

BIORREMEDIÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Utilizando bactérias
gram-positivas

Docente: Maria Bernadete Amancio Varesche

Gabriela Ferreira Coelho
Isabela Barbieri Bombarda
Julia Graziosi Ortiz
Olavo Barato Baraldi

nº USP 11797827
nº USP11797744
nº USP11797810
nº USP11797751

O QUE SÃO OS HERBICIDAS?

Herbicidas são substâncias químicas aplicadas na agricultura utilizadas para o controle de plantas daninhas.



Fonte: Revista Agricola - plantação de soja com erva daninha.



Fonte: Eprodutor - plantação de soja.

Herbicidas



Vantagens

- Reduzir perdas na produção
- Otimizar colheita
- Evitar aumento da infestação



Desvantagens

- Toxicidade
- Contaminação de culturas vizinhas
- Contaminação do solo

- Sintetizado na década de 40.
- Foi um dos componentes do "agente laranja", utilizado na guerra do Vietnã.
- Atualmente: extensamente utilizado.
- No Brasil, sua maior aplicação se dá na cultura de soja.

O HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

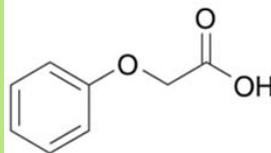


Foto: Ministério da Agricultura

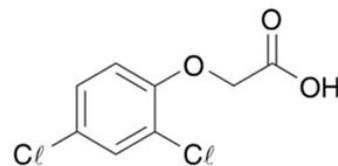


SOBRE

- Nome usual : 2,4-D
- Grupo químico: fenoxiacéticos.
- Classe: herbicidas hormonais (mimetizador de auxina).
- Altamente seletivo : controle de plantas daninhas dicotiledôneas em culturas de arroz, soja, milho, cana de açúcar, pastagens, entre outras.
- Tipos de formulações: ácido, éster e amina.
- Tempo de meia vida no solo: por volta de 6 a 10 dias.
- Profundidade atingida: de 30 a 60 cm no solo.



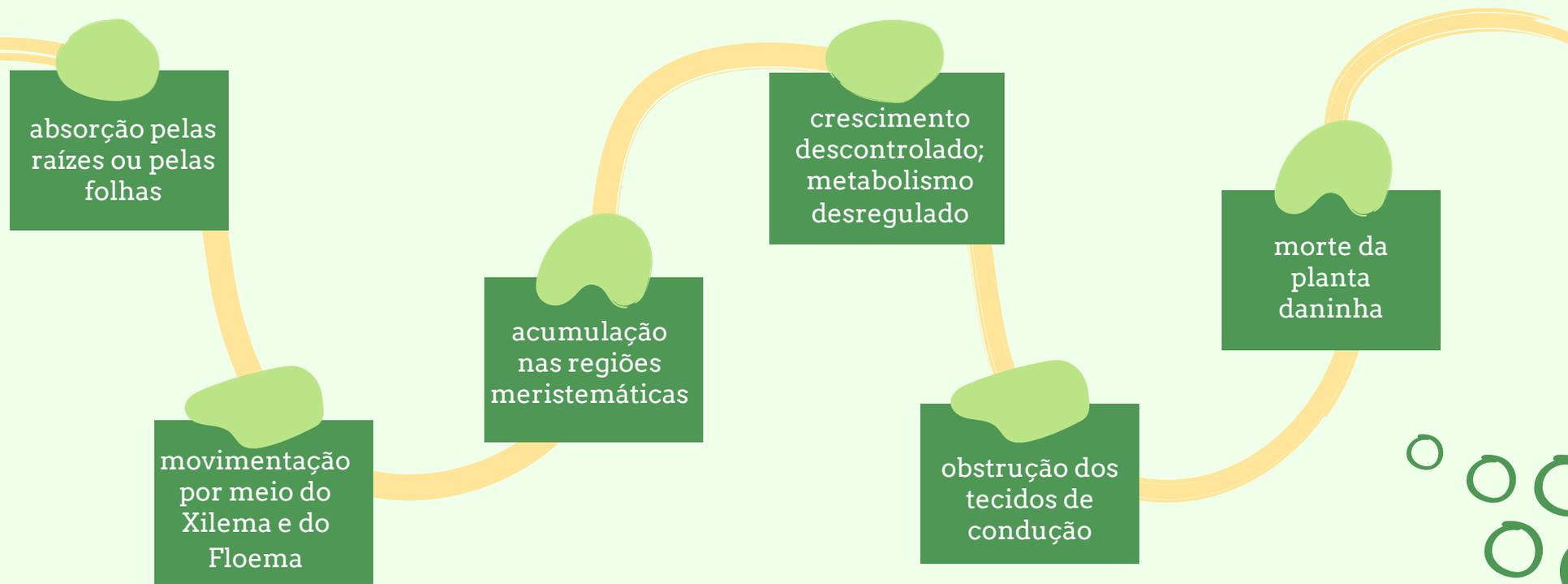
Ácido fenoxiacético



2,4-D



MODO DE AÇÃO





ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Nas plantas

- Enrolamento do caule.
- Calos no caule.
- Folhas enrugadas.
- Diminuição do sistema radicular.
- Pecíolos retorcidos.



Jonas Janner Mamann [outubro/2016]

Fonte: Instituto Brasileiro de Pecanicultura

Nos seres humanos

- Irritabilidade ocular.
- Irritabilidade dérmica.

Classificação toxicológica

CLASSE	DL 50 ORAL (mg / kg)		DL 50 DERMAL (mg / kg)		OLHOS	PELE	CL 50 INALATÓRIA (mg / L) 1 HORA EXPOSIÇÃO
	SÓLIDO	LÍQUIDO	SÓLIDO	LÍQUIDO			
I	< 5	< 20	< 10	< 40	OPACIDADE DA CórNEA, REVERSÍVEL OU NÃO EM 07 DIAS, IRRITAÇÃO PERSISTENTE	CORROSIVO	< 0,2
II	5 - 50	20 - 200	10 - 100	40 - 400	SEM OPACIDADE DA CórNEA, IRRITAÇÃO REVERSÍVEL EM 07 DIAS	IRRITAÇÃO SEVERA	0,2 - 2,0
III	50 - 500	200 - 2000	100 - 1000	400 - 4000	SEM OPACIDADE DA CórNEA, IRRITAÇÃO REVERSÍVEL EM 72 HORAS	IRRITAÇÃO MODERADA	2,0 - 20
IV	> 500	> 2000	> 1000	> 4000	SEM OPACIDADE DA CórNEA, IRRITAÇÃO REVERSÍVEL EM 24 HORAS	IRRITAÇÃO LEVE	> 20

Fonte: http://www.iniciativa24d.com.br/media/upload/Boletim_Tecnico_2.4D.pdf

LEGENDA

- I - Extremamente Tóxicos (faixa vermelha)
- II - Altamente Tóxicos (faixa amarela)
- III - Medianamente Tóxicos (faixa azul)
- IV - Pouco Tóxicos (faixa verde)



Classificado como classe 1.

Tabela comparativa

Substância química	DL 50 mg i.a./kg P.V.
Álcool etílico (bebidas alcoólicas)	10.000
Cloreto de sódio (sal de cozinha)	4.000
Aspirina (remédio)	1.000
2,4-D ácido	699
Cafeína	192
Nicotina (cigarro)	1
Toxina botulínica (contaminante alimentar)	0,00001

Fonte: http://www.iniciativa24d.com.br/media/upload/Boletim_Tecnico_2.4D.pdf

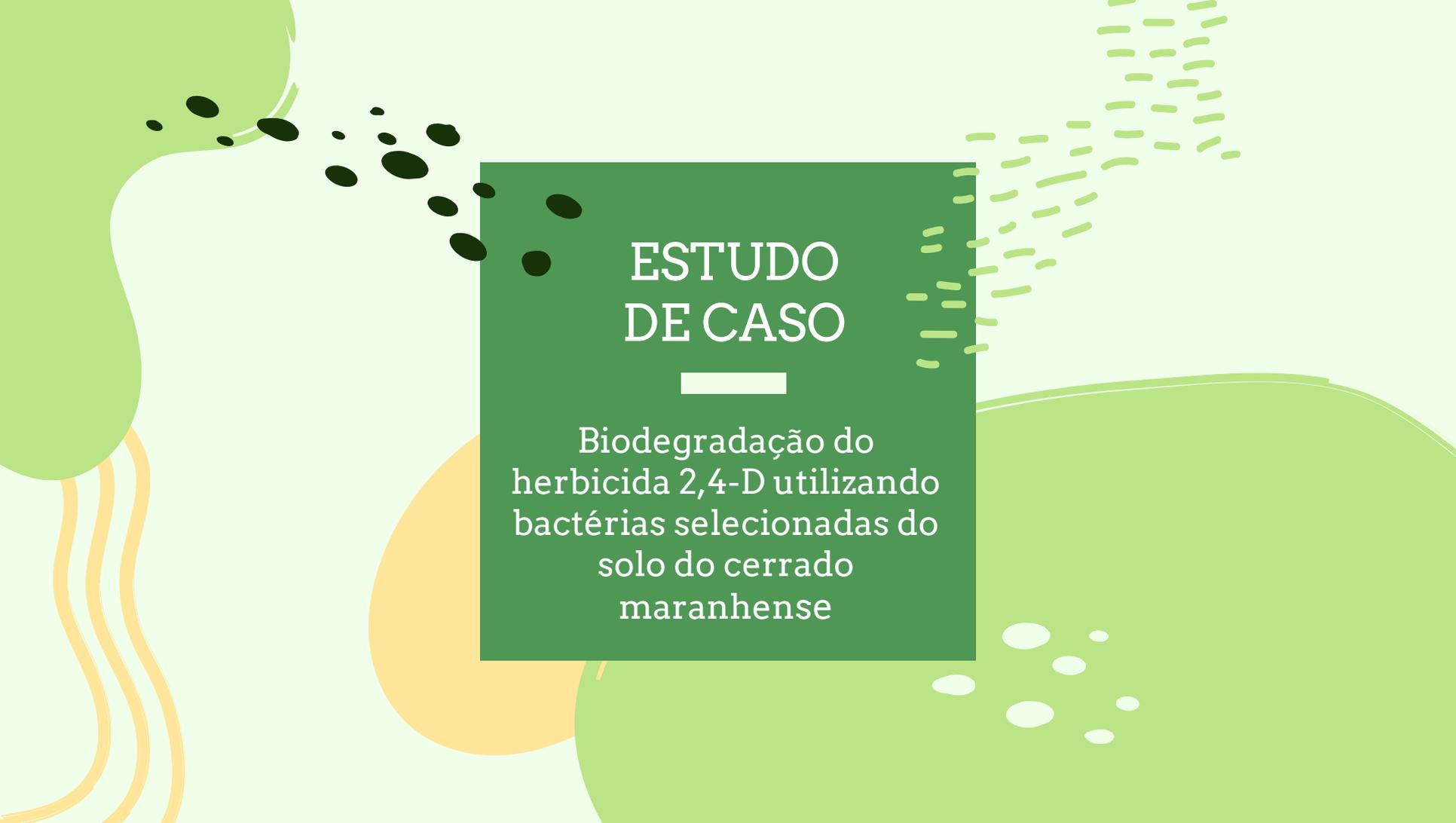
Regras de aplicação

Intervalos de reentrada indicados após a aplicação de produtos à base de 2,4-D			
Aplicação costal ou tratorizada			
Culturas	Tempo da Atividade	Medidas necessárias	Intervalo de reentrada
Milho e Soja	2h	Vestimenta simples	-
	8h	Vestimenta simples	18 dias
Pastagem	2h	Vestimenta simples	5 dias
	8h	Vestimenta simples	23 dias

Fonte: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/4340788/Nota+T%C3%A9cnica+Final+2-4D.pdf/a0ef4bb6-db71-42ae-9174-2fa7e2c9b95f>

Biorremediação

- Técnica que faz uso de organismos vivos para remediar (remover) poluentes no ambiente.
- *Ex-situ X In-situ*
- Para que ocorra a biodegradação é necessário que uma população de microorganismos seja capaz de utilizar o composto como fonte de carbono e energia.



ESTUDO DE CASO

Biodegradação do
herbicida 2,4-D utilizando
bactérias selecionadas do
solo do cerrado
maranhense

O ESTUDO FOI FEITO EM 3 ETAPAS:

1.

Seleção das
bactérias aptas à
degradação do
herbicida

2.

Crescimento das
linhagens em
meio de cultura
líquido

3.

Biodegradação do
herbicida 2,4-D

1. SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS

- As bactérias foram retiradas de amostras do solo de cultivo de feijão e mandioca;
- Foram isoladas em meio mineral J.E. sólido e em meio mineral M9 sólido, suplementados com 2,4-D.

Composição J.E. : $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,5 \text{ g}$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,5 \text{ g}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0,5 \text{ g}$; $\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = 10 \text{ mg}$; $\text{CaCl}_2 = 10 \text{ mg}$; $\text{MnCl}_2 = 0,1 \text{ mg}$; $\text{ZnSO}_4 = 0,01 \text{ mg}$; ágar = 15,0 g por litro de água destilada + 2,4-D ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Composição M9 : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 6,0 \text{ g}$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 3,0 \text{ g}$; $\text{NaCl} = 0,5 \text{ g}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} 0,1\text{M} = 10 \text{ mL}$; $\text{CaCl}_2 1\text{M} = 10 \text{ mL}$; ágar = 15,0 g por litro + 2,4-D ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$).

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE LINHAGENS BACTERIANAS EM MEIO J.E. SÓLIDO, SUPLEMENTADO COM 2,4-D NA CONCENTRAÇÃO DE 20 µg mL⁻¹, APÓS 96 HORAS DE INCUBAÇÃO

LINHAGENS	CRESCIMENTO MICROBIANO	LINHAGENS	CRESCIMENTO MICROBIANO
F1	--	M1	--
F2	+	M2	--
F3	- +	M3	- +
F4	- +	M4	+
F5	++	M5	++
F6	+	M6	++
F7	++	M7	+
F8	+	M8	+
F9	- +	M9	+

-- Pouco crescimento; -+ Crescimento razoável; + Crescimento satisfatório; ++ Ótimo crescimento.

TABELA 2 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE LINHAGENS BACTERIANAS EM MEIO MINERAL M9 SÓLIDO, SUPLEMENTADO COM 2,4-D NA CONCENTRAÇÃO DE 20 µg mL⁻¹, APÓS 168 HORAS DE INCUBAÇÃO

LINHAGENS	CRESCIMENTO MICROBIANO	LINHAGENS	CRESCIMENTO MICROBIANO
F1	- +	M1	--
F2	+	M2	- +
F3	- +	M3	--
F4	- +	M4	+
F5	++	M5	++
F6	- +	M6	++
F7	++	M7	++
F8	+	M8	+
F9	- +	M9	+

-- Pouco crescimento; -+ Crescimento razoável; + Crescimento satisfatório; ++ Ótimo crescimento.

2.1. CRESCIMENTO DE LINHAGENS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO

- As linhagens com ótimo crescimento utilizando o 2,4-D como fonte de carbono foram selecionadas e submetidas ao teste em meio de cultura líquido LB;

Composição LB: triptona=10 g; extrato de levedura=5 g; NaCl=5 g por litro, em tubos de 10 ml.

- Depois, 100 μ L de cada linhagem foram inoculados em meio mineral J.E. + 2,4-D
- Posteriormente, 1mL do inóculo de cada bactéria foi adicionado em 100mL de meio mineral J.E. + 2,4-D

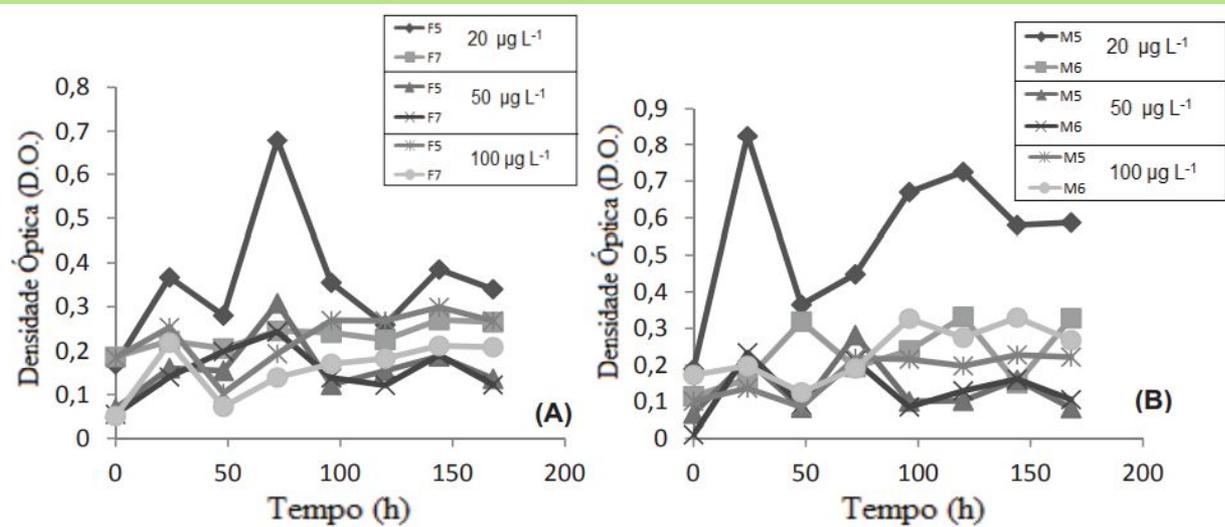


FIGURA 1 - CRESCIMENTO DAS LINHAGENS MICROBIANAS ISOLADAS DE SOLOS COM CULTIVO DE FEIJÃO (A) E MANDIOCA (B) EM MEIO MINERAL J. E. SUPLEMENTADO COM O HERBICIDA 2,4-D EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (20, 50 e 100 µg L⁻¹)

2.2. UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

- As linhagens foram utilizadas para verificar a influência da fonte de carbono e nitrogênio no crescimento bacteriano em 2 situações:
 - I. Meio mineral J.E. + 2,4-D (20,50 e 100 μ g/mL) + glicose (0,5%);
 - II. Meio mineral J.E. + NH_4NO_3 + 2,4-D (20,50 e 100 μ g/mL) + glicose (0,5%)

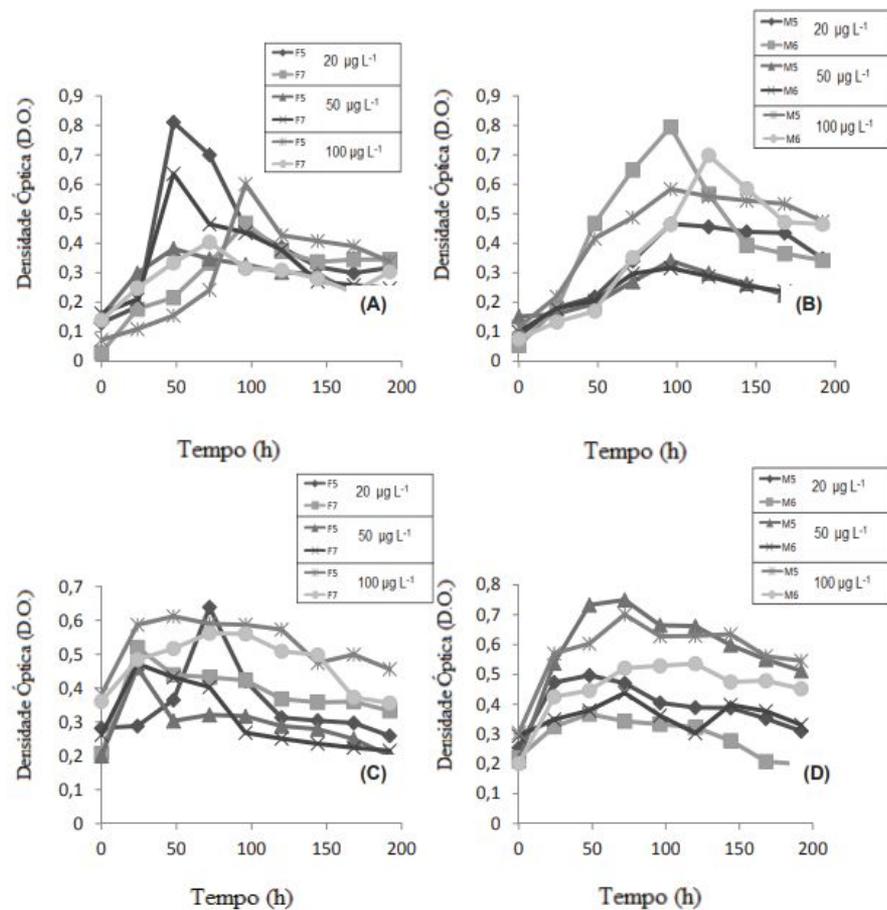


FIGURA 2 - CRESCIMENTO DAS LINHAGENS MICROBIANAS ISOLADAS DE SOLOS COM CULTIVO DE FEIJÃO (A, C) E MANDIOCA (B, D) EM MEIO MINERAL J. E. COM O HERBICIDA 2,4 D (A E B = SUPLEMENTADO COM GLICOSE; C E D = SUPLEMENTADO COM GLICOSE E NITRÓGENO)

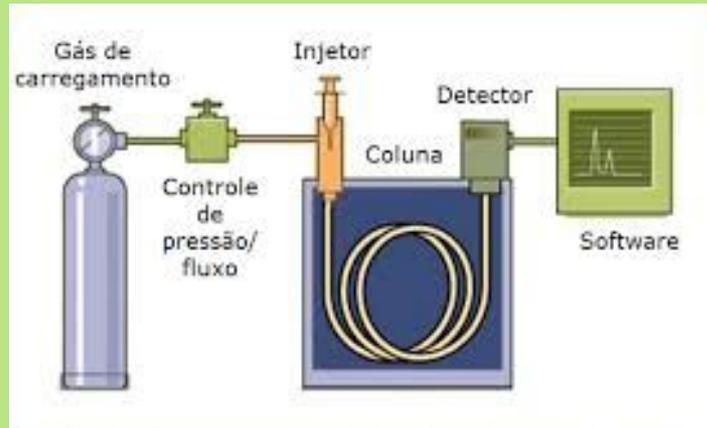
3. BIODEGRADAÇÃO DO 2,4-D EM LABORATÓRIO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS SELECIONADAS

- Realizou-se a análise do herbicida empregando cromatógrafo a gás;
- As bactérias foram identificadas pelo método de coloração de Gram de Hucker.



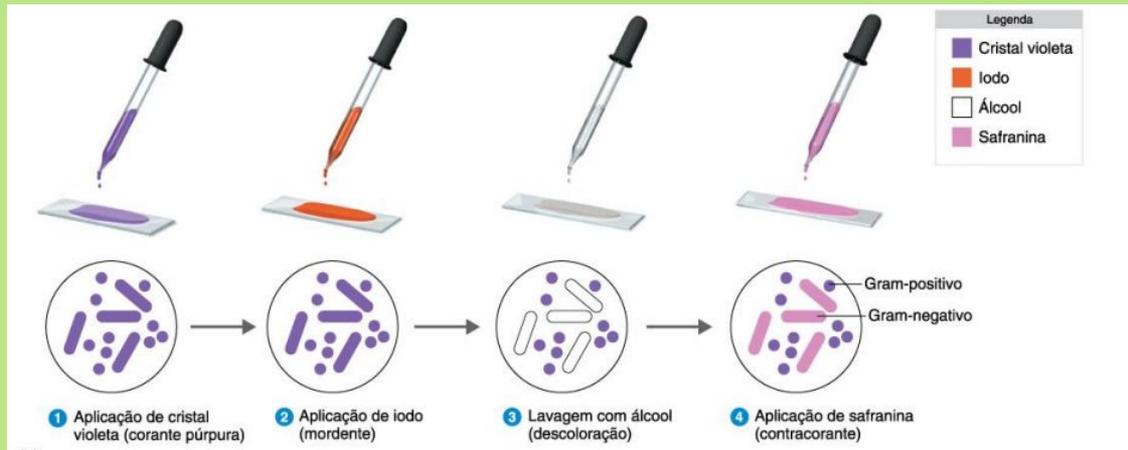
CROMATOGRAFIA A GÁS

- Sistema pneumático;
- Sistema de injeção;
- Coluna cromatógrafa;
- Sistema de detecção.



Fonte: <https://www.dctech.com.br/entendendo-um-sistema-de-cromatografia-gasos-a-ca/>

COLORAÇÃO DE GRAM DE HUCKER



Fonte: <https://www.biomedicinatotal.com.br/2015/04/coloracao-de-gram.html>

O método de coloração de Gram classifica as bactérias em gram-positivas e gram-negativas. A diferença entre elas está relacionada às propriedades físico-químicas das paredes celulares.

As bactérias que biodegradaram o herbicida foram classificadas como gram-positivas, devido a sua coloração violeta vista nas imagens a seguir:

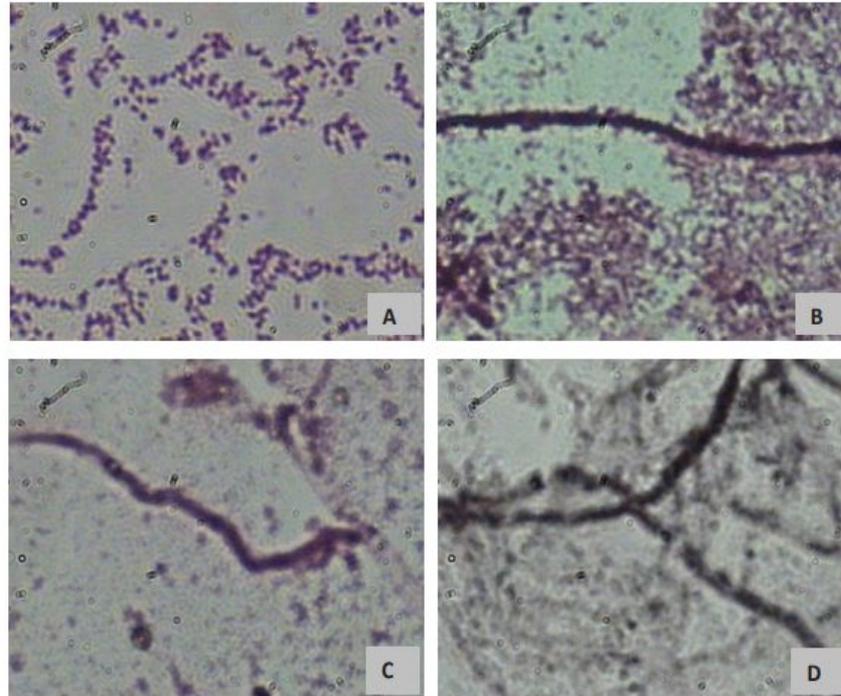


FIGURA 3 - CLASSIFICAÇÃO DAS LINHAGENS MICROBIANAS PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM: (A) F5, (B) F7, (C) M5 e (D) M6

RESULTADOS DA BIODEGRADAÇÃO APÓS 96 HORAS DE INOCULAÇÃO

	% DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA	
LINHAGENS MICROBIANAS	2,4-D	2,4 DCF
F5	85	< Limite de Detecção
F7	92	< Limite de Detecção
M5	81	< Limite de Detecção
M6	86	< Limite de Detecção

CONCLUSÃO

- As linhagens F5, F7, M5 e M6 apresentaram melhor crescimento nos meios de cultura sólidos na presença de 2,4-D;
- O crescimento foi favorecido com adição de fontes de carbono e nitrogênio;
- "Todas as linhagens apresentaram biodegradação do 2,4-D acima de 80%";
- Apresentam grande potencial para biorremediar solos contaminados pelo 2,4-D.

Referências

- [http://www.pppg.ufma.br/cadernosdepesquisa/uploads/files/Artigo%206\(14\).pdf](http://www.pppg.ufma.br/cadernosdepesquisa/uploads/files/Artigo%206(14).pdf)
- <https://www.embrapa.br/documents/1355291/12492345/Como+funcionam+os+herbicidas/954b0416-031d-4764-a703-14d9b28b178e?version=1.0>
- http://www.iniciativa24d.com.br/media/upload/Boletim_Tecnico_2,4D.pdf
- <https://www.agrolink.com.br/downloads/2,4-D.pdf>
- <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/39011/23773>
- <https://www.embrapa.br/tema-plantas-daninhas/sobre-o-tema>
- http://www.ufjf.br/fisiologiavegetal/files/2018/07/7_5-Atividade-Herbicida-24-D.pdf



OBRIGADO

PERGUNTAS?

