

FITORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS E SOLOS POLUÍDOS

O uso das culturas de raízes geneticamente transformadas como modelos experimentais

Generalidades sobre fitorremediação

O uso do termo fitorremediação aplica-se à utilização de sistemas vegetais (árvores, arbustos, plantas rasteiras e aquáticas) e de sua microbiota com o fim de remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas do ambiente. As substâncias xenobióticas geradas pelas diversas atividades humanas incluem compostos inorgânicos, elementos químicos radioativos, hidrocarbonetos derivados do petróleo, pesticidas, herbicidas, explosivos, solventes clorados e resíduos orgânicos industriais. Os métodos químicos e físicos tradicionais de tratamento do solo e da água, como extração com solvente, oxidoredução e incineração são bastante dispendiosos e oferecem riscos de contaminação secundária, pois o material contaminado tem que ser transportado ao local de tratamento. Por essas razões, em anos recentes, passou-se a dar preferência a métodos *in situ*, os quais são mais econômicos e perturbam menos o ambiente.

A fitorremediação, como qualquer outra tecnologia, apresenta várias vantagens e desvantagens (Tabela 1) que devem ser levadas em conta quando for aplicada (Cunningham *et al*, 1996; Glass, 1998). Se o baixo custo é uma vantagem, o tempo para que se observem os resultados pode ser longo, pois depende do ciclo vital da planta. Além disso, a concentração do poluente e a presença de outras toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta. Outra limitação é que as plantas usadas com o propósito de minimizar a poluição ambiental podem entrar na cadeia alimentar e resultaram consequências indesejáveis. Apesar dos problemas ainda não

resolvidos, o mercado para a exploração dessa tecnologia é promissor. Estima-se que os gastos mundiais com a despoluição ambiental no ano 2000 sejam de US\$25 a 30 bilhões. Nos Estados Unidos serão investidos de US\$ 55 a 103 milhões somente em fitorremediação [Glass, 1998]. No Brasil, embora não se tenha idéia dos investimentos globais com despoluição, pode-se dizer que o mercado tende a crescer, em decorrência das exigências de uma sociedade mais esclarecida e à medida que leis mais rígidas são aplicadas dentro e fora do país. Além disso, existem tecnologias mais baratas e que podem ser postas em prática em grandes áreas; são aquelas que devem ser consideradas em países como o Brasil, não somente para remediar, mas também para prevenir a contaminação ambiental. Nos últimos 10 anos, surgiram nos EUA e na Europa inúmeras empresas privadas que exploram a fitorremediação com fins lucrativos, além do que várias indústrias químicas multinacionais, centros de pesquisa e universidades passaram a desenvolver pesquisa básica e aplicada nessa área. No Brasil, sabe-se que algumas empresas estatais e privadas, bem como instituições acadêmicas pesquisam e/ou exploram os métodos de bioremediação (termo usado para designar o emprego de microrganismos e enzimas isoladas livres ou imobilizadas). Em consequência desse desenvolvimento, uma nova terminologia surgiu para designar os processos envolvidos na fitorremediação, os quais estão resumidos na Tabela 2.

O papel das raízes no processo de atenuação da poluição é fundamental, pois seja qual for o destino da substância xenobiótica na planta ou no solo, a sua absorção ou a liberação de moléculas

Dra. Márcia Pletsch
Professora Adjunta da Universidade
Federal de Alagoas
mpletsch@qui.ufal.br

Dr. Barry Victor Charlwood
Professor do King's College London

Brancilene Santos de Araújo
Mestranda do Curso de Pós-Graduação
em Química e Biotecnologia

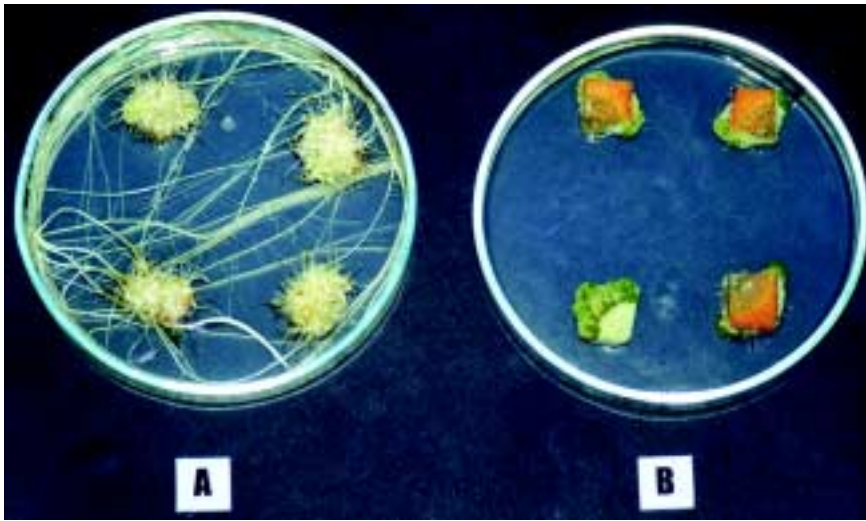


Figura 1: Raízes geneticamente transformadas: (A) formação de raízes sobre os explantes de cenoura após infecção com a *A. rhizogenes*; (B) explantes controles, inoculados apenas com água destilada estéril

ativas (enzimas, por exemplo) pelas raízes é a primeira etapa no curso dos eventos. Pouco se conhece sobre a função específica das plantas na descontaminação do solo, porque a maioria dos estudos, até o momento, foram conduzidos com plantas íntegras, no campo. O contato da planta com os microrganismos na região da rizosfera e outras variáveis experimentais no campo dificultam a análise dos resultados. Nesse contexto, a cultura de tecidos, em particular a cultura de raízes, pode ajudar a esclarecer muitos aspectos do metabolismo vegetal ainda desconhecidos.

As raízes geneticamente transformadas pela *Agrobacterium rhizogenes* (denominadas 'hairy roots' devido ao seu aspecto peculiar caracterizado pela presença de pêlos radiculares) são excelentes sistemas modelos que possibilitam selecionar plantas tolerantes aos diversos tipos de poluentes (inorgânicos e orgânicos) e determinar o papel exclusivo da matriz radicular na absorção e subsequente metabolismo dos compostos xenobióticos.

Raízes geneticamente transformadas pela *A. rhizogenes*

É possível induzir a formação de raízes transformadas em inúmeras espécies vegetais seguindo-se um simples protocolo de infecção de plantas íntegras ou tecidos vegetais com a *A. rhizogenes*. As culturas de raízes originadas por meio desse procedimento têm sido usadas principalmente em estudos relacionados com o metabolismo secundário,

sendo que, nos últimos 15 anos, essas culturas serviram como instrumentos valiosos na elucidação das etapas enzimáticas das rotas metabólicas de vários produtos naturais bioativos, bem como na sua regulação. Entretanto, a aplicação das raízes transformadas não se restringe à produção de compostos secundários, pois o sistema pode ser aplicado para incrementar a biomassa radicular em espécies recalcitrantes, para a produção de proteínas vegetais (enzimas e lectinas comercialmente importantes), para a regeneração de plantas com características fenotípicas singulares (por exemplo, plantas ornamentais) e, mais recentemente, fitorremediação. As culturas de raízes transformadas podem contribuir para a pesquisa e o desenvolvimento dos métodos de fitotransformação, fitoestimulação, rizofiltração e fitoextração. As vantagens da utilização das culturas de raízes transformadas pela *A. rhizogenes* em estudos de fitorremediação estão apresentadas na Tabela 3. Com relação à suscetibilidade das plantas à *A. rhizogenes*, pensava-se, há alguns anos, que, dentro das angiospermas, apenas as dicotiledôneas eram passíveis de transformação, enquanto as monocotiledôneas estavam excluídas do seu espectro de ação. Entretanto, uma melhor compreensão do mecanismo de infecção [Hooykaas & Beijersbergen, 1994] conduziu à construção de cepas supervirulentas de *Agrobacterium* [Hood *et al.*, 1993] e ao uso de protocolos de transformação genética mais eficientes. Assim, descobriu-se

que não apenas as monocotiledôneas são suscetíveis à infecção pela *A. rhizogenes*, mas também as gimnospermas [Wilmlink *et al.*, 1992, Tzafira *et al.*, 1996]. As raízes transformadas podem ser obtidas também por bombardeamento de material vegetal com um plasmídeo que contenha os genes *rol* da *A. rhizogenes* [Kodama *et al.*, 1993].

Culturas de raízes geneticamente transformadas de *Daucus carota*: um modelo experimental para o estudo da tolerância ao fenol e seus derivados clorados

O fenol e os clorofenóis liberados no meio ambiente como resultado da atividade agrícola e industrial são considerados poluentes altamente tóxicos. As culturas de raízes transformadas de cenoura estão sendo investigadas por nosso grupo no que diz respeito à tolerância ao fenol e seus derivados mono, di e tri-clorados, bem como à sua capacidade de remover esses compostos do meio de cultura. A correlação entre a capacidade de remover os fenóis e a produção de peroxidases está sendo investigada paralelamente, porque se sabe que muitas enzimas oxidoreduutoras (lacasas, tirosinases e peroxidases) convertem esses compostos em polímeros insolúveis inócuos [Yu *et al.*, 1994].

Metodologia

Inicialmente, uma cenoura foi lavada em água corrente e esterilizada superficialmente em solução de água sanitária Brilux™ (15%), durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, a cenoura foi enxaguada com água destilada estéril e cortada transversalmente em discos de 3 a 5 mm de espessura, os quais foram colocados sobre meio de cultura GB (meio de Gamborg *et al.* (1968), diluído 50%, contendo 3% sacarose e solidificado com 1% ágar, pH 5.6 - 5.8). Cada disco foi inoculado, na região do periciclo, com uma suspensão aquosa de *A. rhizogenes* cepa LBA 9402 preparada previamente a partir de uma cultura da bactéria cultivada durante 24 horas em meio YMB (0.2 g de K_2HPO_4 , 0.4 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g de NaCl, 10 g de manitol e 0.4 g de extrato de levedura por litro de solução; pH 7.0) que continha rifampicina. Trinta clones de raízes, escolhidos aleatoriamente, foram excisados e cultivados em meio GB contendo ampicilina

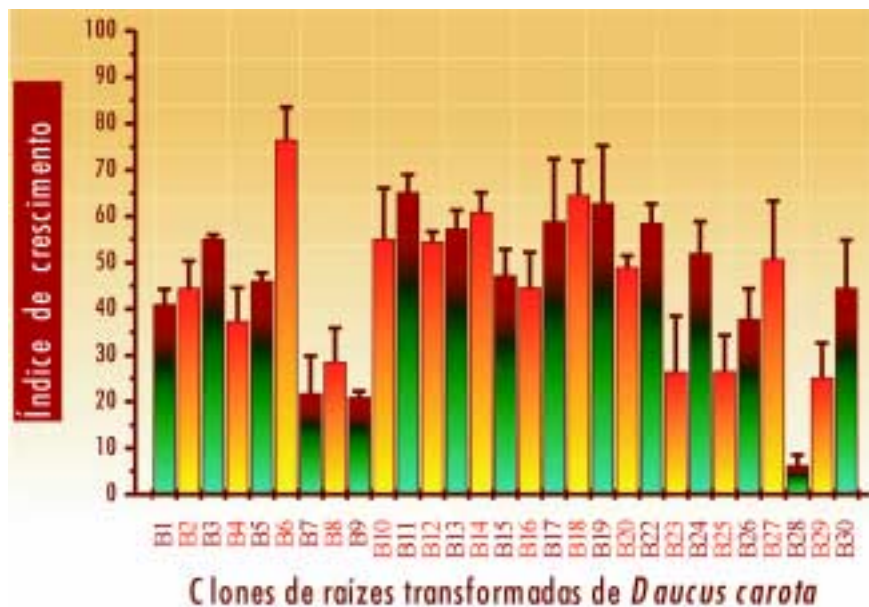


Figura 2: Parâmetros de crescimento das culturas clonais de raízes geneticamente transformadas de *D. carota*, cultivadas em meio GB, no escuro, durante um período de 30 dias

lina (500 mg/L) e incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro. As culturas clonais resultantes foram subcultivadas 5 vezes, a cada 20 dias, com vistas à obtenção de biomassa. A ampicilina foi eventualmente eliminada do meio.

Visando a analisar as características de crescimento das culturas clonais de cenoura, estas foram cultivadas nas condições mencionadas acima durante um período de 30 dias. O incremento da biomassa foi determinado pelo cálculo do índice de crescimento (IC) utilizando-se a fórmula $IC = P_f/P_i$, onde P_f é o peso fresco da cultura no 30^o dia (início da fase estacionária) e P_i o peso fresco do inóculo (0.05g). O tempo de duplicação da cultura (T_D) foi fornecido pela fórmula $T_D = \ln 2(t_1 - t_0)/\ln(IC)$, onde $t_1 - t_0$ corresponde ao período compreendido entre a repicagem e a fase estacionária.

Com o fim de determinar o grau de tolerância aos fenóis, cultivou-se um inóculo (0,05 g) de cada uma das 30 culturas clonais em meio GB que continha, separadamente, fenol, 2-clorofenol (CF), 2,6-diclorofenol (DCF) e 2,4,6-triclorofenol (TCF), nas concentrações de 0.05, 0.5, 1, 2 e 5 mM. Ao final de 30 dias, determinou-se o peso fresco e o peso seco das amostras e calculou-se o IC de cada clone após exposição aos fenóis. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados e Conclusões

A formação de raízes foi observada 15 dias após a infecção dos explantes de cenoura com *A. rhizogenes*. A eficiência da transformação foi bastante alta, com um grande número de raízes sendo

formadas no sítio de infecção como mostra a Figura 1. Entre os 30 clones selecionados para as investigações, o clone B6 apresentou um dos maiores IC (76.56 ± 6.99), enquanto o clone B28 apresentou o menor IC (6.29 ± 2.23), como mostrado na Figura 2. Todos os clones toleraram uma concentração máxima de fenol equivalente a 1 mM, enquanto a concentração máxima de CF, DCF, TCF tolerada foi de 0.05 mM. Acima dos limites de tolerância, todos os fenóis inibiram o crescimento das culturas de raízes e o IC das mesmas foi diminuído em até 95%. Quando o fenol ou seus derivados clorados se encontravam presentes na concentração de 5 mM, as culturas pereceram antes do trigésimo dia do ciclo de crescimento.

A análise de 30 clones isoladamente mostrou que todas as culturas clonais de raízes apresentaram grau semelhante de tolerância aos fenóis tóxicos, apesar de possuírem características de crescimento diversas. Os derivados clorados são mais tóxicos às raízes de cenoura do que o fenol, isto é, o crescimento das culturas só foi possível na presença dos clorofenóis em concentrações 20 vezes menores do que a do fenol. Essa é uma evidência importante, porque diferentes clones de raízes podem apresentar atributos bioquímicos distintos (evidência constatada em estudos relacionados com a acumulação de metabólitos secundários). Se a origem da cultura fizesse diferença (cultura clonal ou mistura de clones), as raízes transformadas não seriam apropriadas para a seleção de plantas destinadas à fitorremediação de xenobióticos específicos, porque a análise de muitos clones individualmente é trabalhosa. Presentemente, nosso grupo está investigando a capacidade das culturas clonais de cenoura removerem os fenóis do meio de crescimento e determinando simultaneamente as variações que ocorrem na atividade das peroxidases durante

o período em que as culturas estão sujeitas ao estresse químico. Os resultados encontrados mostraram que a atividade das peroxidases aumentou nas raízes dentro das 24 horas posteriores à adição dos fenóis às culturas, permanecendo mais ou menos constante por, no mínimo, 5 dias, durante os quais mais de 95% dos fenóis exógenos foram metabolizados (Araujo *et al.*, 1999). Esses resultados permitem-nos arriscar uma generalização, isto é, que as cultu-

Tabela 1: Algumas vantagens e desvantagens da fitorremediação

VANTAGENS	DESvantagens
<ul style="list-style-type: none"> ● O investimento em capital e o custo de operação é baixo; ● É aplicável <i>in situ</i>; o solo pode ser reutilizado; ● Aplica-se a uma grande variedade de poluentes, incluindo alguns recalcitrantes; ● Aplica-se a áreas extensas, onde outras tecnologias são proibitivas; ● Em alguns casos, representa uma solução permanente, pois os poluentes orgânicos podem ser mineralizados. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Os resultados são mais vagarosos do que aqueles observados com outras tecnologias; ● O crescimento de algumas plantas é dependente da estação, do clima e do solo; ● A concentração das substâncias contaminantes pode ser tóxica; ● É incapaz de reduzir 100% a concentração do poluente; ● Aplica-se apenas à superfície do solo ou a águas e alagadiços rasos.

Tabela 2: Estratégias em fitorremediação

Tipo	Destino dos contaminantes
Fitoextração	Absorção do solo e armazenamento nas raízes ou em outros tecidos, sem modificação; o descarte do material contaminado é facilitado;
Fitotransformação	Absorção e bioconversão do contaminante em formas menos tóxicas nas raízes ou em outros tecidos vegetais (catabolismo ou anabolismo);
Fitovolatilização	Absorção e conversão do contaminante numa forma volátil, a qual é liberada na atmosfera;
Fitoestimulação	Estimulação da biodegradação microbiana através dos exudatos das raízes;
Rizofiltração	Absorção e concentração do contaminante nos tecidos vegetais e descarte eventual do material vegetal, apropriado para meios aquosos;
Fitoestabilização	Imobilização, lignificação ou humificação do contaminante no solo.

ras de raízes transformadas são viáveis como modelos experimentais devido ao comportamento similar dos clones com relação à tolerância e à capacidade metabólica. Assim, diferentes espécies e variedades de plantas podem ser testadas sem a preocupação com a seleção de clones específicos, o que invalidaria o uso de tal sistema, proposto principalmente devido à sua simplicidade.

Os produtos da biotransformação dos fenóis nas raízes também estão sendo investigados por nosso grupo, pois a elucidação da rota catabólica dos clorofenóis e sua regulação enzimática é essencial para a produção de plantas transgênicas com capacidade degradativa melhorada. Não tem sentido introduzir na planta um gene (bacteriano, fúngico ou animal) que converta a substância poluente em um intermediário que não possa ser armazenado ou transformado pela maquinaria enzimática natural da planta. O trabalho realizado por Rugh e colaboradores (1996) é um exemplo de manipulação metabólica aplicada à fitorremediação, em que uma seqüência modificada do gene *merA* bacteriano (codifica a enzima íon mercúrico reductase) foi introduzida em *Arabidopsis thaliana*, gerando plantas resistentes ao $HgCl_2$. Essa reductase converte o tóxico Hg^{2+} em mercúrio metálico Hg^0 , relativamente inerte.

Os poluentes químicos se constituem em agentes eliciadores do metabolismo, isto é, ativam genes específicos nas rotas metabólicas e induzem a formação de produtos secundários, que formam parte da estratégia defensiva da planta. A eliciação de culturas vege-

tais com agentes bióticos e abióticos é muito usada no estudo do metabolismo secundário e tem contribuído significativamente para sua compreensão. No caso das culturas de cenoura, as técnicas de eliciação serão empregadas para se identificar que outros genes (além dos que codificam peroxidases) são ativados quando as raízes são expostas a agressores químicos específicos.

Finalmente, as culturas de raízes transformadas de cenoura serão usadas para estudar a sua interação com os microrganismos do solo (individualmente ou em combinação) e tentar entender como esses são influenciados pelas raízes e seus exudatos (fitoestimulação).

Referências bibliográficas

Araujo, B.S., Charlwood, B.V. e Pletsch M.P. (1999) 2ª IUPAC International Conference on Biodiversity, July 1999, Belo Horizonte, Brazil, P142.
 Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, P. e Hsu, F.C. (1996) Adv. Agron. 56, 55-114

Gamborg, O.L., Miller, R.A. e Ojima, K. (1968) Exp. Cell Res. 50, 151-158

Glass, D.J. (1998) The 1998 United States Market for Phytoremediation, D. Glass Associates, Needham, 139pp

Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchen, L.S. e Hoekema, A. (1993) Transgen. Res. 2, 208-221

Hooykaas, P.J.J. e Beijersbergen, A.G.M. (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32, 157-179

Kodama, H., Irifune, K., Kamada, H. e Morikawa, H. (1993) Transgen. Res. 2, 147-152

Pletsch, M., Araújo, B.S. e Charlwood, B.V. (1999) Biotechnol. Adv. (no prelo)

Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stacks, N.M., Thompson, D.M., Summers A.O. e Meagher R.B. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3182-3187

Wilmink, A., Van de Ven, B.C.E. e Dons, J.J.M. (1992) Plant Cell Rep. 11, 76-80

Tzfira, T., Yarnitzky, O., Vainstein, A. e Altamen, A. (1996) Plant Cell Rep. 16, 26-31

Tabela 3: Vantagens do uso das raízes geneticamente transformadas como modelos experimentais (Pletsch et al., 1999)

- Podem ser induzidas a partir de inúmeras gimnospermas e angiospermas;
- Crescem rapidamente em meios diluídos, na ausência de reguladores de crescimento e, por isso, o custo de implementação do sistema é baixo;
- Apresentam estabilidade genética e bioquímica semelhante às das raízes da planta mãe;
- São sistemas isolados que permitem conduzir os estudos de fitorremediação sem a interferência da microbiota e até mesmo dos outros órgãos vegetais.