a direcionar as estratégias no planejamento para controlá-los.

Caso não seja possível erradicar a espécie exótica, deve-se tentar utilizar medidas que, ao menos, minimizem a sua dispersão ou seus efeitos danosos. Dentre as quais pode-se citar a construção de valas ou aberturas no solo para controlar a dispersão de fungos invasores, escavação e incineração de plantas não alvo que estejam sendo afetadas pela espécie invasora, alteração de alguma propriedade física ou nutricional do ambiente que cause prejuízo à sobrevivência da espécie exótica, adição de nutrientes para tentar restabelecer o equilíbrio da microbiota nativa ou das condições nutricionais do ambiente, dentre outras. Destaca-se, entretanto, que a depender do dano que esteja sendo causado não é possível estabelecer apenas medidas de mitigação, podendo ser necessário o uso de métodos mais agressivos e em caráter emergencial até que medidas mais direcionadas possam ser planejadas e colocadas em prática, como o uso de agrotóxicos químicos ou incineração dos solos de ambientes impactados.

IV.3 Proposta de critérios e procedimentos para a contenção de espécies exóticas de microrganismos destinados ao uso como agentes biológicos de controle de pragas e doenças de plantas cultivadas ou como agentes biorremediadores.

Como discutido no item IV.1, os principais impactos negativos causados pela introdução de agentes microbianos no ambiente estão relacionados ao deslocamento competitivo, patogenicidade, toxicidade, efeitos adversos nos organismos não-alvo e alergenicidade. No caso do microrganismo exótico um agravante dos riscos que pode ocorrer é ele se tornar uma espécie invasora devido à possível ausência de um organismo competidor que poderia atuar no controle do seu crescimento populacional. Dessa forma, é importante que esse microrganismo seja mantido na área de introdução e não se disperse para muito além desses limites. Adicionalmente, é importante que esse microrganismo seja transportado com segurança do país de origem até o laboratório brasileiro que fará sua quarentena e não escape dessa área até que seja confirmada a segurança do seu uso. Para isso algumas sugestões de medidas de contenção do microrganismo exótico podem ser pensadas.

Durante a importação do microrganismo exótico, uma medida que garante a sua contenção, é que ele seja transportado acondicionado, no mínimo, em embalagem dupla, sendo a embalagem primária aquela que fica em contato direto com o produto e a embalagem secundária a que envolve a embalagem primária. Essas embalagens devem ser resistentes e apropriadas ao acondicionamento do microrganismo, de modo que garantam sua integridade e evitem perdas e possíveis escapes. Sempre que possível, os organismos devem ser transportados sem seus hospedeiros (para reduzir os riscos de quarentena) e sob estágio de dormência ou inativos, pois isso diminui a probabilidade de escaparem da embalagem. O envio de células microbianas liofilizadas, por exemplo, é mais seguro porque com a liofilização os recipientes de envio podem ser menores facilitando seu manuseio, diferente do que ocorreria com o uso de meios úmidos e recipientes maiores. Outro ponto importante é que a importação deve ser feita para portos ou aeroportos que tenham unidade do VIGIAGRO, assim como já ocorre atualmente para microrganismo que se esteja importando. Isso possibilita que esses produtos à base de microrganismos exóticos passem pelo processo fiscalizatório desse órgão. Adicionalmente, sugere-se que quando se tratar de microrganismos exóticos o nível de risco adotado pelo VIGIAGRO seja o Completo (Vermelho) que é usado para produtos sujeitos à análise documental, vistoria, conferência e inspeção sanitária, zoossanitária, fitossanitária e de qualidade obrigatórias. Outro procedimento que foi sugerido no tópico anterior, mas que também compreende uma medida de contenção é a obrigatoriedade de que todos os microrganismos exóticos, quando entrarem no país, sejam encaminhados para os laboratórios de quarentena e permaneçam neles até que os testes sanitários comprovem a sua identificação e segurança.

Sugere-se que durante o período de quarentena os procedimentos que evitam o escape desses microrganismos sejam reforçados, os quais já são previstos nas normativas nacionais e em algumas internacionais que serão descritas a seguir. O microrganismo exótico deve ser enviado para a estação quarentenária credenciada na sua totalidade e lacrado pelo órgão de inspeção do ponto de recebimento (portos ou aeroportos), sendo o interessado responsável por fazer esse transporte em segurança. Caso ocorra qualquer acidente ou incidente envolvendo o material durante o seu transporte para as instalações de quarentena, o interessado deverá comunicar imediatamente ao setor sanitário da estação quarentenária que irá fiscalizar o material antes de iniciar os testes próprios da quarentena (Instrução Normativa MAPA Nº 52, de 1º de dezembro de 2016). Na quarentena, o cultivo de uma geração pode ajudar a garantir a pureza da cultura, sua identificação e a ausência de hiperparasitas e patógenos ou pragas associadas (FAO, 1995). Para o caso de fungos que apresentam grande potencial para dispersão aérea sugere-se uma contenção por meio de uso de instalações seladas com sistemas de ventilação filtrada (CFIA, 2019). Vale ressaltar que, de acordo com a legislação nacional vigente, os custos dos procedimentos realizados na quarentena são de responsabilidade do interessado. Além disso, o produto em questão somente poderá ser utilizado pelo interessado após a liberação da quarentena, com base no Laudo emitido pelo Responsável Técnico da Estação Quarentenária que ateste resultado negativo para a presença de praga quarentenária e praga sem registro de ocorrência no Brasil ou que elas atendam os limites de tolerância, quando estabelecidos em normas específicas. Quando tais exigências não forem cumpridas, o artigo em questão será destruído à custa do interessado, não lhe cabendo qualquer tipo de indenização ou reparação.

Após sua segurança ser atestada e o microrganismo exótico ser autorizado e liberado para uso no ambiente também seria muito importante que ele permanecesse contido no local da introdução. Entretanto, após a introdução ambiental se torna muito difícil a adoção de medidas para a contenção de qualquer microrganismo. Contudo, algumas medidas podem ser tomadas antes dessa introdução para que a dispersão do microrganismo exótico para áreas no ambiente nas quais ele não é realmente necessário seja minimizada. Neste contexto, sugere-se que a aplicação do produto à base do microrganismo exótico seja feita distante das zonas de águas subterrâneas ou superficiais, sendo importante estabelecer zonas de amortecimento ou tampão ao longo das áreas de águas superficiais para reduzir a possibilidade de sua exposição ao produto, e conseqüentemente, seu espalhamento descontrolado. Também deve-se evitar a aplicação do produto em períodos de chuva ou de ventos fortes, para minimizar seu espalhamento.

Outra medida sugerida e que pode ajudar a conter os microrganismos nos locais de interesse, pelo menos inicialmente, é a sua introdução, quando possível, por meio de células imobilizadas. A imobilização é um processo no qual os microrganismos são contidos em uma matriz polimérica que

permite a difusão das células aos poucos no ambiente. Além disso, o uso de células imobilizadas tem vantagens em relação às formulações feitas com células livres que é a proteção contra estresse abiótico e maior sobrevivência do produto microbiano (Tyagi et al. 2011).

Após a aplicação do produto à base do microrganismo exótico no ambiente, sugere-se que além do monitoramento do microrganismo introduzido, que será discutido no tópico IV, seja feito também o monitoramento regular de áreas próximas, mas onde o produto não foi aplicado, para confirmar que o microrganismo está contido apenas na área de interesse. O monitoramento constante em volta da área de introdução do microrganismo é essencial também para que ações sejam implementadas de forma rápida para a erradicação do microrganismo, caso ele ultrapasse os limites da área de contenção. Esse monitoramento pode ser feito utilizando a técnica de qPCR (PCR quantitativa) com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a espécie do microrganismo exótico. Essa é uma técnica altamente eficaz para monitorar quantitativamente bactérias em diferentes ambientes (Aoi et al., 2006). Devido a sua elevada precisão e sensibilidade a qPCR é muito útil neste contexto, ou seja, para confirmar a ausência do microrganismo nessas áreas. Assim, espera-se que mesmo uma concentração pequena do microrganismo seja detectada.

Vale ressaltar que as medidas de contenção apresentadas são mais abrangentes e poderiam ser facilmente adotadas. Contudo, a depender do grupo microbiano (bactéria, fungo, vírus) e do tipo de interação deste microrganismo no ambiente pode ser necessária a exigência de outras medidas de contenção para a liberação do seu uso. Por isso, novamente, sugere-se que a criação de um comitê de análise de risco formado por especialistas nas áreas de controle biológico microbiano ou nas áreas de biorremediação pode ser importante, pois permitiria uma melhor avaliação dos riscos e das medidas de contenção que são necessárias e podem ser aplicadas a depender de cada caso.

IV.4 Proposta de critérios e procedimentos para o monitoramento de espécies exóticas de microrganismos destinados ao uso como agentes biológicos de controle de pragas e doenças de plantas cultivadas ou como agentes biorremediadores.

Conforme já mencionado no tópico II, o monitoramento constante de espécies exóticas de microrganismos introduzidas no ambiente é muito importante para acompanhar o comportamento da espécie, como e onde elas estão se estabelecendo e espalhando e que impactos estão causando ou podem vir a ter. Mesmo que todo o processo de seleção do microrganismo e sua introdução ambiental tenha sido realizada com rigor e de forma controlada, ainda assim é preciso monitorar e confirmar no ambiente onde foi introduzido a ausência de impactos adversos. Dessa maneira, estabelecer critérios e diretrizes de como esse monitoramento deve ser realizado e em quais intervalos também é fundamental para reforçar a segurança do processo.

Várias metodologias referenciadas e que podem ser utilizadas para monitorar a sobrevivência, crescimento, colonização e atividade de qualquer microrganismo introduzido no

ambiente para diferentes fins foram levantadas no Produto III. As principais foram técnicas baseadas no cultivo, quantificação e isolamento dos microrganismos, avaliação do perfil metabólico da comunidade por meio do sistema Biolog-Ecoplate, dos índices de qualidade do solo e técnicas moleculares diversas, tais como sondas de hibridização, Reações de Polimerase em Cadeia (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos, técnicas de *fingerprint*, genes repórteres e as análises meta-ômicas. Dentre essas técnicas, algumas são mais simples, rápidas e baratas de serem executadas, em geral as técnicas consideradas mais tradicionais e dependentes de cultivo, porém elas não são capazes de fornecer muitas informações sobre a comunidade microbiana da área de interesse. Por outro lado, as técnicas baseadas em estudos de ácidos nucleicos atualmente disponíveis são mais robustas e capazes de fornecer informações bem mais completas de todos os microrganismos presentes no ambiente, porém não são tão acessíveis para serem utilizadas como rotina.

Adicionalmente, algumas dessas técnicas envolvem manipulação genética, como por exemplo, a adição de genes repórteres, os quais permitem que os microrganismos marcados sejam detectados e monitorados de forma específica no ambiente. Apesar de ser uma técnica muito interessante, justamente devido a essa especificidade, para sua utilização é necessário manipular o genoma do microrganismo de interesse, gerando Microrganismos Geneticamente Modificados (MGMs). A introdução ambiental de MGMs envolve uma série de outros questionamentos, riscos e licenças por partes de comitês éticos especializados, o que faz com que essa não seja uma técnica viável de ser proposta e aplicada no monitoramento ambiental de microrganismos exóticos destinados ao uso como ACB ou biorremediadores.

Dessa forma, considerando o custo-benefício das demais técnicas disponíveis e que são viáveis, propõe-se uma combinação de métodos de monitoramento com o uso de técnicas dependentes e independentes de cultivo, com o objetivo de avaliar principalmente efeitos adversos contra organismos não alvo e, indiretamente o equilíbrio do ecossistema. Para um monitoramento mais rotineiro e que pode ser realizado em intervalos mais curtos, mensalmente, por exemplo, ou em um período máximo de 3 meses, propõe-se a utilização de técnicas baseadas em cultivo para quantificar a biomassa do solo. Para sua realização seria necessário coletas de amostras de solo, rizosfera e rizoplano da área na qual o microrganismo foi introduzido, seguido da sua diluição seriada e plaqueamento em meio rico, para quantificação da densidade de bactérias totais da área. Adicionalmente, deve-se quantificar também a densidade de fungos cultiváveis. Pode se utilizar também, de forma alternativa, kits disponíveis comercialmente e que possibilitam mensurar a biomassa microbiana de amostras ambientais *in situ*.

Esse monitoramento permitiria detectar alterações bruscas na densidade de microrganismos totais da área em decorrência da introdução da espécie exótica, caso isso venha a ocorrer. Caso haja

disponível comercialmente meios seletivos para a espécie do microrganismo exótico que foi introduzida, sugere-se, adicionalmente, que a amostra seja também plaqueada no meio seletivo, para a quantificação específica da espécie exótica.

Apesar de não ser voltado diretamente para o monitoramento da biomassa do solo e da espécie introduzida, é muito importante realizar de rotina também análises adicionais para o monitoramento da qualidade do ambiente onde foi realizada a introdução, para mensurar possíveis efeitos indiretos adversos desse microrganismo na área e preservar sua qualidade. Dentre os indicadores de qualidade do solo disponíveis sugere-se a avaliação da respiração e atividade enzimática do solo, que são indicadores comumente utilizados nos programas de monitoramento da qualidade do solo em outros países.

A respiração do solo pode ser determinada pela produção de CO₂ ou o consumo de O₂. A medida da produção de CO₂ é mais sensível, pois a concentração do CO₂ na atmosfera é mais baixa (0,033%) do que do O₂ (20%). A avaliação da respiração do solo pode ser realizada em laboratório ou em campo e, geralmente, é simples, barata e fácil de ser executada (Araújo & Monteiro, 2007). A atividade enzimática do solo possui as características de ser relacionada com a matéria orgânica, propriedades físicas, atividade e biomassa microbiana. Além de ser um claro indicador de mudanças na qualidade do solo, envolve metodologias simplificadas e demonstra sensibilidade para prover informações sobre mudanças nas funções-chave do solo (Araújo & Monteiro, 2007). As principais enzimas indicadoras de qualidade do solo propostas de serem mensuradas são as fosfatases (indicadoras da ciclagem do Fósforo), ureases (indicadoras da ciclagem do Nitrogênio), B-glucosidases (indicadoras da ciclagem do Carbono), arissulfatases (indicadoras da ciclagem do S, enxofre) (Lisboa et al., 2012) e N-acetil glucosaminidases (indicadoras de atividade fúngica) (Winding et al., 2004). Mensurar quimicamente nesses mesmos intervalos a concentração de macro e micronutrientes nas amostras também é sugerido.

Adicionalmente ao uso mais rotineiro das técnicas mencionadas, propõe-se que em um intervalo maior, mas não superior a 6 meses da introdução da espécie exótica e pelo menos semestralmente a partir de então, seja realizado um monitoramento mais completo e com o uso de técnicas moleculares. Sugere-se definir como padrão a técnica de qPCR com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a espécie do microrganismo exótico, como mencionado no tópico anterior, além de oligonucleotídeos iniciadores para bactérias do solo e da rizosfera consideradas como indicadores microbianos, por serem especialmente importantes para processos-chave nos ciclos geoquímicos do solo, tais como os gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio e formadoras de nódulos em leguminosas (*Sinorhizobium*, *Rhizobium*). Os efeitos sobre essas bactérias indicadoras são muito importantes, pois podem afetar o funcionamento do ecossistema do solo (Winding et al., 2004).

Outra alternativa que permite a detecção do microrganismo introduzido, juntamente com a comunidade microbiana da área, são as análises metagenômicas. Estas podem ser realizadas com triagens baseadas em sequências de genes marcadores filogenéticos (metataxonômica) para determinar a riqueza e abundância relativa dos táxons ou abordagens de sequenciamento total de alto rendimento “shotgun”, seguido da anotação dos dados sequenciados, para determinação também da riqueza e abundância relativa dos táxons e, adicionalmente, dos genes funcionais.

É importante monitorar em intervalos regulares outros organismos não alvo da área onde o microrganismo exótico foi introduzido. Propõe-se que as amostras coletadas a intervalos regulares para os demais monitoramentos também sejam avaliadas quanto à densidade total de protozoários e nematóides. Esses organismos compõem a microfauna do solo e desempenham papéis-chave na reciclagem de matéria orgânica. Alguns desses organismos também têm o potencial de suprimir patógenos vegetais, enquanto outros são patógenos vegetais (Winding et al., 2004). Adicionalmente, é importante avaliar se efeitos fitotóxicos estão ocorrendo em outras plantas. Propõe-se monitorar nas espécies não-alvo de plantas da área onde o microrganismo exótico foi introduzido as principais características normalmente relacionadas com o stress em plantas, tais como redução de crescimento de plântulas, redução de brotações e crescimento radicular.

Destaca-se, no entanto, que como em um primeiro momento não se pode determinar se é realmente o microrganismo exótico introduzido o responsável por qualquer efeito danoso que se observe no ambiente, caso esses efeitos sejam constatados sejam planejados ensaios laboratoriais e de microcosmo que permitam determinar de forma não duvidosa se esses efeitos estão realmente sendo causados por esse organismo.

Referências

- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, v. 59, p. 143-169, 1995.
- Andersen, M. C., Adams, H., Hope, B. and Powell, M. Risk Assessment for Invasive Species. *Risk Analysis*, 24: 787-793, 2004.
- Aoi Y, Hosogai M, Tsuneda S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of biotechnology*. Oct 1;125(4):484-91, 2006.
- Araújo A. S., Monteiro, R. T. Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Bioscience Journal*, Sep 18;23(3), 2007.
- CFIA (2019) Containment Standards for Facilities Handling Plant Pests. Disponível em <https://www.inspection.gc.ca/plants/plant-pests-invasive-species/biocontainment/containment-standards/eng/1412353866032/1412354048442?chap=1#s1c1> Acesso em 05 de Novembro de 2019.
- Coblentz, B. E. Exotic organisms: a dilemma for conservation biology. *Conservation biology*, 4(3), 261-265, 1990.
- Davison J. Risk mitigation of genetically modified bacteria and plants designed for bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Dec 1;32(11-12):639-50, 2005.
- Doran, J. W., Parkin, T. B. Defining and assessing soil quality. In: Doran, J. W. et al. *Defining soil quality for sustainable environment*. Madison: Soil Science Society of America Proceedings, p. 03-21, 1994.
- FAO (1995) Code of conduct for the import and release of exotic biological control agents. Disponível em <http://www.fao.org/3/x5585E/x5585e0i.htm> Acesso em 05 de Novembro de 2019.
- Fernandes, P., Ferreira B. S., Cabral JM. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 22:211–216, 2003.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., Skalka, A. M. *Principles of Virology*. Vol. II Pathogenesis and Control (3rd ed.). Washington, D.C.: ASM. pp.42–47, 2009.
- Gomes, M. A., Filizola, H. F. Indicadores físicos e químicos de qualidade de solo de interesse agrícola. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2006.
- Hanage, W. P., Fraser, C., Spratt, B. G. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.*, 3, 6, 2005.
- Heyrman, J., Mergaert, J., Denys, R., Swings, J. The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 181(1), 55-62, 1999.
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., Momol, M. T. Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol*, 45, 245-262, 2007.
- Kabaluk, J. Todd, et al. (ed.). *The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide*. International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), 2010.

Kathleen, M. M., Samuel, L., Felecia, C., Ng, K. H., Lesley, M. B., Kasing, A. (GTG) 5-PCR analysis and 16S rRNA sequencing of bacteria from Sarawak aquaculture environment. *International Food Research Journal*, 21(3), 2014.

Lisboa, B. B., Vargas, L. K., da Silveira, A. O., Martins, A. F., Selbach, P. A. Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 36(1):33-43, 2012.

Lu, T., Yao, B., Zhang, C. DFVF: database of fungal virulence factors. Database, 2012.

Maiden, M. C. J. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3140–3145, 1998.

Mifra - Microbial Identification Framework for Risk Assessment. Disponível em <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/managing-pollution/evaluating-new-substances/biotechnology-living-organisms/microbial-identification-framework-risk-assessment.html#toc4>. Acesso em 18 de setembro de 2019.

Milgroom, M. G., & Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 311-338.

Mocali, S., Benedetti, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161(6), 497-505, 2010.

Montgomery, M. Understanding federal regulations as guidelines for classical biological control programs. In *Implementation and Status of Biological Control of the Hemlock Woolly Adelgid*; Onken, B., Reardon, R., Eds.; FHTET-2011-04; United States Department of Agriculture, Forest Service: Morgantown, WV, USA, 25–40, 2011.

OECD. (2014). Report of the OECD/KEMI/EU workshop on microbial pesticides: assessment and management of risks. Disponível em [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)2&do-clanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)2&do-clanguage=en) Acesso em 03 de Novembro de 2019.

OECD (2015). *Biosafety and the Environmental Uses of Micro-Organisms: Conference Proceedings*. OECD Publishing. Disponível em https://www.oecd-ilibrary.org/environment/biosafety-and-the-environmental-uses-of-micro-organisms_9789264213562-en Acesso em 03 de Novembro de 2019.

OECD (2016) Bacteria: Pathogenicity factors in Safety assessment of transgenic organisms: oecd consensus documents, volume 5 Disponível em <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264253018-4-en.pdf?expires=1570890668&id=id&accname=guest&checksum=CF3A345AC25516FF094E418E81DAD168> Acesso em 03 de Novembro de 2019.

OECD (2017) Report of the 6th biopesticides steering group seminar on hazard and risk assessment of secondary metabolites produced by microbial pesticides. Disponível em [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2017\)5&do-clanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2017)5&do-clanguage=en) Acesso em 03 de Novembro de 2019

Ogunseitan, O. *Microbial Diversity*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 292pp, 2005.

Sá, L. A. N. D., Pessoa, M. C. P. Y., Moraes, G. J. D., Marinho-Prado, J. S., Prado, S. D. S., Vasconcelos, R. M. D. Quarantine facilities and legal issues of the use of biocontrol agents in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 502-509, 2016.

Sagoff, M. Invasive species denialism: a reply to Ricciardi and Ryan. *Biological Invasions*. Oct 1;20(10):2723-9, 2018.

Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*. Mar 10;287(5459):1770-4, 2000.

Sandle, T. Microbial identification. Editor(s): Tim Sandle. *Pharmaceutical Microbiology*. Woodhead Publishing. Pages 103-113. doi:10.1016/b978-0-08-100022-9.00009-8, 2016.

Satyanarayana, T., Raghukumar, C., Shivaji, S. Micróbios extremofílicos: diversidade e perspectivas. *Ciência atual*, 78-90, 2005.

Sharma, R., Polkade, A. V., Shouche, Y. S. 'Species concept' in microbial taxonomy and systematics. *Current Science*, 1804-1814, 2015.

Sierra-García, I. N., Alvarez, J. C., de Vasconcellos, S. P., de Souza, A. P., dos Santos Neto, E.V., de Oliveira, V. M. New Hydrocarbon Degradation Pathways in the Microbial Metagenome from Brazilian Petroleum Reservoirs. *PloS one*, v. 9(2), e90087, 2014.

Spratt, B. G. Multi locus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Curr. Opin. Microbiol*, 2, 312–316, 1992.

Stohlgren, T. J., Schnase, J. L. Risk Analysis for Biological Hazards: What We Need to Know about Invasive Species. *Risk Analysis*, 26: 163-173, 2006.

Thiet, R. K., Boerner, R. E. J. Spatial patterns of ectomycorrhizal fungal inoculum in arbuscular mycorrhizal barrens communities: implications for controlling invasion by *Pinus virginiana*. *Mycorrhiza* 17:507–517, 2007.

Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., de Carvalho, C. C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241, 2011.

Winding, A., Binnerup, S. J., Pritchard, H. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(2), 129-141, 2004.