



## VI-269 - AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DOS FUNGICIDAS CHLOROTALONIL E MANCOZEB EM SOLOS ATRAVÉS DE SISTEMA DE RESPIROMETRIA AERÓBIO

**Emília Brito<sup>(1)</sup>**

Graduando Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Espírito Santo e Graduada em Tecnologia em Saneamento Ambiental pelo Centro Federal de Educação Tecnológica do Espírito Santo.

**Sérvio Túlio Alves Cassini**

Professor do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade do Espírito Santo (UFES)

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Departamento de Engenharia Ambiental – Universidade Federal do Espírito Santo – Vitória - ES – CEP 29060-970 – Brasil – Tele fax: (27) 33352165 – e-mail: [milambiental@yahoo.com.br](mailto:milambiental@yahoo.com.br).

### RESUMO

Para a produção vegetal, muitos são os agricultores que aplicam agrotóxicos nas culturas além dos limites recomendados pelos órgãos competentes. Uma das consequências dessa aplicação indiscriminada é a contaminação de lençóis freáticos e do solo sob cultura. Esta contaminação modifica a microfauna local e podendo causar impactos à saúde de populações humanas.

Dentre muitas metodologias em estudo para a descontaminação de solo, a técnica de biorremediação baseia-se na utilização do potencial dos microrganismos de aclimatizarem e degradarem compostos persistentes no ambiente, podendo assim mineralizar os mesmos. Dentre os microrganismos estudados destacam-se na biorremediação de solos contaminados alguns fungos e as bactérias.

Com o objetivo de estudar a biodegradação dos fungicidas Chlorotalonil e Mancozeb este estudo isolou e caracterizou bactérias com potencial de degradação dos compostos estudados e testou-as em um sistema de respirometria aeróbia, avaliando a especificidade das mesmas e o potencial de degradação. Foram obtidas taxas baixas no período experimentado, comprovando a toxicidade dos compostos em estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agrotóxicos, Mancozeb, Chlorotalonil, Biodegradação, Respirometria

### INTRODUÇÃO

A utilização de bactérias por meio de um processo de aclimação, ou seja, adaptação seletiva as condições de impacto ambiental, pode promover uma significativa remoção de agentes poluentes no ambiente. Esse é o princípio da biorremediação, que está sendo cada vez mais pesquisado, uma vez que a utilização de produtos químicos para remediar impactos muitas vezes gera subprodutos, sendo muitos deles até mais tóxicos que o agente poluidor.

Almejando grandes produções e produtos que visualmente agradem o consumidor, grande é o número de agricultores que utilizam de compostos orgânicos industriais para tal fim. Entretanto, muitas vezes não respeitam os limites de concentrações indicados para estes produtos, além de não pesquisarem sobre a toxicidade do produto, colocando o ambiente e suas saúdes em risco. Grande parte dos agrotóxicos percolam pelo solo, alcançando e contaminando o lençol freático e os corpos d'água próximos a área de cultivo onde este é lançado, além de modificarem a microfauna, uma vez que a aplicação destes pode causar intoxicação desta, selecionando as espécies mais resistentes ao produto utilizado e assim diminuindo a biodiversidade do local.

Pesquisas vêm sendo realizadas para modelar a degradação de compostos orgânicos no solo, utilizando uma gama de metodologias, dentre as quais destacaremos o método respirométrico, que de acordo com a ABNT (1999), que tem sido cada vez mais utilizado para indicar a atividade microbiana e caracterizar a degradação de resíduos orgânicos adicionados ao solo.

A determinação do CO<sub>2</sub> gerado pela respiração bacteriana pode ser quantificada por titulação, condutividade elétrica, cromatografia gasosa, espectroscopia de infravermelho ou por <sup>14</sup>C. No sistema respirométrico aeróbio adotado, a captura do CO<sub>2</sub> é feita por uma solução de álcali introduzida no ambiente de estudo, e determinada através da medição do decaimento da condutividade elétrica desta solução.



A fim de avaliar do potencial de adaptação e degradação bacteriano, este trabalho realizou ensaios de biodegradação em laboratório, sob condições controladas, de cepas aclimatizadas e isoladas dos fungicidas Mancozeb e Chlorotalonil, podendo desta forma avaliar a viabilidade e aplicação destas bactérias na degradação destes compostos *in situ*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

#### Compostos Recalcitrantes

No presente estudo foram utilizados como compostos orgânicos recalcitrantes agrotóxicos, enfocando nos fungicidas Chlorotalonil e Mancozeb, utilizados no cultivo de mamão do estado do Espírito Santo.

#### Fase de Enriquecimento

Foram coletadas amostras de solo rico em nutrientes (solo de cultivo orgânico de hortaliças) e adicionadas em doses de agrotóxicos de 500 miligramas de princípio ativo por um quilograma de solo (sendo que a quantidade de princípio ativo igual a 750 g/ha e 800 g/ha) e acondicionados em frascos apropriados e ao abrigo da luz por um período de 15 dias.

#### Preparação do Meio de Cultura

O Meio de Cultura utilizado para o cultivo dos microrganismos é o Meio Mínimo (MM), preparado segundo o procedimento baseado em Pelczar (1996) e Neder (1992), pesando-se as massas descritas nas tabelas 1 e 2 e completando com água destilada deionizada para os volumes finais descritos nas tabelas. Depois de misturadas em um agitador magnético, as soluções foram transferidas para erlenmeyers de 1000 ml, que foram levados para uma autoclave para esterilização, depois identificados e armazenados em geladeira.

**TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA**

<i>Substância</i>	<i>Quantidade</i>
Água	1000 ml
$(NH_4)_2SO_4$	5,0 g
$KH_2PO_4$	0,9 g
$NaCl$	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
$Na_2HPO_4$	6,2 g
Solução de Micronutrientes	1 ml
Agar	15 g

Fonte: Pelczar (1996)

**TABELA 2 – SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES**

<i>Substância</i>	<i>Concentração</i>
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2000 mg/l
$ZnCl_2$	50 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	30 mg/l
$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	500 mg/l
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	50 mg/l
$AlCl_3$	50 mg/l
$CoCl_3 \cdot 6H_2O$	2000 mg/l
HCl (concentrado)	1 ml/l

Fonte: Chernicharo (1997)



### **Preparação das Placas**

Na preparação das placas de Petri com o Meio de Cultura seguiu-se a metodologia proposta por Neder (1992), na qual o Meio de Cultura foi fundido no microondas, acondicionados nos erlenmeyers, e adicionou-se as doses equivalentes dos compostos em análise. Em seguida, com auxílio de uma pipeta volumétrica de 20 ml e um pipetador automático, o meio enriquecido foi vertido em placas de Petri. Em seguida, as placas foram identificadas e acondicionadas em geladeira até o momento de sua utilização para o cultivo de microrganismos.

### **Inoculação das Placas**

A inoculação das placas com os microrganismos selecionados na fase de enriquecimento foi feita baseada no método descrito por Neder (1992). Nas amostras preparadas na fase de enriquecimento foi verificado o crescimento microbiano e diluídas em pequenas frações em béqueres adicionados de 5 ml de solução salina (0.7% NaCl). Depois foram misturadas em agitador magnético e deixadas em repouso para sedimentação dos sólidos. Após a sedimentação, com auxílio de uma micropipeta, retirou-se alíquotas de 0.1 ml e inoculou-se em placas de Petri previamente preparadas, utilizando a técnica de espalhamento com o auxílio de um alça de vidro. Após esta etapa as placas foram devidamente identificadas e levadas para a estufa a 25°C, ao abrigo da luz, e periodicamente avaliadas para verificação do crescimento bacteriano.

### **Isolamento dos Microrganismos**

Foi feito o isolamento de colônias em placas de Petri de acordo com Neder (1992), no qual inicialmente foram isoladas com auxílio de uma alça de inoculação. Essas colônias foram espalhadas em uma nova placa contendo o meio de cultura + composto em análise, por meio da técnica de esgotamento de alça. Logo após, eram devidamente identificadas e levadas à estufa a temperatura de 25°C e ao abrigo da luz. As colônias inoculadas foram monitoradas periodicamente para averiguação do crescimento microbiano.

Após um período de 15 dias, ao verificar-se o crescimento de colônias isoladas as placas foram levadas à geladeira, a uma temperatura de 4°C, para retardamento do crescimento e consequentemente a conservação dessas colônias. Com o crescimento dos isolados, as colônias também foram acondicionadas em tubos de ensaio para caracterização pelo teste de Gram segundo Ribeiro (2002) e armazenadas em geladeira a 4°C, até a sua utilização nos ensaios de biodegradabilidade. Estas etapas foram resumidas na figura 1.

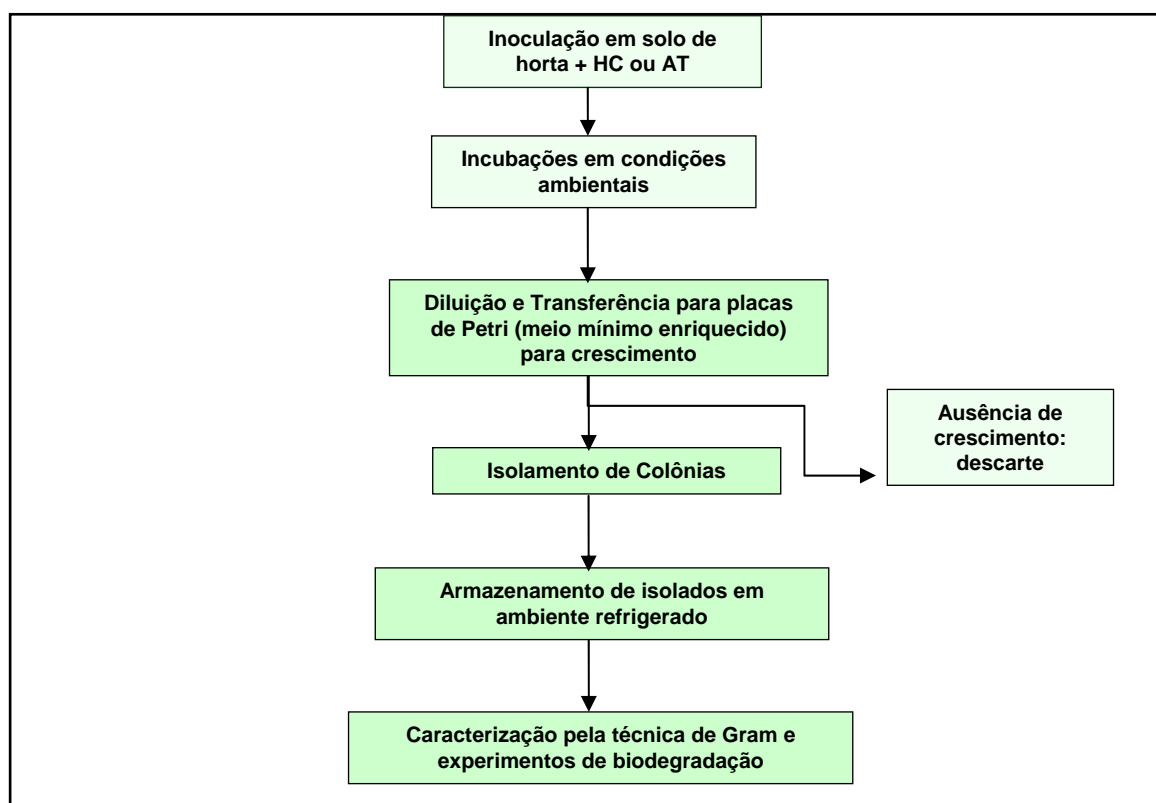


Figura 1: Fluxograma do isolamento bacteriano

### Preparo do Sistema de Respirometria

Na montagem do sistema de respirometria aeróbio foram utilizados potes herméticos contendo 100 g de substrato adicionado de 50% da sua capacidade de campo de meio mínimo líquido (solução descrita na tabela 3), 1 ml de inóculo bacteriano (previamente preparado em shake, em erlenmeyers de 125 ml contendo 20 ml de meio mínimo líquido e uma colônia bacteriana, com temperatura de 25 °C e agitação constante por um período de 5 dias) e as dosagens em análise dos compostos orgânicos em estudo.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LÍQUIDO

<i>Substância</i>	<i>Quantidade</i>
Água	1000 ml
$(NH_4)_2SO_4$	5,0 g
$KH_2PO_4$	0,9 g
$NaCl$	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
$Na_2HPO_4$	6,2 g
Solução de Micronutrientes	1 ml

Fonte: Pelczar (1996)

### Ensaio de Biodegradabilidade

Para a determinação da eficiência de biodegradação o método utilizado baseia-se na medição de  $CO_2$  gerado no processo de biodegradação e construção de uma curva da massa acumulada deste  $CO_2$  em função do tempo, que deverá apresentar fases distintas, tais como: início da curva com baixíssima inclinação, que deverá corresponder à fase de adaptação dos microrganismos, seguida de um elevado crescimento exponencial, uma



vez que nesta fase estará ocorrendo elevada atividade microbiana e por fim, a formação de um patamar, onde a eficiência da biodegradação é drasticamente reduzida (Borges, 2006).

Na quantificação do  $\text{CO}_2$  liberado da respiração microbiana foi adotada a metodologia proposta pela Norma Brasileira 14.283 (ABNT, 1999). Essa norma propõe a captura do  $\text{CO}_2$  produzido, utilizando uma solução padronizada de Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,50 mol/l e posterior quantificação pelo método titulométrico. Entretanto, nos ensaios realizados neste estudo após a troca periódica da solução de NaOH, contida no interior dos potes, foi realizada a quantificação do  $\text{CO}_2$  por meio de leitura de condutividade elétrica (Rodella & Saboya, 1999). Para cada pote foi utilizado um pequeno frasco de polietileno contendo 20 ml de solução de NaOH 0,5 M para a absorção do  $\text{CO}_2$  no interior do pote.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### ISOLAMENTO BACTERIANO

Nas amostras de solo de horta adicionadas dos fungicidas (Chlorotalonil e Mancozeb) ocorreu um crescimento microbiano, verificado visualmente quando adicionadas às doses utilizadas em estudo. Observou-se baixa diversidade quanto a colônias capazes de utilizar os agrotóxicos como fonte de carbono, uma vez que foi isolado apenas um tipo de colônia para cada fungicida em estudo, como podemos ver na Tabela 4.

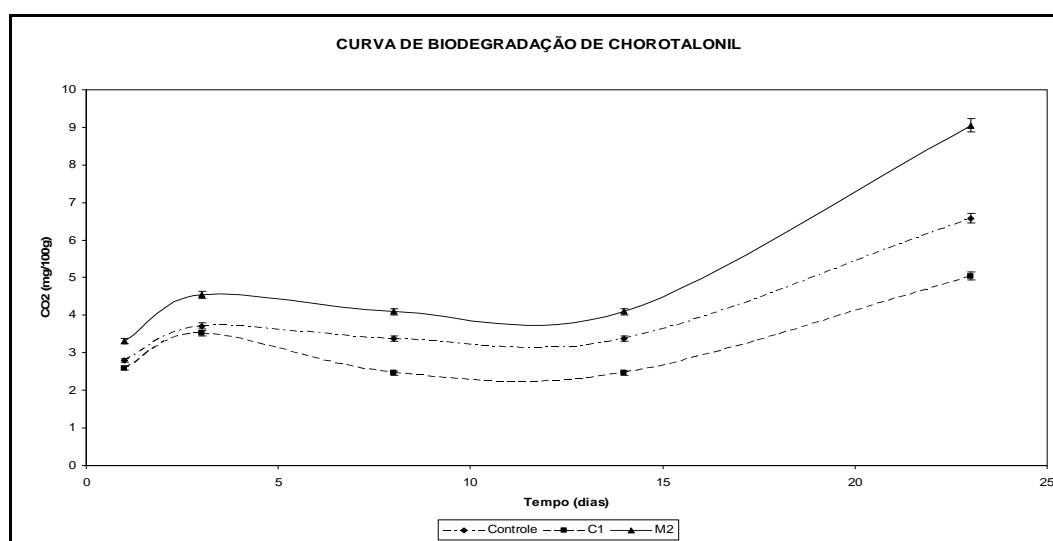
**TABELA 4 – CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS DOS AGROTÓXICOS**

NÚMERO	COMPOSTO ORGÂNICO	CARACTERIZAÇÃO	GRAM
C1	Chlorotalonil	Cinza	-
M2	Mancozeb	Incolor	-

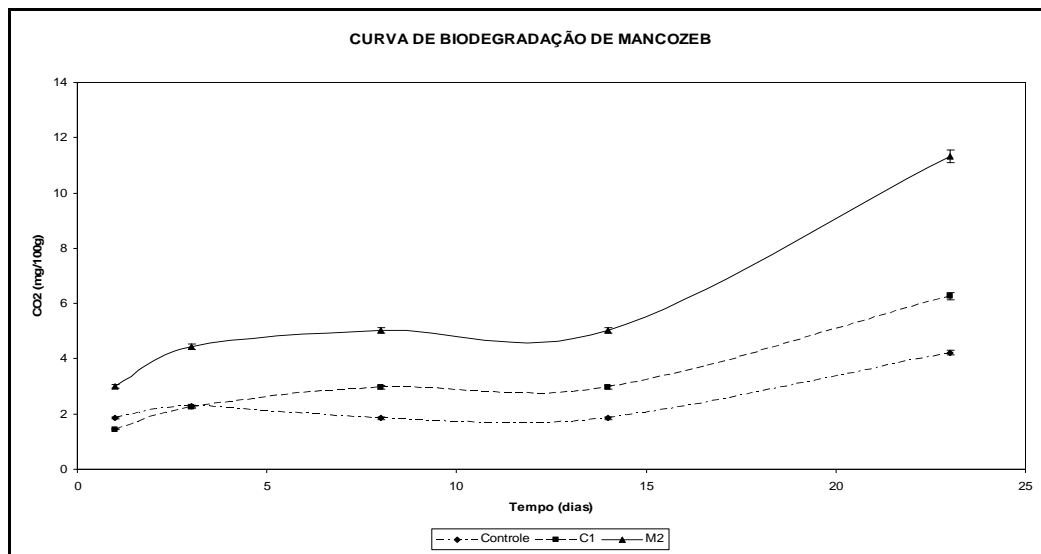
### AValiação DA BIODEGRADABILIDADE AERÓBIA

Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados avaliando a produção acumulada de  $\text{CO}_2$ . O sistema respirométrico montado teve a finalidade de avaliar a degradação dos fungicidas em estudo e a especificidade das cepas isoladas de cada fungicida.

As figuras 2 e 3 mostram as curvas de degradação do Chlorotalonil e Mancozeb respectivamente.



**FIGURA 2: Quantidade de  $\text{CO}_2$  (mg.100<sup>-1</sup> g de substrato + Chlorotalonil) acumulada durante o período de incubação.**



**FIGURA 3: Quantidade de CO<sub>2</sub> (mg.100<sup>-1</sup> g de substrato + Mancozeb) acumulada durante o período de incubação.**

De acordo com a Figura 2 foi obtida no experimento a degradação do Chlorotalonil 9,05 mg CO<sub>2</sub>/100g solo para a cepa M2, 6,58 mg CO<sub>2</sub>/100g de solo para o controle e 5,03 mg CO<sub>2</sub>/100g de solo para cepa C1, o que caracteriza uma baixa degradação deste fungicida no tempo experimentado e mostra que a cepa isolada do Mancozeb não possui especificidade, já que o maior valor de degradação foi obtido pela mesma.

Pela Figura 3 temos que a cepa M2 degradou 11,31 mg CO<sub>2</sub>/100g de solo, a cepa C1 6,27 mg CO<sub>2</sub>/100g de solo e o controle 4,21 mg CO<sub>2</sub>/100g de solo, caracterizando que a degradação foi baixa, mas confirmado a capacidade de degradação da cepa M2, uma vez que a maior taxa de degradação foi obtida por ela.

## CONCLUSÕES

Foram isoladas apenas duas cepas em meio seletivo, o que caracterizar uma baixa diversidade microbiana para os compostos avaliados. A presença de agrotóxicos nas concentrações e condições ensaiadas não apresentou elevada atividade de biodegradação, talvez pelo efeito inibitório desses compostos sobre a microbiota presente ou pela complexidade do composto em estudo. A cepa M2, obtida através do enriquecimento com o fungicida Mancozeb, não apresentou especificidade, uma vez que obteve os melhores valores de degradação tanto para o Mancozeb quanto para o Chlorotalonil, mesmo que relativamente baixas para o período em que foram experimentados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABNT, NBR – 14283 1999. Resíduos em solo – Determinação da Biodegradação pelo método respirométrico, 01-07p.
2. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB). L 6.350 - Solos – Determinação da biodegradação de resíduos – Método Respirométrico de Bartha, 1990.
3. CHERNICHARO, C.A.L. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias - Reatores Anaeróbios. Vol. 5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/UFMG, 1997.
4. BORGES, F. A. T. Biodegradação de Fluidos Base e de Cascalhos Oriundos da Perfuração de Poços de Petróleo e Gás. Vitória: UFES, 2006 (Dissertação de Mestrado).
5. RIBEIRO, M. C., SOARES, M.M.S.R., Microbiologia Prática: Roteiro e Manual – Bactérias e Fungos. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.
6. NEDER, R.N. Microbiologia: manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992.
7. PELCZAR, J. M. Jr., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. 2 ed. São Paulo. Makron Books, 1996.
8. RODELLA, A. A.; SABOYA, L. V. Calibration for conductimetric of carbon dioxide. In: Soil Biology and Biochemistry Journal. USA: Elsevier, 1999, p.2059-2060.