

BIORREMEDIAÇÃO DE UMA ÁREA CONTAMINADA COM O INSETICIDA METAMIDOFÓS POR CORYNEBACTERIUM SP.

Lilian Costa

Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará.
Av. Treze de Maio, 2081, CEP:60040-531.
E-mail: lilian.ifce@hotmail.com.br

Priscila Maria Dellamatrice

Departamento de Tecnologia Ambiental, Centro
Federal de Educação Tecnológica do Ceará. Av. Treze
de Maio, 2081, CEP:60040-531.
E-mail: priscila@ifce.edu.br

Milena Viana de Sousa

Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará.
Av. Treze de Maio, 2081, CEP:60040-531.
E-mail: milenaramil@hotmail.com

Glória Maria Marinho Silva

Departamento de Tecnologia Ambiental, Centro
Federal de Educação Tecnológica do Ceará. Av. Treze
de Maio, 2081, CEP:60040-531.
E-mail: gloriamarinho@ifce.edu.br

RESUMO

Os pesticidas são comumente utilizados na produção agrícola, porém devido à sua toxicidade e persistência tem afetado severamente ao meio ambiente e aos organismos vivos, podendo causar diversos prejuízos. Uma área agrícola com intenso uso de pesticidas localizada no Município de Tianguá, Estado do Ceará, foi escolhida para o presente estudo. Esta área apresentou contaminação pelo pesticida metamidofós em níveis acima de 10 ug/g solo. A degradação do metamidofós neste solo foi estudada utilizando a bactéria *Corynebacterium* sp. no laboratório buscando definir as melhores condições para o tratamento e avaliar a eficiência do método. Posteriormente, foi realizada a biorremediação *in situ* da área contaminada em Tianguá, utilizando a bactéria *Corynebacterium* sp. conjuntamente com o plantio de milho. Também biossurfactantes foram aplicados ao solo visando melhorar as taxas de degradação. Em laboratório, a degradação foi baixa no solo contaminado devido à baixa disponibilidade do produto, causada pelo longo tempo de permanência do produto no solo. A aplicação de biossurfactantes foi capaz de aumentar a degradação do produto neste solo. O tratamento quando aplicado *in situ* foi menos eficiente na degradação, devendo a técnica ser aprimorada através de estudos posteriores.

Palavras-chave: Degradação. Micro-organismos. *Corynebacterium*. Metamidofós. Pesticida e solo.

ABSTRACT

*Pesticides are commonly used in agricultural production, however due to its toxicity and persistence have severely affected the environment and living organisms and can cause several damages. An agricultural area with intensive use of pesticides, located in the city of Tianguá, state of Ceará, was chosen for this study. This area showed contamination by the pesticide methamidophos at levels above 10 ug / g soil. The degradation of methamidophos in this soil was studied using *Corynebacterium* sp. in a laboratory, trying to define the best conditions for treatment and to evaluate the efficiency of the method. Afterwards, the *in situ* bioremediation of the contaminated site in Tianguá was carried out using the bacterium *Corynebacterium* sp. together with the maize cultivation. Biosurfactants were also applied to the soil to improve the degradation rates. In the laboratory, the degradation in the contaminated soil was low due to the low availability of product caused by the long residence time of the product in the soil. The application of biosurfactants was able to increase the degradation of the product in that soil. The treatment when applied *in situ* was less efficient in degradation, thus, the technique should be improved through further studies.*

Keywords: Degradation. Micro-organisms. *Corynebacterium*. Metamidophos. Pesticide and soil.

INTRODUÇÃO

Os pesticidas são comumente utilizados na produção agrícola, porém devido à sua toxicidade e persistência tem afetado severamente ao meio ambiente e aos organismos vivos, podendo causar diversos prejuízos. Atualmente, o Brasil representa o segundo mercado consumidor mundial de pesticidas, com cerca de 461 ingredientes ativos registrados no IBAMA [1]. Globalmente a estimativa de aplicação de agrotóxicos é em torno de 2,5 milhões de toneladas por ano [2].

O metamidofós é um pesticida organofosforado, também conhecido comercialmente como Monitor, Tam, Nitofol, Swipe, Nuratron, Vetaron, Filitox, Patrole, Tamanox, SRA 5172 ou Tamaron, obtido como subproduto do acefato de largo espectro de ação. É bastante tóxico,

pertencente à classe toxicológica I, sendo considerado mutagênico e teratogênico. Age sobre a transmissão do impulso nervoso, inibindo as enzimas colinesterases [3]. Organofosforados são muito utilizados para culturas anuais e frutíferas contra uma larga variedade de insetos [4].

Estudos sugerem que, apesar dos pesticidas organofosforados serem considerados de baixa persistência, eles podem persistir no ambiente por longos períodos de tempo [5], desde que eles são extensivamente utilizados e foram detectados anos depois da aplicação [6].

Pesticidas aplicados ao solo são metabolizados por processos biológicos e não biológicos, onde microrganismos tem papel essencial [7]. A biorremediação envolve o uso de microrganismos ou plantas para tratamento de ambientes contaminados e surge como alternativa para amenizar os efeitos deletérios do largo uso dos pesticidas. Dentro da biorremediação, muitos métodos ainda estão em desenvolvimento, por exemplo a fitorremediação, que tem atraído o interesse devido à sua eficiência, adequação a aplicações em longo prazo, pouca manutenção exigida e vantagens estéticas, e ainda tem o atrativo de apresentar um custo baixo e de ser melhor aceita pela população, pois utiliza plantas em um processo conhecido como mais “natural” [8].

Poluentes presentes nos solos podem ser oriundos de contaminações antigas. Segundo alguns estudos, os pesticidas inicialmente desaparecem no solo em velocidades razoáveis, porém a velocidade tende a diminuir com o tempo devido à escassez do produto aos micro-organismos. Complexas interações entre as moléculas dos contaminantes e as partículas de solo e água presente podem ocorrer, afetando a biodegradação [9]. É comumente aceito que somente pesticidas presentes na solução do solo são disponíveis para a ação microbiana [10].

O uso de biosurfactantes tem o objetivo de melhorar a utilização da fonte de carbono pelos micro-organismos. O surfactante é uma molécula anfipática, apresentando uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, com capacidade de diminuir a tensão superficial ou agir como emulsificantes. Essa propriedade aumenta a solubilidade e a disponibilidade de poluentes hidrofóbicos aos micro-organismos, aumentando o potencial para biodegradação [11].

Biosurfactantes são estruturalmente diversos compostos produzidos por micro-organismos [12]. São produzidos principalmente por bactérias ou

leveduras. Podem ser aniônicos ou não iônicos. São estáveis a altas temperaturas, pH e concentração salina. Biosurfactantes são biodegradáveis, não tóxicos ou menos tóxicos que surfactantes químicos.

O objetivo do trabalho foi testar a bactéria *Corynebacterium* sp. na degradação em um solo de uma área contaminada com metamidofós e avaliar a eficiência do método testado em condições de campo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

A área de estudo pertence ao município de Tianguá, região noroeste do estado do Ceará, e consiste em uma região agrícola onde pesticidas são intensamente utilizados. Foi escolhida para este trabalho uma área cultivada com a cultura do maracujá, onde a frequência de aplicação do pesticida era quinzenal, e a dose aplicada era de cerca de 1 kg/ha. O teor de metamidofós no solo foi determinado e correspondeu a 10 µg/g solo.

Foram feitas análises da fertilidade do solo da área contaminada. O solo continha os seguintes elementos (mg/dm³): P 189; K 431; Ca 4,0; Mg 2,5 e Na 11. O pH era 6,2.

2.2 Micro-organismos

Para os experimentos de degradação do pesticida no solo, foi utilizada a bactéria *Corynebacterium* sp., previamente isolada no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM), tendo esta potencial degradador [13]. Essa bactéria degradou o produto no solo completamente em 20 dias na concentração de 7 µg/g solo.

2.3 Preparo do inóculo

As bactérias foram imobilizadas em matriz de alginato de sódio para aplicação no solo. O meio mínimo BD contendo metamidofós como única fonte de carbono foi utilizado para crescimento, onde foram obtidos densidade de células acima de 10⁵ células . ml⁻¹. Foram adicionados 0,5g de alginato de sódio em 50 ml do meio de cultura e esta solução foi gotejada em 250 ml de solução contendo 2,5g de CaCl₂ e 25g de glicose, em agitador mecânico durante 15 min formando as microcápsulas.

2.4 Degradação do metamidofós no solo contaminado

Estudos da degradação do solo da área contaminada em Tianguá foram realizados para

avaliação do crescimento da cultura inoculada e da degradação neste solo. Amostras de 100g de solo (base seca) foram inoculados com *Corynebacterium* sp. A umidade foi ajustada para 70% da capacidade de campo. Frascos controle foram deixados sem inoculação. Foram aplicados 5 g de inóculo, contendo a bactéria imobilizada para cada 100 g de solo.

Foram feitas análises do metamidofós no solo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para medir a degradação aos 28 e 56 dias. Também foram feitas análises do número de bactérias e fungos antes e depois do tratamento.

Posteriormente foi estudada a degradação do metamidofós nas mesmas condições com a aplicação de biossurfactante, buscando otimizar a degradação. O biossurfactante foi aplicado no lugar da água durante o ajuste da umidade, na quantidade de 14 ml/100g solo.

2.5 Biorremediação *in situ* da área contaminada

A biorremediação foi realizada em uma área de 4 m² e outra de igual tamanho foi deixada como controle. Em ambas as áreas não foi aplicado o pesticida metamidofós durante o experimento. Dentro dessa área foram aplicados 1 kg de inóculo e 2 l do líquido metabólico contendo o surfactante. Em seguida, foi cultivado o milho nesta área, com espaçamento de 30x30 cm.

2.6 Contagem dos micro-organismos

Na contagem dos micro-organismos, foi utilizado o procedimento de diluição em série com células isoladas de um amostra de solo, utilizando-se meio nutriente-ágar para contagem de bactérias, e meio de Martin para contagem de fungos. Para a contagem de micro-organismos degradadores foi utilizado o meio BD, contendo metamidofós como única fonte de carbono. A diluição foi feita misturando-se 10 g de solo a 90 ml de solução salina (0,89%) e agitados em Vortex por 10 min. Aliquotas de 1 ml foram retiradas e transferidas para 9 ml de solução salina. Novamente alíquota de 1 ml foi retirada e transferida para 9 ml de solução salina e assim sucessivamente até obter-se concentrações de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶. Foram plaqueadas as concentrações de 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ para fungos, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ para bactérias e 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ para bactérias degradadoras. As placas foram incubadas à temperatura de 28°C e as contagens feitas após 3 (três) dias para bactérias e micro-organismos degradadores e 5 (cinco) dias para fungos.

2.7 Atividade microbiana

A atividade microbiana pela desidrogenase foi estimada pela conversão de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazolium para 2,3,5-trifenilformazan, o qual possui coloração avermelhada [14]. Foram adicionados 5 ml de solução aquosa 1% de 2, 3, 5 – cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) em 5 g de solo em tubos de ensaio fechados, agitados, e incubados por durante 24 h a 37°C em banho-maria. Após adição de 10mL de metanol, os tubos foram centrifugados e 5mL do sobrenadante foram retirados para leitura em espectrofotômetro a 485nm. Os resultados foram comparados com curvas-padrões previamente construídas.

2.8 Produção do biossurfactante

O biossurfactante foi produzido microbiologicamente a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. A bactéria foi incubada em meio BHI (caldo de infusão de cérebro e coração) durante 48 h em shaker a 150 rpm. O índice de emulsificação foi determinado e correspondeu a 30,3% [15]. O líquido metabólico contendo o biossurfactante é separado através de centrifugação do meio de cultura a 3500 rpm por 7 min para aplicação.

2.9 Análises Químicas

Para a extração do pesticida do solo foi utilizado o sistema de Soxhlet, em que 25 g de solo foram extraídas utilizando acetato de etila como solvente, com duração de 4 h. Após a extração, a umidade foi removida utilizando sulfato de sódio anidro como desidratante e filtradas em filtro de algodão simples. As amostras foram concentradas em rotoevaporador a 40°C para balão de 25 ml e analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian Polaris 335, equipado com coluna C18 microsorb-MV 100-5 e detector UV-bis. Foram utilizados dois sistemas de solventes metanol/água 60:40 e o fluxo foi de 1mL/min.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Degradação do metamidofós no solo contaminado

A degradação no solo contaminado após 28 dias foi cerca de 40,25% (Figura 1). Esses valores não aumentaram após 56 dias, indicando que a maior parte do produto se encontra adsorvida ao solo e indisponível à degradação. Somente uma fração do produto estava disponível à degradação, a qual foi rapidamente degradada e a fração indisponível

permaneceu no solo não sendo degradada ao final do período.

Produtos com longo tempo de permanência no solo podem ser difíceis de remover devido às ligações do produto ao solo que com o tempo tendem a se tornar mais estáveis e permanentes.

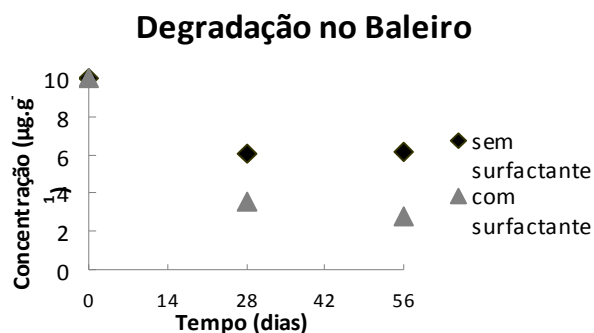


Figura 1 – Degradação no solo contaminado com e sem surfactante, em porcentagem de degradação.

Biossurfactantes, os quais aumentam a biodisponibilidade do produto no solo, foram adicionados ao mesmo solo buscando aumentar a degradação do composto. Após a aplicação do biossurfactante, a degradação no solo aumentou para 65,06% no período de 28 dias (Figura 1). O

aumento da degradação na presença do surfactante mostrou que a baixa degradação estava ligada a baixa disponibilidade do produto e a adição do surfactante foi capaz de aumentar a degradação.

Ao final dos 56 dias a degradação aumentou para 72,9%, a qual não foi completa ainda permanecendo parte do produto no solo.

3.2 Contagem de microrganismos do solo contaminado com surfactante

Havia neste solo a presença de bactérias degradadoras, porém em número muito baixo. Essas aumentaram significativamente após o período de incubação, mostrando que elas foram capazes de crescer utilizando o produto como fonte de energia. Estes valores estão de acordo com os valores de degradação, sendo que a degradação pode ser correlacionada com o aumento de bactérias degradadoras no solo (Figura 2). O número de fungos e de bactérias não variou dentro do período estudado (Figura 2). A unidade de contagem de micro-organismos dar-se por unidade formadora de colônia por grama (UFC/g).

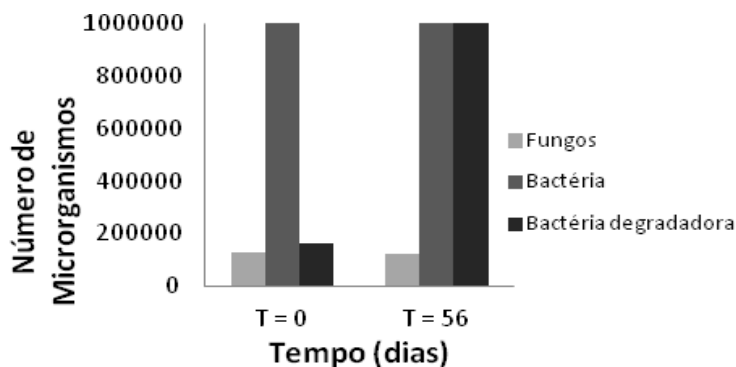


Figura 2 – Contagem de microrganismos do solo contaminado com surfactante (UFC/g)

3.3. Biorremediação *in situ* da área contaminada

Na biorremediação *in situ* realizada na área contaminada, os valores de degradação após 28 dias foram em torno de 49,9%. Após 56 dias estes valores aumentaram para 54,5%. No solo controle, a degradação foi de apenas 5,45% (Figura 3).

A degradação neste solo foi abaixo da encontrada no experimento em laboratório onde o surfactante

também foi aplicado. No solo *in situ*, apesar da aplicação do biossurfactante a maior parte do produto continuou indisponível à degradação neste solo, indicando que em condições de campo a eficiência do biossurfactante pode ser menor, necessitando ser melhor estudada. No campo pode ser necessário doses maiores ou maiores frequências de aplicação para se obter melhores taxas de degradação.

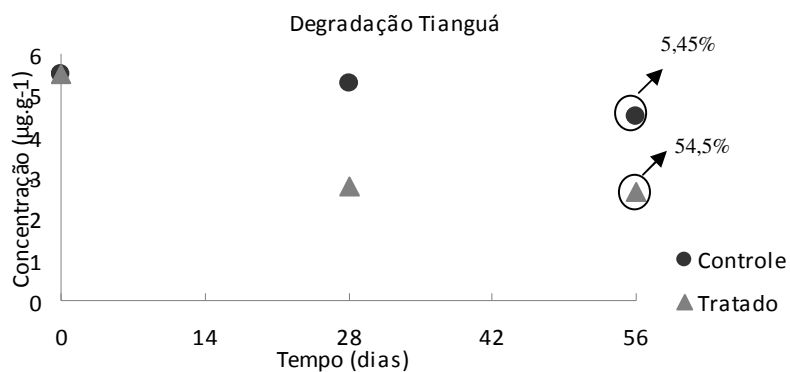


Figura 3 – Degradação do metamidofós no solo *in situ*, em porcentagem de degradação

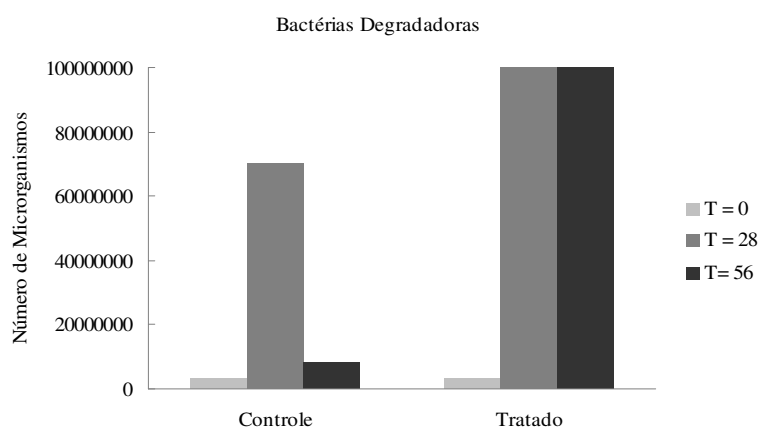


Figura 4 – Contagem de bactérias degradadoras no solo *in situ* (UFC/g)

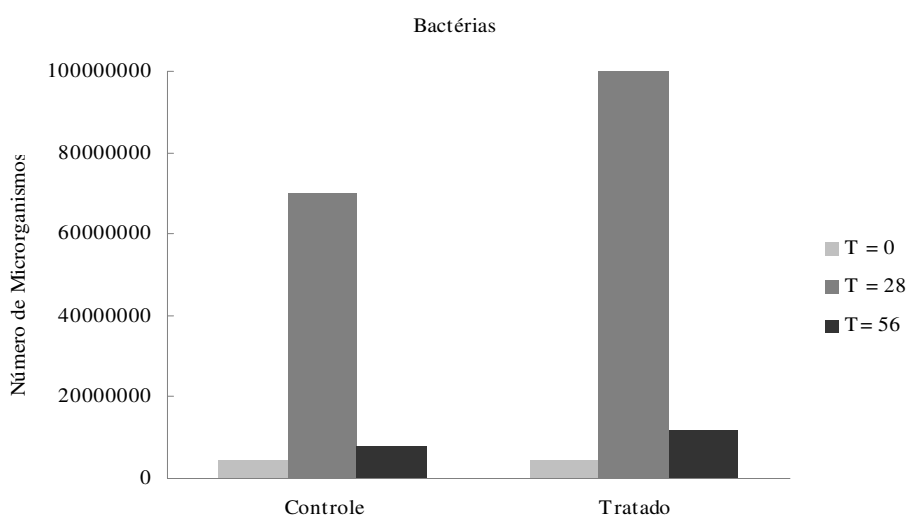


Figura 5 – Contagem de bactérias no solo *in situ*, em porcentagem de degradação

3.4 Contagem de microrganismo no solo *in situ*

No solo havia a presença de bactérias degradadoras, porém em baixa quantidade, as quais aumentaram consideravelmente aos 28 dias para controle e tratado, sendo que no tratado estes valores permaneceram altos até 56 dias (Figura 4). Estes valores estão de acordo com os valores de degradação, onde o aumento na degradação coincidiu com o aumento no número de bactérias degradadoras.

Na contagem de bactérias presentes no solo ao longo do tratamento, houve um grande aumento no número de bactérias aos 28 dias, tanto no solo tratado como no controle, seguido de decaimento após 56 dias, quando possivelmente houve decréscimo na quantidade de substrato (Figura 5).

O número de fungos sofreu um aumento significativo no tempo de 28 dias (Figura 6). No tratado, os valores continuaram altos até os 56 dias, enquanto no controle o número decaiu.

No solo tratado, o aumento do número de fungos pode ser devido à presença da rizosfera das plantas, onde os micro-organismos tem seu crescimento estimulado no solo.

3.5 Atividade Microbiana

A atividade microbiana aumentou ao longo do período estudado em ambos os tratamentos, controle e tratado.

No solo tratado, a degradação foi acompanhada de aumento na atividade no solo (Figura 7).

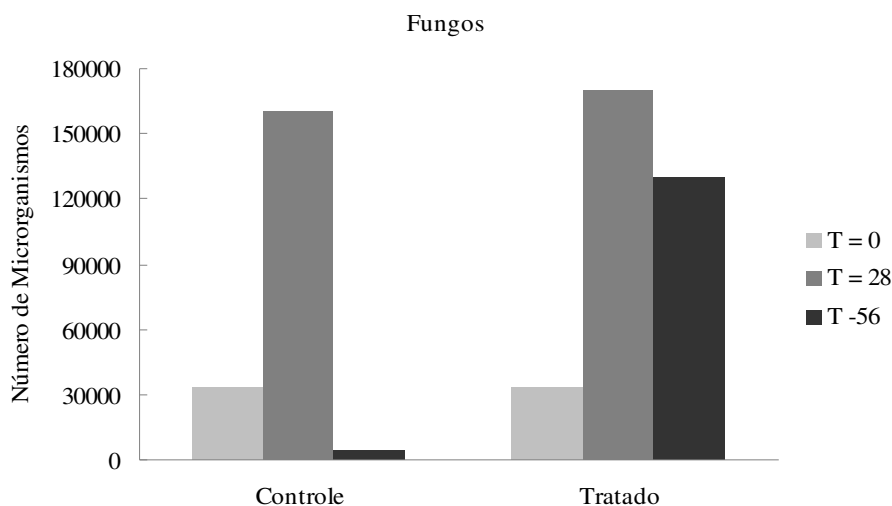


Figura 6 – Contagem de fungos no solo *in situ* (UFC/g)

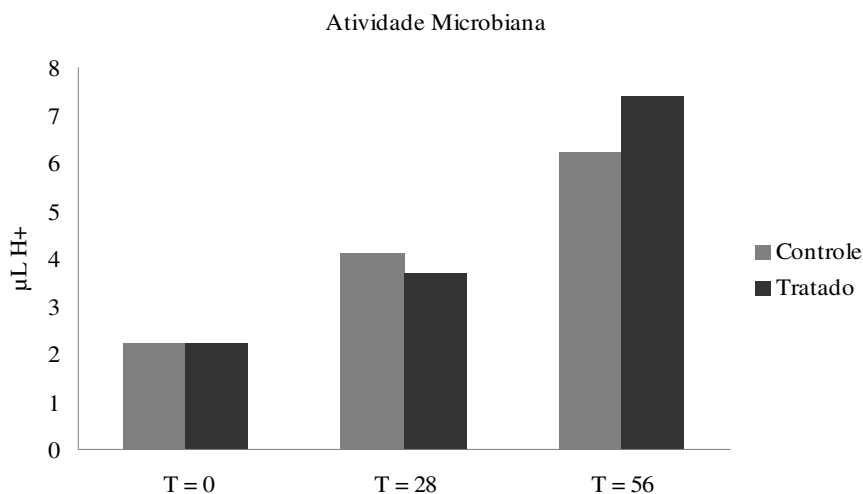


Figura 7 – Atividade microbiana no solo *in situ*

4 CONCLUSÃO

A biorremediação de um solo contaminado com metamidófos utilizando a bactéria *Corynebacterium* foi capaz de reduzir a concentração do produto no solo consideravelmente, porém após certo período a degradação é reduzida não ocorrendo a degradação completa. Isto significa que produtos com longo tempo de permanência no solo podem ser difíceis de serem degradados. O uso de surfactante aumentou a degradação, porém no campo a eficiência destes produtos foi menor. Estudos devem ser feitos para melhorar a eficiência de aplicação destes produtos no solo.

REFERÊNCIAS

- [1] GARCIA, E.G. et al. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.39, n.5, p. 832-839, 2005.
- [2] FERREIRA, C.R.R.P.T. et al. Distribuição territorial das vendas de herbicidas no Brasil 1991-2000. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.32, n.6, p. 15-23, 2002.
- [3] LIMA, F.J.C. et al. Análise de resíduos do inseticida metamidofós em soja e determinação final por cromatografia em fase gasosa. **Pesticidas: Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente**, [S.1.], v. 13, p. 91-102, 2003.
- [4] HAM, X. et al. Degradation of the pesticide Fenothion as mediates by cationic surfactant and X-nucleophilic reagent. **Langmuir**, [S.1.], v. 22, n. 21, p. 9009-9017, 2006.
- [5] ZHANG, Z.L. et al. Occurrence and behaviour of organophosphorus insecticides in the river wuchuan, southeast China. **Journal of Enviromental. Monitoring**, [S.1.], v. 4, p. 498-504, 2002.
- [6] RAGNARSDOTTIR, K.V. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. **Journal of Geological Society**, [S.1.], v. 157, n. 4, p. 859-876, 2000.
- [7] CHOWDHURY, A. et al. Impact of pesticide on soil microbiology parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, [S.1.], v. 48, n.1, p. 114-127, 2008.
- [8] BURKEN, J. B. VOCs Fate and Partitioning in Vegetation: Use of Tree Cores in Groundwater Analysis. **Environmental Science Technology**, [S.1.], v. 36, n. 21, p. 4663-4668, 2002.
- [9] ALEXANDER, M. How toxic are toxic chemicals in soil? **Environmental Science and Technology**, [S.1.], v. 29, n.11, p. 2713-2717, 1995.
- [10] MATA-SANDOVAL, T. et al. Influence of rhamnolipids and triton X-100 on the desorption of pesticides from soils. **Environmental Science Technology**, [S.1.], v. 36, n. 21, p. 4669-4675, 2002.
- [11] BENTO, F.M. et al. Biorremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.1.], v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003.
- [12] JAYASHREE, R. et al. Surfactants enhanced recovery of endossulfan from contaminated soils. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [S.1.], v.3, n. 3, p. 251-259, 2006.
- [13] DELLAMATRICE, P.M.; COSTA, L.S.; SAMPAIO, G. Degradação do inseticida metamidofós por *Corynebacterium* sp. In: Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 11, 2008, Fortaleza, **Anais...**Fortaleza, 2008, p. 550-552. 1 CD-ROM.
- [14] CASIDA, L.E. et al. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, [S.1.], v. 98, n. 6, p. 371-376, 1964.
- [15] COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G.. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Enviromental Microbiology**, [S.1.], v.53, n.2, p. 224-229, 1987.