BIORREMEDIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE NITRATOS POR BIOESTIMULAÇÃO. APLICAÇÃO AO AQUÍFERO SERPA-BRINCHES

J. Madeira[1], M.R. Carvalho[2], S. Chaves[3]
[1]Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal
[2]Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Geologia
[3]Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, BioFIG

RESUMO
O aquífero Serpa-Brinches corresponde ao sector Este do sistema aquífero dos gabros de Beja (SAGB) e é caracterizado como sendo livre e pouco profundo. Devido às suas características geológicas e hidrogeológicas este aquífero é considerado muito vulnerável à contaminação, apresentando geralmente concentrações de nitrato superiores ao valor permitido por Lei, 50 mg/l.
A biorremediação, por bioestimulação, consiste numa estratégia de remoção de nitrato frequentemente adoptada dada a sua acção rápida, baixo investimento e aplicação *in-situ*. Esta técnica baseia-se no processo de desnitrificação biológica, sendo este responsável pela redução do nitrato a azoto molecular. Neste estudo, a estimulação deste processo foi realizada através da adição de uma fonte de carbono à água subterrânea (etanol, serradura, carvão, ácido cítrico ou ácido acético).
De forma a identificar o melhor plano de biorremediação do aquífero em estudo, seleccionaram-se a fonte de carbono e o consórcio de microrganismos mais eficientes na remoção de nitrato do meio.
Foi ainda simulado o fluxo e movimento de partículas no aquífero, para identificar a técnica de aplicação *in-situ* mais adequada à estratégia de biorremediação desenvolvida neste estudo

Pavras-Chave: Aquífero Serpa-Brinches, biorremediação, bioestimulação, nitrato.

ABSTRACT
Serpa-Brinches aquifer corresponds to the Este sector of the gabros de Beja aquifer system, being characterized as unconfined and shallow. Due to its geologic and hidrogeologic characteristics this aquifer is very vulnerable to contamination, presenting nitrate concentrations generally higher than allowed by law, 50 mg/l.
The bioremediation, by Biostimulation, consists in a nitrate removal strategy frequently adopted due its quick action, low investment and on-site application. This technique is based on the process of biologic denitrification, being responsible for the nitrate reduction to molecular nitrogen. In this study, the stimulation of this process was made through the addiction of a carbon source to the groundwater (ethanol, sawdust, coal, citric acid or acetic acid).
To identify the most suited bioremediation plan for the Serpa-Brinches aquifer, the most efficient carbon source and microbial consortium on the nitrate removal from the medium, were selected.
It was also simulated the aquifer flow and particle movement, to identify the on-site application most suited to the bioremediation strategy developed in this study.

Keywords: Serpa-Brinches aquifer, bioremediation, biostimulation, nitrate.

INTRODUÇÃO
As principais causas de poluição por nitrato em Portugal têm origem, sobretudo, na intensificação da agricultura de regadio e na actividade pecuária.
Uma das grandes preocupações acerca da presença de nitrato em água para consumo humano está relacionada com a toxicidade deste composto, uma vez que o nitrato pode ser reduzido a nitrito pelo metabolismo humano. Quando esta redução ocorre no organismo humano pode causar uma doença designada metemoglobinémia, que afecta maioritariamente bebés com menos de 6 meses de idade. Alguns autores (Soares, 2000; Gulis *et al*, 2002, Agostinho e Pimentel, 2005) conseguiram ainda estabelecer uma ligação entre a ingestão de nitrato e a formação de carcinomas, em determinados casos. Contudo, são necessários mais estudos para afirmar com certeza a existência dessa relação (van Loon *et al*, 1997; Yang *et al*, 2007).

Devido às potenciais consequências derivadas da ingestão de nitrato, é fundamental recorrer atempadamente a técnicas adequadas à sua remoção, de modo a evitar o consumo de água contaminada, uma vez que os tratamentos convencionais não removem eficazmente este composto (Soares, 2000).

ENQUADRAMENTO GEOLÓGICO E HIDROGEOLÓGICO

O SAGB é essencialmente constituído por gabros e dioritos, pertencentes ao Complexo Ígneo de Beja e ao Complexo Ofiolítico de Beja-Acebuches. Em termos hidrogeológicos, estas litologias apresentam um comportamento hidrodinâmico e hidroquímico relativamente homogéneo, o que permite considerá-las num único conjunto.

O sistema exibe um comportamento de aquífero livre e misto de características porosas e fissuradas (Duque, 1997, 2005; Duque e Almeida, 1998; Paralta, 2000).

Duque (2005) estimou a transmissividade média de 37,9 m^2/dia para este aquífero, mediana de 16,2 m^2/dia, mínimo de 3,1 m^2/dia e máximo de 371,4 m^2/dia. Segundo este autor, a distribuição da transmissividade tem uma grande variabilidade espacial, como é característico de aquíferos fracturados, sendo que as áreas do aquífero com menor transmissividade se encontram representadas ao redor de Serpa.

A condutividade varia localmente, observando-se variações entre 0,0002 m/dia a 25 m/dia. Os valores mais baixos estão associados às zonas constituídas por blocos mais compactos e os valores mais elevados a zonas mais alteradas e fracturadas (Duque, 2005).

A superfície piezométrica acompanha aproximadamente o modelado topográfico, com gradientes suaves entre 2 e 4% para Oeste, encontrando-se a poucos metros de profundidade (entre 0,75 e 5 m de profundidade, Duque e Almeida, 1998), embora na época estival o nível piezométrico desça alguns metros.

A principal fonte de recarga do sistema aquífero provém da precipitação que se infiltra em toda a área de afloramento do sistema, embora as zonas mais elevadas sejam mais propícias para esse efeito. O sistema descarrega através de nascentes e, fundamentalmente, nas linhas de água, até ser atingido o nível de equilíbrio.

A água subterrânea proveniente deste aquífero apresenta, geralmente, elevada mineralização, apresentado medianas de condutividade eléctrica e resíduo seco de 684 µS/cm e 484 mg/l, pH com tendência alcalina (> 7) e fácies bicarbonatadas calco-magnesianas dada a circulação da água em rochas ígneas básicas (gabros), (Paralta, 2000).

O principal problema ao nível do consumo humano das águas deste aquífero prende-se com os teores em nitrato, que frequentemente ultrapassam o limite legalmente imposto, 50 mg/l (Duque e Almeida, 1998, Duque, 2005, Paralta, 2000, Paralta e Francés, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram efectuadas quatro amostragens de água subterrânea para a realização do mesmo números de ensaios laboratoriais. Sendo o aquífero de Serpa-Brinches relativamente uniforme do ponto de vista litológico, químico e ambiental, optou-se por recolher água num poço ("Horta dos Banhos") onde se juntam águas de várias captações.

Os resultados obtidos no primeiro ensaio laboratorial permitiram concluir que a atenuação natural do aquífero, expressa por um controlo, não teve capacidade para reduzir a concentração de nitrato presente no meio até valores permitidos por Lei para águas de consumo humano, justificando a necessidade de se recorrer à bioestimulação. A utilização dos bioestimuladores, ácido acético e ácido cítrico como fontes de carbono nas concentrações adoptadas (0,1 M e 0,030 M, respectivamente) para este trabalho eram inadequadas uma vez que reduziam drasticamente o pH da água (3,4 e 2,7, respectivamente). Os valores de pH referidos não suportam o crescimento da maior parte das bactérias desnitrificantes e para além disso, a água para consumo humano não pode apresentar pH inferior a 6,5 (Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto)

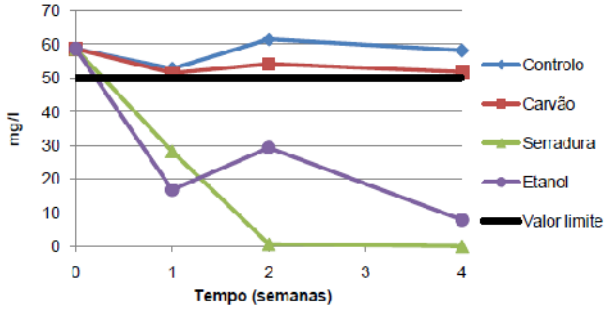

Figura 1 - Concentrações de nitrato presente nas amostras do primeiro ensaio.

De todas as fontes de carbono utilizadas, observa-se que a mais eficiente é a serradura, dado que permite remover na totalidade o nitrato presente na água (Figura 1), situação que nenhuma das restantes fontes de carbono permitiu alcançar. No entanto, esta elevada remoção de nitrato teve como consequência a formação de nitritos (Figura 2) acima do limite estipulado por Lei (0,5 mg/l).

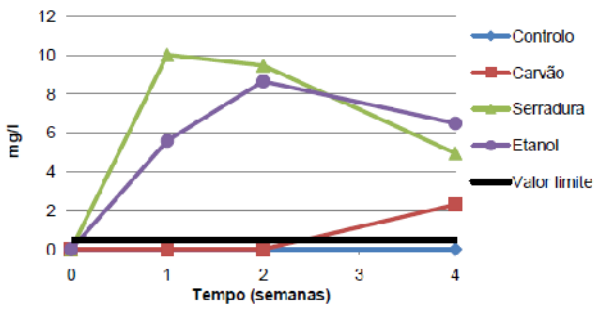

Figura 2 - Concentrações de nitrito presente nas amostras do primeiro ensaio.

A segunda fonte de carbono mais eficiente foi o etanol (fonte de carbono de referência), tendo permitido uma redução de nitrato de 86% (Figura 1). Tal como na serradura, a elevada redução de nitrato levou à acumulação de nitrito muito acima do valor permitido, tendo ultrapassado este em 14 vezes (7 mg/l). O carvão, das três fontes de carbono testadas, foi a única que não foi capaz de suportar a remoção eficiente do nitrato presente no meio (12% de remoção), não tendo sido atingido o valor limite imposto na Lei (Figura 1). Uma vez que a utilização do carvão não permitiu remover a maior parte do nitrato existente no meio, não houve uma formação de nitrito tão elevada. Ainda assim, o valor de nitrito resultante da adição do carvão esteve também acima dos 0,5 mg/l durante a duração do tratamento.

A relação observada entre as fontes de carbono em termos de eficiência de remoção de nitrato manteve-se também ao nível do número mais provável de (NMP) microrganismos presentes nas amostras tratadas (Figura 3).

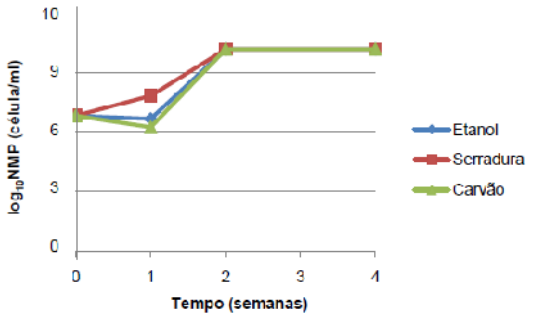

Figura 3 - Determinação do NMP das amostras do primeiro ensaio.

A serradura, que demonstrou ser a fonte de carbono com maior eficiência, foi também a que permitiu suportar o crescimento do maior número de microrganismos. Dada a ausência de oxigénio no meio, a presença de nitrato e a serradura como a única fonte de carbono, estes microrganismos deverão corresponder a desnitrificantes que permitem a remoção de nitrato com utilização de serradura como fonte de carbono. De forma concordante, o NMP para o meio com etanol é inferior ao da serradura, tal como a eficiência de remoção de nitrato, sendo o carvão o menos eficiente, quer na remoção, quer em suportar o crescimento de microrganismos (Figura 3).

O segundo ensaio efectuado não forneceu confiança nos resultados, uma vez que a leitura do NMP de microrganismos presentes nas amostras analisadas indicou a ocorrência de contaminações nos ensaios microbiológicos, pelo que se optou por não o considerar para o estudo.

Os resultados obtidos no terceiro ensaio foram muito semelhantes aos do primeiro. Neste, a serradura permitiu a remoção total do nitrito formado em consequência da elevada redução de nitrato (Figura 4), o que permite inferir que uma fracção da população microbiana presente nestas amostras tem a capacidade de efectuar a desnitrificação completa do nitrato, promovendo a sua remoção sem acumulação de nitrito no final do processo.

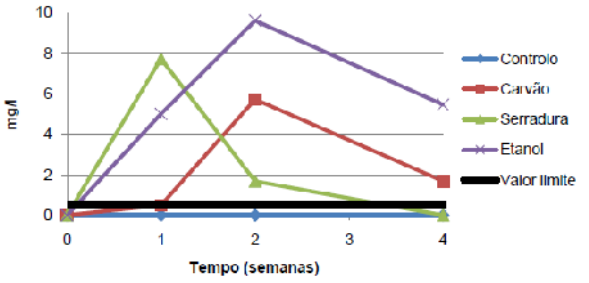

Figura 4 - Concentração de nitrito presente nas amostras de água subterrânea analisadas no terceiro ensaio laboratorial.

Através da análise dos resultados do primeiro e terceiro ensaio foi possível identificar a serradura como a fonte de carbono mais eficiente na remoção de nitrato do meio. O consórcio microbiano mais eficiente nessa remoção foi proveniente da amostra de água subterrânea com adição de serradura, ao fim de 4 semanas de tratamento, no terceiro ensaio.

O quarto ensaio laboratorial foi efectuado unicamente para determinar em quantos dias a metodologia adoptada (bioestimulação por serradura) reduzia o nitrato presente no meio a valores inferiores ao legislado para água de consumo humano. O conhecimento desta situação reveste-se de elevada importância na simulação do funcionamento do aquífero, permitindo o conhecimento do que aconteceria no aquífero após a bioestimulação. Sendo o valor inicial de nitrato presente na água amostrada de 65,4 mg/l, quatro dias foram suficientes para uma redução de nitrato que permitisse atingir o valor estipulado por lei para consumo humano.

A sequenciação dos genes de rRNA 16S (RNA ribossomal da subunidade pequena do ribossoma) dos microrganismos pertencentes ao consórcio seleccionado permitiu a identificação dos seguintes géneros: *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Comamonas*, *Erwinia*, *Pantoea e Klebsiella.* Lim *et al* (2005), identificaram como bactérias desnitrificantes os géneros *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Comamonas*. Em 2006, Shapleigh, elaborou uma lista de géneros que incluem

desnitrificantes, da qual fazem parte as bactérias *Agrobacterium* e *Rhizobium*. No "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (George e Garrity, 2005), os géneros *Sphingomonas* e *Erwinia* são igualmente descritos como potencialmente desnitrificantes. A presença de um grande número de bactérias desnitrificantes no consórcio estudado é concordante e justifica a total remoção de nitrato sem acumulação de nitrito. Apenas uma das bactérias identificadas (*Pantoea sp*.) não se encontra relacionada com géneros que incluem desnitrificantes. Segundo "Bergey's", algumas estirpes do género *Pantoea* são capazes de degradar madeira. Esta pode, por outro lado, desempenhar um papel importante ao nível da degradação da serradura adicionada à água subterrânea. Quanto aos habitats dos géneros e/ou espécies identificadas, a maioria dos microrganismos desnitrificantes identificados podem ser encontrados numa grande diversidade de ambientes, incluindo ambientes aquáticos e solo. Estes factos estão de acordo com a origem dos isolados (um aquífero), suportando a sua origem autóctone. No que diz respeito às fontes de carbono que podem suportar o crescimento dos grupos identificados, estas incluem vários compostos complexos o que indica a possibilidade de algumas espécies conseguirem degradar a serradura.

A simulação de fluxo e movimento de partículas efectuada para o aquífero Serpa-Brinches, permitiu identificar que a metodologia de remediação mais eficaz corresponde ao espalhamento da serradura no solo numa zona de recarga preferencial do aquífero. Deste modo, a água de infiltração disponibilizaria o carbono orgânico fornecido pela serradura e conduzi-lo-ia para o aquífero, de forma a permitir a bioestimulação da água subterrânea e a redução da carga de nitrato e nitrito.

CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu avaliar, através de uma perspectiva integrada, as condições hidrogeológicas e microbiológicas do aquífero Serpa-Brinches de forma a seleccionar a técnica de aplicação da biorremediação mais adequada à remoção de nitrato da água subterrânea.

Através do trabalho desenvolvido foi possível seleccionar a serradura como a fonte de carbono mais eficiente no suporte ao crescimento de microrganismos capazes de proceder à remoção de nitrato e nitrito do meio a tratar. Esta fonte de carbono demonstrou ter uma eficiência superior ao etanol, considerada a fonte de carbono de referência neste estudo. Para além disso, a serradura, sendo uma fonte de carbono alternativa, apresenta a vantagem ser um desperdício industrial, resultando no seu baixo custo, além de que se torna fácil a sua remoção no final do tratamento.

O isolamento dos microrganismos do consórcio seleccionado permitiu concluir que parte destes microrganismos, presentes no aquífero em estudo, apresentam um elevado potencial de remoção do nitrato e nitrito do meio, sendo também capazes de degradar a serradura adicionada.

Através da modelação de fluxo e movimento de partículas no aquífero Serpa-Brinches, considerou-se que a metodologia de biorremediação por serradura mais eficaz na remoção do nitrato do meio seria a aplicação de serradura ao solo nas zonas de recarga do aquífero.

REFERÊNCIAS

Agostinho, J.M., Pimentel, M. (2005). Estudo de Casos de Boas Práticas Ambientais na Agricultura. ISP, 1ª edição, Porto. 96 pp.

Duque, J.M. (1997). Caracterização Hidrogeológica e Modelação Matemática do Aquífero dos Gabros de Beja. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. 210 pp.

Duque, J., Almeida, C. (1998). Modelação Matemática do Sistema Aquífero dos Gabros de Beja. Actas do 4º Congresso da Água, CD-ROM, 12 pp.

Duque, J.M.P. (2005). Hidrogeologia do Sistema Aquífero dos Gabros de Beja. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. 419 pp.

Gulis, G., Czompolyova, M., Cerhanw, J.R. (2002). An Ecologic Study of Nitrate in Municipal Drinking Water and Cancer Incidence in Trnava District, Slovakia. Environmental Research, 88: pp 182-187.

Paralta, E., (2000). Sistema Aquífero dos "Gabros de Beja" (região de Serpa), Excerto do relatório técnico. Instituto Geológico e Mineiro. 64 pp.

Paralta, E.A., Francés, A.P. (2000). Caracterização Hidrogeológica e Avaliação da Vulnerabilidade à Poluição do Complexo Gabro-Diorítico de Serpa-Brinches (Sector Oriental do Sistema Aquífero dos Gabros de Beja). Geonovas, 14: pp 27-35.

Soares, M.I.M. (2000). Biological Denitrification of groundwater. Water, Air, and Soil Polution, 123: pp 183-193.

van Loon, A.J.M., Botterwecka, A.A.M., Goldbohm R.A., Brants, H.A.M., van den Brandta, P.A. (1997). Nitrate Intake and Gastric Cancer Risk: Results From the Netherlands Cohort Study. Cancer Letters, 114: pp 256-261.

Yang, C., Wu, D., Chang, C. (2007). Nitrate in Drinking Water and Rrisk of Death from Colon Cancer in Taiwan. Environment International, 33: pp 649–653.