

DEGRADAÇÃO DO PESTICIDA METAMIDOFÓS NO SOLO UTILIZANDO BIOSURFACTANTES

DEGRADATION OF THE PESTICIDE METHAMIDOPHOS IN SOIL WITH BIOSURFACTANTS

Priscila Maria Dellamatrice¹
Lilian da Silva Costa²
Milena Viana de Sousa³
Alana Silva Marques⁴
Rinaldo dos Santos Araújo⁵

Resumo: Foi estudada a degradação do inseticida Metamidofós em um solo com longo tempo de uso do produto, contendo altos níveis de resíduo, aplicando-se biossurfactantes em várias dosagens para acelerar a degradação. A degradação foi estudada em sistema de lisímetro com coleta de lixiviado. O biossurfactante foi produzido microbiologicamente utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e o líquido metabólico utilizado nas concentrações de 100, 50 e 25% v/v diluído em água. Na concentração de 100% a degradação foi completa, porém houve alta lixiviação. Na concentração de 50%, a degradação também foi completa, porém não houve lixiviação do produto. Na concentração de 25% a degradação foi incompleta com parte do produto permanecendo no solo. A dose de 50% foi considerada ideal, a qual foi eficiente na degradação e não causou lixiviação. Deste solo foi isolada uma bactéria capaz de crescer sobre metamidofós como única fonte de carbono e esta foi classificada como pertencente ao gênero *Leuconostoc* sp.

Palavras-Chave: Metamidofós, Solo, Biossurfactante, Degradação, Microrganismo.

Abstract: The degradation of the insecticide Methamidophos was studied in a soil with long use of this product and containing high residues levels, applying biosurfactants at various dosages to accelerate the degradation. The degradation was studied in lysimeter system with collection of the leachate. The biosurfactant was produced microbiologically by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and the metabolic liquid used at the concentrations of 100, 50 and 25% v/v diluted in water. At concentration 100% the degradation was complete, but the leaching was high. At 50 % concentration, the degradation was also complete, however leaching didn't occurred. At 25 % concentration, the degradation was incomplete with some product remaining in soil. The dosage of 50% was considered the best one, which was efficient to degradation and didn't cause leachate. From this soil, it was isolated one bacterium able to grow on methamidophos as sole carbon source, which was classified as *Leuconostoc* sp.

Key-Words: Methamidophos, Soil, Biosurfactant, Degradation, Microorganism.

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) - Av. Treze de Maio 2081 -. 60.040-531 Fortaleza – CE, e-mail: prisciladell@ig.com.br

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), e-mail: lilian.ifce@yahoo.com.br

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), e-mail: alanaifce@gmail.com

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), e-mail: milenaramil@hotmail.com

⁵ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), e-mail: rinaldo@ifce.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Uma preocupação crescente nas áreas agrícolas com intenso uso de pesticidas é a ocorrência de solos contaminados com altas concentrações de pesticidas (ARTHUR *et al.*, 2000). Locais contaminados frequentemente contêm numerosos poluentes, os quais podem constituir um risco para a saúde de humanos, animais e o meio ambiente (ROCKNE; REDDY, 2003). A toxicidade destes produtos limita a sua degradação natural no ambiente, permanecendo no ambiente por longos períodos. Embora os pesticidas possuam um papel benéfico sobre a produtividade na agricultura, o risco potencial desses compostos químicos no ambiente tem despertado o interesse científico para a biodegradação destes produtos e compostos relacionados (COLLA *et al.*, 2008).

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 diminui com o tempo devido à diminuição da disponibilidade do produto para aos microrganismos. Complexas interações entre as moléculas dos contaminantes e as partículas de solo e água presente podem ocorrer, afetando a biodegradação (ALEXANDER, 1995).

Os pesticidas no solo são metabolizados por processos biológicos e não biológicos, sendo que os microrganismos tem papel essencial (CHOWDHURY *et al.*, 2008). Microrganismos podem degradar numerosos poluentes orgânicos devido à sua maquinaria metabólica e capacidade para se adaptarem em ambientes desfavoráveis (EL FANTROUSSI; AGATHOR, 2005). A cinética da degradação depende de fatores bióticos e abióticos e são específicos para cada pesticida (CHOWDHURY *et al.*, 2008). Dentre estes fatores, a sorção ao solo afeta a biodisponibilidade dos produtos e influencia na eficiência da degradação (GALLIULIN *et al.*, 2001). Assim, somente pesticidas presentes na solução do solo são disponíveis para a ação microbiana (MATA-SANDOVAL *et al.*, 2002).

O uso de biosurfactantes tem o objetivo de melhorar a utilização de fontes de carbono pelos micro-organismos no solo. O surfactante é uma molécula anfipática, apresentando uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, com capacidade de diminuir a tensão superficial ou agem como emulsificantes. Essa propriedade aumenta a

solubilidade e a disponibilidade de poluentes hidrofóbicos aos micro-organismos, aumentando o potencial para biodegradação (BENTO *et al.*, 2003).

Biossurfactantes são estruturalmente diversos compostos produzidos por micro-organismos (JAYASHREE *et al.*, 2006). São produzidos principalmente por bactérias ou leveduras. Podem ser aniônicos ou não iônicos. São estáveis a altas temperaturas, pH e concentração salina. Biossurfactantes são biodegradáveis, não tóxicos ou menos tóxicos que surfactantes químicos.

Estudos realizados com aplicação de surfactantes na biorremediação de solos mostraram aumento nas taxas de degradação para vários produtos estudados, dentre eles creosoto, fenantreno e pentaclorofenol, porém também causando aumentos na lixiviação para o-xileno e o-diclorobenzeno (ATAGANA *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2005; MULLIGAN; EFTEKHARIE, 2003; FORTIN *et al.*, 1997). O aumento ou decréscimo da mobilidade do pesticida no solo foi encontrado ser dependente da natureza química do surfactante, sua concentração no solo ou na água de lixiviação e hidrofobicidade do pesticida (SANCHEZ- CAMAZANO *et al.*, 2005). Assim, a concentração ótima de surfactante deve ser estabelecida antes da biorremediação e depende da natureza do contaminante e tipo de solo (JAYASHREE *et al.*, 2006).

O Metamidofós é um pesticida organofosforado, altamente eficaz, de largo espectro de ação, o qual vem sendo utilizado em grandes quantidades em vários países inteiro (YU; ZHOU, 2005). Muitos estudos têm sido realizados para qualificar os efeitos e os mecanismos de ação do Metamidofós no meio ambiente, sabe-se que tem persistência baixa e está incluído na classe toxicológica I, sendo considerado mutagênico e teratogênico (LIMA *et al.*, 2003). Porém, estudos revelaram que, apesar de serem considerados de baixa persistência, eles pode persistir no ambiente por longos períodos de tempo (ZHANG, 2002), desde que eles são extensivamente utilizados e foram detectados anos depois da aplicação (RAGNARSDOTTIR, 2000).

O objetivo do trabalho foi estudar a degradação e lixiviação do Metamidofós em solo com largo tempo de uso aplicando-se biossurfactantes. Ao final do experimento foi realizado o isolamento da microbiota responsável pela degradação, a qual foi identificada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

A região estudada está situada no município de Tianguá, na serra da Ibiapaba, região noroeste do estado do Ceará. A área estudada apresenta contaminação do solo e do lençol freático generalizada com diversos pesticidas, dentre eles o inseticida metamidofós. A concentração de metamidofós encontrada no solo foi de 16 µg/g solo. Este solo foi classificado como areia quartzosa distrófica, sendo o teor de elementos (mg/dm³): P 180; K 353; Ca 2,9; Mg 1,3 e Na 11. O pH foi de 6,7.

2.2 Produto

Foi estudado o inseticida Metamidofós, do grupo dos organofosforados, considerado altamente tóxico e pertencente à classe toxicológica I. O nome científico é O, S – dimetilfosforamidotioato e sua fórmula molecular é C₂H₈NO₂PS, sendo comercializado com o nomes genéricos Monitor, Tamaron, Nitofol, Tam entre outros (Figura 1). Estudos sugerem que, apesar dos pesticidas organofosforados serem considerados de baixa persistência, eles podem persistir no ambiente por longos períodos de tempo, desde que eles são extensivamente utilizados e foram detectados anos depois da aplicação (ZHANG *et al.*, 2002).

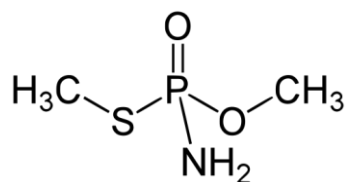


Figura 1 – Metamidofós.

2.3 Análises químicas no solo

Para a extração do pesticidas no solo, foi utilizada metodologia baseada em Tadeo *et al.* (2010), onde 5 g de solo foram extraídos utilizando acetato de etila (10 ml) como solvente sob sonicação em ultra-som por 30 min. Após a concentração da amostra, a umidade foi removida utilizando NaSO₄. As análises foram feitas em cromatógrafo gasoso. As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás Perkin-Elmer, com temperatura do injetor de 250°C, coluna inicialmente em 110°C por 1 min e rampa de 10°C/min até 280° C por 12 minutos e temperatura no detector de ionização por chama de 300°C. O N₂ foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL.min⁻¹.

2.4 Produção de surfactantes

O surfactante foi produzido microbiologicamente a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, as quais tem a capacidade de produzir rhamnolipídeos em meio de cultura. A bactéria foi incubada em meio LB, caldo luria-Bertani (10 g triptona, 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl e 1000 mL água destilada) contendo óleo de babaçu (1%) por 48 h em shaker a 150 rpm. No solo, foi aplicado o líquido metabólico, após centrifugação a 3500 rpm por 7 min (ROBERT *et al.*, 1989).

2.5 Estudo das doses de aplicação do surfactante utilizando lisímetro

Para estudo da dose de aplicação ideal para o surfactante no campo foi utilizado o sistema de lisímetro, com coleta de lixiviado, na altura de 25 cm e largura de 15 cm. O solo foi coletado na área contaminada em Tianguá e incubado em laboratório. Foram feitas aplicações do surfactante em três dosagens diferentes (100, 50 e 25% do líquido metabólico v/v) e controle com água destilada. A degradação foi medida por GC e o número de microrganismos monitorado durante a degradação no solo. O percolado também foi coletado e analisado para determinação da quantidade do produto lixiviado.

2.6 Contagem dos microrganismos

Na contagem dos microrganismos foi utilizado o procedimento de diluição em série, utilizando-se meio nutriente-ágar para contagem de bactérias e meio BD contendo metamidofós como única fonte de carbono para contagem de bactérias degradadoras. Foram plaqueadas as concentrações de 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 dias para bactérias e microrganismos degradadores.

2.7 Isolamento de microrganismos degradadores do metamidofós

Para o isolamento, amostras de 10g de solo foram colocadas em 90 mL de solução salina (0,85%) e agitadas por 10 minutos em agitador eletrônico (Vortex). Alíquotas de 1mL desta solução foram transferidas para 50mL de meio BD, contendo Metamidofós como única fonte de carbono, de onde foram feitos repiques para meios novos a cada 7 dias. As bactérias que cresceram foram plaqueadas em meio sólido onde foram mantidas até a identificação.

2.8 Identificação dos microrganismos

Os microrganismos que cresceram em meio com Metamidofós como única fonte de carbono foram submetidos à coloração de Gram e também foram feitos testes bioquímicos básicos para identificação até gênero, como fermentação de lactose, glicose e sacarose, crescimento sobre citrato, e mobilidade (KONEMAN *et al*, 1993).

3. RESULTADOS

3.1 Estudo das doses de aplicação do surfactante utilizando lisímetro

Após 15 dias, foi encontrada degradação completa do Metamidofós no solo com aplicação do líquido metabólico não diluído (100%) e diluído a 50% v/v. Na diluição de 25% v/v, foi encontrada uma baixa degradação de 17,18%. Aos 30 dias de incubação

nesta concentração, a degradação foi de 38,92%, sendo significativamente menor que no solo com concentrações maiores de surfactante, mostrando que a degradação aumenta na presença do surfactante porém depende da dose aplicada.

No líquido lixiviado coletado após percolação do biossurfactante no solo, foi detectado pesticida somente na amostra da concentração de 100% de surfactante v/v, com presença de $0,495 \text{ ug.mL}^{-1}$ do pesticida, sendo o volume total coletado de 28 mL, mostrando perda do produto por lixiviação. Nesta dose, embora a remoção do produto no solo tenha sido completa, parte do produto foi perdida no processo de lixiviação não tendo sido degradado completamente por micro-organismos e podendo levar a contaminação das águas subterráneas durante o processo de biorremediação. A dose de 50% v/v do surfactante, a qual foi tão eficiente na degradação como a 100% v/v, não causou lixiviação sendo considerada a dose ideal. De acordo com Sanchez- Camazano et al. (2005), a dose pode variar para o pesticida e tipo de solo,

Em um estudo semelhante em coluna de solo, a lixiviação de TCE foi maior que a degradação, chegando a 75% do produto sendo lixiviado, indicando que a aplicação de surfactantes pode levar a lixiviação e contaminação do lençol freático (ROTHMEL *et al.*, 1998).

O biossurfactante mostrou ser eficiente em remover do solo o produto adsorvido, inclusive quando diluído a concentração de 50% v/v, permitindo que ocorra a degradação. Em outro estudo com adição de rhamnolípídeos de *Pseudomonas aeruginosa* na biorremediação, a degradação de hexadecano também foi acelerada com a adição destes produtos (NOORDMAN *et al.*, 2002).

3.2 Contagem de micro-organismos no lisímetro

Não houve aumento no número de bactérias totais nos tratamentos com biossurfactante, o qual foi reduzido significativamente nas menores doses do biossurfactante (Figura 3). O surfactante provavelmente aumentou a disponibilidade de substrato, o qual suportou a manutenção da cultura de micro-organismos.

Houve aumento no número de bactérias degradadoras de Metamidofós após 30 dias de incubação para a concentração de 100 e 50% de biossurfactante, sendo que estes organismos podem estar utilizando o pesticida como fonte de carbono para crescimento. O aumento verificado foi menor na concentração de 100%, onde parte do produto foi lixiviado, resultando em menor concentração de substrato disponível aos microorganismos. Na concentração de 25%, o número de bactérias degradadoras foi ligeiramente reduzido (Figura 2). Assim, o crescimento dos microrganismos esteve correlacionado com a degradação do Metamidofós, demonstrando que a adição do biossurfactante resulta em maior crescimento de microrganismos e conseqüentemente maior degradação.

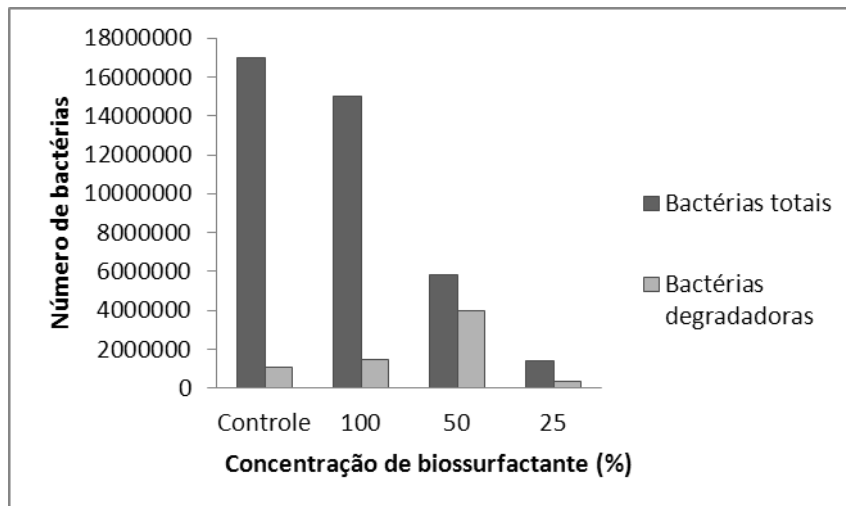


Figura 2 – Contagem de micro-organismos no solo do lisímetro.

3.3 Identificação das bactérias degradadoras do metamidofós

A bactéria degradadora do Metamidofós apresentou colônias brancas e opacas em meio de cultura sólido. No teste de Gram, foi classificada como *streptococos* Gram negativos. Nos testes bioquímicos, a bactéria degradadora do Metamidofós não apresentou crescimento sobre citrato, não apresentou mobilidade, fermentação de glicose, sem fermentação de lactose ou sacarose. A partir destas características foi identificada como pertencente à família *Micrococaceae*, gênero *Leuconostoc sp.*

4 CONCLUSÃO

No solo, o biossurfactante aumentou a degradação do pesticida Metamidofós, porém causou perdas por lixiviação na maior concentração, enquanto na menor concentração a degradação foi menor, mostrando que há uma dose ótima para aplicação eficiente e sem riscos de contaminação das águas superficiais.

Foi isolada do solo contaminado com Metamidofós, uma bactéria capaz de degradar o produto como única fonte de carbono, sendo classificada como pertencente ao gênero *Leuconostoc* sp.

O biossurfactante produzido através da bactéria *P. aeruginosa* mostrou potencial para uso em biorremediação de solos, devendo apenas a dosagem ser quantificada adequadamente para evitar perdas por lixiviação. Diluições podem ser feitas tornando sua aplicação mais econômica.

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALEXANDER, M. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environmental Science and Technology*, [S.1.], v. 29, n.11, p. 2713-2717, 1995.
- ARTHUR, E.L.; PEROVICH, B.S.; ANDERSON, T.A.; COATS, J.R. Degradation of an atrazine and metolachlor herbicide mixture in pesticide contaminated soils from two agrochemical dealerships in Iowa. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 119, p. 79-90, 2000.
- ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. The use of surfactants as possible enhancers in bioremediation of creosote contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 142, p. 137-149, 2003.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER JUNIOR, W.T. Biorremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, [S.1.], v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003.
- CHOWDHURY, A.; PRACHAN, S.; SOHO, M.; SANJAL, N. Impact of pesticide on soil microbiology parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 114-127, 2008.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A.L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Isolamento e Seleção de Fungos para Biorremediação a partir de Solo Contaminado Com Herbicidas Triazínicos. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 3, p.809-813, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v32n3/a16v32n3.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2011.

- EL FANTROSSI, S.; AGATHOR, S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 268-275, 2005.
- FORTIN, J.; JURY, W.A.; ANDERSON, M.A. Enhanced removal of trapped non-aqueous phase liquids from saturated soil using surfactant solutions. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 24, p. 247-267, 1997.
- GALIULIN, R.V.; RASHKIN, V.N. GALIULIN, R.A.; BIRCH, P. The theoretical basis of microbiological transformation and degradation of pesticides in soil. *Land Contamination and Reclamation*, v.9, p.4, 2001.
- JAYASHREE, R; VASUDIVAN, N; CHANDRASEKARAN, S. Surfactants enhanced recovery of endosulfan from contaminated soils. *Int. J. Environ. Sci Tech*, v.3, p. 251-259, 2006.
- E. W. KONEMAN, S.D. ALLEN, W.D. JANDA, P.C. SCHRECKENBERGER, W. C. WINN JR. *Diagnostic microbiology – color atlas and textbook*. 4th Ed. Philadelphia, J.B.Lippincott Company, 1992, 1154 p.
- LIMA, F. J. C.; TANAKA, S. M. C. N.; NUNES, G. S.; SANTOS dos, T. C. R.; CORDEIRO P. J. M. Análise de resíduos do inseticida metamidofós em soja e determinação final por cromatografia em fase gasosa. *Pesticidas: Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 91-102, jan./dez. 2003.
- 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.
- MULLIGAN, C.N.; EFTEKHARIE, F. Remediation with surfactant foam of PCP-contaminated soil. *Engineering Geology*, v. 70, p. 269-279, 2003.
- NOORDMANN, W. H.; WACHTER, J. H.; BOER, G.J.; JANSSEN, D.B. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *P. aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*, v. 94, p. 195-212, 2002.
- RAGNARSDOTTIR, K. V. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *Journal of Geological Society*, v. 157, 859-876, 2000.
- ROBERT, M.; MARCADÉ, M.E.; BOSCH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPINY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters*, v. 11, p. 871-874, 1989.
- ROCKNE, K.J.; REDDY, K. R. Biorremediation of contaminated sites ; *International e-Conference on Modern Trends in Foundation Engineering:, Geotechnical Challenges and Solutions*; pp. 1-22. Oct. 2003;
- ROTHMEL, R.K.; PETERS, R.W.; ST. MARTIN, E.; DEFLAUM, M.F.. Surfactant foam/bioaugmentation technology for in situ treatment of TCE-DNAPs. *Environmental Science and Technology*, v. 32, p. 1667-1675, 1998.
- TADEO, J.L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; GARCIA-VALCÁRCCEL, A.I. Application of ultrasound assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2415-2440, 2010.

Y.YU and Q.X.ZHOU, Adsorption characteristics of pesticides methamidophos and glyphosate by two soils, *Chemosphere* 58 (2005), pp. 811–816.

ZHANG, Z.L.; HONG, H.S.; ZHOU, J.L.; YU, G. Occurrence and behaviour of organophosphorus insecticides in the river wuchuan, southeast China. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 4, p. 498-504, 2002.

ZHAO, B.; ZHU, L.; LI, W.; CHEN, B. Solubilization and biodegradation of phenanthrene in mixed anionic-nonanionic surfactant solutions. *Chemosphere*, v. 58, p. 33-40, 2005.