

## BIORREMEDIAÇÃO EM SEDIMENTOS DE PRAIAS ARENOSAS UTILIZANDO *Bacillus* ISOLADOS DE SOLO DE FLORESTA

CRAPEZ, M. A. C.; TOSTA, Z. T.; BISPO, M. G. S.; MESQUITA, A. C.; LOGULLO, C. J.  
& CORRÊA-JÚNIOR, J. D.

### Resumo:

*Bacillus* são bactérias Gram positivas, capazes de degradarem substâncias aromáticas. Com a utilização de meios de cultura seletivos, tendo ácido benzóico 5mM como fonte de carbono, foram isoladas treze estirpes de *Bacillus* de amostras de solo da Floresta da Tijuca (22° 50' S e 43° 15' W). Amostras de sedimentos de praias arenosas foram coletadas em Angra dos Reis (23° 30' S e 44° 25' W) contendo 0,33; 1,54 e 1,78% de óleos e graxas. A taxa de mineralização nas amostras contendo apenas a microbiota autóctone foi de 3; 1,65 e 0,8% de CO<sub>2</sub> por hora para 0,33; 1,54 e 1,78% de óleos, respectivamente. Quando as amostras foram inoculadas com as estirpes de *Bacillus*, a taxa de mineralização aumentou para 4,65; 3,4 e 2% de CO<sub>2</sub> por hora para 0,33; 1,54 e 1,78% de óleos, respectivamente. Estes resultados mostraram que a presença de *Bacillus* aumentou a produção de CO<sub>2</sub> em 2.5 vezes nos sedimentos com 1,78% de óleo, 2 vezes nos sedimentos com 1,54% de óleo e 1,5 vezes nos sedimentos com 0,33% de óleo. A inoculação de estirpes de *Bacillus* nos sedimentos de praias arenosas foi suficiente para induzir um aumento na taxa de degradação do óleo.

Palavras-chave: *Bacillus*, biorremediação, sedimentos marinhos, solo de floresta.

### Abstract:

**“Bioremediation in marine sediments with *Bacillus* strain selected in samples from forest soil”**

*Bacillus* are a Gram positive bacteria developing high capability of degrading aromatic compounds. By using selective culture media with benzoic acid 5mM as carbon source, thirteen strains of *Bacillus* were selected in samples from Floresta da Tijuca soil (22° 50' S and 43° 15' W). Samples of marine sediments from Angra dos Reis (23° 30' S and 44° 25' W) were collected and examined for oil mixtures (0.33; 1.54 and 1.78%). The rate of oil mineralization in the marine sediments by the autochthonous microbial communities were 3; 1.65 and 0.8% of CO<sub>2</sub> per hour to 0.33; 1.54 and 1.78% of oil, respectively. When the samples were inoculated with *Bacillus* strain, the degree of oil mineralization increased 4.65; 3.4 and 2% of CO<sub>2</sub> per hour to 0.33; 1.54 and 1.78% of oil, respectively. These results show that the presence of *Bacillus* strain increased the CO<sub>2</sub> production 2.5 folds in sediments with 1.78% of oil, 2 folds in sediments with 1.54% of oil and 1.5 folds in sediments with 0.33% of oil content. The autochthonous microbial communities have a slow response to oil. However, the inoculation of a adapted *Bacillus* strain is sufficient to induce an increase in the oil degradation.

Key-words: *Bacillus*, bioremediation, marine sediments, soil forest.

## Introdução

Hidrocarbonetos de petróleo são biogênicos quanto a origem e através do tempo foram alterados por processos geoquímicos e por refinamento. Como poluentes, ocupam posição intermediária entre as substâncias biodegradáveis e altamente recalcitrantes (Bartha, 1986). Por milhões de anos, eles entraram na biosfera de maneira gradual, devido ao processo de erosão. Com a civilização industrial, o transporte através dos oceanos e sua exploração neste ecossistema, causou acidentes como o de Torrey Canyon - 1967, Amoco Cadiz - 1978 e Exxon Valdez - 1989. Estes acidentes foram responsáveis por significativos efeitos na biota marinha e os especialistas afirmam que o equilíbrio ecológico natural só será restaurado entre seis e dez anos (Laubier, 1991).

A biodegradação de petróleo é um processo complexo e depende tanto de fatores abióticos como das comunidades microbianas envolvidas (Swindoll *et al.*, 1988; Leahy & Colwell, 1990; Xu *et al.*, 1995). Em ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo, a população bacteriana hidrocarbonoclástica pode variar entre 0,003% e 100,0% (Mulkins-Phillips & Stewart, 1974; Hollaway *et al.*, 1980). Em áreas produtoras e nas vias de transporte tanto do petróleo bruto como dos seus produtos, o desenvolvimento de comunidades bacterianas específicas é predominante (Atlas & Bartha, 1973; Colwell *et al.*, 1973; Walker & Colwell, 1975; Crapez *et al.*, 1993).

Em ecossistemas marinhos de regiões temperadas, devido a derrames e transporte de petróleo, o emprego da biorremediação está se tornando usual nos processos de recuperação ambiental (Chianelli *et al.*, 1991; Jones & Greenfield, 1991; Bragg *et al.*, 1990). Segundo Prince (1993), biorremediação pode ser definida como um processo de aceleração da biodegradação natural de substâncias orgânicas recalcitrantes ou em concentrações xenobióticas. Ela pode envolver populações microbianas autóctones de um ambiente impactado; adição de estirpes microbianas isoladas de um outro ambiente ou o uso de estirpes oriundas da bioengenharia, que contenham vias degradativas específicas. A partir da conceituação estabelecida por Prince (1993), foram isoladas estirpes de **Bacillus** de solo da Floresta da Tijuca, RJ, para serem utilizadas em ensaios de biorremediação em sedimentos de praias arenosas da região de Angra dos Reis, RJ, que continham hidrocarbonetos de petróleo em diversas concentrações. **Bacillus** são bactérias Gram-positivas, capazes de formar endosporos, aeróbias e mesófilas, de grande diversidade nutricional, sendo capazes de degradar diversas substâncias aromáticas (Gordon *et al.*, 1973; Crapez 1982; Noeth *et al.*, 1988). O isolamento e a manutenção de **Bacillus** em meios de cultura específicos favorecem a atividade hidrocarbonoclástica; em meios de cultura complexos fica afetada a aptidão para degradar aromáticos (Crapez *et al.*, 1986).

## Material & Métodos

Na Floresta da Tijuca, RJ (22° 50' S e 43° 15' W), foram coletadas amostras de solo nas profundidades de 0-, 10-, 15- e 20 cm. A coleta foi realizada pelo método de estudo de diversos horizontes no mesmo perfil: foi escavado o solo até a profundidade de 20 cm, para colocar em evidência todo o conjunto do perfil; em seguida uma das paredes foi colocada em plano vertical e procedeu-se a coleta da terra nas profundidades já determinadas anteriormente. As amostras foram pesadas e distribuídas em meios de cultura contendo meio mineral e fontes de carbono e de energia. O meio mineral é composto de:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 3,57g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,98g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,03g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,5g; solução de oligoelementos - 0,2ml; água destilada - 1000ml (Crapez, 1982). As fontes de carbono e de energia foram bacto-peptona (2,00g/l), ácido benzóico (8mM) e fenol (8mM). Nestes meios de cultura foi feita a enumeração da população de *Bacillus*, pelo método NMP (APHA, 1989). Para o isolamento de *Bacillus* foi utilizado meio de cultura contendo ácido benzóico (5mM) (Crapez, 1982). Através de passagens sucessivas em meios de cultura sólido/líquido/sólido foram obtidas culturas puras. A nutrição carbonada foi estudada utilizando as seguintes substâncias na concentração de 2,00g/l: D- e L-arabinose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manitol, rafinose, ribose, sacarose, trealose, xilose, acetato de sódio, glutamato de sódio, alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, triptofano, treonina, valina, asparagina, glutamina, ácido benzóico (8mM e 10mM), benzeno (8mM), benzoaldeído (8mM), fenol (3mM), nitrobenzeno (8mM), naftaleno (8mM) e tolueno (8-, 10- e 15mM).

Em Angra dos Reis, RJ (23° 30' S e 44° 25' W), foram coletados sedimentos superficiais (0-10 cm), com amostrador em PVC, na região entre marés das praias de Biscaia, Gambelo e Caetés. A população de *Bacillus* foi enumerada com o mesmo procedimento das amostras da Floresta da Tijuca. O teor de óleos e graxas foi determinado na PETROBRÁS/CENPES/SEBIO, utilizando um Oil Content Analyzer Horiba OCMA 220, específico para ligações C-H. Os teores de carbono e de matéria orgânica foram determinados tanto nas amostras da Floresta da Tijuca como nas de Angra dos Reis (Embrapa, 1979).

Na biorremediação, utilizou-se para o controle alíquotas de 50 g de sedimento úmido de cada praia, que foram incubadas à temperatura ambiente, em recipientes de 250ml hermeticamente fechados. Para o experimento foram selecionadas duas estirpes de *Bacillus*, TQ3 e TV4, isoladas de solo da Floresta da Tijuca nas profundidades de 15- e 20 cm e que cresceram em meio de cultura contendo ácido benzóico (10mM). O inóculo foi preparado com as estirpes TQ3 e TV4 crescendo em meios de cultura líquidos com ácido benzóico (5mM) como fonte de carbono e de energia. Após crescimento, as células foram centrifugadas e contadas. Em seguida, alíquotas de 50 g de sedimento úmido de cada praia foram inoculadas com  $10^5$  células

Tabela I. Índice médio de utilização (IMU) de aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos e aromáticos por *Bacillus* isolados de amostras de solo da Floresta da Tijuca, nas profundidades de 0-, 15- e 20 cm.

Profundidade (cm)	Fontes de Carbono	IMU (%)
0	ácido aspártico e glutâmico, prolina, isoleucina, D- e L- arabinose, frutose, galactose, glicose, maltose, sacarose, trealose, glutamato de sódio, ácido benzóico 8mM, benzeno 8mM, fenol 3mM e tolueno 8mM	100
	alanina e arginina	80
	leucina, glutamina, lactose e rafinose	60
	lisina e histidina	40
	fenilalanina, nitrobenzeno 8mM e acetato de sódio	20
15	ácido aspártico e glutâmico, prolina, D- e L- arabinose, frutose, galactose, glicose, maltose, sacarose, trealose, glutamato de sódio, ácido benzóico 8mM, benzeno 8mM, fenol 3mM e tolueno 8mM	100
	isoleucina, leucina, lisina e glutamina	75
	alanina, arginina, asparagina, manitol e acetato de sódio	50
	histidina, fenilalanina, glicina metionina, serina, lactose, rafinose, ácido benzóico 10mM e nitrobenzeno 8mM	25
20	ácido aspártico e glutâmico, prolina, alanina, D- e L- arabinose, frutose, galactose, glicose, maltose, sacarose, trealose, glutamato de sódio, ácido benzóico 8mM, benzeno 8mM, fenol 3mM e tolueno 8mM	100
	arginina e leucina	75
	isoleucina, lisina, glutamina, asparagina, serina, lactose e rafinose	50
	histidina, valina, manitol, ácido benzóico 10mM e acetato de sódio	25

### Biorremediação

Nos ensaios com os microcosmos formados por sedimentos contendo apenas a microbiota autóctone, a praia de Biscaia, com o menor teor de óleos e graxas,  $0,33 \pm 0,01\%$ , foi a que apresentou maior produção de  $[\text{CO}_2]$ , vindo Gambelo em posição intermediária com  $1,54 \pm 0,02\%$  de óleos e graxas e por último Caetés, com  $1,78 \pm 0,02\%$  de óleos e graxas (Fig. 1). Os valores médios de mineralização foram  $3,05 \pm 0,01\%$  (Biscaia),  $1,65 \pm 0,01\%$  (Gambelo) e  $0,80 \pm 0,01\%$  (Caetés) de  $[\text{CO}_2] \text{ h}^{-1}$ . Nos ensaios de biorremediação onde, além da microbiota autóctone, foram inoculadas as estirpes de *Bacillus* TQ3 e TV4 isoladas de solo da Floresta da Tijuca, houve aumento na produção de  $[\text{CO}_2]$  em relação aos experimentos controle, seguindo a ordem decrescente quantitativa de Biscaia para Gambelo e, finalmente, Caetés (Fig. 1). Os valores médios de mineralização ao longo do experimento foram  $4,65 \pm 0,02\%$  (Biscaia),  $3,40 \pm 0,01\%$  (Gambelo) e  $2,00 \pm 0,01\%$  (Caetés) de  $[\text{CO}_2] \text{ h}^{-1}$ . A análise de variância mostrou uma diferença significativa entre os três grupos analisados, praias de Biscaia, Gambelo e Caetés, sendo  $H = 33.06386$ . O teste de Tukey, realizado a posteriori, indicou que os grupos analisados são diferentes entre si, sendo esta diferença altamente significativa: Biscaia x Gambelo =  $0,002282$ ; Biscaia x Caetés =  $0,000022$  e Gambelo x Caetés =  $0,002579$ .

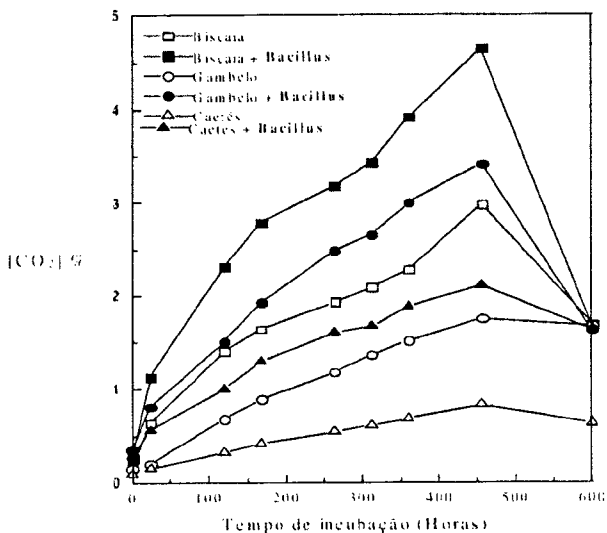


Figura 1. Bioremediação em sedimentos das praias de Biscaia, Gambelo e Caetés, utilizando estirpes de *Bacillus* isoladas da Floresta de Tijuca, RJ.

A produção máxima de  $[CO_2]$  ocorreu às 450 horas, com decréscimo às 600 horas. A produção de  $[CO_2]$  está relacionada com a concentração de óleos e graxas do sedimento, isto é, quanto maior o teor, menor é a taxa respiratória da microflora autóctone, visto que, no experimento controle, a praia de Caetés com  $1,78 \pm 0,02\%$  de óleos e graxas, produziu apenas  $0,80 \pm 0,01\% [CO_2] h^{-1}$  (Fig. 1). Nos ensaios de biorremediação, quando foram inoculadas as estirpes de *Bacillus*, a produção de  $[CO_2]$  aumentou em relação aos controles, que só continham a microflora autóctone, mantendo ainda assim a ordem Biscaia > Gambelo > Caetés. No entanto, a praia de Caetés, com a biorremediação, produziu  $2,00 \pm 0,01\% [CO_2] h^{-1}$  (Fig. 1).

### Discussão

Sharabi & Bartha (1993) classificaram o ácido benzóico como aromático menos complexo e com maior grau de biodegradação no ambiente. A adição de ácido benzóico (5mM) ao meio de cultura atuou seletivamente sobre a microbiota autóctone das amostras de solo, permitindo o isolamento de treze estirpes de *Bacillus* capazes de degradarem vários aromáticos (Tab. I). A nutrição carbonada permitiu a escolha das estirpes TQ3 e TV4 crescendo em ácido benzóico (10mM), fonte de carbono e de energia a nível xenobiótico. Nos ensaios de biorremediação, as estirpes TQ3 e TV4

potencializaram a biodegradação de óleos e graxas, aumentando a produção de [CO<sub>2</sub>] em 2,5 vezes nos sedimentos com 1,78±0,02% de óleos e graxas (Caetés), em 2,0 vezes nos sedimentos com 1,54±0,02% de óleos e graxas (Gambelo) e em 1,5 vezes nos sedimentos contendo 0,33±0,01% de óleos e graxas (Biscaia)(Fig.1).

Segundo Alexander (1994), a entrada de substâncias orgânicas no ambiente seleciona microbiota específica, que se torna aclimatada adquirindo ou desreprimindo vias metabólicas capazes de reconhecerem essas substâncias para, logo em seguida, ser iniciado o processo de biodegradação. Robinson *et al.* (1990) obtiveram maior velocidade na degradação de tolueno em sistemas contendo bactérias aclimatadas à biodegradação desta substância. Resultados semelhantes foram também obtidos com outras substâncias, sugerindo que a presença de um hidrocarboneto aromático funciona como um estímulo prévio a seleção e aclimação de microbiota hidrocarbonoclástica, que também adquire capacidade para degradar substâncias análogas (Wiggins & Alexander, 1988; Ensign *et al.*, 1992; Fan & Scow, 1993). A presença de óleos e graxas nos sedimentos das três praias de Angra dos Reis e os resultados obtidos nos experimentos controle e de enumeração, evidenciaram microbiota hidrocarbonoclástica autóctone aclimatada capaz de biodegradar óleos e graxas presentes no ambiente. No entanto, essas comunidades apresentaram baixa resposta à biodegradação de óleos e graxas. Os resultados dos ensaios de biorremediação evidenciaram que as estirpes de *Bacillus* obtidas de solo de floresta e cultivadas em presença de substrato aromático em concentração xenobiótica, quando inoculadas às amostras de sedimentos das praias, induziram um aumento na taxa de biodegradação de óleos e graxas, de acordo com Alexander (1994) e Prince (1993). As estirpes selecionadas para os ensaios de biorremediação apresentaram comportamento euribiótico ao serem inoculadas aos sedimentos contendo óleos e graxas e a atuação foi sinérgica em relação às comunidades microbianas dos sedimentos das praias de Biscaia, Gambelo e Caetés.

### Agradecimentos

Agradecemos a PETROBRÁS/CENPES/SEBIO-RJ, pelas análises realizadas em seus laboratórios.

### Referências bibliográficas

- ALEXANDER, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, N. Y., 302 pp.
- APHA 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*: Clesceri, L. S.; A. E. Greenberg & R. R. Trussel (eds). 17<sup>th</sup> edição. American Public Health Association. Washington, D. C, 208 pp.

- ATLAS, R. M. & R. BARTHA 1973. Abundance, distribution and oil biodegradation potential of microorganisms in Raritan Bay. *Environmental Pollution*, **4**: 291-300.
- BRAGG, J. R.; J. C. ROFALL & S. McMILLEN 1990. *Columnflow Studies of Bioremediation in Prince William Sound*. Exxon Production Research Company. vol. 1. 29 pp.
- BARTHA, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology*, **12**: 155-172.
- CHIANELLI, R. R.; T. ACZEL; R. E. BARE; G. N. GEORGE; M. W. GENOWITZ; M. J. GROSSMAN; C. E. HAITH; F. J. R. KAISER; R. LESSARD; R. LIOTTA; R. L. MASTRACCHIO; V. MINAK-BERNERO; R. C. PRINCE; W. K. ROBBINS; E. I. STIEFEL; J. B. WILKINSON; S. M. HINTON; J. R. BRAGG; S. J. McMILLEN & R. M. ATLAS 1991. Bioremediation technology development and application to the Alaskan spill. *International Oil Spill Conference, Section VIII*: 549-558.
- CRAPEZ, M. A. C. 1982. *Isolement à Partir du Sol et Étude de Bactéries Aérobies Sporullées Dégradant Composés Aromatiques*. Tese de Doutorado. Université D'Aix-Marseille II. 76 pp.
- CRAPEZ, M. A. C.; Z. T. TOSTA & T. P. LACERDA 1986. Caracterização fenotípica de estirpes de **Bacillus circulans** pertencentes a American Type Culture Collection (ATCC). *Revista Microbiologia*, **19**: 347-353.
- CRAPEZ, M. A. C.; A. C. MESQUITA & C. J. LOGULLO 1993. Distribution of microbial population and biodegradation of aromatic compounds in Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Third Latin American Congress on Organic Geochemistry*: 35-36.
- COLWELL, R. R.; J. D. WALKER & J. D. NELSON 1973. Microbial ecology and the problem of petroleum degradation in Chesapeake Bay. pp. 185-197. In: Ahearn, D. G. & Meyers, S. P. (eds.). *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*. Publication n° LSU-SG-7301. Center for Wetland Resouces, Louisiana State University, Baton Rouge.
- EMBRAPA 1979. *Manual de Métodos de Análise de Solo - Análises Químicas*. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, Rio de Janeiro, Parte 2.
- ENSGN, S. A.; M. R. HYMAN & D. J. ARP 1992. Cometabolic degradation of chlorinated alkenes by alkene monooxygenase in a propylene-grown **Xanthobacter** strain. *Applied Environmental Microbiology*, **58**: 3038-3046.

- FAN, S. & K. M. SCOW 1993. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Applied Environmental Microbiology*, **59**: 1911-1918.
- GORDON, R. E.; W. C. HAYNES & C. H. N. PANG 1973. *The Genus Bacillus*. Agriculture Handbook. Dept. Agriculture, nº 427. Washington. 283 pp.
- HOLLAWAY, S. L.; G. M. FAW & R. K. SIZEMORE 1980. The bacterial community composition of an active oil field in the northwestern Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, **11**: 153-156.
- JONES, M. A. & J. F. GREENFIELD 1991. In situ comparison of bioremediation methods for a number 6 residual fuel oil spill in Lee County, Florida. *International Oil Spill Conference, Section VIII*: 533-540.
- LAUBIER, L. 1991. Les marées noires: conséquence a long terme. *La Recherche*, **22**: 814-823.
- LEAHY, J. G. & R. R. COLWELL 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, **54**: 305-315.
- MULKINS-PHILLIPS, G. J. & J. E. STEWART 1974. Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria in northwestern Atlantic water and coastal sediments. *Canadian Journal Microbiology*, **20**: 955-962.
- NOETH, C.; T. J. BRITZ & W. A. JOUBERT 1988. The isolation and characterization of the aerobic endospore-forming bacteria present in the liquid phase of an anaerobic fixed-bed digester, while treating a petrochemical effluent. *Microbial Ecology*, **16**: 233-240.
- PRINCE, R. C. 1993. Petroleum spill bioremediation in marine sediments. *Critical Review Microbiology*, **19**: 217-242.
- ROBINSON, K. G.; W. S. FARMER & J. T. NOVAK 1990. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Water Research*, **24**: 345-350.
- SHARABI, N. E. D. & R. BARTHA 1993. Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. *Applied Environmental Microbiology*, **59**: 1201-1205.
- SWINDOLL, C. M.; C. M. AELION & F. K. PFAENDER 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Applied Environmental Microbiology*, **54**: 212-217.

- WALKER, J. D. & R. R. COLWELL 1975. Some effects of petroleum on estuarine and marine microorganisms. *Canadian Journal Microbiology*, **21**: 305-313.
- WIGGINS, B. A. & M. ALEXANDER 1988. Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Applied Environmental Microbiology*, **54**: 2803-2807.
- XU, J. G.; Y. FENG; R. L. JOHNSON & D. H. McNABB 1995. Pore structures of oil contaminated, aggregated oil-contaminated and uncontaminated soil in relation to microbial activities. *Environmental Technology*, **16**: 587-594.

### Endereço

CRAPEZ, M. A. C.; TOSTA, Z. T.; BISPO, M. G. S.; MESQUITA, A. C.; LOGULLO, C. J. & CORRÊA-JÚNIOR, J. D.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Cx. Postal 100436, CEP 24241-970, Niterói, Rio de Janeiro, Telefax (021) 719-5934.