

BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA DA ÁGUA POR MICRORGANISMOS PRESENTES EM BIOFILTROS DE CARVÃO

Miriam Ruiz¹; Heloiza Ferreira Alves do Prado²; William Deodato Isique³ & Alessandro Minillo⁴

RESUMO - Estudos demonstram uma série de riscos associados à presença de pesticidas em mananciais de abastecimento público. O comprovado risco dos pesticidas à saúde humana preconiza o uso de métodos complementares para a sua remoção na água durante seu tratamento em estações de tratamento de água. Entre os métodos utilizados, está o uso de filtros de carvão ativado granular (CAG) como agentes adsorventes. No entanto, a capacidade finita de adsorção do carvão torna necessária a sua substituição periódica no leito filtrante, envolvendo um aumento nos custos do tratamento. Contudo, estudos têm reportado a remoção de pesticidas em filtros de carvão ativado granular quando esses são inoculados com espécies microbianas capazes de biodegradarem, prolongando assim o tempo de uso desses filtros. Considerando estes aspectos, o presente estudo avaliará a biodegradação da atrazina na água, isolando e caracterizando fenotipicamente e geneticamente microrganismos específicos que biodegradam este herbicida, para que futuramente sejam inoculados em filtros de carvão para avaliar a remoção de atrazina em condições de laboratório, representando sua utilização como um método alternativo e/ou complementar em estações de tratamento de água.

ABSTRACT - Studies show a number of risks associated with the presence of pesticides in public water supply. The proven risk of pesticides to human health requires the use of complementary methods for removing the water during its treatment in water treatment plants. Among the methods used, is the use of granular activated carbon filters (GAC) as agent adsorbents. However, the finite capacity for adsorption of coal needed to replace the periodic filter bed, involving an increase in treatment costs. However, studies have reported the removal of pesticides in granular activated carbon filters when they are inoculated with microbial species capable of biodegradation, thus extending the time to use these filters. Considering these aspects, this study will assess the biodegradation of atrazine in water, isolated and characterized phenotypically and genetically specific microorganisms that biodegraded this herbicide for the future are inoculated on charcoal filters to evaluate the removal of atrazine in the laboratory, representing its use as an alternative method and / or complement in water treatment plants.

Palavras-chave: Atrazina, biodegradação, biofiltros de carvão.

- 1) Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira FEIS - UNESP, Campus de Ilha Solteira. E-mail miriam.ruiz@hotmail.com
- 2) Doutora em Ciências Biológicas pelo IBC da UNESP, Campus de Rio Claro – Professora do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira.
- 3) Doutor em Química Analítica pelo Instituto de Química de São Carlos – USP de São Carlos. Técnico de pesquisa vinculado ao Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP.
- 4) Doutor em Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos – (EESC-USP) - Jovem Pesquisador FAPESP vinculado ao Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP. E-mail: alminillo@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O emprego de pesticidas, nas últimas décadas, tem produzido acumulação de resíduos tóxicos em vários ecossistemas em todo o mundo (RISSATO et al., 2004). Apesar do aparente benefício para agricultura, o uso indiscriminado destes agroquímicos tem representado um risco à saúde humana e ambiental (LÓPEZ et al., 2005). Conseqüentemente, uma série de estudos se direcionam a remoção destes compostos em meios aquosos, devido à elevada contaminação das águas superficiais por estes compostos, e principalmente por seus efeitos deletérios ao homem (Smethan et al., 1994; Kouras et al.; 1998).

Dentre os métodos desenvolvidos com intuito de melhorar o padrão da qualidade da água potável, o sistema de biofiltração com filtros de carvão ativado biologicamente representa um método promissor e eficiente às estações de tratamento de água (SERVAIS et al., 1992). A principal característica deste sistema de tratamento de água está na capacidade destes biofiltros em remover compostos biodegradáveis que compreendem a maioria das frações indesejáveis da matéria orgânica (SERVAIS et al., 1992). Os filtros de carvão granular (CAG) representam um bom substrato para o desenvolvimento e fixação de microrganismos sobre sua superfície e no interior de seus poros (SERVAIS et al., 1994).

Numerosos estudos estão sendo realizados sobre a degradação de pesticidas por microrganismos, tanto em cultura pura como em consórcios. Estes estudos têm como objetivo isolar e caracterizar espécies microbianas com elevada capacidade de remover diferentes grupos de pesticidas (organoclorados, organofosforous, insecticidas, s-triazina, herbicidas, fungicidas e diflubenzuron) em amostras de água natural (BEKHI et al., 1993; MOUGIN et al., 1994; KAZT et al., 2001; CLAUSEN et al., 2002; LÓPEZ et al., 2005).

A seleção dos microrganismos com a habilidade de biotransformar ou degradar pesticidas a partir de um ecossistema especial, tem sido um importante campo de investigação nas últimas décadas (GLAZER e NIKAIDO, 1995). Neste contexto, o uso de filtros de carvão inoculados com microrganismos eficazes na biodegradação de pesticidas, poderiam ser utilizados para a remoção destes compostos presentes na água durante o seu tratamento. Desta forma, a presença destes microrganismos, capazes de degradar pesticidas, promoveria um aumentando no tempo de uso destes filtros, representando assim uma otimização operacional do tratamento da água em uma Estação de Tratamento de Água (ETA), e uma minimização dos gastos com a regeneração e/ou troca periódica dos filtros CAG.

OBJETIVO

O presente estudo avaliou a biodegradação do herbicida atrazina na água utilizando microrganismos presentes em filtros biológicos de carvão em condições de laboratório, e caracterizar fenotipicamente os microrganismos que poderiam estar associados a este processo.

MATERIAL E MÉTODO

Ensaio de biodegradação da atrazina em laboratório

Para os ensaios de biodegradação do herbicida atrazina em sistema “batch”, foram utilizados microrganismos presentes nos efluentes de filtros de carvão com atividade biológica (CAB) de uma Instalação Piloto de Tratamento de Água do tipo FIME pertencente ao Laboratório de Saneamento da UNESP, Campus de Ilha Solteira.

Delineamento do experimento

Inicialmente a este experimento, foram recolhidas amostras (250 mL) de efluentes de filtros de carvão com atividade biológica (CAB) da Instalação Piloto de Tratamento de Água em frascos estéreis. A partir deste efluente recolhido, uma sub-amostra (40 mL) foi retirada e utilizada como meio inoculante para os ensaios de biodegradação da atrazina.

Neste ensaio foi utilizada uma água de estudo representada por água destilada, esterilizada (120 °C – 15 min) desprovida de elementos orgânicos, o qual recebeu atrazina com concentração final de 10 µg/L.

Para o ensaio foi realizado em um galão (4 L), ambar, contendo a água de estudo e atrazina acrescido de um inóculo (10% (v/v) do efluente colhido dos filtros CAB), em duplicata. Este experimento é realizado no escuro, com agitação orbital (150 rpm) e temperatura controlada (20 ± 2°C). Para o controle deste ensaio foi utilizado um galão (4 L), ambar, contendo a água de estudo e atrazina, mantido nas mesmas condições apresentadas anteriormente, mas sem receber o inóculo do efluente dos filtros CAB (Figura 1).

Inicialmente no ensaio, foi recolhida uma amostra (100 mL) de cada um dos tratamentos (tempo zero), sendo realizadas coletas consecutivas semanais, para leitura do pH e determinação das concentrações de atrazina. Este ensaio teve a duração de 70 dias.



Figura 1- Tratamentos contendo o meio específico e atrazina, com destaque para galão inoculado com microrganismos (a) e sem inóculo de microrganismos (b).

Procedimento de extração em fase sólida (SPE)

Para a extração do herbicida atrazina das amostras, foi empregada uma técnica de extração em fase sólida (SPE) utilizando-se cartuchos C18 (500mg – 6 mL), previamente condicionados com 10 mL de metanol e 10 mL de água Milli-Q. Após o condicionamento dos cartuchos, um volume de 200 mL de amostras de água, recolhida semanalmente de ambos os galões (Figura 1), é passada de forma contínua sobre os cartuchos. Após o término das amostras, 5 mL de água Milli-Q é acrescentada nos cartuchos. Em seguida estes são secos por um tempo de 30 minutos com passagem contínua de gás N₂. Uma vez secos, os cartuchos são eluídos com 5,0 mL de metanol 100%, e o eluato é armazenado em frasco de vidro a -20°C até o momento das análises.

Análise do herbicida atrazina em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE)

A separação e quantificação da atrazina (Figura 2) presente nas amostras foi sendo realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Japão), equipado com detector "Photodiode Array" (SPD-M20A), duas bombas de alta pressão (LC-20AT e LC-20AD), em coluna de fase reversa C-18 (modelo Shim-pack) com 4,6mm x 250 mm e diâmetro de partícula de 5 µm, segundo Talebpour e Bijanzadeh (2007), com adaptações. A fase móvel foi constituída por metanol e água, sendo a análise realizada em sistema isocrático e o comprimento de onda selecionado foi de 222nm. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e um tempo de corrida de 18 minutos para cada amostra analisada, em triplicata.

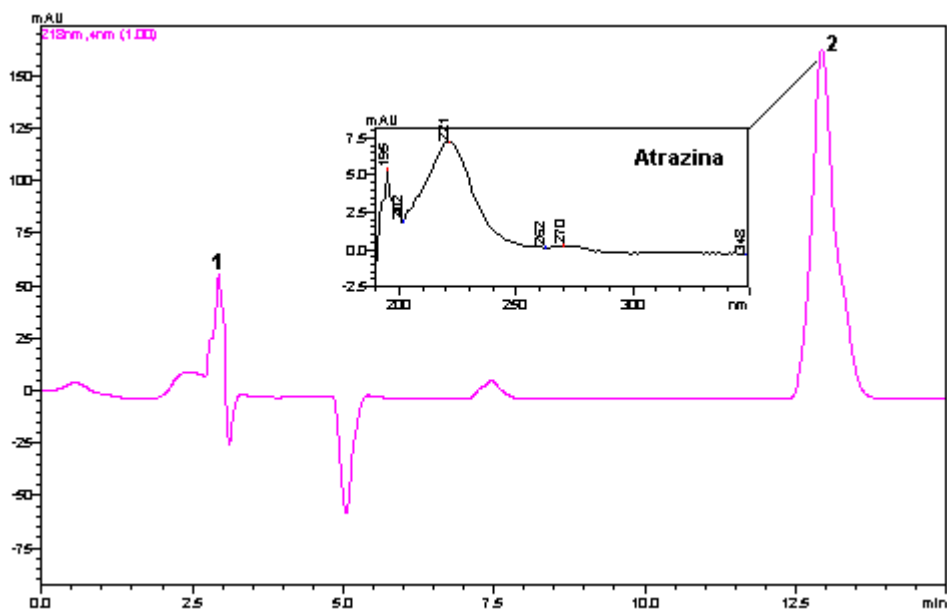


Figura 2. Perfil cromatográfico de Atrazina: 1- Metanol (T.R: 3.01) e 2- Atrazina (T.R: 12.98). Coluna: LC Column Shim-pack C₁₈ (250 mm x 4.6 mm ID, partículas de 5,0 µm), e espectro de absorção do herbicida no comprimento de onda (222 nm).

Isolamento e caracterização das bactérias

Os grupos microbianos desenvolvidos no tratamento testado ao longo do ensaio foram isolados e identificados. Para o isolamento foi utilizado o meio agar, nutriente composto de extrato de carne (3,0 g/L) e peptona (5 g/L) e agar (15 g/L). O volume líquido na superfície do filtro, contendo os microrganismos, foi homogeneizado e 200 µL desse líquido foi transferido para placas de Petri contendo o meio. O líquido foi distribuído com o auxílio de alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 20 °C. As colônias isoladas foram obtidas através de sucessivos plaqueamentos por esgotamento em estrias e logo após foram transferidas para tubos de ensaio contendo agar nutriente inclinado, as quais foram mantidas em refrigeração a 20°C.

Para cada colônia isolada foram observadas características morfológicas como coloração, tamanho e tipo de borda das colônias. Através desse ensaio obtiveram-se as primeiras informações dos possíveis grupos microbianos presentes nos filtros.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Crescimento microbiano e biodegradação de atrazina

Os resultados dos ensaios de biodegradação da atrazina, obtidos revelam uma progressiva degradação deste herbicida sob as condições testadas ao longo do tempo.

De acordo com os resultados, os microrganismos inoculados no tratamento testado promoveram a biodegradação da atrazina (Figura 3). Pode-se constatar que esta remoção ocorreu de

forma eficiente no galão contendo microrganismos, com declínio expressivo nas concentrações do herbicida no tratamento com os microrganismos, especialmente nas primeiras semanas de experimento. Uma explicação para esta alta taxa de degradação observada durante as primeiras semanas poderia está relacionada com o possível crescimento da população de microrganismos e também com o aumento da competição por estes no consumo da atrazina como fonte de alimento, o que promoveu a remoção gradativa do herbicida.

O tratamento controle deste ensaio revelou uma degradação natural da atrazina, pois mesmo após aproximadamente com os 70 dias de estudo, o herbicida apresentou uma porcentagem de remoção ligeiramente pequena (17%) quando comparado com o galão contendo o inóculo de microrganismos (68%).

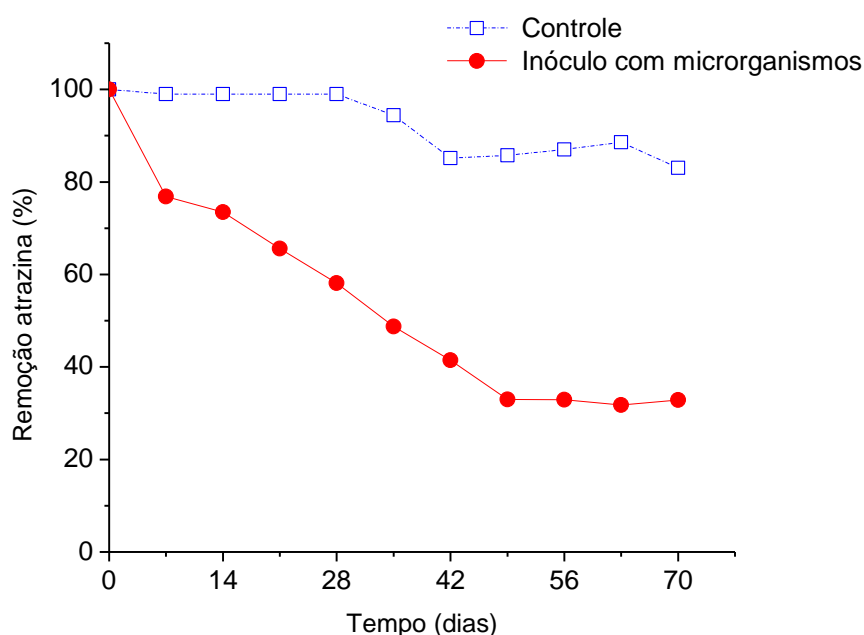


Figura 3. Remoção (%) da atrazina nos tratamento testados durante o estudo.

Valores do pH dos tratamentos testados

Os resultados de pH dos tratamento com e sem microrganismos não apresentaram variações significativas entre seus valores, estando estes com níveis próximos entre si e acima da neutralidade, com valores entre 7,8 e 8,0, respectivamente, determinando um teor levemente básico.

Microrganismos isolados dos ensaios de biodegradação

A partir do material recolhido durante o ensaio de biodegradação do herbicida atrazina, foi possível verificar a presença de 7 formas de colônias bacterianas e apenas 2 colônias de fungos. Estas formas coloniais apresentaram características variadas quanto a cor, tonalidade e arranjo

estrutural entre estas. As características morfológicas entre os microrganismos encontrados estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- Características morfológicas das bactérias e dos fungos responsáveis pela biodegradação do herbicida atrazina nos ensaios realizados.

ISOLADOS	CARACTERÍSTICAS	MICROORGANISMOS
1	Amarela, opaca, borda irregular, ponto central no meio da coluna.	Bactéria
2	Branca, cremosa, borda lisa brilhante, ponto central no meio da coluna.	Bactéria
3	Creme, brilhante, borda lisa, ponto central no meio da coluna.	Bactéria
4	Branca, rugosa, borda irregular, opaca.	Bactéria
5	Filamento branco.	Fungo
6	Filamento branco.	Fungo
7	Laranja, brilhante, borda lisa.	Bactéria
8	Amarela, brilhante, borda lisa.	Bactéria
9	Verde, borda lisa.	Bactéria

As análises referentes à identificação desses microrganismos de espécies bacterianas, responsáveis pela biodegradação da atrazina, estão sendo realizadas por técnicas de amplificação por PCR da região 16S rDNA e seqüenciamento. Até o presente momento, estes encontram-se em análise das composições filogenéticas.

Com relação aos fungos encontrados em menor quantidade no tratamento podem ter sido resultados da contaminação nas placas durante o isolamento dos microrganismos, visto que em novo plaqueamento realizado como mesmo material utilizado anteriormente, estes não se fizeram presentes, comprovando a inexistência desses fungos. Dessa forma, estes não foram identificados.

CONCLUSÃO

Houve a biodegradação da atrazina nos tratamentos contendo microrganismos;

Foi possível verificar que atrazina representou uma fonte de alimento para os microrganismos presentes no meio;

O tratamento controle apresentou uma degradação natural da atrazina, que embora em menor escala, deve ser considerado no balanço total de remoção do herbicida.

Em relação aos grupos fenotípicos presentes no meio, foram encontradas colônias de bactérias no ensaio, em sua maioria bactérias com colorações variando entre branca, verde, amarela e alaranjada;

Novos estudos são necessários a esta proposta, principalmente na caracterização genética das espécies e consórcios de bactérias associadas na biodegradação de herbicidas que possam estar presentes nos mananciais de abastecimento público;

O uso de linhagens específicas de microrganismos capazes de metabolizarem eficientemente estes herbicidas podem, futuramente, representar uma proposta promissora para a ativação biológica no leito de filtros de carvão. Este aprimoramento tecnológico direcionado pode vir a aumentar a eficiência na remoção destes compostos de difícil eliminação durante o tratamento de água.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP (processo: 2008/58927-4) pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do projeto de Iniciação Científica.

BIBLIOGRAFIA

BEKHI, R.M.; TOPP, E.; WARREN, D. & GERMON, P. (1993). “*Metabolism of the herbicide atrazine by Rhodococcus strain*”. Appl. Environ. Microb, 59, pp. 1955–1959.

CLAUSEN, G.B.; LARSEN, L.; JOHNSEN, K.; DE LIPTHAY, J.R. & AAMAND, J. (2002). “*Quantification of the atrazine-degrading Pseudomonas sp. strain ADP in aquifer sediment by quantitative competitive polymerase chain reaction*”. FEMS Microbiol. Ecol., 41, pp. 221–229.

GLAZER, A.N. AND NIKAIDO, H. (1995). “*Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*”. Freeman, New York.

KAZT, I., DOSORETZ, C.G., MANDELBAUM, R.T. AND GREEN, M. (2001). “*Atrazine degradation under denitrifying conditions in continuous culture of Pseudomonas ADP*”. Water Res.,13, pp 3272–5.

KOURAS A.; ZOUBOULIS, A. I.; SAMARA, C.; KOUIMTZIS, T. H. (1998). “*Removal of pesticides from surface waters by combined physicochemical processes*”. Part II: Lindane. *Environmental Pollution*, 103 (2-3), pp. 193-202.

LÓPEZ, L.; POZO, C.; RODELAS, B.; CALVO, C.; JUÁREZ, B.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; & GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. (2005). “*Identification of Bacteria Isolated from an Oligotrophic Lake*”. *Ecotoxicology*, 14, pp. 299–312.

MOUGIN, C.; LAUGERO, C.; ASTHER, M.; DUBROCA, J.; FRASSE, P. & ASTHER, M. (1994). “*Biotransformation of the herbicide atrazine by the white root fungus Phanerochaete chrysosporium*”. *Appl. Environ. Microb.*, 60, pp. 705–708.

RISSATO, S.R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS G.P.; GERENUTTI, M. (2004). “*Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de bauru (SP)*”. *Química Nova, Bauru*, 27, 5, pp. 739-743.

SERVAIS, P.; BILLEN, G. & BOUILLOT, P. (1994). “*Biological colonization of granular activated carbon filters in drinking-water treatment*”. *J. Environ. Eng.* 120, 4, pp. 888–899.

SERVAIS, P.; BILLEN, G.; BOUILLOT, P & BENEZET, M. (1992). “*A pilot study of biological GAC filtration in drinking water treatment*”. *Aqua*, 41, 3, pp. 163–168.

SMETHAN, N.; IRWIN, R.; BLACK, K. & ALAN, S. (1994). “*Drinking safety*”, in *Chemical Processing Technology International*. London, England, pp. 208-219.

TALEBPOUR, Z. & BIJANZADEH, H.R. (2007). “*A selective ¹⁹F NMR spectroscopic method for determination of insecticide diflubenzuron in different media*”. *Food Chemistry*, 105, pp.1682-1687.