

BIODEGRADAÇÃO DE BTX UTILIZANDO MICROORGANISMOS SELECIONADOS DE SOLOS E EFLUENTES INDUSTRIAIS

Maria Vanessa Oliveira¹ | Sandra Silva¹ | Taciane Maíra Costa¹ | Alvaro Silva Lima²

Engenharia Ambiental



ISSN IMPRESSO: 1980 - 1777
ISSN ELETRÔNICO: 2316 - 3135

RESUMO

Com a exploração e comercialização do petróleo e de seus derivados, vazamentos indevidos e acidentais vêm provocando graves danos ao meio ambiente, o que torna imprescindível o desenvolvimento de tratamentos. Uma estratégia para a eliminação dos BTX (benzeno, tolueno e isômeros de xilenos) é através da biorremediação, na qual os microorganismos que apresentam capacidade de metabolizar estes compostos irão transformá-los em substâncias inertes. O objetivo deste trabalho é selecionar microorganismos que degradem BTX, assim como averiguar a degradação microbiana dos compostos. Foi utilizada a metodologia qualitativa para averiguação dos microorganismos potenciais a degradar BTX na qual se utiliza corante 2,6-diclofenol-indofenol (DCPIP). Observou-se que dos 33 microorganismos 4 são aptos a degradar BTX. Estes microorganismos (Biopetros 01 a 04) foram submetidos a fermentações, nas quais foram avaliados parâmetros como testes de pH, DQO, concentração de proteína, massa celular seca e redução da concentração de BTX. Foram obtidas porcentagens de redução de DQO satisfatórias utilizando os Biopetros 01, 02 e 03, nos testes que quantificam a degradação de BTX, realizados por análises de cromatografia (CG/EM) detectaram-se remoções destes solventes apesar da perda dos mesmos por volatilização, na qual o Biopetro 03 apresentou os melhores resultados para o Benzeno (19,37%) e Tolueno (86,38%) e o Biopetro 04 para os Xilenos (96,33%). De acordo com os resultados obtidos, observamos que a metodologia usada revelou um potencial degradador considerável para aplicação em tratamentos de biorremediação.

PALAVRAS-CHAVE

Btx. Biodegradação. Micro-Organismos.

Problems associated with the exploration and trade of oil and its derivatives, such as undue and accidental leaks, have been provoking serious environmental damages, demanding the development of treatments in order to reduce this negative impact. Among the strategies to eliminate the BTX (benzene, toluene e xilene isomers), the bioremediation is an option, and in this process, the microorganisms present the capacity to metabolize these compounds in inert substances. The main objective of this study was to select microorganisms which degrade BTX, as well as to verify the microbial degradation of the compounds. The qualitative methodology was used to investigate the potential microorganisms to degrade BTX, by using the dye 2, 6-diclofenol-indofenol (DCPIP). Of the 33 microorganisms, four were able to degrade BTX. These microorganisms (Biopetros 01 to 04) were submitted to fermentations and parameters as pH tests, DQO, protein concentration, dry cell mass and BTX concentration reduction were assessed. The obtained percentages of DQO reduction were satisfactory using the Biopetros 01, 02 and 03. In the tests that quantify the BTX degradation, realized by chromatography analysis (GC/MS), it was detected reduction of this solvents despite the loss by volatilization; spite of the their loss, the Biopetro 03 showed the best results to benzene (19,37%) and toluene (86,38%) and the Biopetro 04 to xilenes (96,33%). According to the obtained results, the used methodology revealed a considerable degradation potential to be applied in bioremediation treatments.

KEYWORDS

BTX. Biodegradation. Microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o petróleo é ainda o recurso natural mais utilizado e de maior importância para o desenvolvimento do mundo em virtude da sua utilização como matéria prima para uma infinidade de produtos. Esse combustível fóssil não-renovável corresponde a uma mistura de vários compostos, principalmente de hidrocarbonetos.

Acidentes, derramamentos e vazamentos com determinada frequência do petróleo bruto e de seus derivados são fatores responsáveis pela contaminação, seja ela do solo, da água e do ar, através da liberação para o meio ambiente de vários compostos poluidores. Dentre eles encontram-se os hidrocarbonetos benzeno, tolueno e isômeros de xilenos (conhecidos coletivamente como BTX), pondo em risco o ecossistema aquático e a saúde humana.

Os BTX são hidrocarbonetos monoaromáticos que merecem um destaque considerável devido ao seu potencial toxicológico elevado, característica esta que pode ser capaz de comprometer a sustentabilidade ambiental. Dentre esses compostos voláteis, o benzeno possui caráter mutagênico e carcinogênico, por esta razão faz-se necessário o controle de compostos que o contém e medidas preventivas e/ou ações mitigadoras para casos de contaminação. Esses compostos são constituintes de vários derivados do petróleo como, por exemplo, a gasolina, óleo diesel, solventes, combustíveis para aeronaves, materiais sintéticos, entre outros.

A contaminação mais preocupante com BTX é a provocada por vazamentos contínuos de postos de combustíveis, principalmente de gasolina. Esse combustível migra no solo até entrar em contato com os lençóis freáticos, geralmente utilizados para abastecimento

humano, e o benzeno, tolueno e isômeros de xilenos entram em contato com a água, podendo ainda ter ação mais efetiva de dispersão devido à solubilidade destes elementos com o etanol presente na gasolina. Sabe-se que no Brasil existem muitos postos de gasolina distribuídos espacialmente com a vida útil de seus tanques ultrapassada, fator este que favorece a susceptibilidade dessa poluição ambiental.

Em virtude da necessidade de controlar os limites de poluentes na água em níveis baixos, surgiram normas e legislações que atribuem valores máximos considerados seguros para a proteção da saúde humana, inclusive para cada componente BTX. Todavia, a necessidade de se combater os impactos ambientais negativos que crescem a cada dia é inevitável.

Dentre os métodos que surgiram como contribuição para a minimização ou eliminação dos COV (Compostos Orgânicos Voláteis), a biorremediação é a mais adequada para a manutenção do equilíbrio ecológico e a de menor custo. Essa tecnologia eficiente baseia-se na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de degradar poluentes, eliminando-os ou transformando-os em componentes inertes.

O principal objetivo desse trabalho é estudar a degradação microbiana dos hidrocarbonetos BTX, por meio de uma seleção de microorganismos pertencentes ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos do Instituto de Tecnologia e Pesquisa.

O conhecimento do percentual de degradação de BTX, por cada micro-organismos, é fundamental para a contribuição do estudo e aprimoramento dos procedimentos de tratamento da problemática provocada pela contaminação desses hidrocarbonetos. Por meio de uma série de testes e determinações analíticas o presente trabalho possui os seguintes objetivos específicos:

Selecionar, dentre os microorganismos pertencentes ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos do ITP (Instituto de Tecnologia e Pesquisa), aqueles que possuem a capacidade de degradar BTX;

- Averiguar a degradação microbiana de benzeno;
- Averiguar a degradação microbiana de tolueno;
- Averiguar a degradação microbiana de xilenos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMOS

Foram utilizados os microorganismos pertencentes à coleção do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), obtidos da seleção de ambientes com histórico de contato com petróleo, codificados como Biopetro 1 a 5 e de águas residuárias de indústria têxtil, codificados como Coratex 1 a 28.

Inicialmente a seleção de linhagens foi avaliada em placas multipoços, contendo 250mL de meio BH (Tabela 1), 25mL de suspensão microbiana (inóculo de 48h), 10mL de substância teste (benzeno, tolueno e xilenos), 200mL do indicador redox (2,6-diclorofenol-indofenol DCPIP). Posteriormente, devido à deterioração ocorrida nas placas multipoços, em virtude das substâncias teste, passou-se a ser avaliada em eppendorf's, contendo 1000mL de meio BH (Tabela 1), 100mL de suspensão microbiana (inóculo de 48h), 40mL de substância teste (benzeno, tolueno e xilenos), 500mL do indicador redox. Após 12h a adição do indicador redox DCPIP teve a finalidade de sinalizar a ocorrência de oxidação biológica do referido composto, por meio da mudança de coloração do meio de reacional de azul para incolor (SOUSA et al., 2007).

Tabela 1: Composição do meio mineral Bushnell-Hass (BH).

Componente	Concentração (g/L)
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2
CaCl ₂	0,02
K ₂ HPO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,0
NH ₄ NO ₃	1,0
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	1 Gota/L

Também foram utilizadas como substâncias-teste gasolina, óleo diesel e querosene, compostos que possuem os hidrocarbonetos benzeno, tolueno e xilenos em sua composição, para todos os microorganismos utilizados nesse trabalho.

2.3 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

As fermentações foram conduzidas em frascos de 500ml com 100mL de meio a 31oC, 200 rpm e pH inicial de 5,0 inoculado com 10% de inóculo de 48h de idade (microorganismos selecionados) e levados para agitação durante um período de 96h. A composição do meio de fermentação é em % (p/v): KH₂PO₄ (0,1), MgSO₄ · 7H₂O (0,05), extrato de levedura (0,6), peptona (0,13), NaNO₃ (0,3) acrescidos com 2% (p/v) de amido. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. As determinações analíticas foram realizadas a partir do acréscimo da suspensão microbiana e a cada 24 horas.

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Em cada ensaio fermentativo foram realizadas as determinações abaixo, excetuando a determinação dos solventes que foi executada anteriormente aos ensaios de degradação.

- **Determinação do pH:** A determinação do pH foi realizada utilizando um potenciômetro digital de bancada Digimed (pHmetro DM – 20);
- **Determinação da massa celular seca (X, g/L):** Para a determinação da massa celular seca uma alíquota de 8 mL do caldo fermentado foi centrifugada a 3000 rpm durante 3 min. O sobrenadante foi retirado e a massa microbiana foi seca em estufa a 105oC até peso constante;

- **Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO):** A DQO foi determinada através do método colorimétrico de acordo com Standard Methods (APHA, 1995);
- **Determinação de proteína:** A determinação de proteína foi baseada no Método de Lowry (1951), que possui sensibilidade de 20 a 200 mg/L e boa exatidão. O teor de proteína foi dosado por leitura em espectrofotômetro a 750 nm;
- **Determinação de BTX:** As concentrações de benzeno, tolueno e xilenos foram determinadas de acordo com o método 8260-B por meio da medida de compostos orgânicos voláteis em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM) (US, 1995). As condições de operação do equipamento foram: temperatura do injetor de 200°C, temperatura inicial de análise de 35°C, essa temperatura permanece por 5 min e depois passa a 120°C com a taxa de crescimento de 7°C por min. O tempo de análise foi de 17'. A razão do split foi de 20, o fluxo de gás da coluna é 1 mL/min, a faixa de massas é de 40 a 400 m/z. O modo de ionização tem impacto de elétrons de 70 eV. As amostras são concentradas em purgeandtrap por 10 min. As amostras foram enviadas em vials, vedadas com septo de silicone e selo de alumínio, para as análises cromatográficas, diluídas na proporção de 19,6 mL de água para 0,4 mL de amostra, entretanto em virtude da formação de espuma nas análises a proporção passou a ser de 50 mL de água para 0,5 mL de amostra. O potencial de degradação, gerado pelo microorganismo selecionado, foi avaliado pela concentração destes compostos no início e no tempo de análise;
- **Determinação dos solventes:** As composições dos solventes utilizados nesse trabalho foram constatadas por meio de cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas CG-EM. As condições de operações do equipamento foram as mesmas do item de determinação de BTX. As soluções foram adequadamente diluídas e enviadas para as análises cromatográficas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de Linhagens Microbianas

O levantamento das linhagens microbianas aptas a degradar BTX foi obtido utilizando os microorganismos pertencentes à coleção de Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Instituto de Tecnologia de Pesquisa (ITP). Aplicou-se o ensaio qualitativo de identificação de reações de oxi-redução por meio do emprego do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP).

A figura 1 apresenta os resultados da identificação da reação de oxi-redução utilizando caldo fermentado por Biopetro 1 (colunas 1-2); Biopetro 2 (colunas 3-4); Biopetro 3 (colunas 5-6); Biopetro 4 (colunas 7-8); Biopetro 5 (colunas 9-10) e como controle o meio de cultura não fermentado (colunas 11-12). As linhas A, D e H representam os processos de identificação das reações de oxi-redução com meios contendo Benzeno, Tolueno e Xilenos, respectivamente.

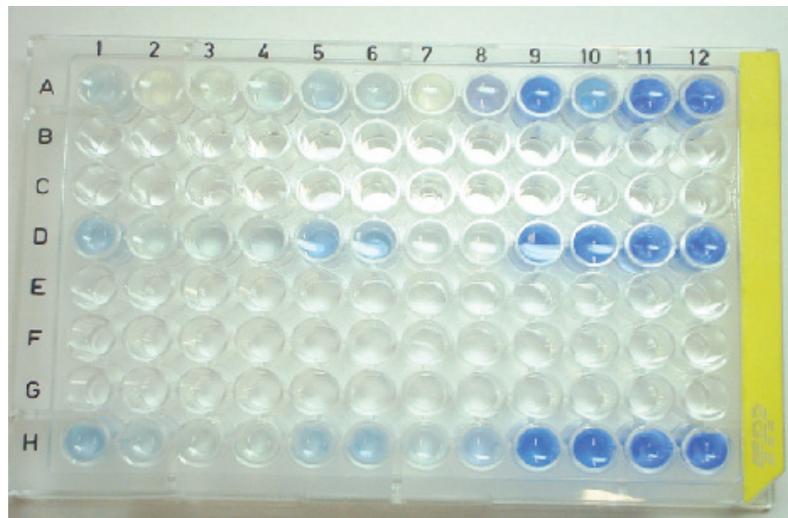


Figura 1: Aspecto da placa multipoços após ação dos microorganismos sobre o meio.
Linha A: benzeno, linha D: tolueno e linha H: xilenos. Colunas 1-2: Biopetro-01, colunas 3-4: Biopetro-02, Colunas 5-6: Biopetro-03, Colunas 7-8: Biopetro-04, Colunas 9-10: Biopetro-05, Colunas 11-12: controle (sem reação com micro-organismos).

Os experimentos controle permaneceram com a coloração do DCPIP denotando a não ocorrência de reações de oxidação-redução similarmente aos experimentos com o meio fermentado com o Biopetro 05 não demonstrando processo de oxidação-redução para nenhum dos solventes, ao passo que a utilização de meio fermentado por Biopetro 01 a 04 promoveu processo de descoloração para todos os solventes, indicando o processo de oxidação-redução e conseqüentemente de degradação destes solventes.

Apesar de bom indicador de degradação, os experimentos em placas multipoços tiveram o inconveniente de ataque dos solventes ao material da placa, e por esta razão passou-se a utilizar eppendorf's.

Os resultados dos ensaios em eppendorf's são apresentados na tabela 2. Observa-se que todos os microorganismos codificados como Biopetro, excetuando o número 05, foram aptos a degradar os BTX, esta observação pode estar relacionada ao ecossistema do qual foi isolada essas linhagens, solos contaminados por petróleo.

No caso dos microorganismos isolados Coratex01 a 28 (selecionados de efluentes têxteis) em relação à degradação das substâncias-teste (BTX) foi observado que a coloração azul da solução permaneceu, demonstrando, assim, a não ocorrência de degradação, como é exibido na Tabela 2. Entretanto foi observado o potencial dessas bactérias degradarem derivados de petróleo que apresentam BTX na sua composição como: gasolina, óleo diesel e querosene. As leituras de degradação são mostradas na Tabela 3.

Tabela 2: Seleção de linhagens degradadoras de benzeno, tolueno e xilenos.

Micro-organismos	Degradação			Micro-organismos	Degradação		
	B	T	X		B	T	X
Biopetro1	+	+	+	Coratex 13	-	-	-
Biopetro2	+	+	+	Coratex 14	-	-	-
Biopetro3	+	+	+	Coratex 15	-	-	-
Biopetro4	+	+	+	Coratex 16	-	-	-
Biopetro5	-	-	-	Coratex 17	-	-	-
Coratex1	-	-	-	Coratex 18	-	-	-
Coratex2	-	-	-	Coratex 19	-	-	-
Coratex3	-	-	-	Coratex 20	-	-	-
Coratex4	-	-	-	Coratex 21	-	-	-
Coratex5	-	-	-	Coratex 22	-	-	-
Coratex 6	-	-	-	Coratex 23	-	-	-
Coratex7	-	-	-	Coratex 24	-	-	-
Coratex8	-	-	-	Coratex 25	-	-	-
Coratex9	-	-	-	Coratex 26	-	-	-
Coratex 10	-	-	-	Coratex 27	-	-	-
Coratex 11	-	-	-	Coratex 28	-	-	-
Coratex 12	-	-	-				

B- Benzeno; T- Tolueno; X- Xilenos; + = degradação; - = não degradação

Microorganismos	Degradação			Microorganismos	Degradação		
	G	D	Q		G	D	Q
Biopetro1	-	-	-	Coratex 13	-	-	-
Biopetro2	-	-	-	Coratex 14	-	+	+
Biopetro3	-	-	-	Coratex 15	-	+	+
Biopetro4	-	-	-	Coratex 16	+	-	+
Biopetro5	-	-	-	Coratex 17	-	-	-
Coratex1	-	-	-	Coratex 18	+	-	-
Coratex2	-	-	-	Coratex 19	+	-	+
Coratex3	-	-	-	Coratex 20	+	-	-
Coratex4	-	-	-	Coratex 21	-	-	-
Coratex5	-	-	-	Coratex 22	+	-	-
Coratex6	-	+	-	Coratex 23	+	-	-
Coratex7	-	-	-	Coratex 24	+	-	-
Coratex8	-	-	-	Coratex 25	+	-	-
Coratex9	-	+	-	Coratex 26	+	-	-
Coratex 10	-	-	-	Coratex 27	+	-	-
Coratex 11	-	-	+	Coratex 28	-	-	-
Coratex 12	-	-	+				

G- Gasolina; D- Diesel; Q- Querosene; + = degradação; - = não degradação.

Sousa *et al.* (2007) observaram a degradação de óleo diesel e também aplicaram o processo de seleção de bactérias degradadoras de petroderivados utilizando o indicador DPPI, selecionaram um *Bacillus* sp. como grande promissor da degradação de óleo diesel.

Nesses testes de seleção de linhagens as bactérias Biopetro – 1 a 4 foram os microorganismos que se mostraram promissores para as análises do potencial de biodegradação de BTX.

Primeiramente foram realizados testes de quantificação da concentração dos solventes empregados neste trabalho para a formação dos meios de cultura. Estas soluções foram preparadas, adequadamente diluídas e enviadas para análise cromatográfica, os dados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Composição dos solventes presentes no meio de cultura.

Componente	Benzeno (%)	Tolueno (%)	Xilenos (%)
Benzeno	76,69	0,96	0,46
Tolueno	9,73	92,13	2,06
Etil benzeno	1,96	1,05	13,19
Xilenos	11,63	5,85	84,29

Os dados demonstram que os meios, mesmo formados com os solventes puros, apresentam presença de outros solventes. Entretanto, os principais elementos são os formadores do solvente. Não houve correspondência aos valores indicados nos rótulos dos solventes que foram de 99,5% para o benzeno (FlukaChemieGmbH); 99,5% para o tolueno (Merc) e 89,4 % para os xilenos (J. T. Backer).

CONCLUSÃO

Foram selecionados os microorganismos codificados como Biopetro 1 a 4 para a degradação de benzeno, tolueno e xilenos e Coratex 6, 9, 11, 12, 14, 15 16, 18, 19, 20, 22 a 27 para a degradação de gasolina e/ou óleo diesel e/ou querosene.

As maiores degradações constatadas em virtude da ação do micro-organismo ocorreram com Biopetro 03 para benzeno (19,37%) e tolueno (86,38%) e com Biopetro 04 para o xilleno (96,33%).

A volatilização dos BTX possuiu grande relevância na obtenção dos dados desse trabalho dificultando a quantificação do potencial de degradação dos mesmos.

Após todos esses aspectos ficou evidente a revelação de um potencial degradador que pode contribuir com a minimização da poluição ambiental gerada pelos BTX, por meio da sua aplicação, com certos aprimoramentos, em tratamentos de biorremediação.

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for The Examination of Water and Weastwader** (1995). Publication Office American Public Health Association 19th edition.

CETESB. **Lista completa com todos os produtos químicos**. 2001. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/produto_consulta_completa.asp?qualpagina=7&sqlQuery=sp_TBPRODIDENTIFICACAO_sel>. Acesso em 18 de maio de 2010.

CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 29 de maio de 2010.

LOWRY, O H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A L., RANDALL, R. **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº518 de 25 de março de 2004**. Disponível em: <http://www.agrolab.com.br/portaria%20518_04.pdf >. Acesso em 14 de junho de 2010.

SOUSA, M. F. V. Q.; VILLELA, A. L. S.; MELO, E. J. V.; SOUZA, M. R.; MELO, B. J. M.; SILVA, P. A. **Desenvolvimento de bioprocesso de degradação de óleo diesel**. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. 1-12, 2007.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A.; LEAL, E. S. **Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados**. *Química Nova*. 28 (1): 1-9, 2005.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 8260B**: Volatile Organic Compounds by Gás Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS). US Environmental Protection Agency.Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati-Ohaio, 1995.

Data do recebimento: 11/07/2012

Data da avaliação: 16/07/2012

Data de aceite: 16/07/2012

1 Graduandos em Engenharia Ambiental – Universidade Tiradentes

2 Doutor em Engenharia de Alimentos, Professor do programa de pós-graduação da Universidade Tiradentes.

Email: alvaro_lima@itp.org.br