

Bactérias anaeróbicas nativas do solo na biodegradação de compostos orgânicos voláteis

Native anaerobic bacteria from soil in the biodegradation of volatile organic compounds

PhD. Leidy Rocío Niño Camacho
Universidade Federal de São Carlos
leinica16@gmail.com

Fecha Recepción: 09/11/17 - Fecha Aprobación: 15/11/17

Resumo: Neste trabalho se realiza uma perspectiva analítica e interpretativa sobre os resultados de um estudo realizado pela autora no Brasil com três classes de bactérias envolvidas geralmente nos processos de biodegradação no solo (bactérias redutoras de sulfato, bactérias redutoras de nitrato y bactérias redutoras de ferro (III)). O objetivo do trabalho foi mostrar a importância de estudos de biodegradação de hidrocarbonetos monoaromáticos em solos com bactérias nativas do solo. O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, conhecidos como BTEX são comumente encontrados em locais próximos a refinarias de petróleo e derivados, postos de abastecimento, ou ao redor de oleodutos, oriundos de vazamentos e/ou derramamentos. No estudo se encontraram evidências de que os compostos BTEX podem ser removidos sob condições anaeróbicas em presença de nitrato e sulfato. Os resultados mostram também a importância de realizar uma caracterização previa da microbiota presente no ambiente antes de iniciar um processo de bioremediação.

Palabras clave: BTEX, bactérias anaeróbicas, bactérias redutoras de nitrato, de sulfato e de ferro

Abstract: This work presents an analytical and interpretative perspective on the results of a study carried out by the author in Brazil with three classes of bacteria generally involved in the processes of soil biodegradation (sulfate reducing bacteria, nitrate reducing bacteria and iron reducing bacteria)). The objective of this work was to show the importance of studies of biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in soils with native soil bacteria. Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes, known as BTEX are commonly found in locations near oil refineries and by-products, filling stations, or around pipelines from leaks and / or spills. The study found evidence that BTEX compounds can be removed under anaerobic conditions in the presence of nitrate and sulfate. The results also show the importance of performing a preliminary characterization of the microbiota present in the environment before starting a bioremediation process.

Keywords: BTEX, anaerobic bacteria, sulfate reducing bacteria, nitrate reducing bacteria, iron reducing bacteria

1. Introdução

O conhecimento da diversidade microbiana no solo é de grande importância para determinar quais populações possivelmente estão envolvidas na biodegradação dos hidrocarbonetos. O solo é um ambiente originalmente rico em quantidade e diversidade de microrganismos, sendo que o crescimento microbiano mais intenso ocorre nas superfícies das partículas do solo, geralmente na rizosfera. As bactérias representam a maior parte da população microbiana do solo, sendo majoritariamente heterotróficas das quais os bacilos esporulados são muito comuns.

No solo ocorre a reciclagem de compostos químicos, sendo onde ocorrem as reações bioquímicas pelas quais os compostos orgânicos são quebrados em compostos inorgânicos ou seus elementos constituintes, em um processo denominado de mineralização, no qual os microrganismos desempenham um papel essencial para as transformações químicas. Na superfície do solo se encontram principalmente as bactérias aeróbicas, já nos horizontes mais profundos as bactérias anaeróbicas ou facultativas são predominantes (Stanier, Ingrahan, Wheelis, & Painter, 1996).

O benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três isômeros de xileno (comumente conhecidos como BTEX) são

constituintes do petróleo e são considerados como os principais contaminantes das águas subterrâneas, tendo ocorrência a partir de acidentes por derramamento na superfície, usualmente provenientes de operações de refino, armazenamento, transporte e comercialização do petróleo e de seus derivados, especialmente com respeito à gasolina e ao óleo diesel. Além disso, atuam também como fontes de contaminação o uso de solventes, o escoamento de gasolina nas ruas e a combustão de madeira (Weelink, Van Eekert, & Stams, 2010). Consequentemente, o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, são frequentemente encontrados como contaminantes nestes locais. Os hidrocarbonetos mais tóxicos são os aromáticos com baixo ponto de ebulição, dentre eles se encontram os BTEX, que tendem a se solubilizar facilmente na água, apresentando baixos coeficientes de partição octanol-água e exibindo uma lenta absorção no solo. Desse modo, esses compostos apresentam um transporte preferencial no meio aquoso, favorecendo a contaminação de reservatórios de água e interações com a cadeia trófica (Mazzeo, Levy, De Angelis, & Marin-Morales, 2010).

A maior parte do petróleo é passível de biodegradação, no entanto trata-se de um processo lento e que pode demorar muitos anos. Mesmo frente à questão cinética, o processo de biodegradação é amplamente aceito hoje no contexto da atenuação natural como uma ferramenta adequada para lidar com a contaminação da superfície terrestre e controlar a propagação de plumas contaminantes com menor custo e menor dano ambiental. (Tonini, De Rezende, & Grativol, 2010).

Segundo a Agência Ambiental Norte-Americana – USEPA – o termo “Atenuação Natural Monitorada” (ANM) refere-se ao uso dos processos de atenuação natural que ocorrem espontaneamente, dentro de um contexto de remediação monitorada e controlada de um sítio, em um período de tempo razoável, com o objetivo de reduzir a concentração e toxicidade de contaminantes até níveis adequados à proteção da saúde humana e ao meio ambiente (U. S. Environmental Protection Agency – USEPA, 1999).

Em geral, a ANM tem custo reduzido quando comparado a outros métodos de remediação. Além disso, é um método que pode ser usado antes ou após outras tecnologias de remediação, podendo ser aplicado mesmo quando o contaminante se

encontra amplamente difundido no solo. No entanto a aplicabilidade da técnica depende da velocidade de migração dos contaminantes, sendo que estes podem migrar antes de serem degradados. Durante a atenuação natural, os microrganismos autóctones passam a utilizar em seus metabolismos os compostos orgânicos poluentes como fontes de carbono, provocando, então, a redução das concentrações dessas substâncias ao longo do tempo (Robb & Moyer, 2001).

2. Biodegradação por Bactérias Anaeróbias

Dentro do ciclo biogeoquímico do nitrogênio, a conversão de amônio em nitrato (nitrificação) é realizada por bactérias quimioautotróficas aeróbias estritas, sendo o nitrato a principal forma de nitrogênio encontrado no solo. O processo de redução do nitrato a nitrito e deste a amônia, gás nitrogênio ou óxido nítrico é chamado de desnitrificação e ocorre em solos saturados com água, pela ação de bactérias do gênero *Pseudomonas*, dentre outras (Stanier, Ingrahan, Wheelis, & Painter, 1996).

Em condições de anaerobiose muitas bactérias aeróbias podem utilizar nitratos no lugar do oxigênio como receptor final de elétrons. Assim quando o material orgânico se decompõe no solo ou na água e o oxigênio se esgota como resultado da respiração aeróbia microbiana, algumas dessas bactérias aeróbias continuaram respirando caso haja nitrato presente e atuando como receptor de elétrons. Esse tipo de bactérias são as redutoras de nitrato (BRN), as quais reduzem o nitrato para nitrito (por exemplo, as *Escherichia coli*).

As bactérias redutoras de sulfato (BSR) são microrganismos anaeróbios estritos, metabolicamente versáteis provenientes de várias famílias e diferentes gêneros. Utilizam o sulfato e outros compostos oxidados de enxofre como receptor final de elétrons (agente oxidante) para a produção de H_2S . Podem crescer de forma heterotrófica usando moléculas orgânicas de baixo peso molecular e de maneira autotrófica usando hidrogênio e dióxido de carbono (Nagpal, Chuichulcherm, Peeva, & Livingston, 2000) (Hao, 2003).

As BRS são comuns em ambientes anaeróbios onde auxiliam na degradação de matéria orgânica. Nesse

tipo de ambiente, as bactérias fermentadoras extraem energia das grandes moléculas orgânicas e, como resultado são geradas moléculas pequenas como ácidos orgânicos e álcoois que são oxidados por bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas. A cor preta dos lodos gerados nestas condições é devida à ação das BRS. O forte cheiro de ovo podre é característico do sulfeto de hidrogênio é com frequência um marcador da presença de bactérias redutoras de sulfato na natureza.

Durante a degradação anaeróbia da matéria orgânica, as BSR podem utilizar tanto o sulfato como receptor de elétrons como também compostos como o tiosulfato, o tetrionato e o enxofre elementar (Hao, 2003) (Postgate, 1979). Algumas BRS também podem crescer na presença de nitrato, devido a seu metabolismo versátil que proporciona um maior saldo energético que com o sulfato.

Por outro lado, as bactérias redutoras de ferro são uma classe especial de microrganismos que utilizam óxidos e hidróxidos de Fe como receptores de elétrons. O Fe (III) é um receptor final de elétrons extensamente utilizado pelos organismos anaeróbios autótrofos e heterótrofos. O fluxo de elétrons nesses organismos é similar aos que usam como receptores finais o oxigênio ou nitrato, porém nos organismos redutores de ferro (III) a enzima final é a ferro-férrico redutase (Lovley, 1993).

Algumas bactérias redutoras de ferro (III) como as *G.metallireducens* podem utilizar hidrocarbonetos tóxicos como o fenol ou tolueno como fonte de carbono. Por isso existe um grande interesse em usar esses microrganismos como agentes de biorremediação em aquíferos contaminados ricos em ferro (III) (Lu, Wang, Huang, & Reichardt, 2008), como é caso do Brasil.

Na Tabela 1 são mostrados os tipos de respiração e as respectivas equações estequiométricas generalizadas

Tabela 1. Tipos de respiração.

Tipo de respiração	Equação estequiométrica generalizada
(1) Aeróbia	$12\text{-CH-} + 15\text{O}_2 \rightarrow 12\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$
(2) Desnitrificação	$\text{-CH-} + \text{NO}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \frac{1}{2}\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$
(3) Redução de manganês	$\text{-CH-} + \frac{1}{2}\text{Mn (IV)} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mn(II)} + \text{HCO}_3^-$
(4) Redução de ferro	$\text{-CH-} + \text{Fe(III)} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe(II)} + \text{HCO}_3^- + 6\text{H}^+$
(5) Redução de sulfato	$\text{-CH-} + \text{SO}_4^{-2} + 5\text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O}$

da oxidação completa da matéria orgânica, com os subprodutos formados em cada caso de mineralização. Em ambientes subterrâneos a sequência de utilização dos receptores de elétrons, seguindo os valores da energia livre de Gibbs é: $\text{O}_2 > \text{NO}_3^- > \text{Fe(III)} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_2$. Primeiramente há uma alta demanda de oxigênio dissolvido que leva à rápida depleção do oxigênio no ambiente e então os processos de biodegradação anaeróbios são prevaletentes.

Quando ocorre um vazamento de algum combustível derivado do petróleo, uma grande concentração de hidrocarbonetos se torna presente no solo, existindo um excesso de doadores de elétrons em comparação com as substâncias receptoras de elétrons. Nas plumas de contaminação ocorre conseqüentemente uma queda na concentração dos receptores de elétrons no centro da pluma, aumentando a limitação da biodegradação (Meckenstock, Martin, & Griebler, 2015), havendo ainda um incremento na toxicidade causada pela alta concentração e variedade de hidrocarbonetos, o que diminui o potencial de degradação dos microrganismos nativos.

A autora realizou um estudo comparativo com três classes diferentes de bactérias nativas e seus respectivos receptores de elétrons. A determinação dos grupos de bactérias foi realizada pela técnica do método do número mais provável (NMP), originalmente descrita por McCRADY em 1915 (McCRady, 1915), esta técnica de microbiologia clássica consiste em estimar a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra sob análise. Útil para contar microrganismos difíceis de cultivar em meio sólido como as bactérias anaeróbias, permitindo manter um ambiente anaeróbio dentro dos tubos, sem necessitar de sistemas mais complexos como câmaras anaeróbias. O líquido de cultura deve ser específico para o crescimento do tipo de microrganismo de interesse. O método requer a realização de uma série de diluições em série da amostra (Sutton, 2010).

Os resultados mostraram que a série com nitrato foi a que apresentou maior presença de bolhas de gás na superfície, fornecendo um indicativo inicial de que alguma atividade biológica estava ocorrendo dentro do frasco e como provável resultado da formação de espécies gasosas e reduzidas de nitrogênio.

As séries com sulfato e ferro também mostraram alguma aparição de bolhas de gás, sendo que na de sulfato a intensidade foi um pouco maior do que na de ferro. O gás produzido pelas BRN é principalmente composto por CO_2 e N_2 , no caso das BRS CO_2 e H_2S , em quanto que as BRF inicialmente produzem bicarbonato que só depois de muito tempo vai se converter em CO_2 , explicando a menor quantidade de gás nos microcosmos com Ferro (III). Na série de controle abiótico não foi observada a aparição de nenhuma bolha, sendo que o aspecto permaneceu inalterado durante todo o tempo monitorado.

Como modo de comparação e resumo dos resultados dos grupos de bactérias caracterizados no trabalho foi realizado um gráfico em função logarítmica das concentrações de bactérias encontradas para cada experimento. Na figura 1 se encontram os resultados para os experimentos com solo nativo contaminado com uma mistura de compostos BTEX. De modo geral as BRN foram predominantes no solo escolhido para o trabalho. Por serem facultativas não são afetadas pela presença de oxigênio. E são mais facilmente adaptáveis a diferentes mudanças ambientais. Não foi observada a presença de BRS no solo nativo, por ser estritamente anaeróbicas e conseqüentemente afetadas pelo oxigênio. As BRF foram detectadas no solo original e também mostraram algum aumento ao final da incubação, tal qual as BRN.

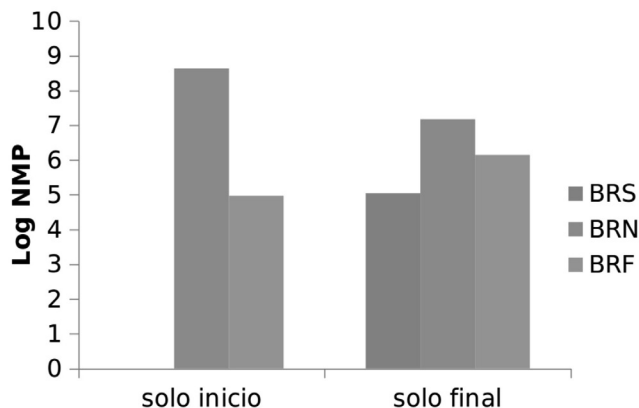


Figura 1. Quantificação de grupos bacterianos por NMP no experimento de degradação de BTEX.

Os resultados em geral mostraram que a presença de nitrato favorece a degradação dos BTEX. Tal fato pode ser atribuído ao favorecimento termodinâmico do nitrato com um maior poder oxidante de $+0,96 \text{ E}^\circ, \text{ V}$ entre o Fe(III) ($+0,77 \text{ E}^\circ, \text{ V}$) e o SO_4^{2-} ($+0,17 \text{ E}^\circ, \text{ V}$) (Moussavi & Ghorbanian, 2015) confirmaram que na ausência de nitrato como receptor de elétrons externo se favorece o metabolismo fermentativo, enquanto que na presença de nitrato ocorre um metabolismo respiratório, com taxas de remoção bem maiores na biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo. Trabalhos prévios mostraram a resistência do benzeno à biodegradação, e também a diminuição nas taxas de degradação a partir de altas concentrações iniciais do benzeno ($>100 \text{ mg kg}^{-1}$), mostrando toxicidade para a microbiota e inibindo a capacidade de biodegradação (DOU, LIU, & HU, Anaerobic BTEX degradado in soil bioaugmented with mixed consortio under nitrate reduction, 2008), (Phelps & Young, 1999). No trabalho mostrado as concentrações iniciais do benzeno foram baixas para evitar este efeito de toxicidade as quais foram entre $1,3$ e 5 mg kg^{-1} .

Outros estudos também demonstraram uma maior eficiência da degradação de compostos orgânicos na presença do íon nitrato, tanto em águas como em solos (DOU, LIU, HU, & DENG, Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction, 2008), (HU, DOU, LIU, ZHENG, & DENG, 2007), (Phelps & Young, 1999). Neste estudo, o nitrato também mostrou ser mais eficiente na remoção dos BTEX, pelo qual poderia se pensar como a melhor opção para estimular a biodegradação destes contaminantes nos solos. Porém, um ponto importante na questão do nitrato é a capacidade poluidora deste íon na natureza (Resende, 2002). O nitrato é a principal forma de nitrogênio associada à contaminação da água. Esse íon possui uma solubilidade elevada sendo facilmente arrastado pelas águas das chuvas em função do fenômeno de lixiviação indo, juntamente com parte do solo para os corpos hídricos, com o agravante de que é fracamente ligado à matéria orgânica do solo (Manahan, 2000).

5. Conclusões

De acordo com a revisão bibliográfica e reflexão do trabalho realizado pela autora pode-se concluir a importância de realizar uma caracterização previa da microbiota presente no ambiente antes de iniciar

um processo de bioremediação, mostrando também a importância da estimulação com o enriquecimento de nutrientes que favorecem a bioremediação e melhoram os tempos de degradação.

No trabalho discutido foram encontradas evidências que os compostos BTEX podem ser removidos do solo estudado sob condições anaeróbicas em presença de nitrato e sulfato, enquanto que o uso de ferro (III) não propiciou uma diminuição significativa na concentração dos contaminantes durante os três meses de incubação, exceto para tolueno.

Referências Bibliográficas

- Blodgett, R., U.S. Food and Drug Administration. (2010). *Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions, Bacteriological Analytical Manual*. Acesso em 27 de 06 de 2015, disponível em <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>
- DOU, J., LIU, X., HU, Z., & DENG, D. (2008). Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. *J. Haz. Materials*, 151, 720-729.
- DOU, J., LIU, X., & HU, Z. (2008). Anaerobic BTEX degradado in soil bioaugmented with mixed consortio under nitrate reduction. *Journal of environmental sciences*, 20, 585-512.
- Hao, O. J. (2003). Sulphate-reducing bacteria. In: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Elsevier.
- HU, Z., DOU, J., LIU, X., ZHENG, X., & DENG, D. (2007). Anaerobic biodegradation of benzene series compounds by mixed cultures based on optional electronic acceptors. *J. Env. Sciences*, 19, 1049-1054.
- Lovley, D. R. (1993). Dissimilatory metal reduction. *Annu Ver Microbiol*(47), 263-290.
- Lu, W., Wang, H., Huang, C., & Reichardt, W. (2008). Aromatic compound degradation by iron reducing bacteria isolated from irrigated tropical paddy soils. *Journal of Environmental Sciences*(20), 1487-1493.
- Manahan, S. E. (2000). *SOIL ENVIRONMENTAL CHEMISTRY- Environmental Chemistry*. Boca Raton: CRC Press LLC.
- MAZZEO, D. C., LEVY, C. E., de ANGELIS, D. F., & MARIN-MORALES, M. A. (2010). BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment*, 408, 4334 - 4340.
- McCrady, M. H. (1915). The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J. Infect. Dis.*(17), 183-212.
- Meckenstock, R. U., Martin, E., & Griebler, C. (2015). Biodegradation: Updating the Concepts of Control for Microbial Cleanup in Contaminated Aquifers. *Environ. Sci. Technol.*(49), 7073-7081.
- Moussavi, G., & Ghorbanian, M. (2015). The biodegradation of petroleum hydrocarbons in an upflow sludge-blanket/ fixed-film hybrid bioreactor nitrate-reducing conditions: Performance evaluation and microbial identification. *Chemical Engineering Journal*, 28, 121-131.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Peeva, L., & Livingston, A. (2000). Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*(70), 370.
- Phelps, C. D., & Young, L. Y. (1999). Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation*, 10, 15-25.
- Postgate, J. R. (1979). *The Sulphate-Reducing Bacteria*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Resende, A. V. (2002). *Agricultura e qualidade da água: contaminação da água por nitrato*. Planaltina: Editora EMBRAPA.
- Robb, J., & Moyer, E. (2001). Natural attenuation of benzene and MTBE at four midwestern retail gasoline marketing outlets. *Contam. Soil Sed. Water, Spring*, pp. 67-71.
- STANIER, R. Y., INGRAHAN, J. L., WHEELIS, M. L., & PAINTER, P. R. (1996). *Microbiología* (2 ed.). Editorial Reverté S.A.
- Sutton, S. (2010). The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification, and Validation, Microbiology Topics. *Journal of Validation Technology [Summer 2010]*, 35-38.
- TONINI, R. C., de REZENDE, C. E., & GRATIVOL, A. D. (2010). Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. *Oecologia Australis*, 14(4), 1025-1035.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. (1999). *Directive 9200.4-17P: Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites*. Acesso em Novembro de 2014, disponível em <http://www.epa.gov/oust/directiv/d9200417.pdf>

WEELINK, A. B., VAN EEKERT, M., & STAMS, A. (2010). Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application . *Rev Environ Sci Biotechnol*(9), 359-385.