

DEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO POR BACTÉRIAS: REVISÃO

Rita Maria Costa Wetler-Tonini¹, Carlos Eduardo de Rezende¹ & Adriana Daudt Grativol¹*

¹ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Departamento de Biociências e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Laboratório de Ciências Ambientais. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, CEP: 28013-602.

E-mails: micro_rita@yahoo.com.br*, crezende@uenf.br, adgrativol@gmail.com

RESUMO

O petróleo é um composto orgânico, formado por processos biogeoquímicos, constituído em sua maior parte por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. A contaminação ambiental por esta substância e por seus derivados causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) de origem petrogênica estão entre os poluentes de maior persistência, apresentando propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos. A maior parte dos componentes do petróleo é passível de biodegradação, no entanto, trata-se de um processo lento, podendo levar décadas até a total descontaminação do ambiente. Assim, técnicas de biorremediação tem sido alvo de diversos estudos a fim de acelerar o processo de descontaminação com menor custo e menor dano ambiental. Neste contexto, bactérias aeróbicas e anaeróbicas têm demonstrado grande potencial para a remediação de poluentes do petróleo, sendo utilizadas com sucesso em diversas técnicas, como atenuação natural, bioaugmentação, bioestimulação, produção de biosurfactantes, entre outras. Este trabalho descreve algumas destas técnicas, bem como as vias aeróbicas e anaeróbicas para o metabolismo de hidrocarbonetos por bactérias e seus fatores intervenientes.

Palavras-chave: HAP; biosurfactante; metabolismo aeróbico; metabolismo anaeróbico; biodegradação.

ABSTRACT

BACTERIAL DEGRADATION AND BIORREMEDICATION OF PETROLEUM COMPOUNDS: A REVIEW. Petroleum is an organic compound formed by biogeochemical processes, consisting mostly of a complex mixture of hydrocarbons. Environmental contamination by this substance and its derivatives cause major ecological impact, and techniques for their remediation have been highlighted in recent decades. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from petrogenic origin are among the most persistent pollutants, with toxic, mutagenic and carcinogenic properties to humans. Most components of oil are biodegradable, however, it is a slow process and may take decades until complete environmental decontamination. Thus, bioremediation techniques have been the target of several studies in order to accelerate the decontamination process with less cost and less environmental damage. In this context, aerobic and anaerobic bacteria have shown great remediation potential of oil pollutants, being successfully used in various techniques, such as natural attenuation, bioaugmentation, bioestimulation, biosurfactants production, among others. This review describes some of these bioremediation techniques, as well as aerobic and anaerobic pathways for bacterial hydrocarbons metabolism and factors involved in its activity.

Keywords: PAH; biosurfactant; aerobic metabolism; anaerobic metabolism; biodegradation.

RESUMEN

DEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN DE COMPUESTOS DE PETRÓLEO POR BACTERIAS: UNA REVISIÓN. El petróleo es un compuesto orgánico formado por procesos biogeoquímicos, constituido principalmente por una mezcla compleja de hidrocarburos. La contaminación ambiental por esta sustancia

y sus derivados causa un gran impacto ecológico y las técnicas para su remediación han sido destacadas en las últimas décadas. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) de origen petrogénico, están entre los contaminantes de mayor persistencia, presentando propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas en los seres humanos. La mayor parte de los componentes del petróleo es pasible de biodegradación. No obstante, este es un proceso lento, que puede tomar décadas hasta la total descontaminación del ambiente. Es así que las técnicas de biorremediación han sido objeto de diversos estudios con el fin de acelerar el proceso de descontaminación con el menor costo y daño ambiental. En este contexto, las bacterias aeróbicas y anaeróbicas han mostrado un gran potencial para la biorremediación de contaminantes de petróleo, siendo usados con éxito en diversas técnicas, como la atenuación natural, bioaugmentación, bioestimulación, producción de biosurfactantes, entre otros. Este trabajo describe algunas de estas técnicas, así como las vías aeróbicas y anaeróbicas para el metabolismo de hidrocarburos por bacterias y los factores que intervienen.

Palabras clave: HAP; biosurfactante; metabolismo aeróbico; metabolismo anaeróbico; biodegradación.

CARACTERÍSTICAS DO PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (alifáticos ou aromáticos), e em menores quantidades, por compostos não hidrocarbônicos e outros componentes orgânicos, alguns constituintes organometálicos, especialmente complexos de vanádio e níquel. É oleoso, inflamável, menos denso que a água, com cor variando entre negro e castanho escuro e odor característico. Sua composição varia em função da localização geográfica e das condições físicas, químicas e biológicas que o originaram (Crapez *et al.* 2002, Van Hamme *et al.* 2003).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são contaminantes ambientais ubíquos, de origem petrogênica, pirogênica ou biogênica (Widdel & Rabus 2001, Foght 2008, Seo *et al.* 2009). HAPs de origem petrogênica são comprovada ou potencialmente tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos, entrando no ambiente principalmente por deposição atmosférica, escoamento urbano, efluentes municipais, águas residuais de indústrias e derramamentos de óleo (Seo *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2009). Assim, a poluição por petróleo constitui um grande risco ambiental e sanitário e, conseqüentemente, a degradação microbiana de hidrocarbonetos é um tema que permanece em destaque (Seo *et al.* 2009).

BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO

A maior parte dos componentes do petróleo (de 60% a 90%) é biodegradável. Entretanto, o restante

(de 10% a 40%), em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. Mesmo tratando-se de uma porção menor, deve-se ressaltar que isto representa toneladas de poluentes impactando ecossistemas e sendo bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O destino destes compostos após um derrame irá depender da interação entre vários fatores, podendo-se destacar a degradação microbiana (Crapez *et al.* 2002).

A presença de hidrocarbonetos em toda a biosfera pode explicar a capacidade de muitas espécies microbianas em utilizar estes compostos como substrato de crescimento, degradando poluentes do petróleo e utilizando-os como fonte de carbono e energia (Boopathy 2000, Ramsay *et al.* 2000, Widdel & Rabus 2001, Díaz 2004, Mandri & Lin 2007). Para tal, é necessário quebrar ao menos parte da molécula, em um composto mais simples, intermediário na via metabólica (Boopathy 2000, Widdel & Rabus 2001, Van Hamme *et al.* 2003, Díaz 2004, Ferguson *et al.* 2007, Jacques *et al.* 2007, Mandri & Lin, 2007).

Algumas características das bactérias propiciam sua adaptação a várias condições ambientais, como seu crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética e rápida adaptação a variações do meio. Para sua sobrevivência e crescimento, bactérias necessitam basicamente de energia, carbono e nutrientes (N, P, S, K, Ca, Mg, etc.) (Martins 2004). Várias vias metabólicas de degradação dos HAPs foram identificadas em diferentes bactérias. A quebra de compostos aromáticos pode ser feita aerobicamente ou anaerobicamente, conforme demonstrado na Figura 1 (Dagley 1975, Bugg & Winfield 1998, Boopathy 2000, Widdel & Rabus 2001, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007).

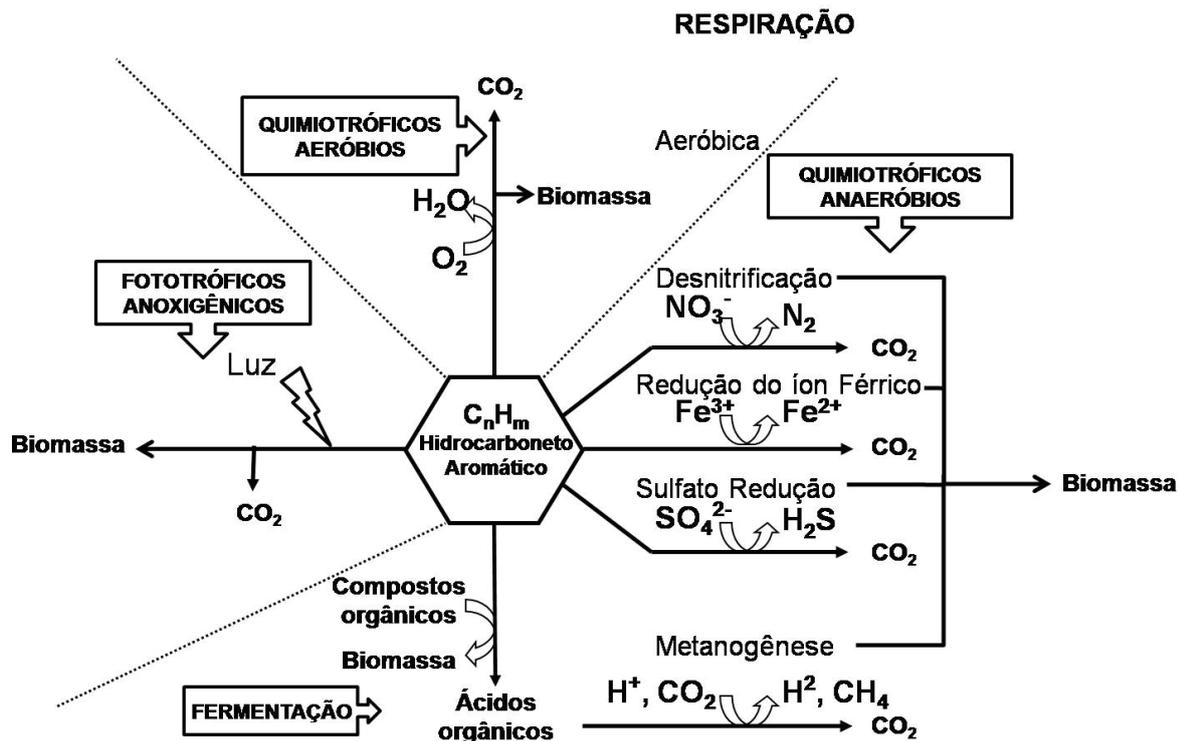


Figura 1. Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração. Figura adaptada de Díaz (2004).

Figure 1. Microbial utilization of aromatic compounds aerobically and anaerobically, showing the different electron acceptors in respiration. Figure adapted from Díaz (2004).

Nos ambientes naturais, a maior parte da matéria orgânica é mineralizada aerobicamente, mas este processo pode ocorrer também na ausência de oxigênio (Smith 1990, Hopper 1991). Entretanto, de acordo com Díaz (2004), a degradação microbiana do petróleo e seus produtos refinados é muito mais rápida em condições aeróbicas do que em condições anaeróbicas.

A susceptibilidade dos componentes do petróleo à biodegradação varia de acordo com a concentração do poluente e com o tamanho da molécula do hidrocarboneto (Chosson *et al.* 1991). Geralmente, um aumento no número de anéis aumenta a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula de HAP, tornando-o menos susceptível à biodegradação (Kanaly *et al.* 2000, Yu *et al.* 2005). A solubilidade dos HAPs em água é, geralmente, baixa e decresce quando o peso molecular aumenta. Compostos de alto peso molecular são, então, considerados recalcitrantes (Seo *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2009).

A característica comum de todas as frações do petróleo é a sua baixa solubilidade em água, dificultando

a ação microbiana em degradá-los (Kanaly *et al.* 2000, Yu *et al.* 2005, Cameotra & Singh 2009, Seo *et al.* 2009). O primeiro passo da degradação microbiana consiste em obter melhor contato da superfície celular com o óleo e então, o transporte através da membrana celular. Apesar das muitas pesquisas nesta área, o mecanismo de transporte e assimilação do óleo dentro das células bacterianas ainda não é totalmente conhecido (Cameotra & Singh 2009). A aplicação de surfactantes pode aumentar a disponibilidade dos HAPs aos microrganismos degradadores, auxiliando na solubilização do poluente (Ganeshlingam *et al.* 1994, Ron e Rosenberg 2001, Mariano *et al.* 2007, Cameotra & Singh 2009, Seo *et al.* 2009).

SURFACTANTES E SUA AÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO

Surfactantes são moléculas anfipáticas, que podem ser obtidos por processos químicos (sintéticos), ou produzidos por microrganismos (biosurfactantes)

(Mulligan *et al.* 2001, Colla & Costa 2003). Surfactantes sintéticos têm sido utilizados na indústria do petróleo, ajudando na limpeza de derramamentos e na recuperação de petróleo em reservatórios. Entretanto, estes produtos podem ser tóxicos ao ambiente e não são biodegradáveis. Por outro lado, os biossurfactantes apresentam vantagens como baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficácia em amplas variações de temperatura, pH e salinidade, além da facilidade de síntese (Tabatabaee *et al.* 2005).

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e possuem características de detergência, emulsificação, solubilização, diminuição da tensão superficial e interfacial e dispersão de fases (Desai & Banat 1997, Maniasso 2001, Ron & Rosenberg 2001, Nitschke & Pastore 2002, Colla & Costa 2003, Yakubu 2007). Estes produtos alteram a hidrofobicidade e aumentam a dispersão de compostos imiscíveis em água, aumentando a degradação microbiana (Ron & Rosenberg 2001, Mariano *et al.* 2007, Seo *et al.* 2009, Cameotra & Singh 2009). A maioria dos biossurfactantes conhecidos é sintetizada por microrganismos cultivados em hidrocarbonetos imiscíveis em água, mas alguns são produzidos em substratos solúveis como glicose, glicerol e etanol (Tabatabaee *et al.* 2005). Eles podem se encontrar como moléculas intracelulares, serem secretados pelas células microbianas ou ficarem aderidos à sua superfície (Ron & Rosenberg 2001, Mariano *et al.* 2007, Cameotra & Singh 2009, Seo *et al.* 2009).

Estudos indicam que a produção de biossurfactantes por bactérias está ligada à alta densidade celular; a presença de biossurfactantes no ambiente desempenha um papel natural, aumentando a degradação de compostos hidrofóbicos, uma vez que aumentam a área superficial das gotas de óleo, permitindo o acesso de mais bactérias ao substrato, otimizando, por conseguinte, a produção de biomassa bacteriana (Mulligan *et al.* 2001, Ron & Rosenberg 2001, Yakubu 2007, Cameotra & Singh 2009).

DEGRADAÇÃO BACTERIANA DE HIDROCARBONETOS POR VIA AERÓBICA

Em bactérias aeróbicas, o oxigênio não é apenasceptor terminal de elétrons para a conservação da energia respiratória, mas também um reagente

indispensável no mecanismo de ativação (Widdel & Rabus 2001). As vias bacterianas de degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos podem ser geralmente, divididas em três partes: (1) O composto aromático é transformado em um metabólito intermediário central da via de degradação dos HAPs, normalmente um catecol, através da introdução de grupos hidroxila por enzimas periféricas, com função de reconhecer as moléculas dos HAPs e convertê-las em intermediários centrais (Bugg & Winfield 1998, Kanaly & Harayama 2000, Widdel & Rabus 2001, Scramin *et al.* 2003, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007); (2) As enzimas de fissão convertem os intermediários centrais em compostos que são utilizados nas vias comuns de geração de carbono e energia da bactéria. Ocorre, então, a abertura do anel do catecol por di-oxigenases, que catalisam a adição de oxigênio molecular ao anel. Esta abertura pode ocorrer em duas posições: entre os grupos hidroxila (clivagem intradiol ou orto), ou adjacente a um dos grupos hidroxila (clivagem extradiol ou meta) (Heider & Fuchs 1997, Bugg & Winfield 1998, Kanaly & Harayama 2000, Scramin *et al.* 2003, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007). As di-oxigenases intradiol, possuem como cofator o Fe^{3+} e produzem o ácido cis-cis-mucônico. Enquanto as di-oxigenases extradiol, dependem do Fe^{2+} , produzindo o semialdeído 2-hidroximucônico e podem ser subdivididas em proximais e distais, para caracterizar a posição da clivagem do anel em relação ao radical (Bugg & Winfield 1998, Kanaly & Harayama 2000, Scramin *et al.* 2003, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007); (3) O produto resultante da abertura do anel é convertido em produtos que entram no ciclo de Krebs. O ácido cis-cis-mucônico será convertido em succinato e acetil-Co-A e o semialdeído 2-hidroximucônico, será transformado em ácido pirúvico e acetaldeído (Kanaly & Harayama 2000, Scramin *et al.* 2003, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007).

DEGRADAÇÃO BACTERIANA DE HIDROCARBONETOS POR VIA ANAERÓBICA

A degradação de hidrocarbonetos em condições estritamente anóxicas foi confirmada no final da década de 1980 (Widdel & Rabus 2001, Díaz 2004). Enquanto a biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos tem sido

bem estudada desde o início do século XX, os registros sobre a biodegradação anaeróbica são relativamente recentes, tratando-se de uma área emergente, que tem sofrido rápidas mudanças (Widdel & Rabus 2001, Meckenstock *et al.* 2004, Foght 2008). Estudos têm mostrado que alguns passos enzimáticos chave na biodegradação de hidrocarbonetos anaeróbios envolvem microrganismos versáteis e singulares bioquimicamente, ativando hidrocarbonetos por mecanismos novos, que diferem completamente daqueles utilizados no metabolismo aeróbico (Widdel & Rabus 2001, Foght 2008).

Muitos ambientes poluídos por hidrocarbonetos são anóxicos, como por exemplo, aquíferos, sedimentos aquáticos e solos submersos. Em tais condições, a biodegradação é realizada por microrganismos anaeróbicos estritos ou facultativos, utilizando aceptores de elétrons como o nitrato (desnitrificantes), sulfato redutores, redutores de Fe^{3+} , CO_2 (organismos metanogênicos), ou outros aceptores (Mn, Cr, U, etc.) (Widdel & Rabus 2001, Díaz 2004, Chakraborty & Coates 2004, Foght 2008).

Condições metanogênicas e de sulfato redução fornecem pouca energia às bactérias, entretanto, são fundamentais no metabolismo de linhagens fermentativas, pois estas, em geral, não fazem a biodegradação completa dos HAPs, tornando-se energeticamente favoráveis apenas quando microrganismos metanogênicos ou bactérias redutoras de sulfato estão presentes no substrato, a fim de usar os produtos gerados durante a fermentação. Diferentemente, bactérias fotossintéticas obtêm energia da luz e degradam os compostos aromáticos anaerobicamente para formar metabólitos intermediários, como acetil-CoA, que são posteriormente utilizados em reações biossintéticas (Díaz 2004).

O catabolismo anaeróbico de compostos aromáticos pode ser dividido em três fases: (1) Os caminhos periféricos convergem para uma via central, formando um intermediário aromático, normalmente benzoil-CoA (Heider & Fuchs 1997, Chakraborty & Coates 2004, Díaz 2004, Foght 2008); (2) Ocorre a abertura do anel aromático, convertendo o composto em 3-hidroxipimelil-CoA, que sofre a ação de uma desidrogenase sendo formado predominantemente glutaril-CoA ou, alternativamente, acetil-CoA (Heider & Fuchs 1997); (3) A enzima glutaril-CoA

desidrogenase produz crotonil-CoA, e libera CO_2 . Segue-se então a transformação de crotonil-CoA em Acetil-CoA, que é oxidado, normalmente, via ciclo do ácido cítrico (Heider & Fuchs 1997).

Informações detalhadas sobre a degradação anaeróbica da HAPs são escassas, e há um debate se HAPs com três ou mais anéis podem servir de substrato de crescimento ou se são apenas parcialmente oxidados através de co-metabolismo com outros substratos (Meckenstock *et al.* 2004, Foght 2008).

Na última década, algumas culturas puras e mistas de anaeróbios foram obtidas, permitindo os primeiros estudos das vias de degradação anaeróbicas. Métodos de cultivo de microrganismos anaeróbios com HAPs como única fonte de carbono e energia foram estabelecidos em 2003, porém, mais bactérias precisam ser isoladas e suas vias degradativas estudadas, uma vez que os processos metabólicos se diferenciam entre as linhagens (Meckenstock *et al.* 2004, Foght 2008).

Um importante fator a ser investigado é se a capacidade degradativa dos organismos isolados em laboratório apresenta a mesma eficiência em condições de campo. Assim, técnicas moleculares podem auxiliar na identificação das linhagens ou comunidades microbianas que agem na degradação de HAPs *in situ* (Meckenstock *et al.* 2004, Foght 2008).

BIORREMEDIÇÃO MICROBIANA E SUAS VANTAGENS

O termo biorremediação pode ser definido como um processo que utiliza a biotecnologia na aceleração da transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos. Normalmente utiliza-se o metabolismo de microrganismos para eliminação rápida de poluentes, para reduzir sua concentração para níveis aceitáveis, transformá-los em compostos de baixa toxicidade, ou mesmo mineralizá-los completamente (Torsvik *et al.* 1990, Colla & Costa 2003, Mandri & Lin 2007, Yakubu 2007). Os processos de biorremediação baseiam-se nas atividades aeróbicas ou anaeróbicas de microrganismos denominados “petrófilos” (Boopathy 2000, Mandri & Lin 2007). Assim, vários tipos de microrganismos utilizam vias bioquímicas complexas para transformar os hidrocarbonetos

em intermediários comuns do seu catabolismo e, a partir daí, em fonte de carbono e energia para seu crescimento (Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007, Mandri & Lin 2007, Seo *et al.* 2009).

Vários aspectos da biorremediação a tornam uma opção atraente na degradação de petróleo, demonstrando vantagens sobre outros métodos de tratamento, pois consiste em um processo natural; algumas técnicas podem ser aplicadas *in situ* com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras. Além disso, muitos microrganismos degradam vários poluentes permanentemente, podendo, ainda, ser associados a métodos de tratamento físicos ou químicos (Boopathy 2000, Mandri & Lin 2007, Yakubu 2007). Nos últimos anos, diversas pesquisas têm indicado que a biorremediação é uma alternativa segura e eficaz de remoção de petróleo do ambiente (Díaz 2004, Yakubu 2007).

TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO E RESPECTIVAS APLICAÇÕES

As estratégias usadas para a biorremediação dos HAPs podem ser divididas entre as técnicas *in situ*, em que não há necessidade de remoção do substrato contaminado, realizando-se a biorremediação no próprio local poluído; e as técnicas *ex situ*, em que é necessário remover o substrato, procedendo-se a biorremediação em instalações apropriadas, fora do local contaminado (Boopathy 2000, Ramsay *et al.* 2000).

A técnica de bioaugmentação consiste na adição de culturas bacterianas com comprovada atividade degradadora dos poluentes a um local, garantindo que o consórcio adequado de microrganismos estará presente em suficientes tipos, número e compatibilidade a fim de metabolizar o poluente de forma eficaz. Esta técnica pode ser utilizada tanto *in situ* quanto *ex situ*, sendo particularmente importante para tratamentos *in situ*, quando não há populações microbianas indígenas capazes de degradar o contaminante (Jorgensen *et al.* 2000, Jacques *et al.* 2007, Mariano *et al.* 2007, Yakubu 2007, Foght 2008).

Outro método que pode ser realizado tanto *in situ* quanto *ex situ* é a bioestimulação. Entretanto, este só é eficaz quando há populações microbianas degradadoras no substrato (Yakubu 2007). A técnica

é realizada estimulando-se a microbiota indígena, otimizando suas condições de crescimento por meio da adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos, regulação de pH, temperatura e aeração (Jorgensen *et al.* 2000, Ramsay *et al.* 2000, Ebuehi *et al.* 2005, Jacques *et al.* 2007, Mandri & Lin 2007, Mariano *et al.* 2007, Yakubu 2007, Foght 2008).

A biorremediação intrínseca é uma técnica realizada *in situ*, sendo conhecida, também, como atenuação natural ou biorremediação passiva. Nesta técnica, o contaminante permanece no local e a descontaminação ocorre através de processos físicos, químicos e biológicos naturais, como volatilização, diluição, sorção e biodegradação. Normalmente, ocorre de maneira muito lenta, exigindo o monitoramento do local em longo prazo, visando a proteção da saúde humana e ambiental (Boopathy 2000, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007, Foght 2008).

O sistema de *landfarming* é aplicado para o tratamento da fase sólida de solos contaminados e pode ser realizado *in situ* ou *ex situ* (Boopathy 2000). Nesta técnica, os microrganismos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os poluentes transformando-os em substâncias inertes como CO₂ e água, por meio do revolvimento do solo e uso de aração, além da adição de nutrientes e, se necessário, de irrigação, bioaugmentação e surfactantes (Doelman & Breedvelk 1999 citado em Jacques *et al.* 2007, Jorgensen *et al.* 2000).

A técnica de *bioventing* ou bioventilação é normalmente utilizada para o tratamento de solos contaminados e baseia-se na introdução de oxigênio no substrato para estimular a atividade dos microrganismos aeróbios, podendo ser aplicada *in situ* ou *ex situ*, de acordo com o local a ser tratado (Boopathy 2000).

A compostagem é outro processo de descontaminação de solos, realizado por microrganismos aeróbios *ex situ*. No emprego desta técnica, o substrato contaminado é removido do local de origem e colocado em pilhas, com ou sem aeração, controlando-se a lixiviação e o escoamento superficial dos líquidos provenientes dessas pilhas (Jorgensen *et al.* 2000, Jacques *et al.* 2007).

Para o tratamento de líquidos ou suspensões *ex situ*, pode-se utilizar biorreatores. Neste método, a biodegradação ocorre em um recipiente ou reator (Boopathy 2000), onde o material contaminado é

misturado com água formando uma suspensão, com 5 a 50% de sólidos, que é agitada mecanicamente, aumentando a aeração, a homogeneidade dos poluentes e sua disponibilidade aos microrganismos. Parâmetros físicos e químicos, como pH, disponibilidade de nutrientes, aeração e temperatura são ajustados para a máxima produção de biomassa, sendo possível, ainda, bioaumentar o substrato. Após a redução dos contaminantes aos níveis desejados, a suspensão é desidratada e a água pode ser reutilizada no biorreator (Doelman & Breedvelk 1999 citado em Jacques *et al.* 2007, Woo & Park 1999, Van Hamme *et al.* 2003). A técnica possui a vantagem de degradar poluentes de maneira muito rápida. Deve-se, entretanto, considerar que quantidade de substrato tratado é limitada pelo tamanho dos biorreatores; em alguns casos, é necessário o pré-tratamento do substrato para remoção de compostos tóxicos aos microrganismos; além do custo elevado, devido à alta tecnologia empregada. Estes fatores restringem sua aplicação aos casos em que outras técnicas provavelmente não trariam resultados satisfatórios (Woo & Park 1999, Doelman & Breedvelk 1999 citado em Jacques *et al.* 2007, Van Hamme *et al.* 2003).

É possível utilizar biofiltros para realizar o tratamento de poluentes voláteis por meio da utilização de colunas de captação microbiana, evitando que os contaminantes sejam emitidos na atmosfera (Boopathy 2000).

O método conhecido como *pump and treat* é utilizado para o tratamento de águas subterrâneas, consistindo no seu bombeamento para a superfície, procedendo-se a descontaminação *ex situ* e posteriormente, pela reinjeção da água tratada (Boopathy 2000).

Segundo Mulligan *et al.* (2001), a utilização de biossurfactantes em diversos tipos de substrato contaminados proporciona altas taxas de remoção de poluentes. A adição destas substâncias a culturas puras ou em solo tem demonstrado aumentar a biodegradação de vários hidrocarbonetos, acelerando o processo de reparação (Ganeshlingam *et al.* 1994, Cameotra & Singh 2009). Assim, existe uma clara correlação entre produção de biossurfactante e utilização de hidrocarbonetos por microrganismos (Cameotra & Singh 2009). Estes compostos têm demonstrado maior versatilidade do que muitos surfactantes sintéticos, auxiliando na remediação da

poluição ambiental por petróleo tanto *in situ* quanto *ex situ* (Mulligan *et al.* 2001, Yakubu 2007).

FATORES INTERVENIENTES NA EFICIÊNCIA E APLICABILIDADE DA BIORREMEDIAÇÃO

A eficiência de cada processo de degradação depende de fatores físicos, químicos e biológicos como a biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, estrutura molecular do poluente e sua concentração. Diversos fatores ambientais que abrangem pH, temperatura, umidade, atividade de água, oxigênio dissolvido, nutrientes, fontes de carbono e energia a disponibilidade de receptores de elétrons, e a presença de co-metabólitos influenciam a utilização de poluentes pelos microrganismos (Boopathy 2000, Van Hamme *et al.* 2003, Jacques *et al.* 2007, Seo *et al.* 2009).

A umidade é considerada por Haider (1999), o fator ambiental mais crítico na biodegradação, uma vez que uma atividade microbiana elevada ocorre apenas com disponibilidade de água adequada. Entretanto, o teor de água no substrato tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio, ou seja, um alto teor de água, resulta em baixa concentração de O₂, causando prejuízos diretos à atividade dos microrganismos aeróbios, que são importantes agentes na degradação dos HAPs, (Leahy e Colwell 1990, Jacques *et al.* 2007). No entanto, em condições de hipóxia ou anoxia, as bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativas se tornam dominantes na comunidade microbiana devido à sua capacidade de usar aceptores de elétrons alternativos em substituição ao oxigênio (Johnsen *et al.* 2005, Cameotra & Singh 2009).

A temperatura é um fator físico que influencia o consumo de substrato pela microbiota, sua atividade metabólica, e por consequência, a biodegradação dos HAPs (Haider 1999). De acordo com Leahy & Colwell (1990), baixas temperaturas limitam a degradação destes poluentes, uma vez que o metabolismo microbiano diminui e a viscosidade dos HAPs aumenta nestas condições. Em contrapartida, em altas temperaturas, a toxicidade destes compostos aumenta. Assim, a degradação dos HAPs é melhorada na faixa de temperatura entre 30°C e 40°C, diminuindo a viscosidade dos compostos e aumentando o metabolismo microbiano.

O pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos (Jacques *et al.* 2007).

A presença e o teor de nutrientes inorgânicos exercem influência na atividade da microbiana. Os efeitos da adição de N e P demonstram resultados conflitantes, provavelmente devido às características de cada ambiente em relação aos teores de nutrientes, tipo de contaminante e população microbiana indígena (Leys *et al.* 2005). O ferro e o enxofre são outros nutrientes que podem influenciar na biodegradação de HAPs, pois desempenham funções celulares relacionadas ao seu metabolismo, como a participação na estrutura das enzimas que realizam sua degradação nas células microbianas (Jacques 2005).

A matéria orgânica consiste na fonte de carbono e energia para os microrganismos, ou seja, um alto teor de matéria orgânica está associado a uma maior abundância e diversidade microbiana. Níveis mais baixos de matéria orgânica, normalmente, relacionam-se com uma menor abundância bacteriana (Boopathy 2000). Em contrapartida, uma grande quantidade de matéria orgânica, está normalmente relacionada a substratos de partículas finas, que propiciam a sorção dos HAPs. Em virtude da baixa solubilidade em água e da forte tendência de sorção dos HAPs às partículas sólidas, sua biodisponibilidade aos microrganismos degradadores é reduzida (Johnsen *et al.* 2005, Cameotra & Singh 2009).

A biodegradação pode ainda, ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar os poluentes ou por condições ambientais desfavoráveis à sobrevivência e atividade dos microrganismos degradadores (Johnsen *et al.* 2005, Jacques *et al.* 2007). A produção de metabólitos tóxicos, repressão de enzimas, presença de substratos preferenciais, e a falta de substratos indutores podem, também, ser considerados como fatores limitantes (Boopathy 2000, Van Hamme *et al.* 2003, Jacques *et al.* 2007).

A biorremediação deve ser adaptada às condições locais específicas, havendo necessidade caracterizar o ambiente a ser tratado e de fazer estudos prévios

em pequena escala antes da limpeza do local contaminado (Boopathy 2000, Mariano *et al.* 2007), com a finalidade de esclarecer alguns fatores a se considerar antes de escolher e aplicar uma técnica de biorremediação, dentre os quais, podemos citar: (i) se o contaminante é biodegradável; (ii) se a biodegradação está ocorrendo naturalmente no local contaminado; (iii) se as condições ambientais são adequadas para a biodegradação; (iv) se o poluente não for completamente degradado, qual será o comportamento do material residual (Boopathy 2000).

Alguns dos critérios não-técnicos que afetam a aplicabilidade das técnicas de biorremediação também devem ser considerados, pois a técnica escolhida deve ser capaz de alcançar a limpeza necessária; possuir custo vantajoso em relação a outras opções de remediação; possibilidade de contaminantes residuais após a biorremediação em níveis aceitáveis; percepção pública e regulatória favorável; capacidade de cumprir as limitações de tempo e espaço (Boopathy 2000).

Outros fatores constituem limitações ao uso da biorremediação, como a questão econômica e a responsabilidade ambiental. Clientes e agências reguladoras, normalmente, avaliam a biorremediação de forma rigorosa, uma vez que se trata da aplicação de técnicas inovadoras, há imposição de normas rígidas e exigência de maior desempenho do que para tecnologias convencionais. Assim, o investimento em biorremediação tem sido lento e, por conseguinte, esta atividade em escala comercial ainda fica aquém de outros setores industriais (Boopathy 2000).

PRINCIPAIS BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO

Desde a década de 1950, bactérias degradadoras de compostos do petróleo vêm sendo isoladas. Os principais gêneros são *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*,

Streptomyces e *Vibrio* (Crapez *et al.* 2002, Jacques *et al.* 2007, Mandri & Lin 2007, Seo *et al.* 2009).

A biodegradação do petróleo em ambientes naturais ou em laboratório, não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com microrganismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo (Crapez *et al.* 2002, Tiburtius *et al.* 2004, Jacques *et al.* 2007).

Nos últimos anos, diversas pesquisas começaram a se voltar ao estudo de tais consórcios, que têm demonstrado maior eficiência do que as culturas puras na degradação de poluentes do petróleo, podendo mineralizar completamente estes compostos devido à complementaridade metabólica entre seus membros (Crapez *et al.* 2002, Van Hamme *et al.* 2003, Tiburtius *et al.* 2004, Jacques *et al.* 2007).

A complementaridade metabólica em consórcios microbianos é essencial para a degradação de alguns hidrocarbonetos, uma vez que estes podem apresentar toxicidade para certos microrganismos e, em contrapartida, servir de fonte de carbono para outros. Assim, o metabolismo de compostos tóxicos por alguns microrganismos resistentes, gera subprodutos que serão utilizados por outras espécies como substrato de crescimento (Van Hamme *et al.* 2003, Tiburtius *et al.* 2004).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de biorremediação constituem uma boa alternativa na descontaminação de ambientes poluídos por petróleo e seus derivados, apresentando, na maioria das vezes, baixo custo de implementação, e menor risco ambiental do que técnicas de limpeza que envolvem processos físicos e químicos. Para a biorremediação ser bem sucedida, as técnicas utilizadas necessitam da presença de microrganismos com capacidade fisiológica e metabólica para degradar os poluentes do local, além de alguns fatores físico-químicos do ambiente que favoreçam sua atividade (Boopathy 2000). Compreender como estes fatores afetam a transformação de um

determinado HAP é difícil e entender os processos em ambientes naturais onde misturas de HAPs estão presentes é ainda mais complexo (Van Hamme *et al.* 2003). A contaminação pode ocorrer em substratos multifásicos, heterogêneos, haver associação do contaminante com partículas e sua dissolução em líquidos. Assim, o estudo da ecologia microbiana tem aumentado nos últimos anos, e, com uma abordagem interdisciplinar, envolvendo microbiologia, biologia molecular, engenharia, ecologia, geologia e química, tem fornecido informações úteis para a melhoria das estratégias de biorremediação, além de permitir avaliar o impacto da técnica utilizada sobre os ecossistemas (Boopathy 2000).

AGRADECIMENTOS: Ao Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pelo fornecimento da infra-estrutura necessária para o desenvolvimento deste estudo. Ao INCT - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Transferência de Materiais Continente-Oceano (Proc. 573.601/2008-9). CER recebe apoio do CNPq (PQ 306.234/2007-6) e FAPERJ (E-26/102.697/2008), ADG recebe apoio da CAPES (AUX-PE-PNPD-2303/2008) e RMCWT recebe apoio FAPERJ (E-26/101.829/2008).

REFERÊNCIAS

- BOOPATHY, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63-67.
- BUGG, T.D.H. & WINFIELD, C.J. 1998. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports*: 513-530.
- CAMEOTRA, S.S. & SINGH, P. 2009. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial Cell Factories*, 8:16.
- CHAKRABORTY, R. & COATES, J.D. 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 437-446.
- CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J. & DESSERT, D. 1991. Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. *Nature*, 351: 640-642.
- COLLA, L.M. & COSTA J.A.V. 2003. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, Rio Grande, 13: 85-103.
- CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S. & PEREIRA, D.C. 2002. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência Hoje*, 30: 179.

- DAGLEY, S.A. (1975). Biochemical approach to some problems of environmental pollution. *Essays in Biochemistry*, 11: 81-138.
- DESAI, J.D. & BANAT, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1): 47-64.
- DÍAZ, E. 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, 7: 173-180.
- EBUEHI, O.A.T.; ABIBO, I.B.; SHEKWOLO, P.D.; SIGISMUND, K.I.; ADOKI, A. & OKORO, I.C. 2005. Remediation of Crude Oil Contaminated Soil by Enhanced Natural Attenuation Technique. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 9 (1): 103-106.
- FERGUSON, A.S.; HUANG, W.E.; LAWSON, K.A.; DOHERTY, R.; GIBERT, O.; DICKSON, K.W.; WHITELEY, A.S.; KULAKOV, L.A.; THOMPSON, I.P.; KALIN, R.M. & LARKIN, M.J. 2007. Microbial analysis of soil and groundwater from a gasworks site and comparison with a sequenced biological reactive barrier remediation process. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1227-1238.
- FOGHT, J. 2008. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology*, 15: 93-120.
- GANESHALINGAM, S.; LEGGE, R.L. & ANDERSON, W.A. 1994. Surfactant enhanced leaching of polyaromatic hydrocarbons from soil. *Process Safety and Environmental Protection*, 72: 247-251.
- HAIDER, K. 1999. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: Adriano, D.C. et al. (Ed). *Bioremediation of contaminated soils*. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p. 33-51.
- HEIDER, J. & FUCHS, G. 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 243: 577-596.
- HOPPER, D.J. 1991. Aspects of the Degradation of Aromatics by Microorganisms. In: Betts, W.B. (org), *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. London. Spring-Verlang Limited. p. 69-89.
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I. & CAMARGO; F.A.O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, 37 (4): 1192-1201.
- JACQUES, R.J.S. 2005. Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. 188p.
- JOHNSEN, A.R.; WICK, L.Y. & HARMS, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133: 71-84.
- JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN J. & SUORTTI A-M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 107: 245-254.
- KANALY, R.A.; BARTHA, R.; WATANABE, K. & SHIGEAKI, H. 2000. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10): 4205-4211.
- KANALY, R.A. & HARAYAMA, S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182 (8): 2059-2067.
- LEAHY, J.G. & COLWELL, R.R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54 (3): 305-315.
- LEYS, N.M.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W. & SPRINGAEL, D. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 66 (6): 726-736.
- MANIASSO, N. 2001. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, 24 (1): 87-93.
- MANDRI, T. & LIN, J. 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6 (1): 023-027.
- MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F. & BONOTTO, D.M. 2007. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 346-353.
- MARTINS, B.A.D. 2004. Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil. 86p.
- MECKENSTOCK, R.U.; SAFINOWSKI, M. & GRIEBLER, C. 2004. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, 12: 257-276.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. & GIBBS, B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60: 371-380.
- NITSCHKE, M. & PASTORE, G.M. 2002. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*, 25 (5): 772-776.

- RAMSAY, M.A.; SWANNELL, R.P.J.; SHIPTON, W.A.; DUKE, N.C. & HILL, R. T. 2000. Effect of biorremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 41 (7-12): 413-419.
- RON, E.Z. & ROSENBERG, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3 (4): 229-236.
- SCRAMIN, S.; DENTZIEN, A.F.M. & MELO, I.S. 2003. Indução da enzima pirocatecase por *Acinetobacter baumannii* envolvida na biodegradação do herbicida Diuron. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13: 113-118.
- SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. 2009. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* . 6: 278-309.
- SMITH, M.R. 1990. The biodegradation of aromatics hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*,1: 191-206.
- TABATABAEE, A.; MAZAHARI ASSADI, M.; NOOHI, A.A. & SAJADIAN, V.A. 2005. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering*, 2 (1): 6-12.
- TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P. & LEAL, E.S. 2004. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, 27 (3): 441-446.
- TORSVIK, V.; SALTE, K.; SORHEIM, R. & GOKSOYR, J. 1990. Comparison of Phenotypic Diversity and DNA Heterogeneity in a Population of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (3): 776-78.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. & WARD, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 503-549.
- WIDDEL, F. & RABUS, R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 259-276.
- WOO, S.H. & PARK, J.M. 1999. Evaluation of drum bioreactor performance used for decontamination of soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74:937-944.
- YAKUBU, M.B. 2007. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, 6 (24): 2735-2739.
- YU, S.H.; KE, L.; WONG, Y.S. & TAM, N.F.Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, 31: 149-154.
- ZHOU, H.W.; WONG, A.H.Y.; YU, R.M.K.; PARK, Y.S. & TAM, N.F.Y. 2009. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *Microbial Ecology*, 58: 153-16.

Submetido em 14/09/2010

Aceito em 18/11/2010