

BIORREMEDIAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

Seminário de Biologia

Felipe Eiki Taromaru - 11797869

Leonardo Matias de Oliveira Filho - 4822898

Renan Perin de Souza - 11894579

Thiago Lima da Cunha - 11797831





01

INTRODUÇÃO

Contextualização e Pesticidas,
Biorremediação

02

MICROORGANISMOS

Principais Biorremediadores e
a Ascídia *Didemnum ligulum*

03

ESTUDO DE
CASO

Biorremediação do
Pentaclorofenol (PCP)

04

CONCLUSÃO

Conclusão e Resultados do
Estudo de Caso

01



Introdução

Apresentação sobre os Pesticidas Organoclorados, citação de dois exemplos e Biorremediação



Empregados pela indústria desde a década de quarenta do século XX.



Persistentes, permanecem ativos no meio ambiente.



Não diluem em água.



Capazes de mutação em tecidos orgânicos.



Pesquisa e desenvolvimento nessa área cresceu.



Com grandes aprimoramentos os mesmos passaram a ser resistentes à degradação química e biológica.

PESTICIDAS ORGANOCLORADADOS



DANOS À SAÚDE

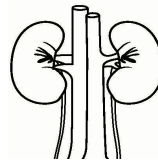
Sistema Nervoso Central.



Sistema de defesa do Organismo.



Lesões hepáticas, renais e cerebrais.



Câncer em órgãos do aparelho digestivo,
pulmão e rim.



Afeta negativamente o sistema reprodutivo.



PRESENÇA DOS PESTICIDAS



Atingem os solo de pela incorporação direta, e também através de tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas.

SOLO



Segundo estudos 25% da produção mundial destes pesticidas chega a este ecossistema. Observando concentrações alarmantes de DDT e Aldrin

MAR



Um teste feito em 2016 revelou que 14% das amostras de alimentos escolhidas possuíam níveis acima dos recomendados pela ANVISA, no Brasil.

ALIMENTOS

EXEMPLOS DE PESTICIDAS



DDD

(DICLORODIFENILDICLOROETANO)

É um **metabólito** do DDT, está no **Grupo B2** na classificação de agentes cancerígenos.

Persiste muito ao tempo, portanto o mesmo não é mais registrado para uso agrícola.



DIELDRIN

Desenvolvido na década de 1940, considerado um pesticida muito eficaz.

Poluente orgânico extremamente persistente com difícil decomposição.

A partir de 1970, sua venda foi restrita, tendo sua última utilização sendo registrada em 1984.

BIORREMEDIAÇÃO

- Contaminantes de uma matriz ambiental:



SOLO

OU



ÁGUA

- Ocorre naturalmente pela ação de bactérias, fungos e plantas.



REMEDIAÇÃO



DEGRADAÇÃO



TRANSFORMAÇÃO



REMOÇÃO



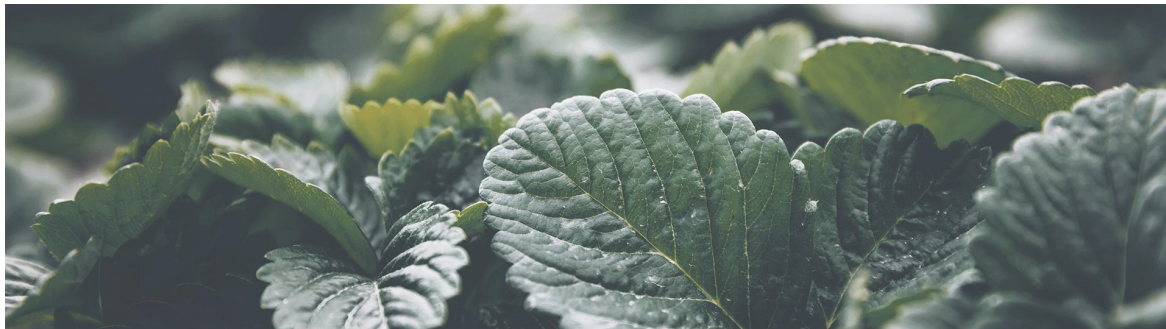
- Combinação de métodos químicos e biológicos.



- Monitoração da área contaminada.



02



Microorganismos

Principais Biorremediadores e a Ascídia

Didemnum ligulum

BIORREMEIADORES



FUNGOS

Basidiomicetos (De podridão branca)

- Resilientes
- Colonizadores
- Degradadores de Lignina

PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

Organização em filamentos

Oxidação

Formato bacilar



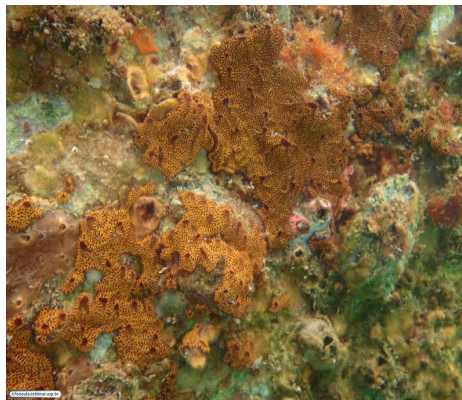
BACTÉRIAS

Actinomicetos

Agrobactérias

Pseudomonas

Corynebacterium

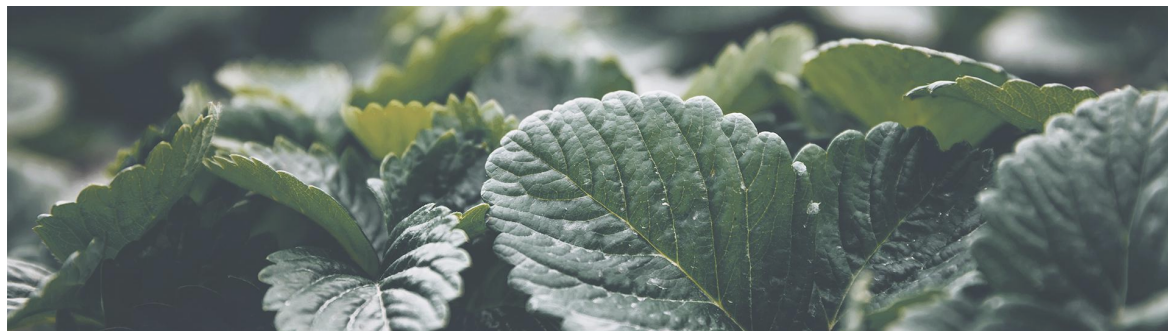


O Ascídia *Didemnum ligulum*

- Ambiente Marinho-tropical
- Colônias
- Filtradores
- Resiliência
- Tratamento de efluentes



03



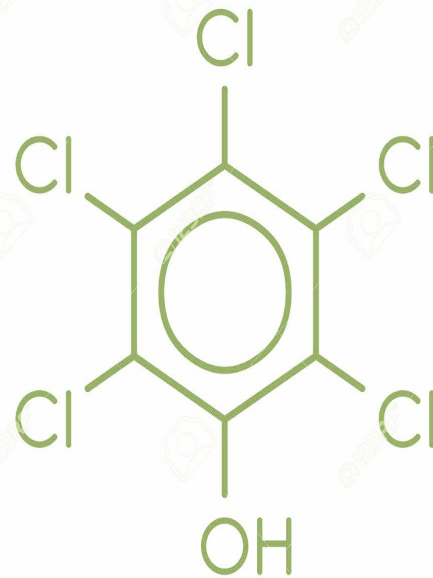
Estudo de Caso

BIODEGRADAÇÃO DO PESTICIDA PENTACLOROFENOL (PCP)
PELO FUNGO MARINHO ASCÍDIA *DIDEMNUN IIGULUM* por
BRUNA VACONDIO

- Pesticida Organoclorado de alto nível de toxicidade;
- Pode ser encontrado em águas superficiais e subterrâneas, adsorvido em solo ou no ar;
- Bioacumulação;
- Usado principalmente como herbicida e preservante de madeira;



PENTACLOROFENOL (PCP)



pentachlorophenol

DANOS A SAÚDE



- A contaminação do pesticida é mais significativa ao contato dérmico;
- Baixa Exposição:
 - Irritação no trato respiratório, garganta e olhos, produzindo sensação de queimação e lacrimejamento;
- Alta Exposição:
 - Febre alta, fraqueza, alterações respiratórias, da pressão sanguínea e do débito urinário, convulsão e colapso.

PENTACLOROFENOL (PCP)

Padrões e valores orientadores

Meio	Concentração	Comentário	Referência
Solo	0,16 mg/kg*	Valor de Prevenção	CONAMA 420/2009
	0,35 mg/kg*	VI cenário agrícola-APMax	
	1,3 mg/kg*	VI cenário residencial	
	3 mg/kg*	VI cenário industrial	
Solo	0,01 mg/kg*	Valor de Prevenção	Valores orientadores para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo- CETESB-DD 256/2016/E
	0,07 mg/kg*	VI cenário agrícola	
	0,6 mg/kg*	VI cenário residencial	
	1,9 mg/kg*	VI cenário industrial	

Meio	Concentração	Comentário	Referência
Água potável	9 µg/L	Padrão de potabilidade	Portaria 2914/2011
Água subterrânea	9 µg/L	VMP (consumo humano)	CONAMA 396/2008
	10 µg/L	VMP (recreação)	
Água subterrânea	9 µg/L	VI	Valores orientadores para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo- CETESB-DD 256/2016/E
Águas doces	0,009 µg/L	VM (classes 1 e 2)	CONAMA 357/2005
	3 µg/L	VM pesca/cultivo de organismos (classe 1)	
Águas salinas	0,009µg/L	VM (classe 3)	CONAMA 357/2005
	7,9 µg/L	VM (classe 1)	
	3 µg/L	VM pesca/cultivo de organismos (classe 1)	
Águas salobras	13 µg/L	VM (classe 2)	CONAMA 357/2005
	7,9 µg/L	VM (classe 1)	
Águas salobras	3 µg/L	VM pesca/cultivo de organismos (classe 1)	CONAMA 357/2005
	13 µg/L	VM (classe 2)	

* = peso seco ; APMax = Área de Proteção Máxima; VI = Valor de Investigação (CONAMA)/ Valor de intervenção (CETESB); VMP = Valor Máximo Permitido; VM = Valor Máximo.

MÉTODOS

- 15 linhagens diferentes da ascídia coletadas da região de São Sebastião- Litoral de São Paulo;
- Fragmentos do fungo esterilizados e colocados em placas de Petri;
- Placas incubadas durante 7 dias à temperatura de 25°C;
- 2 etapas:
 - Análise da biodegradação do pesticida.



PLACAS DE PETRI

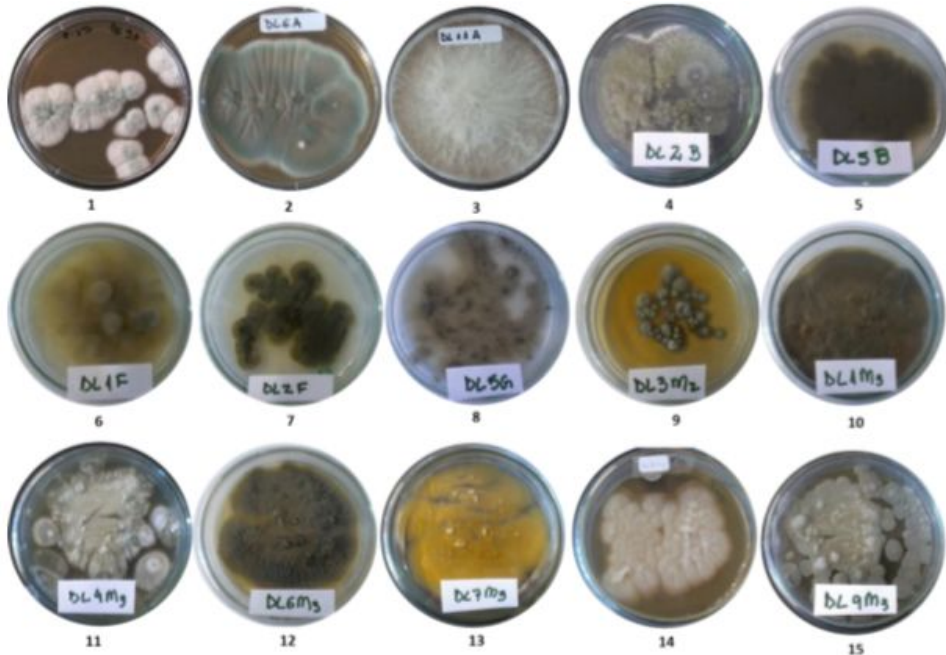


Figura 16: Linhagens puras isoladas da ascidia *Didemnum Ligulum*: 1- DL5A; 2- DL6A; 3- DL11A; 4- DL2B; 5- DL5B; 6- DL1F; 7- DL2F; 8- DL5G; 9- DL3M2; 10- DL1M3; 11- DL4M3; 12- DL6M3; 13- DL7M3; 14- DL8M3; 15- DL9M3 (elaborado pelo autor).

MEIO DE CULTURA SÓLIDO

- pH 8.
- Meio de Cultura Sólido de Malte 3% em água do mar artificial.
- Malte 3% - extrato de Malte (30,0 g/L), peptona de farinha de soja (3,0 g/L), e ágar bacteriológico (20 g/L).
- Solução de Estoque - PCP como soluto e seu solvente, o acetato de etila na proporção 5 mg de PCP/ 100 μ L.
- Placas sem o PCP e com o PCP nas concentrações de 10, 25, 30, 40 e 50 mg/mL.
- Incubadas e vista em um período de 21 dias, sendo de 7 em 7 dias feito a medição do diâmetro da colônia formada.

Tabela 4: Crescimento médio^b das linhagens de fungos marinhos em 7 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 7 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	30 mgL ⁻¹	40 mgL ⁻¹	50 mgL ⁻¹
DL6A	5,1	1,8	0,7	0	0	0
DL5A	3,1	1,6	1,0	0,1	0	0
DL11A	6,6	2,2	0,8	0,7	0	0
DL2B	7,8	4,1	3,0	1,8	0,7	0,9

^bDesvio padrão mínimo de 0,07 e máximo de 0,4

Tabela 5: Crescimento médio^c das linhagens de fungos marinhos em 14 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 14 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	30 mgL ⁻¹	40 mgL ⁻¹	50 mgL ⁻¹
DL6A	6,7	3,6	1,7	0,1	0	0
DL5A	4,8	3,0	1,6	0,3	0	0
DL11A	8,0	4,9	1,8	1,6	0	0
DL2B	8,0	6,6	5,9	2,7	1,4	2,1

^cDesvio padrão mínimo de 0 e máximo de 0,2

Tabela 6: Crescimento médio^d das linhagens de fungos marinhos em 21 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 21 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	30 mgL ⁻¹	40 mgL ⁻¹	50 mgL ⁻¹
DL6A	8,0	5,4	2,5	0,2	0	0
DL5A	6,6	4,5	3,2	0,4	0	0
DL11A	8,0	7,2	3,1	2,8	0	0
DL2B	8,0	7,6	7,2	3,8	2,2	3,5

^dDesvio padrão mínimo de 0,1 e máximo de 0,5

AMOSTRA DE DL6A

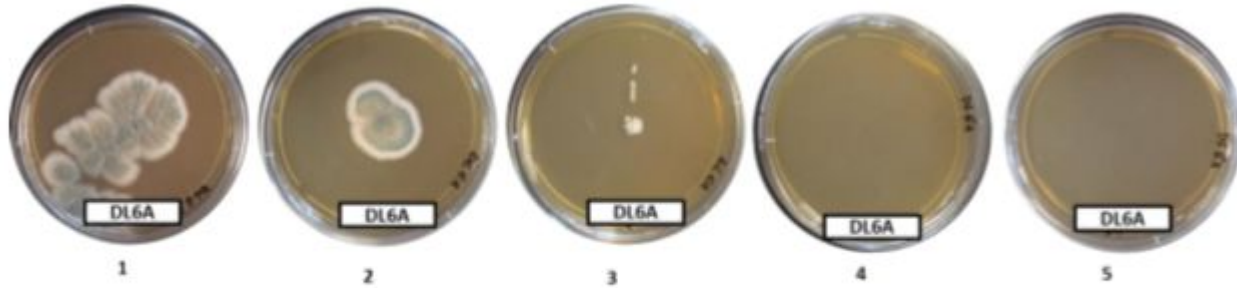


Figura 17: Cultivo da linhagem DL6A em 21 dias nas concentrações de: 1- 10; 2- 25; 3- 30; 4- 40 e 5- 50 mgL^{-1} de PCP/placa.

AMOSTRA DE DL2B

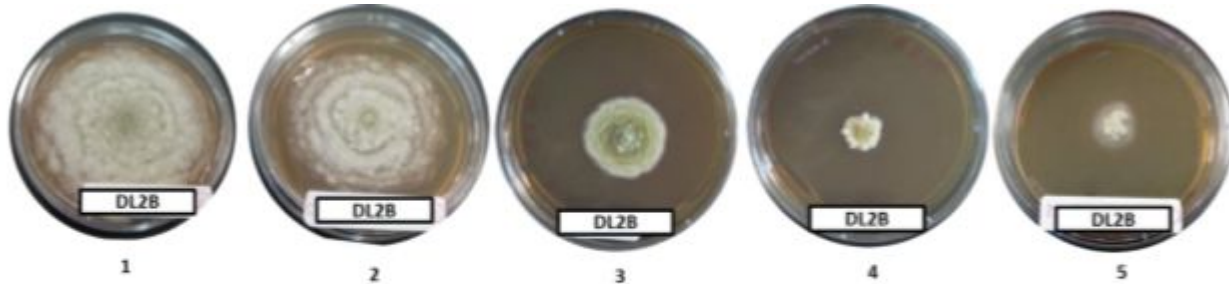
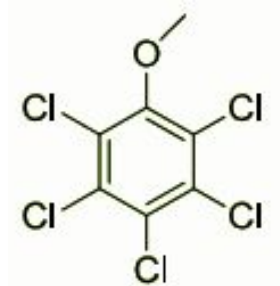


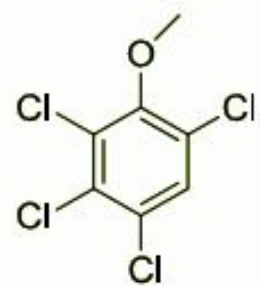
Figura 20: Cultivo da linhagem DL2B em 21 dias nas concentrações de 1- 10; 2- 25; 3- 30; 4- 40 e 5- 50 mgL^{-1} de PCP/placa.

MEIO DE CULTURA LÍQUIDO

- Linhagem DL2B selecionada.
- Inoculação de 100.000 esporos em meio de cultura Malte 3%.
- pH do meio ajustado para 8.
- Incubação de 100.000 esporos/ml em agitação orbital por 3 dias. (30° C , 130 rpm).
- Adição de 2 mg do pesticida PCP.
- Degradação do pesticida efetivada nos primeiros 7 dias.
- Produtos da degradação do PCP prejudiciais ao meio ambiente (PCA e 2,3,4,6-TeCA).



Pentacloroanisol (PCA)



Tetracloroanisol (TeCA)

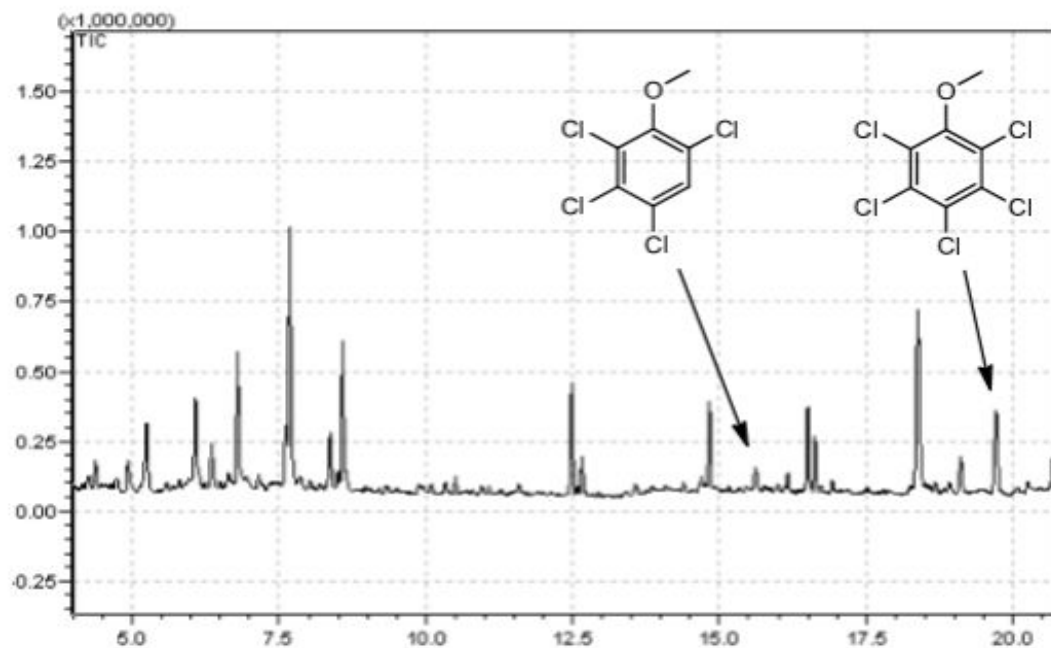


Figura 25: Cromatograma de íons obtido por meio das análises em CG-EM da reação de biodegradação do PCP em 7 dias, referente a extração do extrato micelial.

BIODEGRADAÇÃO DO PCA

- Meio de Cultura Líquido Malte 3%
- Principal produto advindo da biodegradação do PCP
- 20 mg/L de PCA

Tabela 8: Quantificação do PCA por CG-DIC após biodegradação em 7, 14 e 21 dias de incubação (30°C, 130 rpm).

Tempo (dias)	Concentração do PCA (mgL ⁻¹)	% de PCA degradado
7	2 ± 0,1	0
14	1,82 ± 0,01	9
21	1,54 ± 0 12	23

Biodegradação do 2,3,4,6-Teca

- Produto da reação de biodegradação do PCP.
- Feita nas mesmas condições estabelecidas ao PCA.
- Observação de que ele é um produto formado após a degradação do PCA, ou seja, próximo produto intermediário.

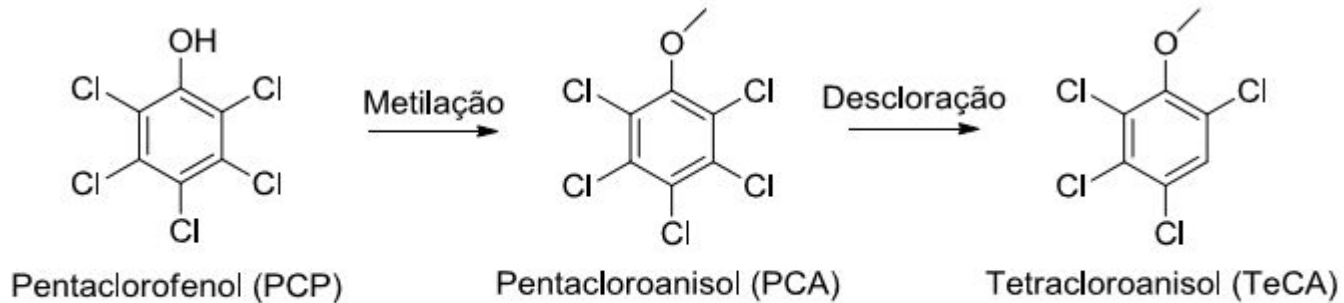


Figura 34: Proposta de rota para biodegradação do pesticida PCP por uma linhagem de fungo marinho.

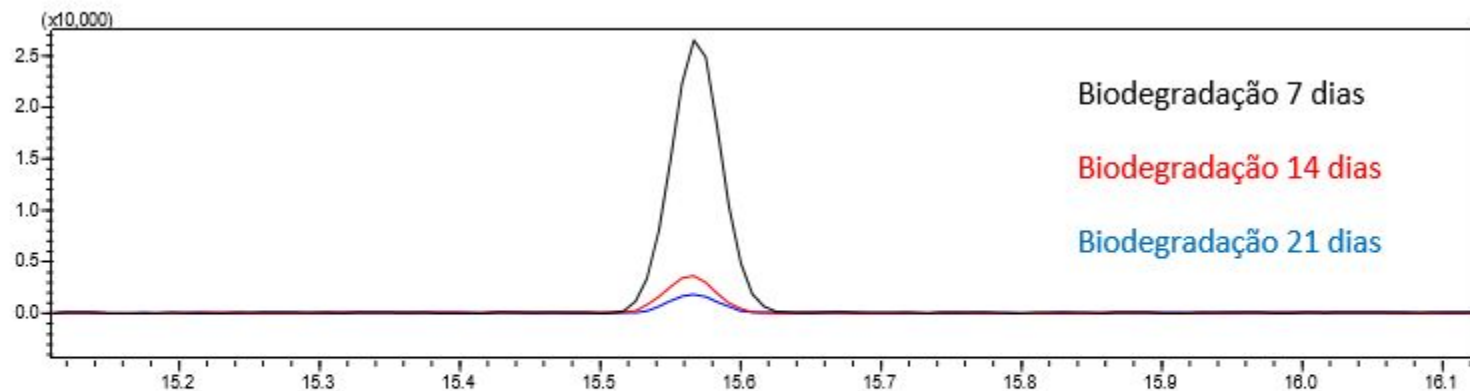
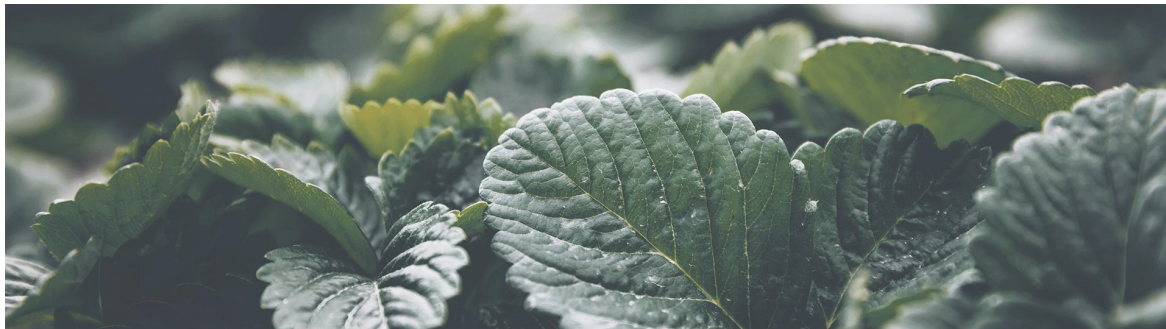


Figura 33: Diminuição da concentração de 2,3,4,6-TeCA na degradação do PCA ao longo de 7,14 e 21 dias evidenciado pelo aumento da intensidade do íon m/z 231 em análise de CG-EM.

04



Conclusão

Resultados obtidos pelo Estudo de Caso

- Linhagem DL2B do fungo *ASCÍDIA DIDEMNUN* *LIGULUM* tem 99,6% de semelhança com a espécie de fungo *trichoderma harzianum*.
- O fungo *trichoderma harzianum* apresentou grande eficiência na biodegradação do PCP.
- PCA e 2,3,4,6-TeCA apresentaram uma redução no meio.
- Fungo pouco utilizada na biorremediação de organoclorados, tornando-se uma proposta de grande valor.

CONCLUSÃO E RESULTADOS OBTIDOS

Obrigado !!

REFERÊNCIAS

<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Pentaclorofenol.pdf>

<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/2102/5793.pdf?sequence=1>

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-753X2004000200007&nrm=iso

<https://portalseer.ufba.br/index.php/cadgeoc/article/view/5553/4041>

https://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completal.asp?consulta=DIELDRIN

https://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completal.asp?consulta=D%20D%20D

<https://www.ecycle.com.br/3740-organoclorados>

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21133/tde-17032002-115002/publico/Yogui2002.pdf>

https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/ToxFAQS_Foreign_Language_PDFs/tfacts35_portuguese.pdf

Tabela 4: Crescimento médio^b das linhagens de fungos marinhos em 7 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 7 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mg.mL ⁻¹	25 mg.mL ⁻¹	30 mg.mL ⁻¹	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹
DL1M ₃	4,2	0	0	0	0	0
DL4M ₃	1,5	0	0	0	0	0
DL6M ₃	1,9	0	0	0	0	0
DL7M ₃	0,9	0	0	0	0	0
DL8M ₃	0,6	0	0	0	0	0
DL9M ₃	3,9	0	0	0	0	0
DL1F	1,9	0,2	0	0	0	0
DL2F	2,1	0,4	0	0	0	0
DL3M ₂	2,5	0,5	0	0	0	0
DL5B	1,6	0,6	0	0	0	0
DL5G	1,5	0,9	0	0	0	0
DL6A	5,1	1,8	0,7	0	0	0
DL5A	3,1	1,6	1,0	0,1	0	0
DL11A	6,6	2,2	0,8	0,7	0	0
DL2B	7,8	4,1	3,0	1,8	0,7	0,9

^bDesvio padrão mínimo de 0,07 e máximo de 0,4

Tabela 5: Crescimento médio⁵ das linhagens de fungos marinhos em 14 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 14 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mg.mL ⁻¹	25 mg.mL ⁻¹	30 mg.mL ⁻¹	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹
DL1M ₃	6,6	0	0	0	0	0
DL4M ₃	3,6	0	0	0	0	0
DL6M ₃	4,2	0	0	0	0	0
DL7M ₃	3,1	0	0	0	0	0
DL8M ₃	1,5	0	0	0	0	0
DL9M ₃	5,4	0	0	0	0	0
DL1F	2,6	0,4	0	0	0	0
DL2F	4,3	1,2	0	0	0	0
DL3M ₂	4,3	1,3	0	0	0	0
DL5B	3,1	1,5	0	0	0	0
DL5G	4,8	3,4	0	0	0	0
DL6A	6,7	3,6	1,7	0,1	0	0
DL5A	4,8	3,0	1,6	0,3	0	0
DL11A	8,0	4,9	1,8	1,6	0	0
DL2B	8,0	6,6	5,9	2,7	1,4	2,1

⁵Desvio padrão mínimo de 0 e máximo de 0,2

Tabela 6: Crescimento médio^d das linhagens de fungos marinhos em 21 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 21 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mg.mL ⁻¹	25 mg.mL ⁻¹	30 mg.mL ⁻¹	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹
DL1M ₃	8,0	0	0	0	0	0
DL4M ₃	6,5	0	0	0	0	0
DL6M ₃	8,0	0	0	0	0	0
DL7M ₃	6,2	0	0	0	0	0
DL8M ₃	2,8	0	0	0	0	0
DL9M ₃	7,1	0	0	0	0	0
DL1F	6,1	0,9	0	0	0	0
DL2F	8,0	3,0	0	0	0	0
DL3M ₂	8,0	3,2	0	0	0	0
DL5B	8,0	3,3	0	0	0	0
DL5G	8,0	6,3	0	0	0	0
DL6A	8,0	5,4	2,5	0,2	0	0
DL5A	6,6	4,5	3,2	0,4	0	0
DL11A	8,0	7,2	3,1	2,8	0	0
DL2B	8,0	7,6	7,2	3,8	2,2	3,5

^dDesvio padrão mínimo de 0,1 e máximo de 0,5