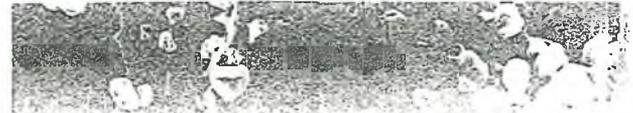




# Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação



Julietta Ueta

Newton Lindolfo Pereira

Ilda Kazumi Shuhama

Depto. Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

Antonio Luiz Cerdeira

CNPMA/EMBRAPA, Jaguariúna, SP.

Fotos cedidas pelos autores

## Microrganismos degradadores do herbicida Atrazina



Os sistemas biológicos têm a habilidade de crescer e multiplicar com maior ou menor intensidade dependendo das suas características inerentes e das condições impostas pelo ambiente. A produção de alimentos se dá por meio da prática da agricultura e da pecuária e o rendimento desta produção enfrenta a concorrência de outros sistemas biológicos vegetais, animais, microbianos ou parasitários. Desta forma, o processo de modernização da agricultura, nos anos 60, introduziu o emprego de novas variedades mais produtivas e dependentes de adubos químicos, uso intensivo de herbicidas, bactericidas, fungicidas, acaricidas, parasiticidas, inseticidas, enfim pesticidas e máquinas agrícolas a fim de se aumentar os índices de produtividade. O emprego destes agentes químicos resultou em aumento da produtividade, mas por outro lado trouxe conseqüências adversas ao homem, visto serem estes agentes nocivos ao homem e ao ambiente.

O mercado mundial de agroquímicos movimenta atualmente US\$ 30 bilhões e

de fertilizantes US\$ 50 bilhões. O Brasil é o 5º maior consumidor de pesticidas e movimenta US\$ 2,5 bilhões. Os herbicidas representam a maior parcela tanto em âmbito mundial como no Brasil. Calcula-se que somente cerca de 0,1% atinge o alvo específico enquanto os restantes 99,9% da aplicação tem potencial para se mover em diferentes compartimentos ambientais tais como o solo e águas residuais e subterrâneas.

A prática mundial do uso de agroquímicos por longos períodos, muitas vezes indiscriminada e abusiva, vem trazendo preocupações à autoridades públicas e aos envolvidos com saúde pública e sustentabilidade dos recursos naturais, em conseqüência da contaminação ambiental. O Brasil tem uma diversidade imensa de sistemas ecológicos únicos e sensíveis, alguns dos quais submetidos à agricultura intensiva.

Os resultados de inúmeros trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agroquímicos e seus produtos de degradação em solos e águas superficiais e subterrâneas. Os relatos iniciaram-se nos anos 70 e desde então, com o aprimoramento das técnicas analíticas com maior acuidade e sensibilidade, mostraram por exemplo que em 1988, mais da metade dos estados americanos possuíam águas subterrâneas contaminadas (PARSONS & WITT, 1989). O uso indiscriminado de agroquímicos

## Aquífero de Botucatu



Figura 2- Aquífero Botucatu ou Guarani

levo à contaminação dos solos onde índices acima de 5000 ppm de atrazina, 3000 ppm de clorpirifos, 3900 ppm de diuron, e 1900 ppm de parathion foram descritos na literatura (WINTERLIN *et al.*, 1989).

A detecção de contaminação ambiental por agroquímicos exige o estabelecimento de políticas ambientais severas que controlem o uso indiscriminado e abusivo destes agentes, o desenvolvimento de técnicas de descontaminação dos sítios contaminados e o emprego de

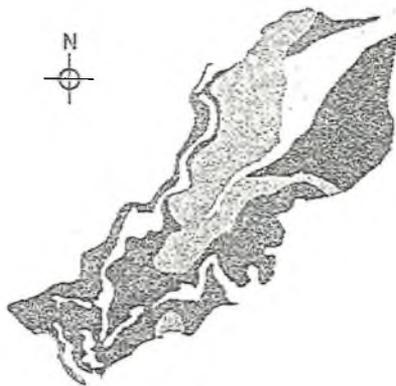


Figura 1- Microbacia do Espiradinho - as cores definem os diferentes tipos de solo

técnicas alternativas de plantio.

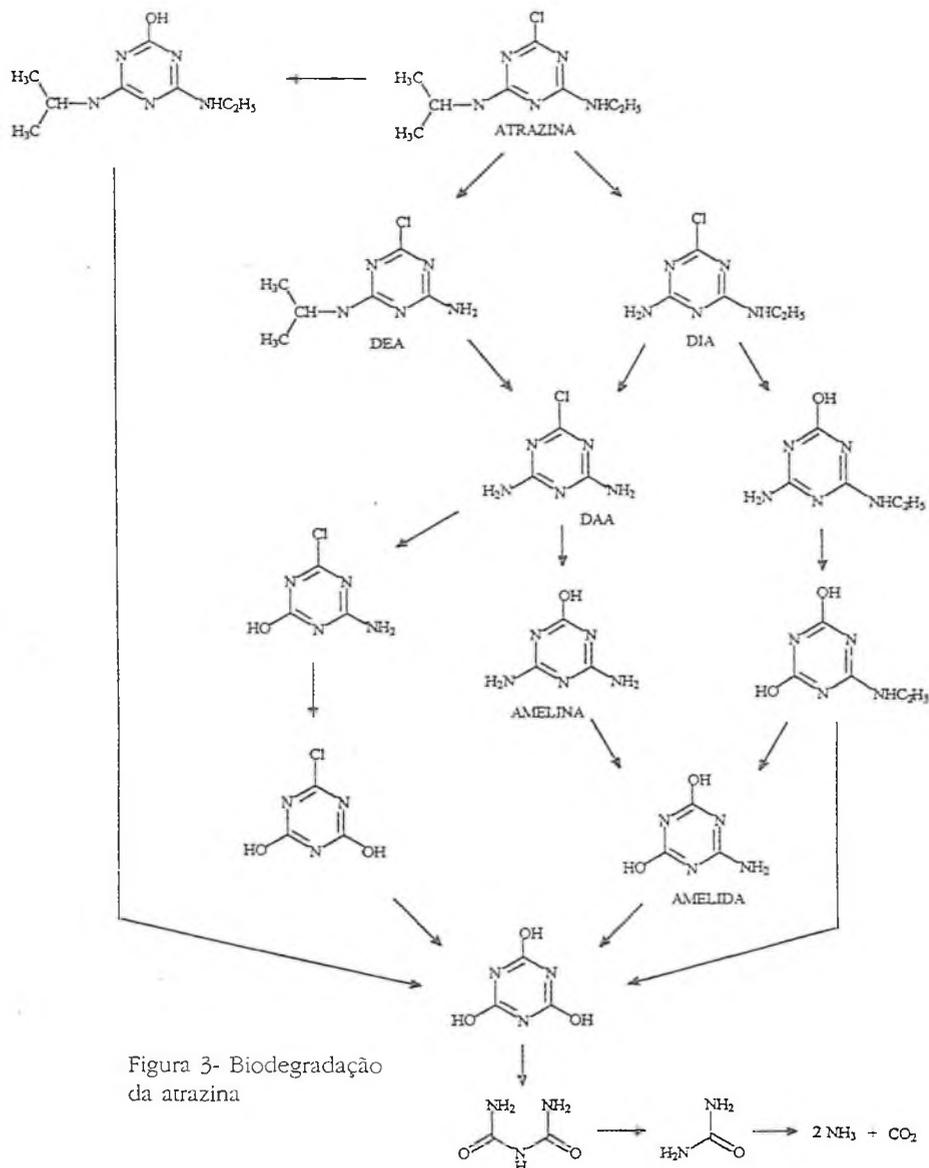
O HERBICIDA  
ATRAZINA

Os herbicidas triazínicos vem sendo empregados na agricultura para o controle de ervas daninhas, devido a capacidade destes compostos orgânicos em inibir a fotossíntese. Dentre eles destacam-se a atrazina, simazina, propazina e ametrina. A atrazina em uso há mais de 30 anos, representa 12% (mais de 40 000 toneladas/ano) de todos os pesticidas empregados nos Estados Unidos em culturas de milho, sorgo, cana e abacaxi, como também é largamente empregada nos Estados centrais e moderadamente em Estados do leste. O Brasil, com as culturas da cana e milho na liderança, emprega também elevadas quantidades de herbicidas triazínicos. Das 150.000 toneladas/ano dos pesticidas consumidos, cerca de 33%, são herbicidas; somente a cultura de cana de açúcar, vem consumindo acima de 20.000 toneladas, que representa em torno de 13% do total de pesticidas.

A atrazina é um contaminante potencial da água em virtude de suas características: alto potencial de escoamento, elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade baixa para moderada em água, absorção moderada à matéria orgânica e argila. De fato, a presença de atrazina em águas subterrâneas americanas é cerca de 10 a 20 vezes mais freqüente do que o contaminante segundo na lista (HALLBERG, G.R. - 1989). No Canadá, os estudos constataram a presença de atrazina em poços, sendo que alguns apresentam índices da ordem de 10 ug/L de atrazina e um produto de degradação, também fitotóxico (BELLUCK et al, 1991).

A MICROBACIA DO ESPRAIADO E O  
AQUÍFERO BOTUCATU  
OU GUARANI

Estudos geológicos coordenados pela EMBRAPA/CNPMA revelaram uma área na região de Ribeirão Preto, SP, com cerca de 4.000 hectares, definida como microbacia do Espraiado, com alto risco de contaminação por agroquímicos (figura 1). Esta região está localizada em uma área de recarga do aquífero Botucatu ou Guarani. Este aquífero está abrigado na bacia sedimentar do Paraná, ocu-



pando uma extensão de 1 150.000 km<sup>2</sup> (figura 2). A maior parte encontra-se em território brasileiro (840.000 km<sup>2</sup>), no entanto uma considerável porção localiza-se na Argentina, Paraguai e Uruguai. O aquífero, que possui água de excelente qualidade e é extraída de poços semi-artesianos, abastece centenas de cidades de pequeno e médio porte, atingindo 60% das cidades urbanas do Estado de São Paulo. Na região de Ribeirão Preto, com mais de 2 milhões de habitantes, praticamente 100% das cidades são abastecidas exclusivamente com água subterrânea.

As áreas de recarga (150.000 km<sup>2</sup>) se localizam nas bordas leste e oeste do aquífero em faixas alongadas do pacote sedimentar que afloram à superfície. Nestas áreas, as águas de chuva alimentam o aquífero, confluindo para a calha da bacia.

As áreas de recarga se constituem nas

regiões onde o aquífero é mais vulnerável. O mau uso destas terras pode, em longo prazo, comprometer a qualidade do recurso natural mais precioso para a humanidade, a água.

A BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA

A maioria dos compostos orgânicos, xenobióticos, tais como agroquímicos em geral, não se perpetuam no ambiente pois podem ser biodegradados pela ação de organismos vivos presentes na natureza, que atacam a estrutura molecular destes compostos orgânicos. Os microrganismos, pela sua capacidade degradadora, participam de forma significativa na eliminação ou redução acentuada dos níveis de pesticidas empregados na agropecuária. No entanto, dependendo da natureza qualitativa e quantitativa do composto empregado e das características gerais do solo, ocorre o acúmulo a índi-



Figura 4 - População microbiana de amostra de solo incubada com atrazina (1,66 g/L) por 14 dias

ces considerados tóxicos.

A molécula de atrazina, formada por um anel aromático heterocíclico clorado e N-alkilado, não é facilmente biodegradada. Alguns microrganismos tem demonstrado habilidade de biodegradar parcial ou totalmente a molécula, levando a formação de  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$  (figura 3).

A degradação parcial da molécula de atrazina por fungos tais como *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus stolonifer* foram relatados, embora a maioria das ações microbianas relatadas, recaem sobre bactérias do gênero *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* e principalmente *Pseudomonas*, um gênero bastante versátil também com habilidade para degradar 2,4-D (BEHKI & KHAN, 1986; BEHKI et al, 1993; LEVANNON, 1993). A mineralização completa da atrazina por um único microrganismo não é comum, mas consórcios empregando 2 ou mais espécies diferentes são capazes de mineralizar atrazina (RASODEVICH et al, 1995). Os achados de KORPRADITSKUL et al, 1993, mostraram que amostras de solos do Japão e da Tailândia contém uma população elevada de degradadores de atrazina. Esta população não foi capaz de, no solo, degradar com eficiência a atrazina presente. Pode-se concluir que, espécies do mesmo gênero e mesmo subespécies, podem apresentar capacidade metabólica distinta que traduzem em habilidade de degradar compostos orgânicos dos mais diversos. Os isolamentos a partir de amostras de solo de locais diferentes, tem

conduzido à diversidade de isolados, resultados, às vezes, concordantes e, outras, discordantes, embora sempre resultados que acrescentam aos achados anteriores.

#### SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS BIODEGRADADORES DE ATRAZINA

O isolamento e seleção de linhagens microbianas capazes de biodegradar atrazina, é um trabalho bastante atraente e de interesse nacional quando se utiliza solos tropicais submetidos à agricultura intensiva.

Em nossos trabalhos microbiológicos, decidimos trabalhar com amostras de solo coletadas da região da microbacia do Espiraiado. Os pontos de coleta das amostras foram definidos através da superposição de diversos mapas geológicos e de acordo com as características e propriedades do solo da região, com cobertura de cana de açúcar (CERDEIRA et al, 1998).

Partindo de 9 pontos, as amostras foram coletadas a 2 profundidades diferentes: 0-20 e 80-90 cm. e submetendo estas amostras ao tratamento com atrazina (1mg/mL em suspensão de solo). Após tratamento, as suspensões foram plaqueadas revelando populações diversas de microrganismos como as da figura 4. Os microrganismos isolados foram testados em sua habilidade para metabolizar atrazina. Para monitorar a degradação de atrazina, os microrganismos foram incubados em meio líquido, contendo como

única fonte de carbono ou carbono e nitrogênio, a atrazina na concentração de 10ug/mL. Após um período de incubação variado, as amostras foram analisadas em seu conteúdo residual de atrazina por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). A figura 5 ilustra a biodegradação do herbicida com os cromatogramas de 2 amostras designadas 4 e 5, onde pode-se observar a degradação parcial (amostra 4) e total (amostra 5) de atrazina após 26 dias de incubação.

#### BIORREMEDIAÇÃO

A descontaminação de sítios já sujeitos à contaminação podem ser obtidos por técnicas de remediação e restauração. Usualmente, estas técnicas consomem montantes astronômicos, como os 7 bilhões gastos devido à contaminação por metais pesados. Tecnologias avançadas tais como o uso de sistemas biológicos de tratamento, para reduzir ou destruir resíduos perigosos, são vistas como uma opção para a tecnologia de descontaminação. Um dos campos mais promissores da biotecnologia que visa o empre-

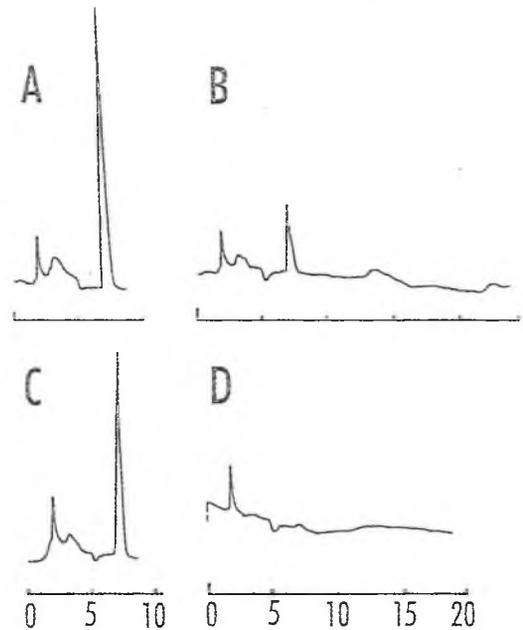


Figura 5 - Cromatograma de CLAE (Cromatografia líquida de Alta Eficiência) de amostra de solo: coluna RP-18 (250x4,6 mm); fase móvel -  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (70:30, v/v); detector UV - 220 nm; fluxo 1mL/min.

- A - Amostra 4 - 0h
- B - Amostra 4 - 26 dias de incubação
- C - Amostra 5 - 0h
- D - Amostra 5 - 26 dias de incubação

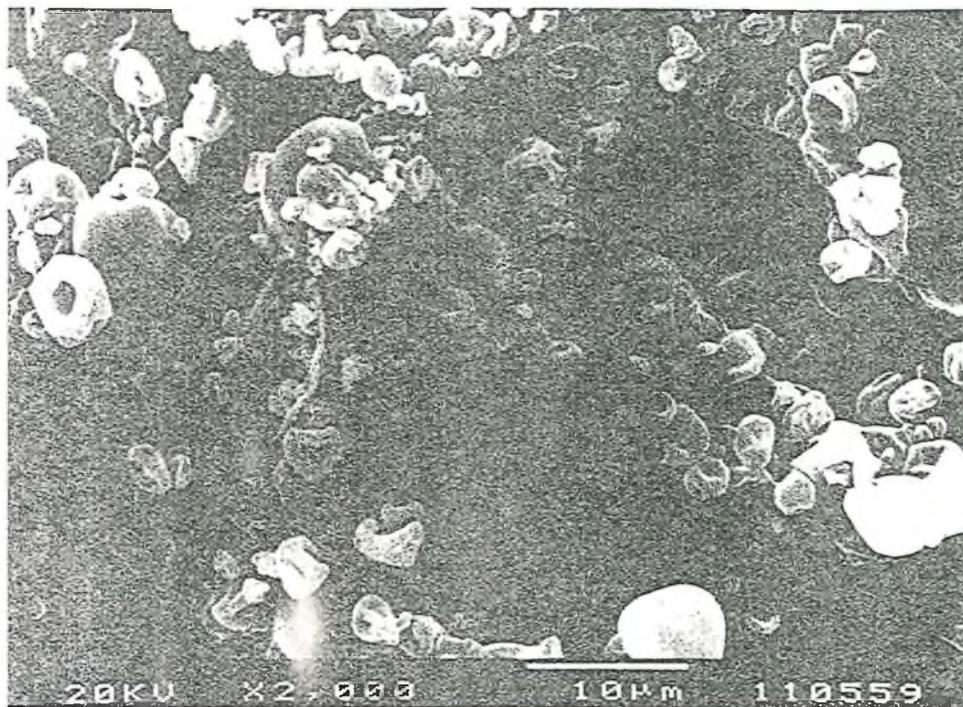


Figura 6 - Fotomicrografia de partícula do processo de microencapsulação

go dos microrganismos, direciona-se para a remediação de locais contaminados devido ao uso de agroquímicos. Uma vez que microrganismos presentes em solos são capazes de degradar e mineralizar pesticidas, pode-se desenvolver remediação biológica ou biorremediação de sítios contaminados, empregando-se microrganismos selecionados. A biorremediação tem por objetivo inocular o solo com microrganismos com capacidade de metabolizar os resíduos tóxicos presentes no ambiente. A biorremediação vem sendo desenvolvida com o objetivo de explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana para a transformação de contaminantes em produtos menos tóxicos, que podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais. Estudos baseados no uso de microrganismos para degradar compostos químicos são descritos freqüentemente na literatura, bem como a degradação total ou parcial de pesticidas por populações microbianas naturais presentes em solos.

Isolamento, caracterização e identificação dos microrganismos com habilidade ou atividade enzimática metabolizadora dos materiais químicos potencialmente tóxicos, é essencial para utilizá-los em biorremediação como medida mitigadora nos problemas decorrentes do uso irracional de agroquímicos.

Tentativas para se aplicar processos de biorremediação em solos contami-

nados, por simples adição destes ao solo, por meio de um processo conhecido como bioaumento ou bioampliação, não vem alcançando o sucesso esperado. A incorporação de nutrientes ao solo ou outra manipulação da área denominada de bioestimulação, para promover o crescimento microbiano, tem resultado em sucesso limitado (US Geological Survey).

O enfoque que estamos utilizando é desenvolver um sistema de liberação de microrganismos como os empregados para a liberação de fármacos em medicamentos, como um modelo para ser aplicado em processos de biorremediação. Por meio do emprego de conhecimentos de tecnologia farmacêutica, pretende-se incorporar os microrganismos de interesse aos sistemas de liberação, que podem liberar microrganismos para biorremediar solos. Sistemas de liberação controlada ou sustentada podem ser desenhados para uso no solo. Neste sentido, microcápsulas, uso de matrizes poliméricas como derivados de alginato, amido ou celulose, estão sendo adaptados.

A figura 6 mostra a fotomicrografia de partículas desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa para a microencapsulação de microrganismos. As microcápsulas serão empregadas em experimentos de campo para se avaliar e otimizar a mineralização de atrazina.

As microcápsulas poderão então ser lançadas a sítios contaminados permi-

tindo a biorremediação do solo e consequente proteção dos aquíferos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHKI, R. M.; KHAN, S. U. (1986) - Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 34: 746-749.
- BEHKI, R. M.; TOPP, E.; DICK, W.; GERMON, P. (1993) Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1955-1959.
- BELLUCK, D. A.; BENJAMIN, S. L. and DAWSON, T. (1991) - Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: Risk assessment, policy, and legal implications. In L. Somasundaram and J. R. Coats (eds.) *Pesticide Transformation Products: Fate and Significance in the Environment*. American Chemical Society, Washington, DC.
- CERDEIRA, A. L.; LANCHOTE, V. L.; GOMES, M. A.; BONATO, P.; PESSOA, M.; SHUHAMA, I. K.; UETA, J. (1998) - Herbicide residue in soil and water from sugarcane area in Brazil. In *Congrés Mondial de Science du Sol*, 16 Anais 1-7
- HALLBERG, G. R. (1989) - *Agr. Ecosys. Environ.* 26: 299-367
- KORPRADITSKUL, R.; KATAYAMA, A.; KUWATSUKA, S. (1993) Degradation of atrazine by soil bacteria in stationary phase. *J. Pesticide Sci* 18: 293-298
- LEVANON, D. (1993) - Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biol. Biochem.* 25(8): 1097-1105.
- PARSONS, B. & WITT, J. M. (1989) - Pesticides in groundwater in the USA. A report of a 1988 survey of US States. EM 8406; *Oregon State University Extension Service*.
- RASODEVICH, M.; TRAINA, S.; HAO, Y.; TUOVINEN, O. H. (1995) - Degradation and mineralization of atrazine by soil bacterium isolate *Appl Environ Microbiology* 61:297-302
- WINTERLIN ET AL (1989) *Arch Environ Contam Toxicol.* 18: 734-747.
- Participantes do trabalho: Pós-graduandos, graduandos estagiários e técnicos especializados dos laboratórios de Tecnologia das Fermentações, Controle de Qualidade e Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP.