

INFLUÊNCIA DO BIODIESEL SOBRE COMUNIDADES MICROBIANAS EM DERRAMAMENTOS SUBSUPERFICIAIS

Débora Toledo Ramos; Helen Simone Chiaranda; Lorena Bittencourt Guimarães; Márcio Luís Busi da Silva; Henry Xavier Corseuil¹

Resumo – O uso de biocombustíveis na matriz energética brasileira e no mundo vem se tornando cada vez mais freqüente. Com isso, espera-se uma maior freqüência da contaminação ambiental decorrente de derramamentos acidentais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do biodiesel sobre comunidades microbianas em derramamentos subsuperficiais, uma vez que a presença do biodiesel em misturas contendo diesel pode atuar positivamente na degradação dos hidrocarbonetos através do aumento da biomassa bacteriana ao longo e à jusante da pluma. PCR quantitativo foi utilizado para estimar a concentração das bactérias totais (16S rDNA), redutoras de sulfato, nitrato e ferro. Os resultados demonstraram que concentrações de bactérias totais coincidiram com os pontos de maior concentração dos ácidos orgânicos voláteis (metabólitos da biodegradação do biodiesel). Não foi detectada presença de bactérias redutoras de ferro e nitrato. A alta demanda biológica de oxigênio favoreceu o aparecimento de zonas anaeróbias redutoras associadas com sulfato redução. A presença de sulfeto como indicador geoquímico corroborou com a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS). O monitoramento temporal da área utilizando qPCR demonstrou ser uma ferramenta indispensável para compreensão das mudanças nas comunidades microbianas após um evento de contaminação da água subterrânea.

Palavras-chave - biodiesel, qPCR, degradação anaeróbia de hidrocarbonetos.

Abstract – The use of biodiesel in Brazil and worldwide as a sustainable energy matrix is becoming more frequent. So, it is expected an increase in environmental contamination frequency due to accidental spills. The aim of this work was to evaluate the influence of biodiesel over microbial communities in subsurface spills, as the presence of biodiesel in mixtures containing diesel may pose a positive role in hydrocarbons degradation by increasing overall bacterial biomass along the plume length and downgradient. Quantitative PCR (qPCR) was performed to estimate the

¹ Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas (REMAS) - Florianópolis, SC - 88040-970. Tel.: (48) 3331-7569 / Fax: (48) 3234-64598. Email: debora.toledo@uol.com.br¹

concentration of total bacteria (16S rDNA), sulfate, nitrate and iron reducing bacteria. Results demonstrated that the highest bacteria concentration coincided with the highest concentration of volatile fatty acids. The high biological oxygen demand, as a result of biodiesel and its metabolites biodegradation, favored the development of anaerobic niches that are associated with sulfate reduction. The presence of sulfide as a geochemical indicator corroborated with the presence of sulfate reducing bacteria (SRB). The presence of SRB species is known to be associated with anaerobic hydrocarbons biodegradation. The use of qPCR as a monitoring tool seems to be relevant to better understand the effects of biodiesel on microbial population changes that ultimately affect hydrocarbons biodegradation and remediation.

Keywords - biodiesel, qPCR, anaerobic hydrocarbons degradation.

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista toda a problemática envolvida com o consumo do petróleo e seus derivados como riscos de derramamento, poluição do solo, ar e água, bem como o rápido aumento do preço do petróleo, combustíveis alternativos estão recebendo uma atenção considerável. (De Mello et al, 2007). Novas tecnologias estão sendo aplicadas para produzir combustíveis fósseis renováveis, tais como o biodiesel, o qual é um combustível obtido através de fontes orgânicas vegetais ou animais e produzido principalmente através da transesterificação do óleo ou gordura (Pasqualino et al., 2006). Por ser um combustível muito promissor e com a crescente introdução na matriz energética brasileira, é fato que o biodiesel poderá entrar em contato com o meio ambiente por meio de acidentes ambientais que poderão eventualmente acontecer.

O biodiesel possui uma estrutura molecular suscetível ao ataque enzimático de microrganismos os quais podem utilizá-lo em seu metabolismo para fins de crescimento (Zhang, 1998). A biodegradação do biodiesel resulta na formação de metabólitos como ácidos orgânicos voláteis (ácido acético, propiônico, butírico) que serve como substrato para o crescimento de diversos microrganismos aeróbios ou anaeróbios (Scrimgeour, 2005).

Através do uso de técnicas moleculares de identificação de microrganismos como *real-time quantitative PCR* (qPCR) é possível obter informações sobre a concentração e os tipos de comunidades microbianas dominantes que podem estar atuando no processo de biodegradação do contaminante. Por exemplo, a presença de uma enzima que catalisa a primeira etapa da degradação anaeróbia do tolueno foi detectada em comunidades microbianas que degradam tolueno sob condições de sulfato redução, ferro redução, condições desnitrificantes e metanogênicas (Beller,

2002). Existem determinadas espécies de bactérias relacionadas com estas condições por possuírem genes que expressam tal característica, *Geobacter metallireducens* associado com processo de redução de ferro (III) (Stults et al, 2001), assim como o processo de desnitrificação foi relacionado com a bactéria *Rhizobium radiobacter* (Braker, 1998).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da presença de biodiesel (B100) sobre comunidades microbianas existentes em derramamentos subsuperficiais, bem como analisar quais grupos de bactérias estão envolvidos, já que se a presença de biodiesel acarretar em um aumento da biomassa bacteriana ao longo e à jusante da pluma em misturas contendo diesel, o biodiesel poderia atuar positivamente na degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes no diesel.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

A área experimental está localizada na Fazenda Experimental da Ressacada, situada na região sudoeste da cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. No dia 12/06/08, foi feita uma liberação controlada de 100L de biodiesel de soja puro (B100) em uma área com 260m² e profundidade de aproximadamente 6m (Figura 1). Para fins de monitoramento, foram instalados 35 poços, cada um com 5 níveis de profundidade. O biodiesel foi liberado no poço identificado como fonte de contaminação (PMF). Foram selecionados 5 poços de monitoramento (PM) para realizar as análises físico-químicas e microbiológicas: PM 3, Fonte, 9, 10 e 15 (Figura 1).

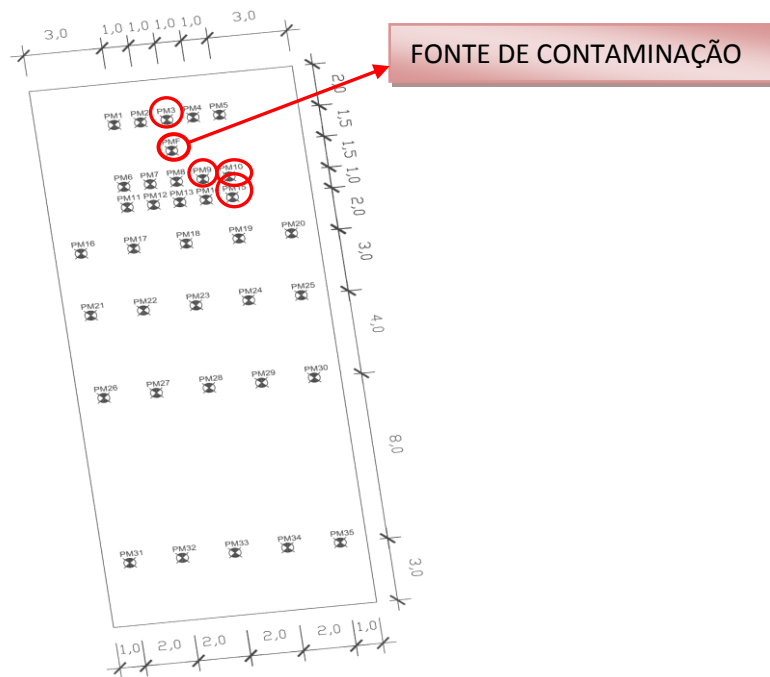


Figura 1. Demonstração gráfica da área de estudo (B100) com seus respectivos poços de monitoramento e poços de monitoramento analisados.

2.2 Coleta das Amostras

A coleta das amostras foi realizada 1 ano após a liberação controlada do biodiesel (B100). As amostras de água subterrânea foram coletadas com auxílio de uma bomba peristáltica Millipore (Modelo Easy-Load) com mangueiras Masterflex® Tygon. A coleta para as análises físico-químicas foi realizada em todos os níveis de monitoramento, enquanto que a coleta para as análises microbiológicas foi realizada somente no nível 2. Foram utilizados frascos de vidro âmbar com tampa plástica para coletar 300 mL de amostra para as análises físico-químicas, 40 mL de amostra para a análise de metano e para as análises microbiológicas foram coletados 1L de amostra, sendo estas armazenadas em frasco de vidro âmbar previamente esterilizado. Logo após a coleta das amostras, os frascos foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo e, ao chegar ao laboratório, foram mantidos sob refrigeração e as amostras foram analisadas em até 7 dias.

2.3 Análises Físico-Químicas de Indicadores Geoquímicos

As análises de metano foram realizadas em cromatógrafo gasoso (HP 6890) equipado com coluna capilar de sílica fundida HP 1 (19095z-123, HP, EUA), detector FID e headspace autosampler (HP 7694). O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo de 2 mL/ min e coluna capilar de sílica (metilsiloxano, n. 19095z-123, HP, EUA). As temperaturas de operação do injetor e detector para o metano foram 190°C e 250°C, respectivamente, e a temperatura inicial da coluna

para estas análises foi de 40°C e a final 250°C a uma taxa de aquecimento de 30°C por minuto. Para os ácidos orgânicos voláteis a temperatura do injetor foi 220°C e do detector 250°C e a programação de temperatura foi iniciada com 100°C e mantida por 3 minutos, então a temperatura aumentou para 185°C a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto e esta temperatura foi mantida por 3 minutos, a temperatura final da coluna aumentou para 240°C a uma taxa de 30°C por minuto.

Os ânions nitrato, nitrito e sulfato foram analisados em um cromatógrafo iônico (Dionex, modelo ICS-1000), equipado com detector de condutividade iônica e coluna AS4A-SC. Carbonato e bicarbonato de sódio foram utilizados na fase móvel e os limites de detecção foram $\geq 1 \mu\text{g/L}$. As análises de ferro (II) e sulfeto foram conduzidas em espectrofotômetro HACH-DR / 2500. Para o ferro (II), o método seguido foi 3500-Fe D- método 1,10 fenantrolina, e para sulfeto, foi utilizado o método 4500-S² D- método colorimétrico azul de metileno (Standard Methods, APHA 2002).

2.4 Extração de DNA

A análise de biologia molecular feita pela técnica de PCR requer primeiramente a extração de DNA de bactérias que estejam eventualmente presentes na amostra de água subterrânea. E para tanto, um litro de água subterrânea proveniente dos poços de monitoramento selecionados para amostragem foi filtrada em Kitassato e bomba de vácuo usando filtro Millipore 0.22 μm . Após filtração, os filtros foram transferidos para kit de extração de DNA MoBio Power Soil™ kit (Carlsbad, CA). O DNA foi extraído de acordo com as recomendações do kit. Após o processo de extração, 100 μL de DNA foi obtido e armazenado em frascos livre de DNA e RNA com capacidade para 2 mL (Eppendorf) e estocados em congelador até o momento da análise em PCR quantitativo (qPCR).

2.5 PCR Quantitativo em Tempo Real

As análises de biologia molecular foram realizadas pelo método de reação em cadeia da polimerase (*real-time quantitative polymerase chain reaction*). PCR quantitativo foi utilizado para quantificar bactérias totais, redutoras de nitrato (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*), redutoras de ferro (gêneros *Geobacter*), redutoras de sulfato (*Desulfobacterium sp.*).

A quantificação das bactérias totais foi determinada utilizando os primers BACT1369F e PROK1492R (Beller et al., 2002 ; Da Silva e Alvarez, 2004), bactérias redutoras de nitrato foram determinadas por meio da utilização dos primers NIRS1F, NIRS6R, NIRK1F e NIRK5R (Braker, 1998), para análise de bactérias redutoras de sulfato foram utilizados os primers 361F e 685R

(Stults et al., 2001) e para as bactérias redutoras de ferro foram utilizados os primers 561F e 825R (Stults et al., 2001). As análises foram realizadas no equipamento Mastercycler ep realplex (Eppendorf) e os kits utilizados para fazer a reação da PCR foram Taqman e Sybr-Green (Applied Biosystem, EUA). A concentração das bactérias foi detectada baseando-se nos resultados provenientes de uma curva de calibração realizada com DNA de bactérias padrão conhecidas por terem determinados genes responsáveis por expressar características específicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ésteres metílicos de ácidos graxos provenientes do biodiesel são praticamente insolúveis em água devido a sua alta massa molecular e baixa polaridade (Gomes, 2008). Desta forma, em um aquífero tais compostos têm a tendência de permanecerem na fonte de contaminação ao invés de migrarem juntamente com o fluxo da água subterrânea. No entanto, quando os ésteres do biodiesel sofrem um processo de degradação o produto desta reação são os ácidos orgânicos voláteis, os quais possuem um caráter anfifílico (Scrimgeour, 2005), tornando-os capazes de migrar com o fluxo da água por possuírem solubilidade em água, afastando-se da região da fonte e, conseqüentemente, atingindo uma área de influência maior. Na Figura 2 é possível observar a migração dos ácidos orgânicos voláteis totais ao longo da área no período de 1 ano, sendo que, como há uma maior concentração de ésteres do biodiesel na fonte de contaminação, nesta região foi encontrada também uma concentração maior de ácidos orgânicos voláteis (124,1mg/L). Tais resultados indicam que um processo de degradação do biodiesel já está ocorrendo na área.

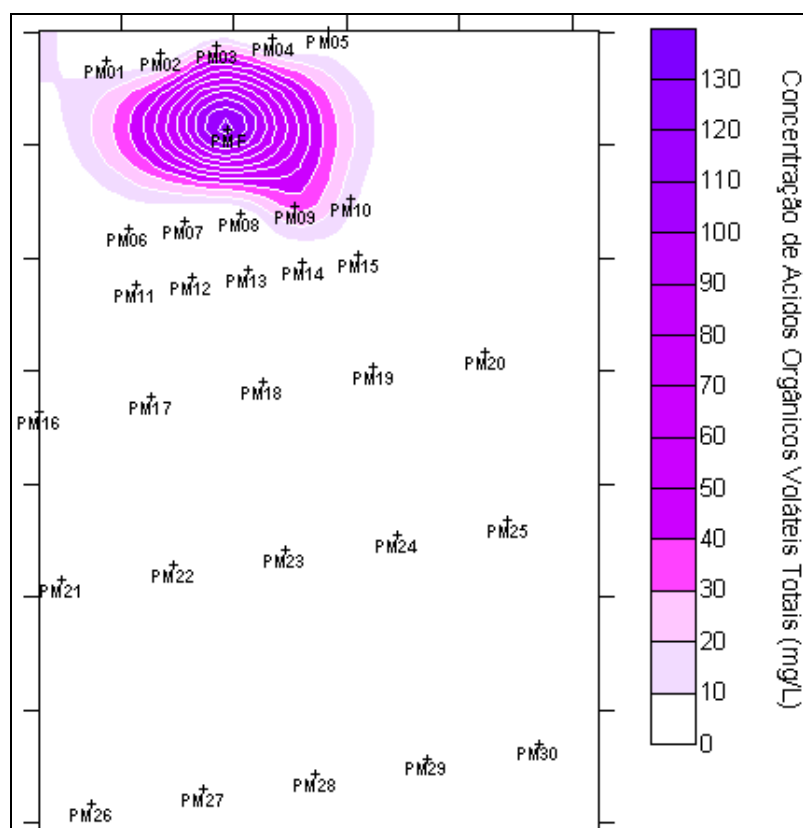


Figura 2. Concentração de ácidos orgânicos voláteis totais (soma dos ácidos acético, propiônico e butírico) e poços de monitoramento da área experimental, 1 ano após a liberação do biodiesel.

A presença dos metabólitos da degradação do biodiesel presente na área pode atuar como substrato para os microrganismos existentes no local. Para possibilitar este tipo de análise, foi feita uma comparação entre a área contendo biodiesel (B100) e um aquífero situado na mesma região, porém não contaminado (ANC). Foi observado que a concentração bacteriana nas regiões onde foi detectada a presença de ácidos orgânicos voláteis também foi significativamente maior do que quando comparado a um aquífero não contaminado (Figura 3), cujas concentrações bacterianas ficaram abaixo do limite de detecção ($<10^1$ número de cópias de gene / mL). Os resultados apresentados na figura 3 demonstraram que a presença destes metabólitos do biodiesel favoreceu o aumento da biomassa de microrganismos na área de influência. É esperado que este aumento da biomassa, em consequência da alta biodegradabilidade do biodiesel e seus derivados (ácidos orgânicos voláteis), favoreça o crescimento de bactérias que possuam o gene catabólico responsável pela degradação de BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos).

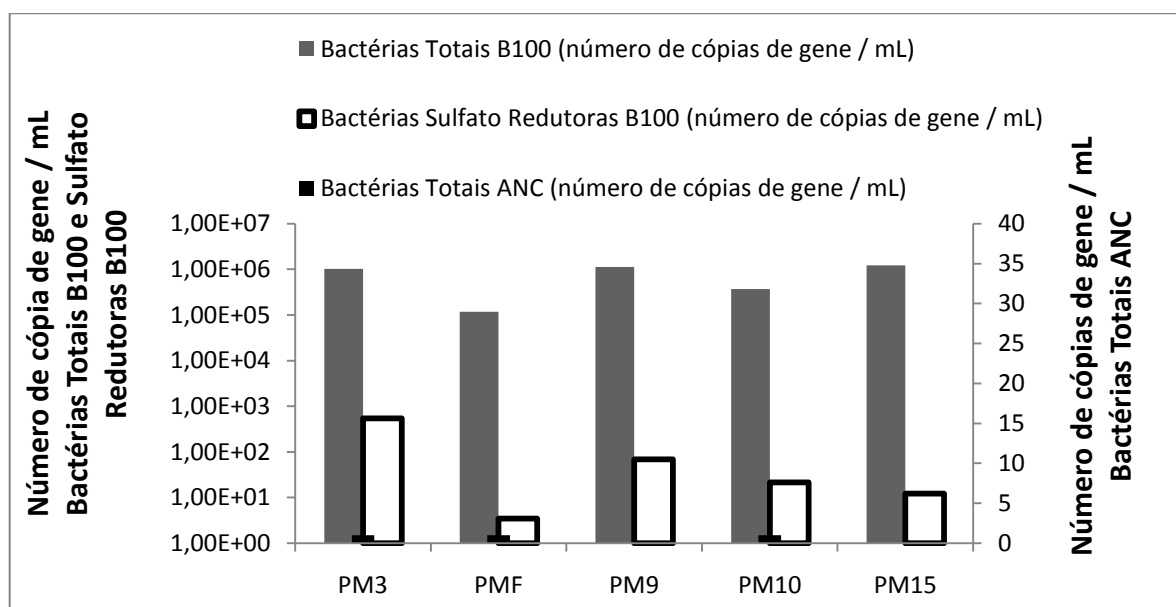


Figura 3. Poços de monitoramento e concentração de bactérias totais e sulfato redutoras na área B100 e bactérias totais na área ANC.

Com a redução da disponibilidade de oxigênio os microrganismos irão passar a consumir outros receptores de elétrons, tais como, nitrato (NO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}), manganês (Mn^{4+}), ferro (Fe^{3+}) e gás carbônico (CO_2) para poderem fazer a oxidação da matéria orgânica. A utilização preferencial destes compostos é determinada de acordo com a quantidade de energia que estes podem fornecer as células microbianas, ou seja, quais são termodinamicamente mais favoráveis e também pela disponibilidade destes no meio (Chapelle, 2001). Para monitorar a ocorrência de processos como nitrato, ferro e sulfato redução, analisam-se os intermediários do processo de redução destes compostos como, sulfeto (S_2^-), nitrito (NO_2^-) e ferro II (Fe^{2+}).

A presença de grande quantidade de matéria orgânica resultante da degradação do biodiesel e de seus ácidos orgânicos voláteis faz com que a demanda biológica de oxigênio aumente, favorecendo o aparecimento de zonas anaeróbias redutoras. A ocorrência de sulfato redução pode ser caracterizada pela presença de sulfeto, o qual foi encontrado em concentrações de até 10 mg/L (Figura 4). Os resultados das análises de sulfeto revelaram uma maior concentração deste composto nos poços de monitoramento onde foi encontrada uma maior concentração de ácidos orgânicos voláteis (Figura 2), desta forma, observa-se que houve o aparecimento de uma zona anaeróbia redutora associada à sulfato redução. Tal resultado corrobora com o fato de ter sido encontrada presença de bactérias anaeróbias na área, especificamente, pertencentes ao grupo de bactérias redutoras de sulfato (Figura 3). Embora não caracterizadas, BRS são frequentemente associada à biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos (Beller, 2002 ; Rabus, 1998 ; Beller, 1997 ; Kane, 2002 ; O'Flaherty, 1998 ; Muuyzer e Stams, 2008). Adicionalmente, apesar de serem nomeadas de

acordo com sua habilidade em utilizar sulfato como receptor de elétrons, BRS podem crescer em ambientes com pouca concentração de sulfato, ou até mesmo na ausência deste. BRS podem participar de processos fermentativos desempenhando um papel importante na degradação de compostos orgânicos em ambientes anaeróbios, uma vez que estes compostos atuam como substratos para o processo fermentativo mediado por este grupo específico de bactérias. (Bryant et al., 1977; Guyot e Brauman, 1986; Muuzer e Stams, 2008; O'Flaherty, 1999).

A presença de nitrito em uma área pode caracterizar a existência de processo de nitrato redução. No entanto, os resultados demonstraram ausência de nitrito nos poços de monitoramento analisados o que é coerente com o resultado de ausência de bactérias redutoras de nitrato na área (dados não demonstrados). Foram encontradas concentrações de ferro II na área, o que poderia caracterizar a ocorrência de ferro redução, porém, não foi detectada presença de bactérias redutoras de ferro.

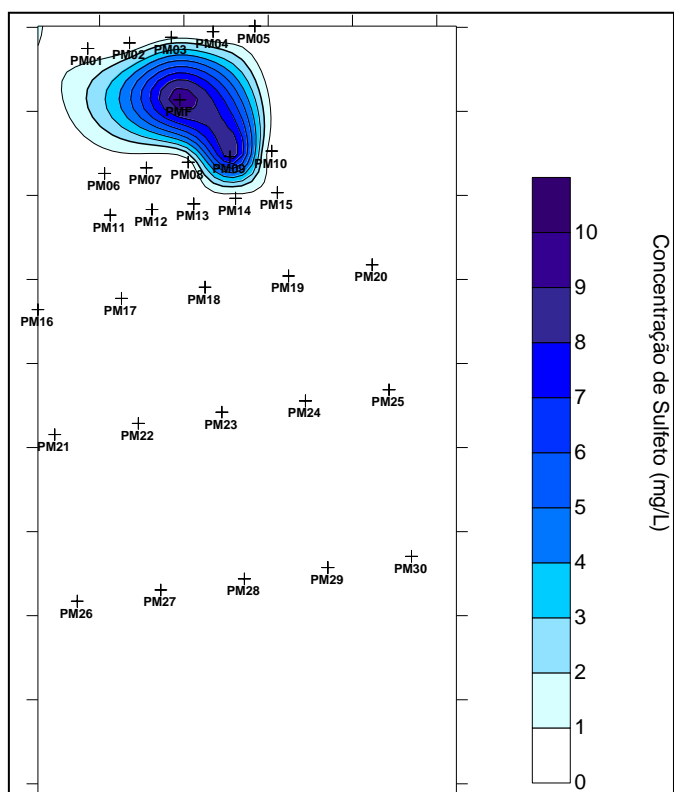


Figura 4. Concentração de sulfeto e poços de monitoramento da área experimental, 1 ano após a liberação de biodiesel.

As análises de biologia molecular juntamente com as análises químicas dos indicadores geoquímicos, serviram como ferramentas para possibilitar a compreensão dos processos que podem estar eventualmente ocorrendo em um aquífero contendo biodiesel. Os indicadores geoquímicos fornecem resultados sobre a ocorrência de processos como sulfato, sulfato e ferro redução, entre

outros. As análises de biologia molecular revelam quais grupos de microrganismos estão atuando nos processos os quais são determinantes para saber se a biorremediação poderá ocorrer. Adicionalmente, a ausência tanto de indicadores químicos como de bactérias poderá também auxiliar no entendimento dos processos que estão ocorrendo na área. Por exemplo, a ausência do indicador geoquímico nitrito, bem como a ausência de bactérias redutoras de nitrato, serviram de subsídios para compreender que não está ocorrendo um processo de degradação via nitrato redução.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente trabalho demonstraram que a presença de biodiesel estimula o crescimento bacteriano. A demanda de DBO e de outros receptores de elétrons decorrentes da atividade metabólica na biodegradação do biodiesel favoreceu a formação de zonas anaeróbias redutoras de sulfato. O uso da técnica de qPCR para o monitoramento da área corroborou com os resultados geoquímicos indicando dominância dos grupos de bactérias redutoras de sulfato. BRS são capazes de degradar o biodiesel e são comumente associadas com a degradação de hidrocarbonetos. Assim, a presença do biodiesel em misturas contendo diesel pode contribuir positivamente para a degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na composição do diesel através: i) do aumento da biomassa bacteriana, e ii) contribuindo para a formação de ácidos orgânicos voláteis que possuem velocidade de migração similar à da água subterrânea e desta forma podem contribuir para o crescimento de biomassa à jusante e ao longo da pluma, precedendo a migração dos hidrocarbonetos. Contudo, estudos posteriores devem ser realizados para investigar se a biomassa formada pelo biodiesel possui genes catabólicos necessários para a biodegradação dos hidrocarbonetos presentes na composição do diesel.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLER, H. R., KANE, S. R., LEGLER, T. C., and ALVAREZ, P. J. J. A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. **Environmental Science and Technology**. v. 36, n. 18, p. 3977 -3984, 2002.

BELLER, H.R. & SPORMANN, A.M. Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfatereducing strain PRTOL1. **Applied Environmental Microbiology**. n. 63, p. 3729-3731, 1997.

BRAKER, G. ; FESEFELDT,A. ; WITZEL, K-P. Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (nirK and nirS) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 10, p. 3769-3775, Oct. 1998.

BRYANT, M.P. ; CAMPBELL, L.L. ; REDDY, C.A. ; CRABILL, M.R. Growth of *Desulfovibrio* in Lactate or Ethanol Media Low in Sulfate in Association with H₂-Utilizing Methanogenic Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.33, n.5, p. 1162-1169, May, 1977.

CHAPELLE, F. H. **Ground-water microbiology and geochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 477 p.

DA SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Enhanced Anaerobic Biodegradation of Benzene-Toluene-Ethylbenzene-Xylene-Ethanol Mixtures in Bioaugmented Aquifer Columns. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.8, p.4720-4726, 2004.

DE MELLO, J. A. ; CARMICHAEL, C. A. ; PEACOCK, E. E. ; NELSON, R. K. ; AREY, J. S. ; REDDY, C.M. Biodegradation and environmental behaviour of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**. v. 54, p. 894-904, 2007.

GOMES, A.P.N. **Biodegradação de biodiesel soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos**. 2008. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GUYOT, J.P. & BRAUMAN, A. Methane Production from Formate by Syntrophic Association of *Methanobacterium bryantii* and *Desulfovibrio vulgaris* JJ. **Applied and Environmental Microbiology**. v.52, n. 6, p. 1436-1437, Dec, 1986.

KANE, S. R ; BELLER, H.R ; LEGLER, T.C. ; ANDERSON, R.T. Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. **Biodegradation**. v. 13, p. 149-154, 2002.

MUUYZER,G. & STAMS, A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**. n.6, p. 3729-3731, May, 2008.

O'FLAHERTY,V. ; LENS,P. ; LEAHY,B. COLLERAN,E. Long-term competition between sulphate-reducing and methane-producing bacteria during full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. **Water Research**. v. 32, n.3, p. 815-825, Março, 1998.

O'FLAHERTY, V. ; COLOHAN, S. ; MULKERRINS, D. ; COLLERAN, E. Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. II: microbial interactions and toxic effects. **Bioresource Technology**. v. 68, p. 109-120, July, 1998.

PASQUALINO, J.C. ; MONTANÉ, D. ; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**. v. 30, p. 874-879, 2006.

RABUS, R. & HEIDER, J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. **Arch. Microbiol**. v.170, p. 377-384, 1998.

SCRIMGEOUR C. Chemistry of Fatty Acids. **Bailey's industrial oil and fat products**. 6. ed. Dundee: John Wiley & Sons, 2005. p. 1-43.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2002). 20th Edition. American Public Health Association. Washington, DC. USA.

STULTS, J.R. ; SNOEYENBOS-WEST, O. ; METHE,B. ; LOVLEY, D.R. ; CHANDLER, D.P. Application of the 5' Fluorogenic Exonuclease Assay (TaqMan) for Quantitative Ribosomal DNA and rRNA Analysis in Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.6, p. 2781-2789, June, 2001.

ZHANG, X.; PETERSON, C.; REECE, D.; HAWS, R. & MOLLER, G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Trans. ASAE**, v. 41, p.1423-1430, 1998.