

Sofia Raquel Madalena Catarino

Biorremediação

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Olga Cardoso e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O orientador

(Professora Doutora Olga Cardoso)

A estagiária

(Sofia Raquel Madalena Catarino)

Eu, Sofia Raquel Madalena Catarino, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011155013, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, ____ de _____ de 2016

A estagiária,

(Sofia Raquel Madalena Catarino)

Índice

Resumo _____	página 3
Abstract _____	página 3
1. Introdução _____	página 4
2. Visão Interdisciplinar _____	página 5
3. Tipo de microrganismos utilizados na biorremediação _____	página 5
3.1 Fitorremediação	página 6
3.2 Biorremediação	página 7
3.2.1 Fatores físicos e químicos	página 8
3.2.1 Fatores biológicos	página 9
4. Implementação de um processo de Biorremediação _____	página 10
5. Potenciais Benefícios e Limitações da Biorremediação _____	página 13
5.1 Potenciais Benefícios da Biorremediação	página 13
5.2 Limitações da Biorremediação	página 14
6. Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) ao emprego da Biorremediação _____	página 15
6.1 Potencial e vantagens do uso de OGMs	página 15
6.2 Problemas relacionados com os OGMs	página 16
6.3 Contenção física dos OGMs	página 16
6.3.1 Métodos de controlo dos OGMs	página 17
7. Exemplos de aplicação de técnicas de Remediação _____	página 19
7.1 Exemplo de aplicação da técnica de Fitorremediação	página 19
7.2 Exemplo de aplicação da técnica de Biorremediação	página 20
7.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KUCdI, um possível candidato para biorremediação de cádmio	página 20
7.2.2 Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados	página 20
Conclusão _____	página 23
Bibliografia _____	página 24
Bibliografia de imagens _____	página 25

Índice de imagens

Figura 1 - Representação de processos de Fitorremediação _____	página 7
Figura 2 - Comparação entre os custos do tratamento de solos empregando diferentes técnicas de remediação _____	página 13
Figura 3 - Esquema representativo do processo de remediação de contaminantes orgânicos _____	página 21

Resumo

A qualidade de vida na Terra está intimamente ligada à qualidade global do ambiente, mas os resíduos resultantes da atividade humana têm-se tornado um problema que exige uma solução urgente. Surge assim uma grande necessidade de técnicas de remediação com uma boa relação custo-benefício. A Biorremediação - processo pelo qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados para reduzir ou remover poluentes do ambiente - vem dar resposta a esta necessidade, uma vez que o seu custo é baixo, as técnicas utilizadas são simples e é bem aceita pelo público (uma vez que é um processo natural) em comparação com as técnicas tradicionais de remediação.

O objetivo desta monografia é fazer então uma revisão dos aspetos gerais da biorremediação, potenciais usos e principais limitações.

Palavras-chave - Biorremediação, fitorremediação, poluentes, Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) ao emprego da Biorremediação.

Abstract

The quality of life on Earth is linked inextricably to the overall quality of the environment. However, waste products resulting from human activity, have recently become a serious problem that demands an urgent solution. This has created an urgent need for a remediation technique that is both effective and not too costly. Bioremediation - the process by which living organisms, usually plants or microorganisms, are used to decrease or remove environmental pollutants - responds to this need, since it uses techniques that are both simple and low-cost and is generally well accepted by the public (since it is a natural process) when compared with traditional remediation techniques.

The main goal of this monograph is to review the general aspects of bioremediation, its potential uses and major limitations.

Keywords - Bioremediation, phytoremediation, pollutants, Genetically Engineered Microbes (GEMs) for Bioremediation purpose

I. Introdução

Produtos tóxicos resultantes da atividade humana têm sido sempre motivo de preocupação. Hoje, estes desperdícios vão desde esgotos urbanos a resíduos nucleares. Durante muitos anos, a solução passou pela escavação de um buraco e o despejo desses materiais para aterros. Hoje, este método tornou-se insuficiente. Os materiais tóxicos destes aterros começaram a infiltrar-se nas fontes de água e em áreas importantes para a vida humana. Este problema encontrou solução na Biorremediação (Hornung, 1997)

Muitos dos contaminantes ambientais e/ou seus produtos de degradação resultam em efeitos nocivos e/ou mutagénicos aos organismos vivos, podendo levar à eliminação seletiva de indivíduos e acarretar modificações na estrutura ecológica e funcional da comunidade biológica e por estas razões, há atualmente uma grande preocupação em se desenvolverem biotecnologias para descontaminar ambientes poluídos.

Biorremediação é então o modo da natureza se limpar a ela própria. Neste processo, o local contaminado é exposto a um exército de microrganismos que transformam o contaminante numa substância segura (como dióxido de carbono e a água) recorrendo ao uso de actividade biológica natural. (Gaylarde et al., 2005)

A biorremediação consiste assim na transformação ou degradação de contaminantes em substâncias químicas não-tóxicas ou menos tóxicas que a molécula original. Vários organismos podem ser usados para esta técnica, como plantas, algas e fungos, mas o agente favorito são as bactérias. (Hornung, 1997)

Esta técnica está se a tornar a tecnologia de escolha para a remediação de muitos ambientes contaminados. Nas últimas décadas, várias tentativas têm sido feitas no sentido de aumentar a capacidade biodegradativa da natureza, com o objectivo de atingir em larga-escala uma efetiva e barata restauração ambiental. (Mabik, 2004)

Existe uma grande variedade de tecnologias para tratar desperdícios tóxicos. As tecnologias usadas têm em consideração diversos factores, como as condições do local a tratar, o tipo de microrganismos aí existentes ou o tipo, a quantidade e a toxicidade dos contaminantes. De acordo com estas características escolhe-se o método mais adequado a cada situação (Mashi, 2013).

Antes da implementação de um processo de remediação, estudos multidisciplinares têm que ser feitos, uma vez que é necessário conhecimento de vários campos para a correta aplicação destas técnicas.

2. Visão Interdisciplinar

A implementação de processos de remediação num ambiente contaminado requer a condução de um estudo detalhado, com uma visão interdisciplinar, envolvendo áreas como microbiologia, biologia química, biologia molecular, química orgânica e analítica e engenharia.

Por exemplo, é necessário o conhecimento aprofundado das características químicas da molécula que se pretende eliminar, uma vez que a estrutura química influencia vários aspetos do metabolismo biológico. (Gaylarde et al., 2005).

O grau de toxicidade de uma molécula está relacionado com a sua estrutura molecular. A estrutura molecular define o tipo e a intensidade de interação com diferentes componentes e metabolitos intracelulares, que podem ocasionar efeitos citotóxicos e /ou mutagénicos.

Outro factor importante relacionado com a estrutura molecular é a biodisponibilidade da molécula. Muitos dos poluentes têm carácter apolar, o que não é compatível com os sítios de entrada e transportadores de membrana celular, indisponibilizando-os, desta maneira, para o metabolismo intercelular. Alguns microrganismos contornam este obstáculo produzindo surfactantes. A busca de biosurfactantes que possam ser utilizados como aditivos em solos contaminados com compostos pouco solúveis é hoje uma das linhas em grande desenvolvimento nas pesquisas de biorremediação. Outro aspeto a ser analisado é a composição química do ambiente. (Gaylarde et al., 2005)

Assim, é crucial para o sucesso de qualquer técnica de biorremediação, uma equipa multidisciplinar, uma vez cada processo é particular e quase sempre necessita de um adequação e de uma optimização específica para a aplicação em diferentes sítios afetados, sendo sempre necessário uma análise integrada de parâmetros físicos, químicos e biológicos. Nos próximos pontos serão discutidos alguns destes parâmetros.

3. Tipo de microrganismos utilizados na biorremediação

As bactérias são geralmente preferidas, mas fungos algas e plantas também têm sido usados. As bactérias adaptam-se e crescem em temperaturas negativas, assim como em calor extremo, no deserto, na água, com excesso de oxigénio e em condições aneoróbicas ou na presença de

componentes perigosos. Os principais requisitos são uma fonte de energia e uma fonte de carbono. Devido a adaptabilidade dos microrganismos e outros sistemas biológicos, estes podem ser usados para degradar ou remediar ambientes contaminados (Vidali, 2001).

Apesar de tudo isto, o uso de plantas para descontaminar o ambiente também é muito frequente. Assim, as técnicas mais usadas, utilizam como organismos remediadores as plantas (fitorremediação) e bactérias (biorremediação):

3.1 Fitorremediação

Uma técnica *in situ* que faz uso de organismos vivos é a fitorremediação, que utiliza plantas e comunidades microbianas associadas à rizosfera para degradar, isolar ou imobilizar poluentes no solo e nas águas subterrâneas – técnica atraente pelo baixo custo, natureza não destrutiva e estética agradável. (Marques et al., 2006)

A fitorremediação tem por base a fisiologia vegetal, a bioquímica do solo e a química dos contaminantes, promovendo a reabilitação da estrutura e da ecologia do solo. As plantas também mantêm a estrutura do solo, garantindo trocas gasosas e o desenvolvimento dos microrganismos, inclusive os biorremediadores. (Marques et al., 2010)

Tendo em vista que nem todas as espécies vegetais se desenvolvem em ambientes contaminados, o primeiro passo é a identificação das espécies que, além de apropriadas às condições locais, sejam tolerantes ao contaminante. Este *screening* pode ser feito por meio da avaliação da taxa de germinação e do crescimento na presença de concentrações crescentes do contaminante no solo.

O passo seguinte passa por avaliar a capacidade da planta tolerante em promover a descontaminação do solo. A eficiência do processo é medida em função da redução do contaminante no solo a concentrações abaixo dos valores de referência e tempo requerido. (Marques et al., 2006)

Existem 5 técnicas de Fitorremediação:

a) **Fitoextração ou Fitoacumulação:** é um processo pelo qual as plantas acumulam contaminantes nas raízes, rebentos e folhas. Esta técnica tira baixos níveis de contaminantes numa grande área contaminada;

b) **Fitotransformação ou Fitodegradação:** refere-se a remoção de componentes orgânicos do solo, sedimentos ou água e subsequente transformação em componentes menos nocivos;

c) **Fitoestabilização:** as plantas reduzem a mobilidade e migração do solo contaminado. Através da sua absorção e ligação à estrutura da planta, forma-se uma massa estável, que garante que os contaminantes não vão reentrar no ambiente;

d) **Rizodegradação:** Passa pela quebra do contaminante através da atividade existente na rizosfera. Consiste numa relação simbiótica, que recorre a microrganismos que obtêm os nutrientes que necessitam enquanto conferem um ambiente mais saudável às plantas;

e) **Rizofiltração:** é uma técnica de remediação aquática que envolve a remoção de contaminantes pelas raízes das plantas. (Mashi, 2013)

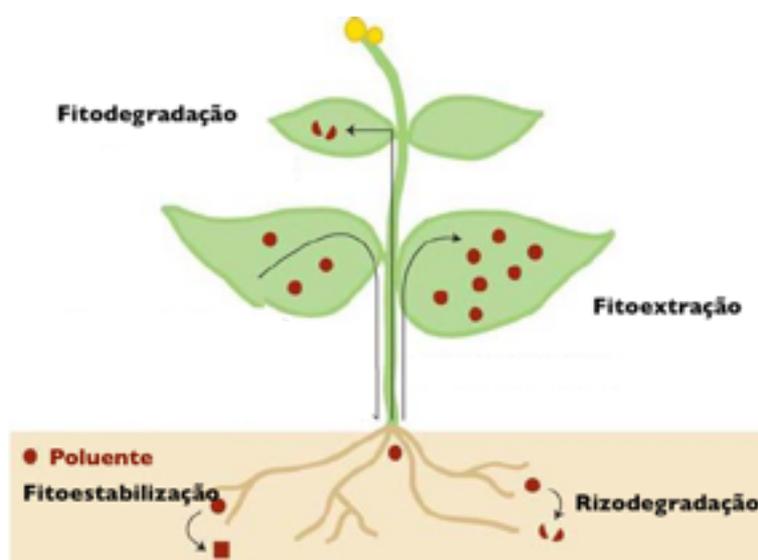


Figura 1 - Representação de processos de Fitorremediação. (Adaptado de Mashi, 2013)

3.2 Biorremediação

O sistema metabólico que se tem mostrado mais apto para biodegradar contaminantes é o microbiano, uma vez que os microrganismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando ativamente dos principais ciclos biogeoquímicos e, representando portanto, o suporte de manutenção da vida na Terra. Esta extraordinária diversidade metabólica deve-se à combinação do potencial genético individual das diferentes espécies, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos, e a capacidade de

metabolismo integrado apresentada pela comunidade microbiana em conjunto: produtos do metabolismo de um microrganismo pode ser substrato para outro. (Gatlarde et al., 2005)

No entanto é necessário que também as condições do meio sejam as ideais para os processos ocorrerem, uma vez que as características físico-químicas e nutricionais do meio externo e o compartimento intracelular microbiano estão estritamente relacionadas. Mesmo que um sistema microbiano possua todos os requisitos bioquímicos e genéticos necessários para a degradação, se as características físico-químicas e componentes nutricionais do meio não condizem com as necessidades metabólicas do microrganismo, a biodegradação não ocorrerá. (Gaylarde et al., 2005).

Assim, quer os fatores físicos e químicos quer os fatores biológicos, têm que ser estudados na implementação de um processo de remediação:

3.2.1 Fatores físicos e químicos

Os principais parâmetros físicos que influenciam na degradação são: natureza física da matriz onde o composto é encontrado (solo, água, sedimento), temperatura e luz. Por exemplo, nas regiões temperadas do globo, a atividade metabólica de microrganismos pode ser reduzida em função das baixas temperaturas médias anuais, reduzindo, conseqüentemente, a taxa de degradação de poluentes nestas áreas.

Diversos fatores químicos podem influenciar, acelerando ou reduzindo, a taxa de degradação de um poluente. Entre estes fatores incluem-se a composição química da matriz ambiental, que define a capacidade nutritiva, o pH, humidade, teor de oxigénio dissolvido, o potencial *redox* do meio e a composição e estrutura química do poluente. (Gaylarde et al., 2005)

A presença de outros contaminantes de estrutura simples pode também dificultar o metabolismo de moléculas mais complexas, pois a comunidade microbiana direciona o seu metabolismo para degradar, preferencialmente, os menos complexos. (Gaylarde et al., 2005)

Um exemplo da importância das condições do meio na biodegradação é a presença ou ausência de oxigénio: os géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium*, reconhecidas pelo seu potencial biodegradativo de pesticidas e derivados de petróleo, só sobrevivem na presença de oxigénis. (Vidali, 2001)

3.2.2 Fatores biológicos

A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença de uma população de microrganismos capaz de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação (Vidali, 2001)

A biodegradação é mais provável quando a estrutura química do composto poluente é semelhante à estrutura de moléculas naturais. As enzimas que catabolizam a degradação de compostos naturais podem apresentar baixa especificidade pelo seu substrato e, desta maneira, os contaminantes com estrutura química semelhante a compostos naturais podem ser reconhecidos pelo sítio ativo da enzima, possibilitando, assim, que sejam quimicamente transformados. (Vidali, 2001).

Quando o poluente tem a possibilidade de percorrer todos os passos catalíticos de uma determinada rota catabólica enzimática, provavelmente torna-se uma possibilidade nutritiva para o microrganismo, sendo os produtos da sua degradação aproveitados pelo seu metabolismo construtivo e energético. Porém, quando o composto é apenas parcialmente degradado, por ação de uma ou mais enzimas de uma rota catabólica sem que o produto resultante contribua para a sobrevivência do microrganismo, esta transformação metabólica é denominada de “co-metabolismo”. (Gaylarde et al., 2005).

O produto do co-metabolismo, muitas vezes, pode servir de substrato para transformações enzimáticas de outras espécies microbianas, possibilitando a degradação completa do contaminante. (Gaylarde et al., 2005).

Um exemplo de um processo de remediação que tira proveito das condições de adaptação e da diversidade metabólica dos microrganismos é a biorremediação de Cobre (Cu).

O cobre é um micronutriente essencial para todos os seres vivos, porém em grandes concentrações pode causar sérios problemas ambientais para os seres humanos (como cancro e até mesmo a morte). Para organismos como plantas, fungos e bactérias, concentrações elevadas de cobre, promovem uma pressão de seleção, mantendo somente os organismos resistentes neste local contaminado. (Andreazza et al., 2013)

Para sobreviver em concentrações elevadas deste metal, os microrganismos desenvolveram mecanismos de resistência. Estes mecanismos incluem a redução do transporte do cobre, complexação pelos componentes celulares e acumulação de Cu internamente na célula. (Andreazza et al., 2013)

Concentrações elevadas de íons de cobre no ambiente exercem uma pressão de seleção promovendo a sobrevivência de microrganismos que tenham determinantes genéticos para a resistência ao metal. Como exemplos, a bactéria *Desulfovibrio* spp. complexa o cobre pela produção de sulfato, reduzindo o potencial tóxico do cobre para a bactéria, ao passo que a *Klebsiella pneumoniae* tem uma adaptação transitória fisiológica e a *Escherichia coli* tem um aumento de proteínas na membrana, provavelmente envolvendo o transporte do cobre. (Andreazza et al., 2013)

4. Implementação de um processo de Biorremediação

A biorremediação é uma tecnologia complexa e a sua implementação ocorre em etapas, que compreendem o estudo do ambiente, do tipo de contaminante, dos riscos e da legislação pertinente. Em primeiro lugar, é necessário uma caracterização do tipo e da quantidade poluente bem como avaliações de natureza biológica, geológica, hidrológica, do sítio contaminado. (Gaylarde, 2005)

Algumas técnicas de tratamento envolvem a adição de nutrientes para estimular ou acelerar a actividades de micróbios naturais do ambiente. Optimizar as condições ambientais vai potenciar o crescimento de microrganismos e aumentar a população, resultando numa degradação de substâncias contaminantes aumentada. No entanto, os microrganismos necessários para remover um determinado contaminante podem não estar naturalmente presentes nesse sistema, chamando se assim de microrganismos exógenos, que podem ser introduzidos no sistema. (Mabik, 2004)

Existem 3 processos de biorremediação:

- **Biotransformação** - Alteração de moléculas contaminantes em moléculas menos tóxicas ou inofensivas;
- **Biodegradação** - Ocorre a quebra de substâncias orgânicas em moléculas orgânicas mais pequenas ou moléculas inorgânicas;
- **Mineralização** - Biodegradação completa de materiais orgânicos em materiais inorgânicos tais como o dióxido de carbono e a água. (Hornung, 1997)

Estas três classificações podem ocorrer *in situ* (no local da contaminação) ou *ex situ* (os contaminantes são levados do local e tratados num outro local).

Existem vantagens e desvantagens quer para a estratégia *in situ* quer para a *ex situ*.

Estratégias *ex situ* removem os contaminantes dos sítios e colocam-nos num ambiente controlado. Este ambiente permite uma monitorização mais fácil e manutenção das condições e progressos, tornando o processo mais rápido. No entanto, esta remoção dos contaminantes do local contaminado consome tempo, é cara e potencialmente perigosa. No processo de trazer os contaminantes à superfície, os trabalhadores e o público geral têm exposição aumentada aos materiais tóxicos. Existem várias técnicas para facilitar a biorremediação *ex situ*:

- O solo pode ser escavado e transportado para um biorreator;
- A lavagem do solo é um outro método: a água é empurrada através dos contaminantes e depois transferida para um biorreator para tratamento;
- A ventilação do solo também pode igualmente ser usada, onde o ar é forçado através da região contaminada e depois o ar com poluentes é transferido para um reactor. (Leung, 2004)

Os métodos de extração de contaminantes dependem da natureza do poluente em questão. (Hornung, 1997)

A adoção deste procedimento pode resultar num aumento considerável do custo do processo, porém, não obstante a essa desvantagem, é possível controlar, com maior facilidade, as condicionantes do meio que são consideradas os fatores-chave utilizados no tratamento dos solos; (Leung, 2004)

As técnicas *ex situ* podem também servir para se fazer um estudo controlado, de modo a que se projetem técnicas de remediação em grandes áreas contaminadas (*in situ*), de maneira a serem evitadas possíveis consequências, como a adição desnecessária de bactérias ou nutrientes. Um exemplo de uma técnica *ex situ* aplicada com este fim é a descontaminação ambiental do pesticida endosulfan.

Amostras de solo foram analisadas e tratadas através da adição de bactérias que não se encontravam presentes no ambiente normal. As condições ambientais do solo foram simuladas num biorreator. A remoção completa do endosulfan foi observada ao longo de 25 dias e os resíduos da sua degradação desapareceram completamente após 30 dias. (Greeshma, Namasivayam, 2016)

Este estudo permitiu extrapolar da escala do biorreator (técnica *ex situ*) para aplicação numa larga área escala e concluir que a biorremediação deste pesticida pode ser realizada *in situ*, nas camadas superficiais e subsuperficiais, através da técnica de bioaugmentação, com a adição das bactérias necessárias para a degradação do endosulfan. (Greeshma, Namasivayam, 2016)

As estratégias *in situ* apresentam a vantagem de não requerem a remoção dos contaminantes do local de contaminação, e para se esse objectivo, são usadas técnicas de Bioestimulação ou Bioaugmentação.

Algumas tecnologias de tratamento envolvem então a adição de nutrientes para estimular ou acelerar a actividade de microrganismos endógenos. Optimizar as condições ambientais vai aumentar o crescimento de microrganismos e aumentar a população microbiana, resultando numa degradação de substâncias perigosas aumentada. (Mabik, 2004)

Bioestimulação é a adição de nutrientes, oxigénio ou outros aceitadores ou dadores de electrões ao local, com o objetivo de aumentar a população ou atividade natural dos microrganismos próprios do local. (Leung, 2004)

No entanto, se a atividade biológica necessária para degradar um contaminante específico não está presente no local, microrganismos adequados de outros locais, chamados microrganismos exógenos, podem ser introduzidos no sistema. (Mabik, 2004)

Bioaugmentação é adição de microrganismos que podem biotransformar ou biodegradar contaminantes. A vantagem da biorremediação *in situ* é que não há necessidade de extração dos contaminantes, resultando em menos exposição dos trabalhadores, e é também menos dispendiosa. (Leung, 2004)

Na remoção de pesticidas (um poluente que tem despertado grande preocupação nos ambientalistas) pode ser usada a técnica de bioaugmentação.

Microrganismos, como bactérias dos géneros *Nocardia* e *Pseudomonas* ou fungos filamentosos, como *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus stolonifer* têm sido utilizados na degradação destes compostos em solos ou efluentes. Assim, quando há uma contaminação com pesticidas, estas espécies com potencial remediador reconhecido podem ser adicionadas ao local poluído. (Pereira, Freitas, 2012)

As técnicas de remediação, quer sejam *in situ* ou *ex situ*, apresentam muitas vantagens que justificam o seu uso, como por exemplo, capacidade de remover um contaminante e um custo baixo. No entanto, apresentam também algumas desvantagens, que limitam a sua aplicação.

5. Potenciais Benefícios e Limitações da Biorremediação

5.1 Potenciais Benefícios da Biorremediação

Vários aspetos da Biorremediação tornam-na uma escolha atraente. A biorremediação tem várias vantagens em relação a outras abordagens, e é frequentemente usada em combinação com outras soluções. (Mashi, 2013). Algumas das suas vantagens são:

- A biorremediação é um processo natural e, portanto, é aceite como um processo seguro. Os micróbios são capazes de degradar os contaminantes a substâncias inofensivas que não são prejudiciais para o meio ambiente, tais como o dióxido de carbono, água e biomassa celular;

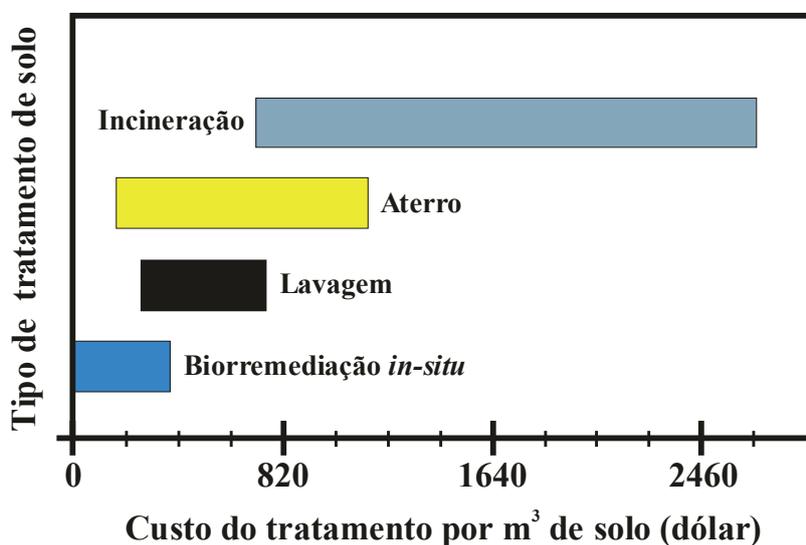


Figura 2 - Comparação entre os custos do tratamento de solos empregando diferentes técnicas de remediação (Adaptado de Andrade et al., 2010)

- Biorremediação transforma poluentes, em vez de simplesmente movê-los de um meio para o outro. Por exemplo, no passado, alguns solos poluídos foram despejados em aterros, caso em que o poluente não foi destruído, mas apenas transferidos e o problema só foi adiado; (Mashi, 2013)
- A análise da Figura 1 permite observar que a biorremediação é a técnica que apresenta o custo de tratamento mais baixo quando comparado às demais. A incineração caracteriza-se por apresentar custos maiores relacionados ao tratamento de solos e, conseqüentemente, à inviabilidade do processo, dependendo do volume de solo a ser tratado; (Andrade et al., 2010)

- A Biorremediação pode ser *in situ*, o que possibilita não causar disfunções *major* em atividades normais. Isto elimina a necessidade de transportar os desperdícios e as potenciais ameaças à saúde humana e ambiental, que podem surgir durante o transporte; (Vidali, 2001)

5.2 Limitações da Biorremediação

Ainda que a biorremediação se mostre promissora, existem outras preocupações que tornam esta tecnologia menos favorável. Existe um número de desvantagens associadas à biorremediação e é necessária mais pesquisa nesta área para aperfeiçoar a tecnologia. As principais limitações são:

- Transformação incompleta - Existe a possibilidade que os contaminantes não sejam completamente transformados em substâncias inócuas. Há a preocupação que os produtos de degradação possam ser ainda mais persistentes ou tóxicos que a molécula original. Não existe garantia que todos os contaminantes são transformados em componentes seguros;
- Os processos biológicos são muito específicos. Em ordem ao organismo reduzir com sucesso os níveis de poluentes, as suas condições de crescimento devem ser determinadas e mantidas. A presença de populações microbianas metabolicamente capazes, ambiente adequado às condições de crescimento, níveis apropriados de nutrientes e os contaminantes devem ser cuidadosamente monitorizados. O controlo destas condições é difícil, particularmente porque as condições variam de local para local; (Mashi, 2013)
- A biorremediação está limitada aos compostos biodegradáveis. Nem todos os compostos são susceptíveis de rápida e completa degradação;
- É difícil extrapolar de estudos escala-piloto a operações no campo;
- É necessária pesquisa para desenvolver as tecnologias apropriadas para locais com misturas complexas de contaminantes;
- É um processo mais demorado que as restantes opções de tratamento, como escavação e remoção de solos ou incineração. (Vidali, 2001)

Outros problemas podem ser também:

- A poluição geralmente envolve vários compostos, de diferentes classes químicas, requerendo a seleção e utilização de diferentes microrganismos com metabolismo específico para os diferentes poluentes;

- Quando as concentrações dos poluentes são baixas, os microrganismos podem não produzir as enzimas necessárias; quando são muito altas, os microrganismos podem ser inibidos;
- Alguns dos poluentes presentes podem ser incompatíveis com o processo de biorremediação implementado;
- Alguns compostos são rapidamente adsorvidos pelo solo, sedimento e/ou água, diluindo-se abaixo do nível exigido para a ativação da biodegradação, contudo permanecendo ainda em concentrações acima da desejável;
- A taxa da biorremediação pode ser muito baixa, resultando em um processo de longa duração.

Alguns dos problemas acima relatados podem ser superados através do uso de Organismos Geneticamente Modificados (ou *Genetically Engineered Microorganisms*, ou GEMs, em inglês). (Gaylard et al., 2005)

6. Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) ao emprego da Biorremediação

6.1 Potencial e vantagens do uso de OGMs

Ainda que as técnicas de biorremediação pareçam muito promissoras, muitas vezes os contaminantes ou o conteúdo do local contaminado também são tóxicos para o organismo envolvido no processo de biorremediação. Este problema pode causar dificuldade em manter uma taxa de remediação alta. Uma solução para estas limitações passa então pelo uso de OGMs que são resistentes às condições extremas do local contaminado e têm também propriedades de biorremediação.

Por exemplo, a radiação é prejudicial para a maioria das formas de vida, incluindo a maioria das bactérias. No entanto, existe uma espécie de bactéria, *Deinococcus radiodurans*, que é resistente a danos por radiação. Se os genes para a redução de metais puderem ser transferidos para esta espécie radiação-resistente ou os genes radiação-resistente puderem ser transferidos para bactérias metais-redutoras, o OGM resultante iria ser mais eficiente em processos de biorremediação em locais de fugas de metais radioactivos. (Leung, 2004).

Este é apenas um exemplo de uma espécie bacteriana a ser estudada pela a sua capacidade de resistir a condições extremas. Por exemplo: *Bacillus infernus* pode resistir a altas temperaturas, e *Methanococcus jannaschi* pode resistir a altas pressões (até 230 atm) em adição a temperaturas elevadas. (Leung, 2004). Outras manipulações genéticas podem passar por alterar a velocidade de

passos limitantes em vias metabólicas conhecidas, através do aumento da taxa de degradação ou integração de novas vias metabólicas para a degradação de compostos anteriormente recalcitrantes. (Sayler; Ripp, 2000)

6.2 Problemas relacionados com os OGMs

É assumido que os OGMs apresentariam um baixo nível de “performance” devido às exigências energéticas extra, impostas por elementos genéticos introduzidos por engenharia, e seriam, portanto, incapazes de competir em condições do mundo real.

Apesar de numerosos estudos terem mostrado que a sobrevivência de OGMs no ambiente não é problemática, um número igual tem chegado à conclusão que a sua sobrevivência é dificilmente previsível. (Sayler; Ripp, 2000)

Um dos problemas principais dos OGMs é a instabilidade de seus genes exógenos, principalmente quando inseridos em forma de plasmídeos. Quando esta instabilidade é devido à segregação deficiente, ou seja, parte da população gerada após um ciclo de divisão celular pode não ter o plasmídeo, o problema pode ser superado com a inserção dos genes de interesse no cromossoma bacteriano, mediante o uso de transposões. No entanto, a inserção de novos genes no cromossoma de um microrganismo pode ter efeitos inesperados, como interferência na regulação de outras vias metabólicas, acarretando, por exemplo, o aumento da produção de toxinas ou inativação da expressão de outras propriedades de interesse. É necessário que o microrganismo seja construído de maneira que seus efeitos no meio ambiente sejam mínimos e/ou seu tempo de sobrevivência seja limitado. (Gaylarde et al., 2005)

6.3 Contenção física dos OGMs

Para que os efeitos dos OGMs no ambiente seja mínimo é necessário que existam métodos que possibilitem o seu controlo.

Um dos modos de conter os OGMs é projetá-los para que sejam susceptíveis de contenção biológica. Uma solução passa ou por construir OGMs que apenas consigam permanecer viáveis nas condições ambientais para as quais foram concebidos (isto é, apenas na presença de um contaminante específico) ou por incluir nos OGMs mecanismos de auto-destruição (genes suicidas) que podem ser induzidos quando for necessário erradicar a população de OGMs. Estas estratégias, até ao momento presente, não podem garantir total eliminação do OGMs, após

introdução no ambiente, e podem representar um grande risco, mais relacionado com o potencial de transferência de genes do que propriamente com o processo de Biorremediação. (Sayler; Ripp, 2000)

Um exemplo de uma técnica de contenção física são então os eventos geneticamente programados, que envolve o uso de elementos suicidas. O problema do uso desta técnica a é que pode sobreviver até 1 em 10^4 células por geração, devido às taxas de mutações normais. Cálculos mostram que um nível de confinamento satisfatório é atingido somente quando os organismos modificados carregam 8 mecanismos suicidas separados, cada qual com um tipo de controlo diferente.

Contudo, um outro problema surge. Pesquisas mostram que o DNA de OGMs, mesmo o libertado após a morte das células, pode ser transferido para outras células. (Gaylarde et al., 2005)

6.3.1 Métodos de Controlo dos OGMs

Uma das críticas mais comuns da biorremediação é a incapacidade de se documentar a eficácia de um processo de remediação de longa duração, sem a utilização de métodos de análise caros, como a cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

Afirma-se frequentemente que a biorremediação é a tecnologia de tratamento economicamente mais eficaz disponível, custando pelo menos um terço a menos do que os métodos convencionais de incineração ou aterro. Ao considerar a despesa adicional de monitoramento contínuo, no entanto, biorremediação pode tornar-se uma alternativa muito menos rentável. (Sayler; Ripp, 2000)

A Universidade do Tennessee, em colaboração com Oak Ridge National Laboratory, atingiu a primeira, e até agora única, libertação em campo de um OGM com fins de biorremediação. O OGM em questão foi a estirpe *Pseudomonas fluorescens* HK44. A estirpe original de qual a estirpe HK44 foi extraída, foi isolada de uma instalação central de gás, fortemente contaminada com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH).

O plasmídeo catabólico de naftaleno - pUTK21- foi introduzido na *Pseudomonas fluorescens*, formando a estirpe *P. fluorescens* HK44. Esta estirpe contem um gene *lux* produtor de bioluminescência, fundido dentro do promotor do gene catabólico de naftaleno.

Portanto, a exposição da estirpe HK44 a naftaleno resulta num aumento da expressão do gene catabólico, degradação naftaleno e uma resposta bioluminescente coincidente.

A finalidade deste esquema de engenharia foi desenvolver um OGM capaz de detectar um contaminante ambiental e responder a ele através de um sinal facilmente detectável, tal como bioluminescência.

Deste modo, a estirpe HK44 serve como um repórter para a biodisponibilidade e biodegradação do naftaleno, e, por meio de bioluminescência, pode ser usado como uma ferramenta para a monitorização in situ de processos de biorremediação. (Sayler; Ripp, 2000)

O uso do sistemas baseados no gene *lux* oferece várias vantagens para monitorização de processos de biorremediação: em primeiro lugar, a bioluminescência é facilmente detectada e não requer uso de dispositivos de pesquisa caros; Em segundo lugar, a produção de bioluminescência pela estirpe HK44 não necessita de qualquer adição exógena de produtos químicos ou co-factores; Em terceiro lugar, a bioluminescência pode ser monitorada directamente, proporcionando um perfil contínuo em tempo real, próximo do processo de biorremediação. (Sayler; Ripp, 2000)

Um outro estudo, realizado em 1993, utilizando igualmente uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens* modificada, passou pela adição deste OGM no meio ambiente, para prever a sua sobrevivência. Para isso, a bactéria modificada foi aplicada em sementes do trigo e vaporizada nas folhas emergentes. As conclusões das investigações foram as seguintes:

- A vaporização não causou grande espalhamento do OGM nas áreas locais adjacentes aos locais de aplicação;
- *P. fluorescens* normal e recombinante causaram mudanças temporárias (até 69 dias) na microbiota e na rizosfera das plantas inoculadas, mas não no restante do solo, e os microrganismos mais sensíveis foram os não- formadores de esporos de crescimento rápido;
- As mudanças produzidas pela introdução da linhagem recombinante não foram diferentes daquelas causadas pela não-recombinante;
- As perturbações foram pequenas, sem efeitos para o crescimento e/ou saúde das plantas.

Mesmo que estes resultados sugiram que o ambiente não tenha sido significativamente alterado, é sempre recomendado, diante das poucas evidências experimentais e práticas existentes, limitar o espaço e o tempo de vida dos OGMs. (Gaylarde et al., 2005)

7. Exemplos de aplicação de técnicas de Remediação

7.1 Exemplo de aplicação da técnica de Fitorremediação

A utilização de herbicidas é uma prática comum na atividade agropecuária e consiste numa importante ferramenta para se alcançarem elevadas produções em áreas extensas.

Todavia, o emprego de moléculas que apresentam longo período residual no solo, pode resultar na impossibilidade de uso da área por espécies de interesse agrícola, susceptíveis ao herbicida em questão.

O sulfentrazone, recomendado para uso em pré-emergência na cultura da cana-de-açúcar, destaca-se como herbicida de larga utilização e que apresenta longo período residual no solo.

Resíduos de sulfentrazone podem permanecer no solo por cerca de dois anos, oferecendo risco de contaminação a lençóis freáticos e impossibilitando o cultivo de espécies susceptíveis. Diante disto, a fitorremediação pode representar uma opção para a descontaminação de áreas que sofreram com intensas aplicações deste herbicida. (Madalão, et al. 2012)

O potencial remediador das espécies *Crotalaria juncea*, *Canavalia ensiformis*, *Cajanus cajan* e *Cajanus cajan* para o herbicida sulfentrazone foi medido, utilizando-se o milho (*Pennisetum glaucum*) como planta bioindicadora. O mecanismo responsável pela remediação ainda não está bem elucidado, mas, no caso da fitorremediação de herbicidas (particularmente do sulfentrazone), a fitodegradação é o mecanismo mais provável, considerando-se a possibilidade de completa mineralização do contaminante por esta via. (Madalão, et al. 2012)

Quando *P. glaucum* foi cultivado após *C. juncea*, apresentou maior ganho em biomassa e maior altura, e os sintomas de fitotoxicidade foram menos acentuados.

C. juncea apresenta assim a maior capacidade de fitorremediar solos contaminados com sulfentrazone, sendo assim considerada como a planta mais desejável para efetuar fitorremediação dos solos contaminados com este herbicida. (Madalão, et al. 2012)

7.2 Exemplo de aplicação da técnica de Biorremediação

7.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* KUCdI, um possível candidato para biorremediação de cádmio

Entre os metais ou metalóides, o arsénio, cádmio, mercúrio, chumbo e cromo são conhecidos por serem extremamente tóxicos em baixas concentrações, mesmo que não tenham nenhuma função biológica significativa até agora descoberta. Cádmio (Cd) causa taxa de crescimento reduzida, fase de latência longa, menor densidade de células e pode até causar a morte de bactérias em níveis inferiores a 1 ppm.

As bactérias podem desintoxicar metais pesados de modos diferentes. Muitas bactérias adsorvem metais pesados na sua parede celular ou ligam iões-metálicos a proteínas. Os micróbios podem também fazer precipitar metais pesados de forma a reduzir a sua biodisponibilidade. (Sinha; Mukerjee, 2009)

Foi encontrada uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* KUCdI resistente a Cd, que pode eficazmente acumular Cd, tornando esta estirpe no candidato ideal para recuperação de um ambiente contaminado com este metal. (Sinha; Mukerjee, 2009)

A distribuição de Cd na célula foi investigada e o resultado mostrou que uma grande fracção do total acumulado de Cd intracelularmente se encontra no envelope bacteriano (84,43%), sendo que a maior parte no periplasma (com um máximo de 55,98%). (Sinha; Mukerjee, 2009)

O citoplasma teve uma acumulação de Cd muito baixo, cerca de 15,57% do total da absorção. (Sinha; Mukerjee, 2009)

Nos testes realizados à *Pseudomonas aeruginosa* KUCdI resistente a Cd, durante a fase ativa de multiplicação, a estirpe apresentou capacidade de remover mais de 75% e 89% de cádmio solúvel do meio de cultura e da água residual industrial contendo Cd. (Sinha; Mukerjee, 2009)

Pode-se concluir então que a estirpe mostra uma grande promessa para a desintoxicação microbiológica bem sucedida de Cd por biorremediação quer *in situ* quer *ex situ*, de locais contaminados com Cd, sobre as condições de crescimento adequadas. (Sinha; Mukerjee, 2009)

7.2.2 Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados

O mundo atual está cada vez mais dependente do petróleo e de seus derivados para a manutenção de sua atividade industrial. O que se tem notado, nas duas últimas décadas, é que a

poluição causada por petróleo tem sido um dos principais problemas do meio ambiente. Quando ocorre o derramamento de gasolina em solos, por exemplo, uma das principais preocupações é a contaminação das águas subterrâneas, que também podem contaminar, especialmente, os aquíferos, que são usados como fontes de abastecimento de água para o consumo humano. (Andrade et al., 2010)

Em 1975, perto de 300 mil litros de combustível de avião foram derramados em Hanahan, South Caroline. Imediatamente após o derrame, foram tomadas medidas para evitar que o combustível se espalhasse abundantemente, que falharam em impedir que este entrasse no solo permeável e atingisse a água subterrânea. Como resultado, a água que servia áreas residenciais encontrava-se contaminada, em 1985. Depois de serem efectuados estudos pelo *U.S. Geological Survey* foram encontrados microrganismos naturais presentes nos solos que estavam ativamente a consumir os poluentes e a transformá-los em componentes inofensivos. Também concluíram que a taxa de degradação dos poluentes poderia ser muito aumentada pela adição de nutrientes - Bioestimulação. No final de 1993, a contaminação nas águas da área residencial tinha sido reduzida por 75% e a água subterrânea que antes continha mais de 5 000 partes por bilião de tolueno estava sem contaminantes detetáveis. (Chapelle, 1995)

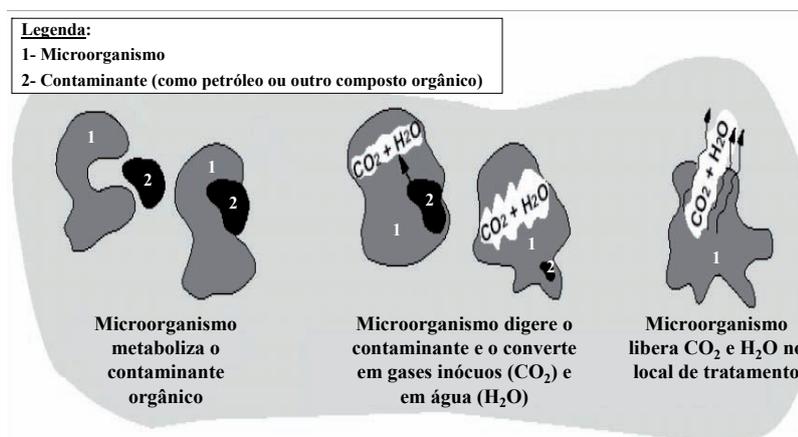


Figura 3 - Esquema representativo do processo de remediação de contaminantes orgânicos (Adaptado de Andrade et al., 2010)

O petróleo é uma mistura complexa que contém vários compostos, sendo que os hidrocarbonetos representam a fração majoritária. De acordo com a sua origem, a composição química e as suas propriedades físicas variam. Devido, principalmente, à complexidade dessa mistura, o tratamento de áreas contaminadas por essas substâncias é bastante difícil e problemático. (...) Os compostos de interesse que exigem maior preocupação ambiental são: os benzenos, toluenos, etilbenzenos e xilenos. Esses compostos, são definidos como hidrocarbonetos

monoaromáticos, cujas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzénico. (Andrade et al., 2010)

Esses compostos aromáticos são tóxicos tanto ao meio ambiente como ao ser humano, nos quais atuam como depressoress do sistema nervoso central e apresentam toxicidade crónica.

A biorremediação aeróbica requer um meio oxidante. O oxigénio atua como recetor de eletrões e os contaminantes são utilizados pelos microrganismos como fontes de carbono (doador de eletrões), necessários para manter as suas funções metabólicas, incluindo o crescimento e reprodução. Os hidrocarbonetos monoaromáticos cumprem essa função como doadores de eletrões, caso haja recetores suficientes (oxigénio dissolvido) para que a reação ocorra, sendo assim utilizados e degradados pelas bactérias. (Andrade et al., 2010)

Pesquisas sugerem que devido à elevada diversidade de compostos em solos contaminados por petróleo e derivados, estudos preliminares à biorremediação são de suma importância para o tratamento dessas matrizes ambientais. Salienta-se que o fator crítico para definir se a biorremediação é a técnica mais apropriada para o tratamento do local contaminado é a biodegradabilidade do contaminante. Por isso, o estudo detalhado de cada parâmetro que afeta a biodegradação deve ser feito cautelosamente pelos responsáveis do projeto de remediação. (Andrade et al., 2010)

Conclusão

Os problemas ambientais atuais atingiram proporções históricas, causando uma enorme necessidade de técnicas de remediação com uma boa relação custo-benefício. Quando comparada com processos tradicionais, como incineração ou aterro, a biorremediação apresenta a relação mais favorável, oferecendo a possibilidade de reduzir ou eliminar completamente um poluente num determinado ambiente contaminado, ao preço mais baixo.

Os organismos ideais para estes processos de remediação são as bactérias, uma vez que possuem uma grande adaptabilidade a diversos ambientes e que possuem uma enorme variedade metabólica. No entanto, organismos como plantas e fungos também são usados.

O processo de biorremediação pode seguir várias técnicas, que devem ser aplicadas de acordo com cada caso, como por exemplo: tratamento *in situ* ou *ex situ*, adição de bactérias exógenas com propriedades de degradação mais adequadas ao contaminante em questão ou adição nutrientes de maneira a “alimentar” as bactérias naturais do local contaminado. Para tomar esta decisão, estudos com equipas multidisciplinares devem ser realizados e cada situação deve ser analisada.

Algumas das limitações desta técnica, como concentrações baixas de poluentes, taxa de remediação baixa ou incompatibilidades entre os contaminantes e o processo, podem ser resolvidos com recurso a OGMs. Mas o uso destes organismos levanta questões de segurança, devido à falta de conhecimento relacionado com a sobrevivência destas bactérias no ambiente e interação com outras espécies.

Os desafios para o progresso desta técnica incluem ultrapassar a falta de conhecimento integrado, uma vez que a biorremediação é um tema multidisciplinar, que exige investigadores de diversos campos, como microbiologistas, bioquímicos, engenheiros, geologistas, etc.

Assim, apesar de já se encontrar a ser utilizada em várias situações, como descontaminação de solos com pesticidas, herbicidas, metais pesados e petróleo, a biorremediação é uma técnica muito promissora para encontrar solução os ambientes contaminados no nosso planeta.

Bibliografia

1. Andrade, Juliano de Almeida; Augusto, Fábio; Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes (2010) - **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. *Jornal Eclética química*. vol: 35
2. Andrezza, Robson; Camargo, Flávio Anastácio de Oliveira; Antonioli, Zaida Inês, Quadro, Maurício Silveira; Barcelos, Amauri Antunes (2013) - **Biorremediação de áreas contaminadas com Cobre**. *Revista de Ciências Agrárias*, 2013, 36(2):127-136; Sociedade das ciências agrárias de Portugal
3. Chapelle, F.H (1995) - **United States Geological Survey Bioremediation: Nature's Way to a Cleaner Environment**. Acedido a 20/0//2016 em <http://pubs.usgs.gov/fs/1995/0054/report.pdf>
4. Gaylarde, Christine Claire; Bellinaso, Maria de Lourdes; Manfilo, Gilson Paulo (2005) - **Biorremediação - aspetos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos**; *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. vol: 34 pp: 36-43
5. Greeshma, Odukkathil; Namasivayam, Vasudevan (2016) - **Residues of endosulfan in surface and subsurface agricultural soil and its bioremediation**; *Journal of Environmental Management*. Jan 1, 2016, Vol. 165, p72, 9 p.
6. Hornung, U. (1997) **Soil venting**. Acedido a 3/08/2016 em <http://cage.rug.ac.be/nms/LHKW/lhkw.htm/>.
7. Leung, Molly (2004) - **Bioremediation: Techniques for Cleaning up a mess**. *Jornal BioTeach*. vol: 2 pp: 18-22
8. Mabik (2004) - **Bioremediation: Natures way to a cleaner Environment**. Malaysian Biotechnology information centre Acedido a 25/7/2016 em <http://bic.org.my/Bicnews/9/2739/12/2004>
9. Madalão, João Carlos; Pires, Fábio Ribeiro; Chagas, Kristhiano; Filho, Alberto Cargnelutti; Procópio, Sergio Oliveira. (2012) - **Uso de leguminosas na fitorremediação de solo**

contaminado com sulfentrazone ; *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 390-396, out./dez. 2012

10. Marques M., Rosa G., Aguiar C. (2006) - **Plants with potential for phytoremediation of oil-contaminated soil based on germination and biomass growth** NATO/ CCMS Workshop on Management of Industrial Toxic Waste
11. Mashi, Hassan B. (2013) - **Biorremediation: Issues an Challenges**; *jornal JORIND*. vol: 11 (2) pp: 1596-8303
12. Pereira, Aline Ramalho Brandão; Freitas, Diego Antônio França (2012) - **Uso de microorganismos para a Biorremediação de ambientes impactados**. *Revista Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, Pereira & Freitas, v(6), no 6, p. 975 – 1006, 2012.
13. Sayler, Gary; Ripp, Steven (2000) - **Risk assessment for the release of a recombinant microorganism**. *Environmental biotechnology* Capítulo: 11, pp: 286–289
14. Sinha, Sangram; Mukherjee, Samir Kumar (2009) - **Pseudomonas Aeruginosa kudcI, a possible candidate for cadmium bioremediation**. *Brazilian Journal of Microbiology*.vol: 40 pp: 655-662
15. Vidali, M. (2001) - **Bioremediation - An overview**; *IUPAC, Pure and Applied Chemistry* 73, 1163–1172

Bibliografia de imagens

1. Mashi, Hassan B. (2013) - **Biorremediation: Issues an Challenges**; *jornal JORIND*. vol: 11 (2) pp: 1596-8303
2. Andrade, Juliano de Almeida; Augusto, Fábio; Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes (2010) **biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. *Jornal Eclética química*. vol: 35