



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BENZENO,  
TOLUENO E XILENO EM MICROCOSMOS**

**RENATA BRAZ**

Florianópolis  
Novembro/2015  
Renata Braz

# **BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BENZENO, TOLUENO E XILENO EM MICROCOSMOS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan  
Coorientador: Marilda Fernandes

Florianópolis  
Novembro/2015

**Renata Braz**

**BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BENZENO, TOLUENO E  
XILENOS EM MICROCOSMOS**

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize  
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan  
Orientador

---

Dr<sup>a</sup>. Marilda Fernandes  
Coorientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Luisa Jost

---

Dr<sup>a</sup> Jessee Severo Azevedo Silva

Florianópolis  
Novembro/2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida e toda força e fé buscada nele nos momentos em que os obstáculos pareciam invencíveis.

Aos meus pais amados, Simoni e João. Devo a vocês tudo que hoje sou e o que tenho conquistado. Incansavelmente me mostraram o caminho do bem, me ensinando valores, caráter e acima de tudo a humildade. Agradeço em especial toda a força durante a graduação, não só financeira como emocional, alimentando meu sonho e me fazendo acreditar que era possível.

A minha vó, Maria, *in memoriam*, você é minha inspiração de vida. Foi o abraço e as palavras mais confortantes que tive em toda minha história, obrigado por me lapidar e auxiliar em toda minha criação, quando meus pais precisavam estar ausentes.

A minha irmã Maria Eduarda, agradeço por entender minha ausência nos momentos especiais da sua vida, em todos esses anos. Obrigado por me remeter a infância, e lembrar coisas tão simples, porém de imensa felicidade.

Agradeço aos meus tios, tias, primos e primas por todos os votos de coragem, força e conforto nos momentos mais difíceis. O carinho e os ensinamentos recebidos de vocês foram importantes em toda esta jornada.

Ao meu amor Victor Hugo, por toda paciência comigo, todo carinho e segurança que me transmitiu. Seu otimismo, bondade, força e alegria foram meus alicerces nesses últimos meses. Obrigado por estar ao meu lado de coração aberto, me apoiando e incentivando.

As minhas orientadoras, Marilda Fernandes e Vera Buscuñan, por toda dedicação e acima de tudo, por todo o conhecimento comigo compartilhado. Agradeço de forma especial a Marilda pela confiança na elaboração deste projeto. Agradeço a Vera, pois além de uma grande professora foi uma grande amiga, me tranquilizando durante toda a execução do projeto.

Aos meus amigos Anderson, Mirela, Suelen, Júlia e Oseias, por estarem comigo desde o início da faculdade, sendo minha segunda família nos momentos bons e nos momentos ruins. Por todas as palavras de ajuda e pelas descontrações. Sentirei saudades das conversas exclusivamente sobre a faculdade e das tardes de estudos que acabava em comida. Ao Anderson agradeço a fiel amizade, carinho e toda cumplicidade adquirida ao longo destes anos, tornastes um amigo-irmão que levarei sempre comigo. Obrigado por sua amizade. A Suelen meu agradecimento

mais que especial, fostes bem mais que amiga de faculdade, você é minha melhor amiga, irmã para compartilhar os segredos e companheira de morada. Só você conhece cada detalhe de toda esta caminhada, e sem dúvidas tens a minha eterna gratidão por me aguentar durante toda a polaridade que o curso me proporcionou. A Mirela, nossa, não sei o que falar de você, minha amiga, você sempre me mostrando o lado simples da vida, sua presença me submete ao conforto da minha família, a calma. Você foi meu ponto de equilíbrio. Quero agradecer você, por toda a ajuda na parte experimental deste projeto.

Aos meus amigos do laboratório Franciane, Renan, Luisa, Bruno, Luana, Francieli e Juliana, por todo o aprendizado e união. Um agradecimento especial à química Franciane, por todas as vezes que me socorreu e por toda paciência que teve comigo na elaboração deste trabalho (eu sei que quase enlouqueci você).

E agradeço as minhas amigas, Sara, Ana, Renaly e Manuela, suas amizades foram muito especiais. Vocês foram pessoas da qual eu pude compartilhar grandes momentos e histórias incríveis durante todo esse tempo. Obrigado por fazerem parte da minha vida, vocês foram responsáveis pela minha conquista, me distraíndo, dando força, e acima de tudo muito carinho e otimismo.

Agradeço a Ana, bióloga, e sua equipe que não mediu esforços para realizar as análises que foram necessárias para o presente trabalho. Você se mostrou muito prestativa, agradeço. Suas análises foram muito importantes para a conclusão deste projeto.

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém. Confie em si mesmo. Quem Acredita sempre alcança. (Renato Russo).*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
<b>2.1 Gasolina</b> .....	18
<b>2.2 Microorganismos</b> .....	19
<b>2.3 Condições para a ocorrência da biodegradação</b> .....	20
<b>2.4 Tecnologias de remediação</b> .....	21
<b>2.4.1 In situ</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5 Biodegradação</b> .....	22
<b>2.5.1 Biodegradação Aeróbica</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5.2 Biodegradação Anaeróbica</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6 Cinética de biodegradação</b> .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	27
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	27
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	28
<b>4.1 Microcosmo</b> .....	28
<b>4.2 Instrumentação</b> .....	30
<b>4.2.1 Cromatografia Líquida e Gasosa</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2.2 Espectrofotometria</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2.3 Preparação da amostra de solo</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2.4 Análise Molecular (qPCR)</b> .....	<b>35</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	37
<b>5.1 Fatores que influenciam no processo de Biodegradação</b> .....	37
<b>5.1.1 Receptor de elétrons Sulfato</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1.2 Produtos metabólicos</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1.3 Temperatura</b> .....	<b>44</b>
<b>5.1.4 pH</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1.5 Nutrientes</b> .....	<b>46</b>
<b>5.2 Compostos benzeno, tolueno, o-xileno</b> .....	47
<b>5.3 Resultado Molecular (qPCR)</b> .....	49
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	50

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Potencial padrão de redução para os receptores de elétrons.

**Figura 2.** Distribuição de espécies de sulfeto em função do pH da solução aquosa, 25 °C.

**Figura 3.** Microcosmo constituído em vidro de penicilina com capacidade para 100 mL.

**Figura 4.** Cromatógrafo de troca iônica utilizado para as determinações dos ânions.

**Figura 5.** Cromatógrafo gasoso utilizado nas determinações dos compostos BTX e metano.

**Figura 6.** Espectrofotômetro de bancada.

**Figura 7.** Concentração de sulfato ( $\text{mg L}^{-1}$ ) na fase aquosa dos microcosmos em relação ao tempo (dias), determinados por cromatografia iônica. (n=3)

**Figura 8.** Curva de calibração do Sulfato.

**Figura 9.** Concentração de Sulfeto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) na fase aquosa dos microcosmos em função do tempo (dias), determinada por espectrofotometria. Método de azul de metileno 4500 –  $\text{S}_2^-$  D.  $\lambda_{\text{max}} = 664 \text{ nm}$ .

**Figura 10.** Concentração de acetato na fase aquosa dos microcosmos em função do tempo (dias), determinada por cromatografia iônica. (n=3)

**Figura 11.** Curva de calibração para o acetato

**Figura 12.** Concentração de metano na fase aquosa dos microcosmos em função do tempo (dias), determinado por CG - FID.

**Figura 13.** Variação da temperatura dos microcosmos ao longo do tempo (dias).

**Figura 14.** Variação do pH do microcosmos ao longo do tempo (dias).

**Figura 15.** Concentração dos compostos benzeno, tolueno, e o-xileno ao longo do tempo em dias.

**Figura 16.** In da concentração de Benzeno, Tolueno e Xileno em função do tempo, em dias.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Dados para a elaboração da curva de calibração do sulfato.

**Tabela 2.** Limite de quantificação e de detecção para determinação de sulfato.

**Tabela 3.** Dados para a elaboração da curva de calibração do acetato.

**Tabela 4.** Limite de quantificação e de detecção para determinação de acetato

## LISTA DE ABREVIATURAS

BTX - Benzeno, Tolueno, *o*-Xileno

LOD. – Do inglês, *limit of detection*, Limite de Detecção

LOQ. – Do inglês, *limit of quantification*, Limite de Quantificação

US EPA – *United States – Environmental Protection Agency*

## RESUMO

A contaminação de aquíferos proveniente do derramamento de petróleo e/ou derivados é um dos problemas ambientais de alta gravidade, visto que nos aquíferos estão confinados 30% das águas doces presentes no planeta, capaz de abastecerem a maior parte da população. A contaminação por derivados de petróleo torna a água inutilizável pois, dos diversos compostos presentes no contaminante, benzeno, tolueno e xilenos são considerado o mais nocivo à saúde humana. Uma das formas de tratamento dessas águas para que possam ser reutilizadas para suprir as necessidades humanas é a biodegradação, consumo dos contaminantes pelas colônias de bactérias, presentes no meio, servindo como fonte de energia. Esta remediação pode ser estimulada com a adição de receptores de elétrons – nutrientes que atuam como agentes oxidantes para os contaminantes, fornecendo energia para o desenvolvimento de populações específicas de bactérias. Um dos receptores de elétrons utilizados é o sulfato de sódio, por sua alta solubilidade em água, facilitando sua capacidade receptiva de elétrons e valor máximo permitido no padrão de potabilidade 250 mg L<sup>-1</sup> (CONAMA, 2009). Para avaliar a capacidade receptiva do sulfato de sódio foram montados microcosmos com solo (20 g) e água (98 mL), provenientes da fazenda Ressacada, simulando um aquífero. Foram adicionados os contaminantes benzeno, tolueno e *o*-xileno a uma concentração 60 mg L<sup>-1</sup> de cada, e sulfato de sódio a uma concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. Os microcosmos foram purgados com nitrogênio gasoso para propiciar uma condição anóxica. Em seguida os frascos foram lacrados e mantidos sob controle de temperatura e luz. O monitoramento da capacidade receptiva do sulfato foi feito a cada quinze dias, sacrificando um microcosmo e realizando as análises de benzeno, tolueno e *o*-xileno por cromatografia a gás com detector de ionização de chamas; determinações de sulfato, acetato e demais nutrientes brometo, nitrato, nitrito, fosfato e cloretos por cromatográfica de troca iônica com um detector de condutividade; as determinações de Fe II e sulfeto, ambos os produtos formados da redução dos receptores de elétrons Fe III e sulfato, respectivamente, por métodos colorimétricos, utilizando a técnica de espectrofotometria; e controle de pH e temperatura. A quantidade de receptores de elétrons sulfato não supriu a alta demanda dos contaminantes, imobilizando as bactérias sulfatorredutoras. A suposição é de que a matéria orgânica presente no solo foi utilizada como fonte energética para o desenvolvimento de bactérias Arqueas, identificadas por técnica

de biologia molecular e pelos metabólitos acetato e metano, formados. O decaimento da concentração de sulfato foi inferior a quantidade relativa necessária para degradar a concentração dos BTX presentes, estimada pelo balanço estequiométrico para degradação do benzeno, assim como a quantidade de sulfeto presente não corresponde ao produto da sulfatorredução, inviabilizando uma conclusão sobre a eficiência desta rota de biodegradação usando este solo e água subterrânea. A sulfatorredução é um mecanismo de biodegradação com um gasto energético alto. Para que esta rota de degradação ocorra é preciso ausência de oxigênio e que tenha condições favoráveis para o crescimento bacteriano tais como: pH entre 5,5 – 8,0, temperaturas entre 20,0 a 40,0 °C e os micros e macros nutrientes.

*Palavras Chaves: Contaminação de águas subterrâneas, Bioestimulação, Sulfatorredução*

## 1 INTRODUÇÃO

A água é o recurso natural essencial à vida. É assegurado pela Constituição Federal o direito de todo ser humano em ter acesso a uma água de qualidade, livres de impurezas e contaminações.

De toda a água presente no planeta, 97% não são adequadas para a dessedentação humana e uso doméstico. Somente 3% correspondem à água doce, propícia para o uso humano. A maior parte desta pequena porcentagem se encontra no estado sólido, presente nos polos, restando uma pequena fração disponível para o uso dos seres vivos. De toda água doce, 30% está confinada em aquíferos. Aquíferos são formações geológicas de armazenamento de águas subterrâneas. Nos aquíferos são encontradas as maiores reservas de água doce disponíveis da Terra.

Sabendo que a quantidade disponível de água própria para consumo é baixa comparando a extensão do planeta e dos milhares de humanos que a utilizam como fonte vital, é desafio para os ambientalistas o cuidado e controle dessas águas, que muitas vezes estão sendo contaminadas e se tornando impróprias para o uso doméstico.

Um dos maiores contaminantes das águas subterrâneas são os derivados de petróleo. Utilizados como fonte de combustão em indústrias e meios automotivos, eles são transportados frequentemente por todo território e armazenados em tanques subterrâneos. A falta de cuidado no transporte e armazenamento faz com que esses produtos, destacando-se a gasolina por ser comum e muito utilizada, atinjam o solo e, conseqüentemente, as águas subterrâneas, contaminando nossa reserva de água potável.

Das centenas de compostos presentes na gasolina, a mistura de hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno e xilenos se destaca por ser parcialmente solúvel em água, nociva à saúde humana. A exemplificar, o benzeno é considerado um composto cancerígeno.

Dentre as diversas formas de tratamentos de águas subterrâneas, a remediação *in situ* é comumente aplicada. Neste ramo da remediação destaca-se a tecnologia passiva ou atenuação natural por ser uma alternativa de baixo custo, porém lenta. Este processo de remediação pode ser acelerado ou bioestimulado

pela adição de receptores de elétrons em locais contaminados por gasolina. O desafio deste trabalho consiste em simular um aquífero contaminado, adicionando sulfato como receptor de elétrons estimulando a biodegradação do benzeno, tolueno e *o*-xileno por bactérias sulfatorredutoras.

O trabalho foi desenvolvido no Núcleo Ressacada de Pesquisa em Meio Ambiente – REMA, localizado no bairro da Tapera – Florianópolis, Santa Catarina. O Núcleo está associado a Universidade Federal de Santa Catarina através de uma parceria com diversos departamentos, destacando-se o de Engenharia Sanitária e Ambiental. O REMA desenvolve pesquisa relacionando a problemática das contaminações de solos e águas subterrâneas por petróleo e derivados de petróleo, propondo técnicas de biorremediação e modelagens matemáticas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Diante de diversos problemas ambientais que o mundo vem sofrendo, um dos grandes desafios dos ambientalistas é o tratamento de águas subterrâneas contaminadas por petróleo e seus derivados, destacando-se o benzeno, tolueno e *o*-xileno. Essas contaminações normalmente ocorrem por derramamento de petróleo e derivados nos solos, durante o processo de transporte, e por vazamentos de reservatórios de postos de combustível, atingindo os confinamentos de água.

### 2.1 Gasolina

A gasolina é composta praticamente de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e alguns derivados oxigenados (PETROBRAS). Quando derramada no solo, forma uma pluma característica de líquidos não aquosos. Ao atingir a água subterrânea a gasolina dissolve-se parcialmente, sendo os compostos: benzeno, tolueno e xilenos os primeiros a se solubilizar em água. O benzeno, tolueno e xilenos são produzidos durante o processo de destilação e estão associados aos produtos de refino, gasolina, querosene e diesel. São os constituintes mais solúveis e móveis da fração gasolina e por isso são utilizados como indicadores de contaminação por combustíveis fósseis. A solubilidade do benzeno em água é de  $1750 \text{ mg L}^{-1}$ , do tolueno  $515 \text{ mg L}^{-1}$  e do *o*-xileno de  $158 \text{ mg L}^{-1}$  (CORSEUIL, 1994).

Os hidrocarbonetos aromáticos, sendo eles o benzeno, tolueno, e xilenos (isômeros *orto*, *para* ou *meta*), são vilões ao organismo humano. Mesmo em concentrações na ordem de  $\mu\text{g/L}$  podem apresentar alta toxicidade, considerados depressores do sistema nervoso central (SILVA, *et al.*, 2002). Dentre os compostos: benzeno, tolueno e xilenos, o benzeno é considerado o mais nocivo ao homem, sendo comprovado seu efeito cancerígeno.

A resolução CONAMA nº 420 de 28 de dezembro de 2009, com base nos parâmetros estabelecidos pela portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde, e resolução CONAMA nº 396/2008 estabelece, para substâncias químicas, valores padrão que permitem a potabilidade das águas subterrâneas, sendo os valores máximos permitidos: Benzeno  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , Tolueno  $170 \mu\text{g L}^{-1}$ , *o*-xileno  $300 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A gasolina brasileira difere da maior parte das gasolinas comercializadas no exterior. No Brasil, a gasolina é uma mistura de gasolina e 24-26% de álcool (Etanol

anidro). A adição de etanol na gasolina influencia no processo de solubilidade em água, podendo aumentar a concentração de hidrocarbonetos aromáticos (BTX) na água subterrânea, assim como o aumento da mobilidade da pluma de contaminação, levando a uma dispersão da mesma pelo aquífero. Outra intervenção do etanol é no processo de retardo da biodegradação de BTX (FERNANDES E CORSEUIL, 1996; SANTOS, 1996). Durante o processo de biodegradação o etanol é preferencialmente degradado, consumindo oxigênio. O etanol pode causar alteração no ambiente inativando os microorganismos que degradam os contaminantes aromáticos (CORSEUIL, 1997).

## 2.2 Microorganismos

Os microorganismos são os principais agentes do sistema de biorremediação de aquíferos contaminados. As bactérias são capazes de converter um produto tóxico em um não tóxico (YOUNG e CERNIGLIA, 1995; ATLAS, 1997).

Para a manutenção do balanço de elétrons no metabolismo celular, os microorganismos realizam uma série de reações catalíticas (GOLDSTEIN, 1985) partindo da oxidação dos contaminantes durante o processo redox, fornecendo em contra partida energia para as células microbianas (DOLFING *et al.*, 2009) reduzindo assim o impacto ambiental causado pelo contato dos compostos nocivos no aquífero (ATLAS, 1997).

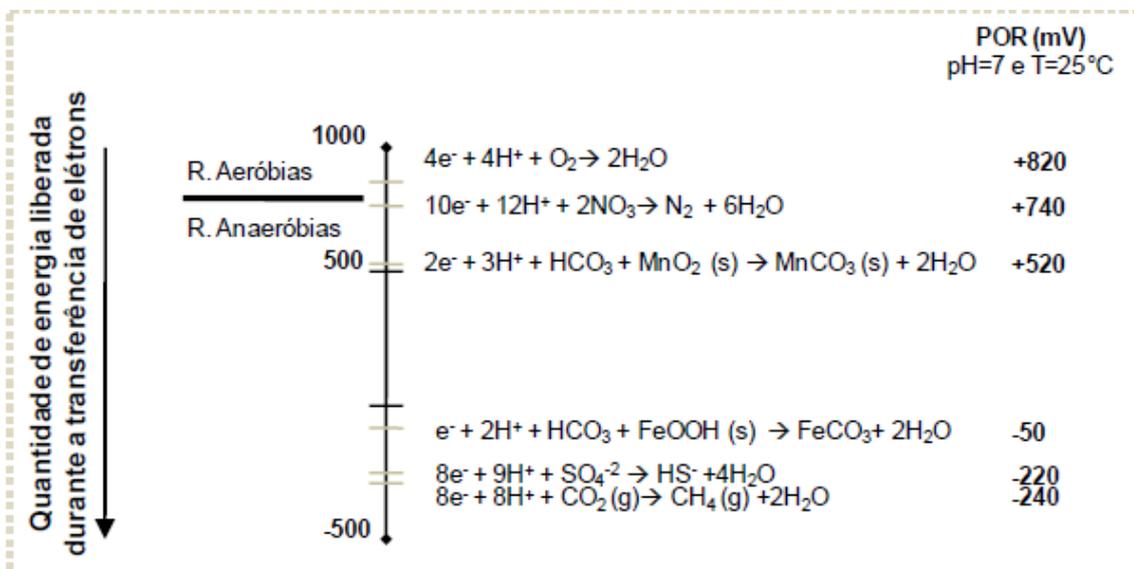
Os microorganismos sobrevivem em seus habitats sob as condições disponíveis. Quando alguma interferência atinge seu habitat leva a um distúrbio no microecossistema, forçando as bactérias a passarem por um período de adaptação. Apesar dos contaminantes servirem de fonte energética para essas bactérias é preciso um tempo de adequação para os microorganismos. A população nativa de bactérias que sobrevivem na presença do contaminante, após a adaptação, inicia a degradação. A população de bactérias nativas também é influenciada por fatores abióticos tais como, pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, competitividade e predação (BOWER e ZEHNDER, 1993; SANTOS, 1996).

### 2.3 Condições para a ocorrência da biodegradação

A utilização dos receptores de elétrons depende dos parâmetros de pH e do potencial padrão de redução ( $E^0$ ). Essas condições determinam qual a reação predominante, na qual as bactérias têm um menor gasto energético. É comum que a biodegradação ocorra na seguinte sequência: desnitrificação, redução de ferro (III), redução de sulfato e metanogênese (SMITH, 1997; FERNANDES, 2002).

Na figura 1 é possível observar a ordem das reações redox utilizando os receptores de elétrons energeticamente mais favoráveis para a degradação dos contaminantes, sob pH 7 e temperatura de 25 °C.

**Figura 1.** Potencial padrão de redução para os receptores de elétrons.



FONTE: STUMM e MORGAN (1981), adaptado por SERBENT, (2012).

O pH e a temperatura influenciam diretamente a atividade dos microorganismos. A maior parte dos microorganismos se desenvolvem na faixa de pH 6 e 8 (CHAPELLE, 2001; WIEDEMEIEIR, *et al.*, 1999), porém alguns toleram variações maiores. A temperatura é um fator primordial no desenvolvimento dos microorganismos. Predominam em ambientes superficiais os microorganismos classificados como *mesófilos* – ativamente em temperaturas na faixa entre 20 – 40 °C (CHAPELLE, 2001).

## 2.4 Tecnologias de remediação

As ações de remediação em locais contaminados podem ser classificadas como: *ex situ* – o processo de recuperação ocorre fora do local onde houve a contaminação, sendo necessário escavações e deslocamento do material contaminado para outro local e; *in situ* – este processo ocorre no mesmo local onde acontece a contaminação, fomentando menores impactos (NANO, *et al.*, 2003).

### 2.4.1 *In situ*

Em solo e águas subterrâneas contaminados, principalmente com petróleo e derivados de petróleo, a remediação *in situ* é comumente aplicada devido ao baixo custo comparado as técnicas *ex situ* e por apresentar resultados positivos para o processo. Das técnicas aplicadas, destacam-se a bioventilação, aspersão de ar (air-sparging), bioestimulação com receptores de elétrons, atenuação natural (tecnologia passiva), bioaumentação, (land-forming), entre outras (HINCHEE *et al.*, 1994; NORRIS e MATTHEWS, 1994). A técnica utilizada depende da demanda de contaminante e é baseada no cenário onde ocorre o derramamento (RAMOS, 2013).

Em locais onde há escassez de nutrientes e receptores de elétrons é inviável a aplicação do processo de atenuação natural. Neste caso, faz-se uso de tecnologias de remediação ativas (RAMOS, 2013), nas quais há interferência da engenharia durante os projetos, com intuito de acelerar a descontaminação (FAHRADIAN *et al.*, 2008).

São ditas como tecnologias ativas: a) aspersão de ar – injeção de ar na zona saturada, formando canais (JOHNSON, *et al.*, 1993). Há um aumento do oxigênio dissolvido e a volatilização dos contaminantes presentes no aquífero (NORRIS *et al.*, 1994). Esta técnica é adequada para aquíferos homogêneos; b) bioventilação – bioestimulação da biodegradação aeróbica. Ocorre o fornecimento de oxigênio no meio (HINCHEE *et al.*, 1994); c) bioestimulação com receptores de elétrons – inserção de nutrientes e/ou receptores de elétrons no local da contaminação (LIEBEG e CUTRIGHT, 1999). Os nutrientes e/ou receptores de elétrons são injetados promovendo condições seletivas e o aumento da taxa de biodegradação dos contaminantes (HOOLIGER *et al.*, 1997; DA SILVA *et al.*, 2005; FAHRADIAN *et al.*, 2008). Os principais receptores são o oxigênio, nitrato, ferro (III) e sulfato (CORSEUIL, 1997).

## **2.5 Biodegradação**

A biodegradação consiste em uma reação contendo contaminante (como por exemplo, os BTX), juntamente com um receptor de elétrons, nutrientes e microorganismos. Destacam-se como receptores os compostos que possuam afinidade por elétrons (redutores). Biodegradação procede de uma reação redox, onde o hidrocarboneto é oxidado, ou seja, doa elétrons, e os receptores de elétrons são reduzidos, isto é, ganham elétrons (FERNANDES, 2002).

### **2.5.1 Biodegradação Aeróbica**

O processo aeróbico é o mecanismo preferencial de biodegradação de contaminantes de petróleo e/ou derivados de petróleo. Os microorganismos nativos, com o auxílio do oxigênio (receptor de elétrons) e nutrientes presentes no meio, são capazes de biodegradar os hidrocarbonetos (GOLDSTEIN *et al.*, 1985).

A facilidade da biodegradação utilizando oxigênio como redutor no meio está relacionada ao peso molecular da matéria orgânica, dita como hidrocarbonetos provenientes do petróleo e/ou derivados de petróleo. Hidrocarbonetos com baixo peso molecular são comumente favorecidos para este processo (ATLAS e BARTHA, 1987).

Esta é uma técnica vantajosa energeticamente e de rápido processo, porém é limitada pela presença de oxigênio dissolvido. O rápido consumo de oxigênio pelos microorganismos resulta em posterior inibição do processo de degradação aeróbica (HUTCHINS *et al.*, 1998; DA SILVA, 2005).

### **2.5.2 Biodegradação Anaeróbica**

As limitações das condições aeróbicas tornam a técnica de biodegradação bioestimulada por receptores de elétrons em condições anaeróbicas interessante para o tratamento de aquíferos contaminados com hidrocarbonetos (REINAHRD *et al.*, 1997).

Na ausência de oxigênio, o ambiente fica adequado para a ativação das bactérias anaeróbicas, que usam os demais receptores de elétrons no processo

redox. Nesse ambiente anóxico, são utilizados como receptores de elétrons o nitrato, ferro (III), sulfato e o dióxido de carbono (FERNANDES, 2002).

Na escassez de oxigênio dissolvido, as bactérias anaeróbicas iniciam a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Porém, para as bactérias anaeróbicas serem ativamente produtivas, além da ausência de oxigênio, algumas condições devem ser atendidas, tais como, pH, temperatura, salinidade e potencial oxidação-redução (FERNANDES, 2002).

A bioestimulação anaeróbica é uma tecnologia de remediação que vem recebendo destaque por ser uma metodologia economicamente viável comparada às alternativas de remediação e também pelos receptores de elétrons serem compostos quimicamente mais estáveis do que o oxigênio. Por ser bioestimulado, o método não possui a limitação proveniente da carência de receptores de elétrons (REINHARD *et al.*, 1997; DA SILVA *et al.*, 2005).

O nitrato pode ser adotado como receptor de elétrons pelos microorganismos sob condições anaeróbicas, para degradar os hidrocarbonetos, destacando o *mix* benzeno, tolueno e xilenos. Este mecanismo é conhecido como desnitrificação. O produto da desnitrificação é o dióxido de carbono, água e nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>).

A caracterização da ocorrência da desnitrificação é o decaimento da concentração da matéria orgânica (BTX) e das concentrações de nitrato (CHAPELLE, 1993).

A biodegradação utilizando nitrato é amparada quando o meio possui pH variando entre 6 e 10, e um potencial de oxidação-redução de 665mV e -200mV (STOTZKY, 1974).

As condições para a ocorrência de nitrato redução são: a) concentrações relativas de nitrato, b) matéria orgânica, c) população de bactérias desnitrificantes, d) ausência de oxigênio dissolvido (STARR e GILLHAM, 1993).

A biodegradação utilizando Ferro (III) como receptor de elétrons torna-se predominante na ausência de oxigênio dissolvido e nitrato, utilizados como receptores de elétrons.

O ferro (III) insolúvel é reduzido a ferro (II) solúvel pela matéria orgânica (contaminante) com o auxílio de microorganismos. Esta via de degradação é muito favorável, visto que o ferro (III) geralmente é o receptor de elétrons mais abundante do meio e pode ser encontrado em sedimentos na forma de hidróxido, oxi-hidróxido e óxido de ferro (III) (LOVLEY *et al.*, 1991).

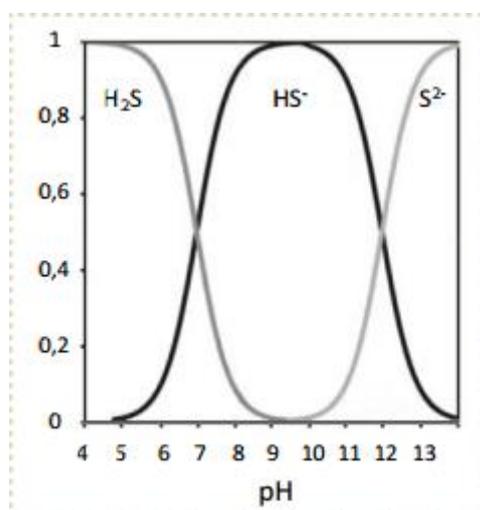
A degradação via ferroredução é caracterizada pela presença de ferro (II) dissolvido (BORDEN *et al.*, 1994). São notáveis altas concentrações de ferro (II) em ambientes contaminados com benzeno, tolueno e xilenos (LOVLEY *et al.*, 1991).

De acordo com POSTGATE (1966 e 1979), citado por FERNANDES (2002) e RAMOS (2010), as bactérias redutoras de sulfato passam a dominar a degradação de hidrocarbonetos nos aquíferos contaminados após a baixa e/ou inexistente concentração de oxigênio, nitrato e ferro (III). Um dos favorecimentos deste domínio é proveniente do baixo potencial de oxidação-redução em  $\text{pH} \approx 7$ .

Durante o processo de sulfatorredução as bactérias *Desulfovibrio*, *Disulfomicrobium*, *Desulfanamura* e *Desulfuramonas* reduzem o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a sulfeto, nas formas de  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$  e  $\text{S}^{2-}$ , sendo o material orgânico oxidado e mineralizado sob a forma de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (SCHROT *et al.*, 2001).

Segundo PARKIN (1994) citado por SERBENT (2012), as formas de sulfeto são influenciadas pelo pH e temperatura. A figura 2 apresenta um esquema da influência do pH na formação das espécies de sulfeto em água doce.

**Figura 2.** Distribuição de espécies de sulfeto em função do pH da solução aquosa, 25 °C.

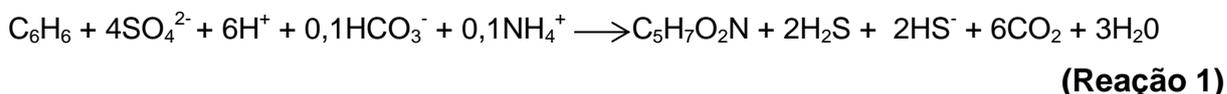


FONTE: PARKIN, *et al.*, (1994), adaptado por SERBENT, (2012)

A respiração anaeróbica com sulfato pode ocorrer por duas vias de fonte energética. A primeira utilizando hidrogênio gasoso, nomeada como reação heterotrófica; e uma segunda opção é utilizando compostos orgânicos como fonte energética. Entre os compostos orgânicos, os álcoois são preferenciais como fonte de carbono, porém os BTX também são sugeridos como possível fonte energética a

ser utilizada pelos microrganismos no processo de sulfatorredução (SCHROT *et al.*, 2001).

A equação abaixo descreve o processo de oxirredução quando benzeno é utilizado como fonte energética para a respiração anaeróbica (GOMES, 2008):



Em condições anaeróbicas, a metanogênese seria a última reação a ocorrer, por ser menos favorecida termodinamicamente. As condições metanogênicas ocorrem em potencial de redução abaixo de -200 mV e o pH igual a 7 (ZEHNDER, 1978).

O mecanismo de biodegradação via metanogênese conduz os contaminantes: benzeno, tolueno e xilenos, a dióxido de carbono e metano, intermediados pelas bactérias metanogênicas (COZZARELLI *et al.*, 1990; WEINER e LOVLEY, 1998).

Este mecanismo decorre em duas etapas, envolvendo o processo de fermentação e respiração. Primeiramente os compostos: benzeno, tolueno e xilenos são fermentados pelas bactérias fermentativas, resultando em acetato e hidrogênio. Em seguida o acetato e o hidrogênio são transformados em produtos metabólitos para outras bactérias, produzindo metano, dióxido de carbono e água (ZEHNDER, 1978).

## 2.6 Cinética de biodegradação

Um dos parâmetros utilizados para a análise da biodegradação de compostos orgânicos, é a taxa de biodegradação (WIEDEMEIER *et al.*, 1999; WEISS e COZZARELLI, 2008).

A taxa de biodegradação é proporcional ao produto da constante de biodegradação  $k$  pela concentração do reagente  $C$ , sendo sua velocidade determinada pela ordem da reação  $n$ , (CHAPRA, 2008):

$$\frac{dc}{dt} = -k \cdot C^n$$

**(equação 1)**

Para a biodegradação de poluentes em solos e águas subterrâneas, é utilizado, geralmente, o decaimento de reação de primeira ordem (WIEDEMEIER *et al.*, 1999; COZZARELLI *et al.*, 2010; KAO *et al.*, 2010).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar o processo de biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos, tendo como destaque benzeno, tolueno e *o*-xileno por adição de sulfato em ambientes anaeróbicos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a eficiência do receptor de elétrons sulfato na degradação dos compostos BTX.
- Determinar a concentração dos compostos voláteis BTX, ao longo do tempo, utilizando a técnica de cromatografia a gás.
- Mostrar através da cromatografia iônica e a gás se houve ou não a geração dos subprodutos: Acetato e metano, respectivamente;
- Determinar sulfetos dissolvidos e ferro (II) por métodos colorimétricos.
- Avaliar a presença de microorganismos no experimento por meio de técnicas de biologia molecular.

## 4 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Núcleo Ressacada de Pesquisa em Meio Ambiente – REMA, situado no bairro Tapera – Florianópolis, Santa Catarina. O Núcleo de Pesquisa dispõe da infraestrutura em equipamentos, vidrarias e materiais necessários para o desenvolvimento de pesquisa em águas contaminadas por petróleo e seus derivados.

### 4.1 Microcosmo

O projeto envolve o estudo da reação de biodegradação dos compostos BTX, presentes na gasolina, utilizando as bactérias sulfatorredutoras. Os experimentos foram preparados em microcosmos. Os microcosmos representam uma simulação de um aquífero, com tamanho reduzido e adequado para o estudo em bancada de laboratório. A disposição do experimento em microcosmos facilita o controle dos parâmetros pH e temperatura, e de um ambiente favorável para a sulfatorredução.

**Figura 3.** Microcosmo com solo e água subterrânea proveniente da Fazenda Ressacada.



FONTE: Autoria Própria (2015)

O material sólido e a água subterrânea para a preparação dos experimentos foram coletados no campo experimental do REMA. A água foi coletada em um dos poços de monitoramento, livre de contaminantes. No local da coleta, foram realizadas as análises de temperatura – 26,43°C, pH – 5,63, condutividade – 0,043 mS/cm, OD – 0,75 mg L<sup>-1</sup>, e potencial de redução – 189 mV. Essas análises foram realizadas em campo, utilizando um analisador de água da marca Q&D Micropurge® Flow Cell, modelo MP20-1380. Juntamente com as análises de Fe (II), sulfeto e ânions, estes dados passaram a ser usados como o branco do experimento. O sedimento foi coletado no campo experimental onde não havia contaminantes e/ou adição de produto químico, sendo realizadas análises para determinação das quantidades iniciais de sulfeto e Fe (II).

O experimento foi montado em frascos de penicilina, previamente lavados e secados em estufa, com capacidade de 100 mL.

A coleta do solo procedeu após um período longo de chuvas. Antes de realizar a montagem dos microcosmos, este permaneceu em estufa durante 60 minutos, em uma temperatura de aproximadamente 50 °C. Na sequência foi homogeneizado e peneirado e posteriormente, acondicionado nos frascos de vidro.

Pesou-se aproximadamente 20 g deste sólido para cada vidro de penicilina em balança analítica SHIMADZU. Adicionou-se a água subterrânea, anteriormente coletada e previamente filtrada, aproximadamente 10 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de sódio com objetivo de enriquecer o meio com receptores de sulfato. A concentração de 10mg L<sup>-1</sup> foi pré-estabelecida em experimentos de campo realizados no REMA (SERBENT, 2012). Esta concentração otimizada permite a ação das bactérias sem que o sistema fique saturado de sulfato, inibindo o trabalho das bactérias.

Uma vez que a biodegradação via sulfatorredução é favorecida em ambiente anaeróbico, foi borbulhado nitrogênio no sistema por cinco minutos, deixando o oxigênio dissolvido em baixa concentração e propiciando a condição anaeróbica. Em seguida, o microcosmo foi selado com septo de borracha, revestido com teflon, juntamente com lacres de alumínio.

Para evitar interferências e/ou contaminação de outros compostos da gasolina, foram empregados compostos grau P.A. (para análise) benzeno, tolueno e o-xileno, da marca VETEC, considerados, dentre os constituintes da gasolina, os compostos mais nocivos à saúde humana e de maior solubilidade em águas subterrâneas.

Com base em experimentos realizados anteriormente em microcosmos, (SANTOS, 1996) utilizou-se uma concentração de aproximadamente 60 mg L<sup>-1</sup> de cada composto (benzeno, tolueno, *o*-xileno) através de seringas Hamilton de 50 µL.

Foram montados 20 frascos de microcosmos, sendo sacrificado um a cada 15 dias para as análises. Os frascos foram armazenados no escuro, para evitar interferência da luz e também acondicionados em uma temperatura entre 23-27 °C. Foram adotadas as técnicas de espectrofotometria para análise de ferro II e sulfeto, cromatografia líquida para determinação dos ânions acetato, brometo, cloreto, nitrato, nitrito, fosfato, sulfato, e cromatografia a gás para determinar a concentração dos compostos voláteis (BTX e metano).

## 4.2 Instrumentação

### 4.2.1 Cromatografia Líquida e Gasosa

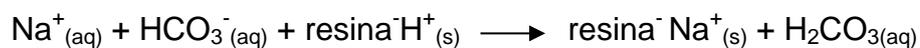
A cromatografia líquida foi empregada para as determinações dos íons acetato, cloreto, nitrito, nitrato, sulfato, fosfato e brometo. A técnica de separação consiste em uma fase móvel, eluente, e uma fase estacionária. O estudo foi realizado em um cromatógrafo de Íons da marca Dionex ICS-3000, equipado com coluna Thermo Scientific IonPac™ As22, 4x250mm, RFIC™, com detector de condutividade, figura 4. Como o objetivo é separar e quantificar espécies carregadas, este tipo de equipamento é capaz de expressar resultados confiáveis com alta sensibilidade e fácil operação.

Para a curva de calibração foram utilizados padrões da marca J. T. Backer, empregando o método de *chromatography with chemical suppression of eluent conductivity* – Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1992).

Uma solução composta pela mistura de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio (4,5mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 1,4 mM NaHCO<sub>3</sub>) foi utilizada como fase móvel eluente. Após o *sparging* era eluído de forma isocrática no sistema.

É acoplado ao equipamento uma supressora, para evitar a interferência das altas concentrações dos eletrólitos necessários para a eluição em tempo razoável do analito. A supressora consiste em uma membrana de troca seletiva, uma solução regenerante suprime a condutividade do eluente oriundo da coluna de separação, somente os íons da amostra permanecem e são encaminhados para o detector. A

supressora possui um recheio ácido, característico de resina trocadora de cátions. Segue o esquema de reação que ocorre na supressora:



**(Reação 2)**

**Figura 4.** Cromatógrafo de troca iônica utilizado para as determinações dos ânions.



FONTE: Autoria própria (2015)

As análises foram realizadas em triplicada, utilizando uma alíquota de 0,5 mL da amostra, límpida, para evitar depósitos na coluna.

Para a quantificação dos BTX e metano foi adotado a técnica de cromatografia a gás. A determinação desses analitos foi realizada com o cromatógrafo a gás da de marca Agilent (modelo 7890) com *headspace auto sampler* estático (modelo 7697 A) equipado com detector de ionização de chama e coluna de sílica fundida HP 1 (metil siloxano) nº 19095z-123, com 0,53 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e espessura de filme 2,65 µm. Este equipamento se encontra acoplado a um computador com *software chemStation*. O gás de arraste é o Hélio com fluxo de 7,0 mL min<sup>-1</sup>.

As soluções padrão utilizadas foram da sigma- Aldriche (Padrão certificado) e a preparação foram realizadas segundo o método EPA/8015 A e D (US EPA, 1996).

A solução padrão para metano foi preparada a partir do gás metano com 99,5% de pureza, da empresa White Martins. Para a determinação o gás metano é borbulhado dentro de um recipiente que contém água ultrapura, por um tempo, até

atingir o equilíbrio entre a fase gasosa e aquosa. A partir dos dados de pressão parcial e constante de Henry, para o metano foi possível calcular a concentração de metano na fase aquosa (STUMM, MORGAM, 1981).

**Figura 5.** Cromatógrafo gasoso utilizado nas determinações dos compostos BTX e metano.



FONTE: Autoria própria (2015)

Em *vails* de 20 mL, foram adicionadas alíquotas de 10 mL da amostra extraída dos microcosmos sacrificados, para as análises de metano e BTX, respectivamente. Foram usadas as primeiras alíquotas, succionadas com o auxílio de uma seringa. Os vails vedados, contendo a solução padrão ou amostra, foram submetidos à extração por adsorção em fase sólida (SPME) pela exposição à fibras recobertas com PDMS (polidimetilsiloxano).

Essas amostras foram injetadas no equipamento por um injetor automático com liner para SPME, que expõem a fibra de SPME para dessorção térmica, seguindo para o processo de partição do analito entre a fase móvel e a fase líquida imobilizada no recheio da coluna.

O detector de ionização em chama é normalmente acoplado quando se deseja determinar hidrocarbonetos. Os compostos orgânicos geram íons e/ou elétrons quando pirolisados com a temperatura da chama de ar sintético e

hidrogênio. O detector consegue monitorar a corrente produzida por esses íons, gerando picos no cromatogramas.

Foi elaborada uma curva de calibração em triplicada com intervalos de concentrações  $0,025 \text{ mg L}^{-1}$  a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  com um limite de detecção de  $0,010 \text{ mg L}^{-1}$  para o metano.

#### 4.2.2 Espectrofotometria

Para as análises de Fe II e sulfeto, utilizou-se a espectrofotometria. O método aplicado foi baseado no *AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION* (1998). Utilizou um espectrofotômetro de bancada – HACH modelo DR 2500, figura 6. Foram necessários 25 mL de amostra para cada análise. As amostras passaram por uma filtração, retendo as impurezas, pois como se trata de um método colorimétrico, a transparência da amostra pode afetar nos resultados expressos.

**Figura 6.** Espectrofotômetro de bancada.



Nas determinações espectrofotométricas foram utilizados kits comerciais que adotam métodos baseados no *Standard Methods* (APHA, 1992). Métodos padrões baseados nas propriedades colorimétricas de sistemas conhecidos: método 3500-Fe D para Fe II, utilizando o sistema de complexação com a orto fenantrolina. O Fe III é reduzido com cloreto de hidroxilamônio para Fe II que reage com a orto fenantrolina formando um complexo de cor vermelho-alaranjado com  $\lambda_{\text{max}} = 510\text{nm}$ ;

Método 4500-S2-D para o sulfeto dissolvido. O método utiliza o azul de metileno. O sulfeto, em contato com um agente oxidante como o dicromato de potássio numa solução fortemente ácida reage com o íon N,N-dimetil-p-fenilenodiamônio para produzir o azul de metileno ( $C_{16}H_{18}N_3SCl$ ) ( $\lambda_{max} = 664$  nm). Foram utilizados kit para análise de Sulfeto: Sulfite 1 reagent. Cat. 1816-32. HACH - Ácido sulfúrico e água desmineralizada. Sulfite 2 reagent. Cat. 1817-32. HACH - (Dicromato de Potássio e água desmineralizada).

Determinou-se Fe(II) e  $S^{2-}$  a partir de uma curva analítica elaborada com soluções de sais de Fe II e  $S^{2-}$ , de alta pureza.

#### 4.2.3 Preparação da amostra de solo

Com base em FREITAS (2015), a análise de Fe II em solo foi realizada por espectrofotometria, utilizando o mesmo método (método 3500-Fe D) aplicado para a análise das amostras de água. Porém, foi preciso realizar um processo de preparo da amostra, neste caso, do solo. A extração do Fe II presente nos solos dos microcosmos foi realizada no LEMAS – Laboratório de Espectrometria de massa, localizado no departamento de Química da Universidade de Santa Catarina. Foram selecionadas cinco amostras, sendo uma delas o branco. Para avaliar a eficiência do método, foi feita análise de uma amostra de referência *Robin Test River Sediment Samples (RS-3)*. Foram pesados em tubos *falcons* 0,05g de solo em duplicada, adicionado 1 mL de ácido clorídrico (37% m/v P.A.), sendo esta a solução extratora. Após homogeneização, foi encaminhado à ação de ultrassom, em banho ultrassônico, em uma temperatura controlada entre  $55 \pm 2$  °C durante 30 minutos. Após este período, foi avolumado para 10 mL. As amostras foram encaminhadas ao laboratório REMA, onde se procedeu a complexação com a orto fenantrolina. Uma alíquota de 170  $\mu$ L do sobrenadante foi pipetada, transferida para um nessler e avolumada a 25 mL. Foi utilizado o mesmo kit comercial aplicado para as análises de água. A curva analítica adotada para as determinações foi elaborada a partir de uma solução estoque de sulfeto ferroso  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , com intervalo de concentrações de  $0,10 \text{ mg L}^{-1}$  a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo o limite de detecção considerado o primeiro ponto da curva.

#### 4.2.4 Análise Molecular (qPCR)

Foi compilado ao presente trabalho os dados da técnica de qPCR, realizados pela equipe de microbiologia do laboratório REMA, coordenado pela Bióloga Ana Liedke.

O PCR (reação em cadeia de enzima polimerase) é uma técnica de caráter biológico que permite amplificar pequenas quantidades de DNA. O processo consiste em três etapas: a) desnaturação – elevação da temperatura com intenção de separar as cadeias e desnaturar o DNA genômico; b) anelamento – decaimento da temperatura promovendo a anelação dos indicadores com a fita de molde de DNA; c) extensão – elevação da temperatura para ocorrer a síntese do DNA pela enzima Taq DNA polimerase (NASCIMENTO, REBELLO SUAREZ e SILVA PINHAL, 2010).

Para realização desta técnica primeiramente foi executado a filtração à vácuo, utilizando uma membrana filtrante da marca Milipore de 0,22 µm.

Com auxílio do Kit de extração DNA MOBIO *Power soil*<sup>TM</sup> Kit, foi executado a extração do DNA. Este processo consiste em adições de soluções químicas seguidas de centrifugações e filtrações. Em seguida, foi possível realizar a análise de PCR quantitativa.

Dois análises foram realizadas, a quantificação de bactérias totais, Arqueas e sulfatorredutoras. Os pares de iniciadores utilizados foram BACT1369F (5'-CGGTGAATACGTTCCCTCGG -3') e PROK1492R (5'- GGATTACCTTGTTACGACTT -3') e a sonda TM1389F (5'- /56-FAM/CTT GTA CAC ACC GCC CGT C/3BHQ\_1/ -3'), ARCH1-1369F (5'- CGGTGAATACGTCCCTGC -3' ) e PROK1541R (5'- AAGGAGGTGATCCTGCCGCA -3' ) e sonda TM1389F (5'- /56-FAM/CTT GTA CAC ACC GCC CGT C/3BHQ\_1/ -3') e 561-F (5'-GCG TGT AGG CGG TTT CTT AA-3') e 825-R (5'- TAC CCG CAGA CAC CTA GTT CT-3'), respectivamente. O equipamento utilizado para as reações foi HT 7900 PCR Applied Biosystems, disponível no LAMEB (Laboratório Multiusuário de estudos em Biologia - MIP/UFSC).

A programação da qPCR foi a seguinte: 50°C por 2 min para desnaturação do DNA, seguidos de 95°C por 10 min e 40 ciclos a 95°C por 15 s, e 60°C por 1 min. Para as análises de PCR que não utilizaram a sonda TM1389F foi necessário usar o corante Syber Green e com isso a programação de temperatura no equipamento foi a seguinte: 50°C por 2 min, seguidos de 95°C por 10 min e 55 ciclos a 95°C por 15 s

e 60°C por 1 min e por fim acrescenta-se a curva de fusão (Melting curve), que é 95°C por 15 s, seguidos de 60°C por 15 s, 20 min de aquecimento e finaliza com 95°C por 15 s (BELLER *et al.*, 2002).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Fatores que influenciam no processo de Biodegradação

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade do sulfato como receptor de elétrons na biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e *o*-xileno (BTX). Para tal, foram realizados ensaios em microcosmos planejados para simularem em escala de bancada, as condições de derramamento de gasolina em um aquífero. Os microcosmos foram preparados com solo e água subterrânea coletados em uma área experimental do REMA, conforme detalhado previamente.

Os receptores de elétrons, produtos metabólicos, pH, temperatura e nutrientes são parâmetros avaliados como indicadores da degradação dos contaminantes no local. Os receptores de elétrons e produtos metabólicos indicam de forma direta a biodegradação dos contaminantes, enquanto os nutrientes, pH e a temperatura estão relacionados com o crescimento da população microbiana e a maior ativação das bactérias, responsável pelo processo de degradação.

O uso de microcosmo permitiu um controle maior desses parâmetros e das condições. Foram preparados vinte microcosmos que a intervalos de quinze dias foram sendo sacrificados, um a um, para a determinação dos parâmetros avaliados: acetato, brometo, cloreto, nitrato, nitrito, fosfato, sulfato, sulfeto, Fe(II), BTX e metano. Os resultados obtidos nas análises no período de 200 dias serão apresentados a seguir, em forma de gráficos e os dados experimentais relacionados no apêndice 1.

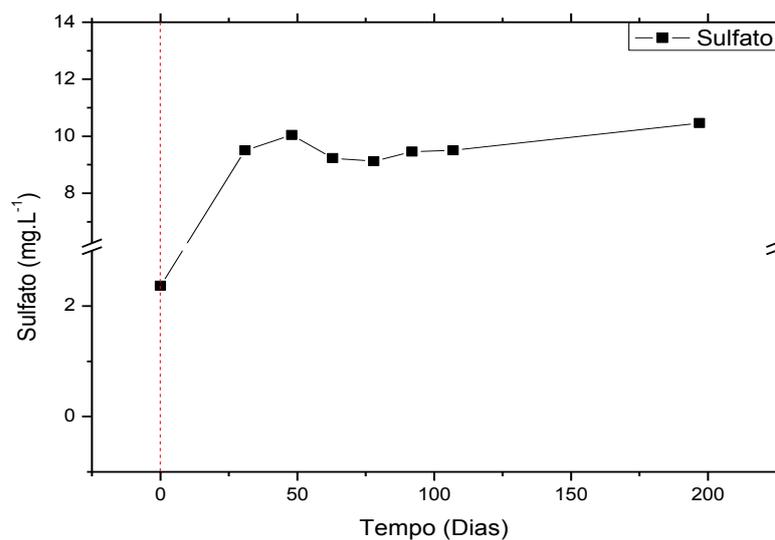
#### 5.1.1 Receptor de elétrons Sulfato

O processo de sulfatorredução é verificado pela observação da diminuição da concentração de sulfato e o aumento da produção de sulfeto no meio. Com o objetivo de favorecer este processo, foi efetuada a injeção de sulfato nos microcosmos, resultando em uma concentração próxima a 10 mg L<sup>-1</sup>. Na figura 7, observa-se a variação da concentração de sulfato na fase aquosa do microcosmo ao longo do tempo, para 200 dias. A variação acentuada e característica do consumo de sulfato pelas bactérias sulfato-redutoras não foi observada. A menor concentração de sulfato detectada foi de 9,12 mg L<sup>-1</sup>, em 78 dias. As pequenas

diferenças nos valores encontrados para as concentrações de sulfato podem estar associadas a imprecisões nas determinações associadas a erros experimentais.

A sulfatorredução é favorecida e pronunciada quando o ambiente está livre de oxigênio, ou seja, um ambiente anóxico. Para buscar estas condições foi injetado gás nitrogênio, durante cinco minutos, reduzindo a quantidade de oxigênio dissolvido na água. Porém, durante esta etapa, foi necessário que o frasco de penicilina permanecesse sem lacres, já que estava completo por água, e não tinha *head space*. Possivelmente, a purga não foi efetiva, restando no frasco vestígios de oxigênio, preferencialmente utilizado como receptor de elétrons pelas bactérias.

**Figura 7.** Concentração de sulfato ( $\text{mg L}^{-1}$ ) na fase aquosa dos microcosmos em relação ao tempo (dias), determinados por cromatografia iônica ( $n=3$ ).



Os resultados foram quantificados através de comparação com uma curva de calibração (Figura 8). Para a curva de calibração foi preparada uma solução estoque a partir de reagentes padrões. Por diluição preparou-se sete novas soluções (solução trabalho) com concentrações distintas, realizando três leituras para cada concentração (tabela 1). Os parâmetros de mérito do método estão baseados em na curva analítica, método mais confiável para ser aplicado em técnicas analíticas de separação. O limite de detecção (LD), utilizando a expressão (RIBANI, *et. al.*, 2004).

$$LD = 3,3 \times \frac{S}{S} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão, calculado pela média do coeficiente linear obtido das três curvas (replicatas); e  $S$  é a média do coeficiente linear das três curvas obtidas (replicatas).

O limite de quantificação (LQ), o menor valor do analito que pode ser quantificado na amostra. Representa uma relação entre a concentração, à precisão e a exatidão exigida. Utilização a relação 10:1, o LQ é a razão entre o desvio padrão do coeficiente linear pela inclinação da curva analítica. Esta relação resulta na concentração mínima quantificada e pode ser expressa pela equação (RIBANI, *et. al.*, 2004):

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad \text{(Equação 3)}$$

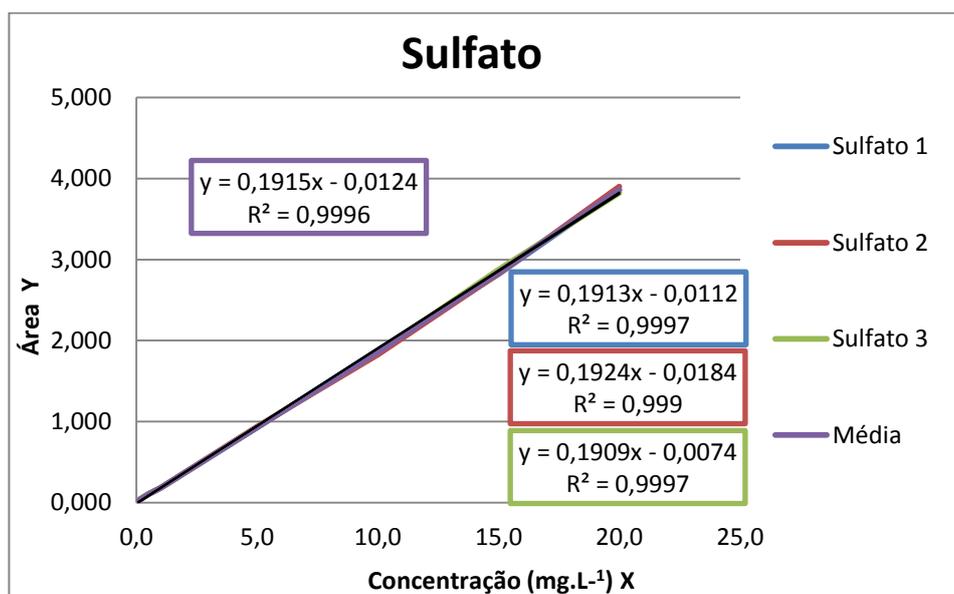
Onde o  $s$  é o desvio padrão do coeficiente linear;  $S$  é o coeficiente angular da curva de calibração.

Em técnicas de separação nem sempre é apropriado a utilização do método sinal-ruído. A curva é construída pela área do pico e, quanto maior o pico, maior a relação sinal-ruído, conseqüentemente, decai a resposta do LOD e LOQ (RIBANI, *et. al.*, 2004).

**Tabela 1.** Dados para a elaboração da curva de calibração para o sulfato.

Conc. mg/L	Sulfato 1	Sulfato 2	Sulfato 3	Desvio Padrão	Média
<b>0,1</b>	0,023	0,028	0,032	0,004509	0,0277
<b>0,5</b>	0,103	0,101	0,103	0,001155	0,1023
<b>1,0</b>	0,181	0,180	0,180	0,000577	0,1803
<b>5,0</b>	0,924	0,935	0,928	0,005568	0,9290
<b>10,0</b>	1,884	1,828	1,858	0,028024	1,8567
<b>15,0</b>	2,821	2,828	2,875	0,029366	2,8413
<b>20,0</b>	3,856	3,900	3,823	0,038631	3,8597

\*Condições: Técnica- Cromatográfica iônica com detector de condutividade. Alíquota: Triplicata, 10 mL cada, da solução trabalho. Desvio padrão e média, obtidos por cálculos matemáticos.

**Figura 8.** Curva de calibração para determinação de sulfato.

\*Condições: Baseado nos dados da tabela 1

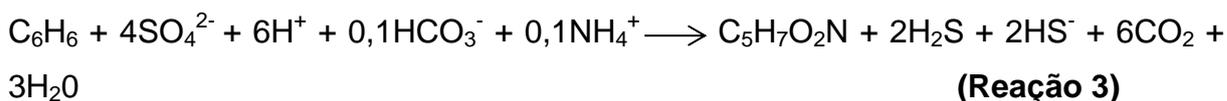
**Tabela 2.** Parâmetros de mérito para determinação de sulfato por cromatografia iônica.

Analito	Coefficiente Linear	Coefficiente Angular	LD (mgL <sup>-1</sup> )	LQ (mgL <sup>-1</sup> )
Sulfato	-0,0112	0,1913	0,0777	0,235
	-0,0184	0,1924		
	-0,0074	0,1909		
Média	0,0056	0,1915		

\*Condições: Aplicação das equações 2 e 3, respectivamente.

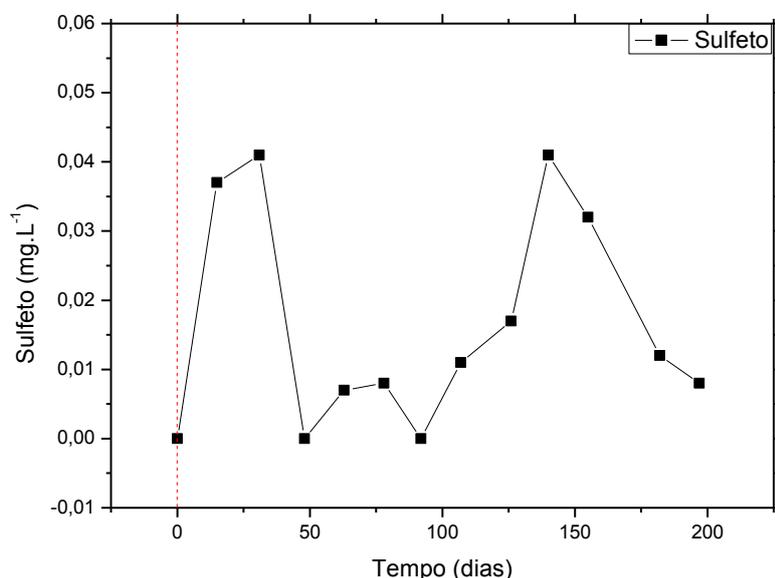
### 5.1.2 Produtos metabólicos

O sulfeto é formado da redução do sulfato durante a oxidação da matéria orgânica. A maior concentração de sulfeto encontrada foi de 0,041 mgL<sup>-1</sup> em 31 e 141 dias (Figura 9). Para uma estimativa teórica do sulfeto formado proveniente da degradação via sulfatorredução dos compostos benzeno, tolueno e *o*-xileno foi utilizado a estequiometria da reação com o benzeno, composto mais solúvel entre os demais.



Na degradação de um mol de benzeno ( $91,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) seriam consumidos 4mols de sulfato ( $433 \text{ mg L}^{-1}$ ) e formados 4 mols de sulfeto ( $145 \text{ mg L}^{-1}$ ). As concentrações de sulfato e sulfeto encontradas não correspondem à estequiometria molar teórica da reação. A mistura de benzeno, tolueno e *o*-xileno na concentração presente nos ensaios necessitaria de aproximadamente  $1299 \text{ mg.L}^{-1}$  de sulfato, para sua total degradação. A adição de sulfato foi baseada em (RAMOS, 2010), que adotou a concentração de sulfato presente nos solos Norte-Americanos, aproximadamente  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Como o presente trabalho é uma simulação de aquífero e não está tendo recarga de água, foi reduzido para  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , para evitar possíveis inativação das bactérias em virtude da maior salinidade.

**Figura 9.** Concentração de Sulfeto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) na fase aquosa dos microcosmos em função do tempo (dias), determinada por espectrofotometria. Método de azul de metileno 4500 –  $\text{S}^{2-}$  D.  $\lambda_{\text{max}} = 664 \text{ nm}$ .



Em estudo complementar, foi evidenciado que o sulfeto pode se complexar com Fe II, presente no meio, formando sulfeto ferroso ( $\text{FeS}$ ), tornando-se insolúvel (BERNER, 1969).

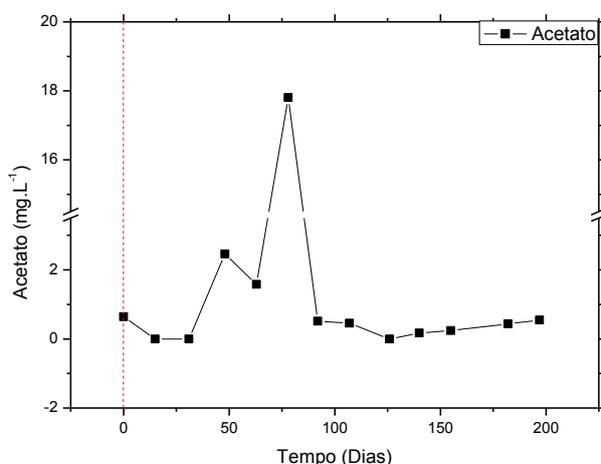
O Fe II é um metabolito da degradação via ferroredução. Esta via é capaz de inibir metabolicamente as bactérias redutoras de sulfato, por ser uma via de degradação energeticamente mais favorável (SERBENT, 2012).

As análises de Fe II realizadas em água e solo, através do método 3500-Fe D – método 1,10 fenantrolina para o Ferro II apresentaram níveis de Fe II abaixo do limite de detecção. O limite de detecção estabelecido para Fe II foi de  $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Possíveis vestígios de Fe II presente, não poderão ser atribuídos ao resultado de uma redução do receptor Fe III e degradação de matéria orgânica.

Na degradação de compostos orgânicos, outro subproduto possível de ser formado é o acetato. Porém, por ser um intermediário, quando formado é rapidamente consumido. Na Figura 10, pode ser observado a variação nas concentrações de acetato ao longo dos dias, tendo em 78 dias uma concentração de  $17,80 \text{ mg L}^{-1}$  de acetato presente no meio.

Segundo estudos realizados por KUIVILA, et. al., (1989) e BAEDECKER *et. al.*, (1993), concentrações de acetato proveniente da biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, geralmente, não ultrapassam  $3 \text{ mg L}^{-1}$ . Acima desses níveis, as bactérias utilizam preferencialmente o acetato como fonte de energia. O elevado valor de acetato deve estar associado com matéria orgânica presente originalmente no solo e que não foi considerada nos ensaios.

**Figura 10.** Concentração de acetato na fase aquosa dos microcosmos em função do tempo (dias), determinada por cromatografia iônica (n=3).



As análises de acetato foram feitas por cromatografia iônica, seguindo os mesmos parâmetros utilizados para determinação de sulfato, assim como para

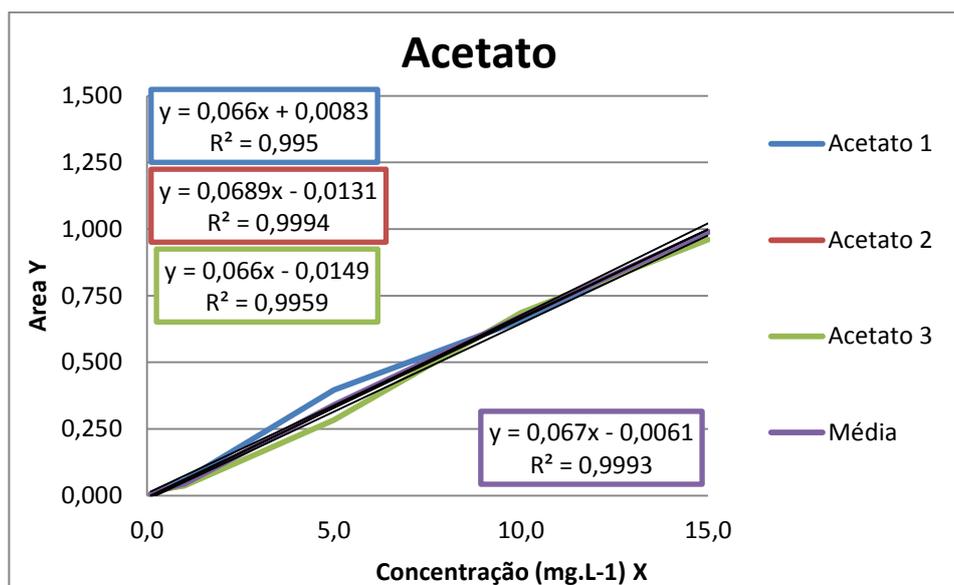
determinação do limite de detecção e de quantificação (Tabela 4). Foram realizadas três injeções separadas e medidas de área para cada concentração, utilizando a curva de calibração (figura 10) para a quantificação da amostra.

**Tabela 3.** Dados para a elaboração da curva de calibração do acetato.

	Conc. mg L <sup>-1</sup>	Acetato 1	Acetato 2	Acetato 3	Desvio Padrão	Média
pd 1	0,1	0,006	0,006	0,004	0,0011	0,0053
pd 2	0,5	0,031	0,025	0,027	0,0030	0,0277
pd 3	1,0	0,057	0,039	0,037	0,0110	0,0443
pd 4	5,0	0,396	nd	0,284	0,0791	0,3400
pd 5	10,0	0,658	nd	0,686	0,0197	0,6720
pd 6	15,0	0,988	1,022	0,960	0,0310	0,9900

Alíquota: Triplicata, 10 mL cada, da solução trabalho. Desvio padrão e média, obtidos por cálculos matemáticos.

**Figura 11.** Curva de calibração para determinação de acetato.



**Tabela 4.** Parâmetros de mérito para análise de acetato por cromatografia iônica.

Analito	Coefficiente Linear	Coefficiente Angular	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
Acetato	0,0083	0,0660	0,0569	0,17
	-0,0131	0,0689		
	-0,0149	0,0660		
Média	0,0129	0,0670		

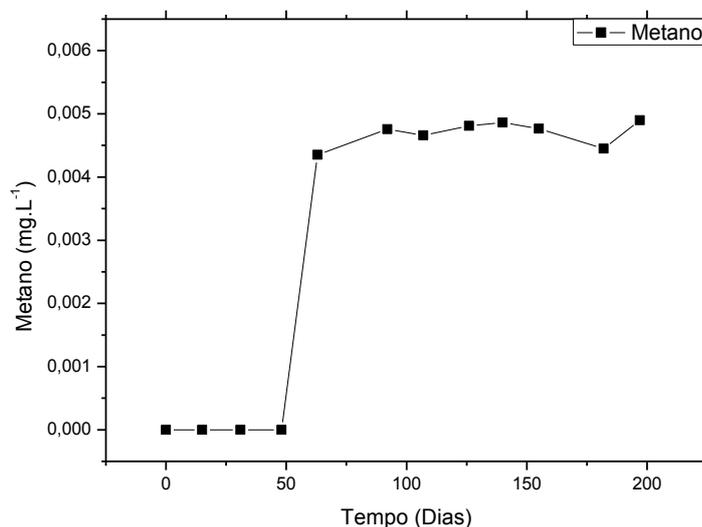
\*Condições: Aplicação das equações 2 e 3, respectivamente.

A presença de acetato pode servir como fonte de carbono para as bactérias metanogênicas (LOVLEY, *et. al.*, 1996; SCHINK, 1997). O acetato formado é utilizado como substrato pelas *Arqueas metanogênicas acetoclásticas*.

A via de redução metanogênica é pronuncia quando as concentrações dos demais receptores de elétrons são baixas e/ou escassas, no ambiente.

Foi observado após 63 dias o aparecimento de metano (Figura 12), assim como o decaimento da concentração de acetato (Figura 9) no mesmo período de tempo, indicativo da ocorrência de metanogênese.

**Figura 12.** Concentração de metano na fase aquosa dos microcosmos em função do tempo (dias), determinado por CG - FID.



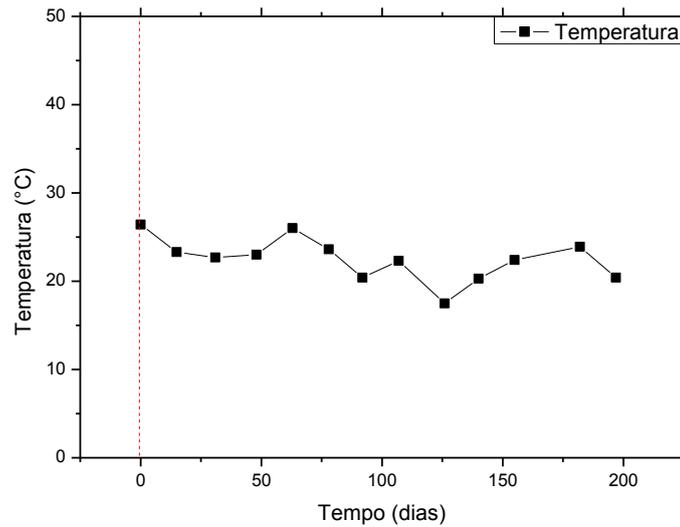
\*Condições: Volume das amostras – 10 mL, em *head space*. O método de análise utilizado para a detecção foi o EPA/5021A combinado com EPA/8015D (US EPA, 1997).

### 5.1.3 Temperatura

Os valores de temperatura estão expressos na figura 13. Durante o período de análise foi caracterizado uma variação na temperatura, entre 20 a 27°C. A faixa de temperatura obtida esta dentro da faixa favorável para o desenvolvimento das bactérias, 20 a 40 °C (CHAPELLE, 2001).

De acordo com US EPA, 1997 os aquíferos sofrem uma baixa variação na temperatura. Sendo os microcosmos uma simulação de aquíferos contaminados, teve-se cautela em armazenar os frascos com os microcosmos em ambiente com a temperatura controlada em um intervalo menor de variação.

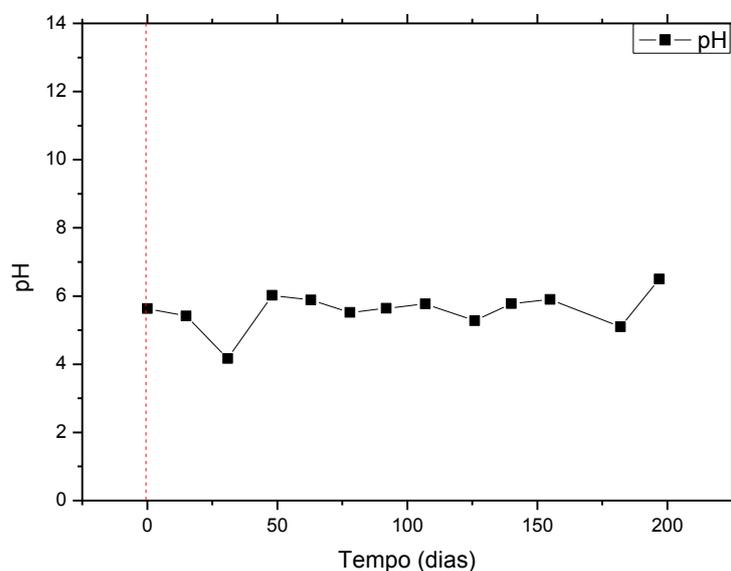
**Figura 13.** Variação da temperatura dos microcosmos ao longo do tempo (dias).



#### **5.1.4 pH**

Os valores de pH detectados ao longo do período de análise, apresentaram uma variação de 5,5 a 6,5, como pode ser visto na figura 13. Apesar dos microorganismos preferirem pH alcalino, na faixa de 6 a 8 (CHAPELLE, 2001), algumas bactérias sulfatorredutoras são caracterizadas por sua resistência e capacidade de crescimento em pH ácido (KOSCHORRECK, 2008).

**Figura 14.** Variação do pH da fase aquosa do microcosmos ao longo do tempo (dias).



### 5.1.5 Nutrientes

A disponibilidade de nutrientes é essencial no desenvolvimento dos microorganismos atuantes na degradação dos contaminantes. Dentre os nutrientes, destacam-se o fosfato, nitrato, nitrito e ferro. As análises destes nutrientes, por cromatografia iônica (dados não apresentados), resultaram em níveis de concentrações abaixo do limite de detecção estabelecido pelo método, para os analitos.

O solo e a água não passaram por nenhum processo de adição de nutrientes, visto que o objetivo do presente trabalho é a avaliação da eficiência dos receptores de elétrons sulfato para o tratamento de aquíferos contaminados com derivados de petróleo. Portanto optou-se por trabalhar com o solo e a água coletados no aquífero do núcleo de pesquisa da Fazenda Ressacada, sem modificar sua composição.

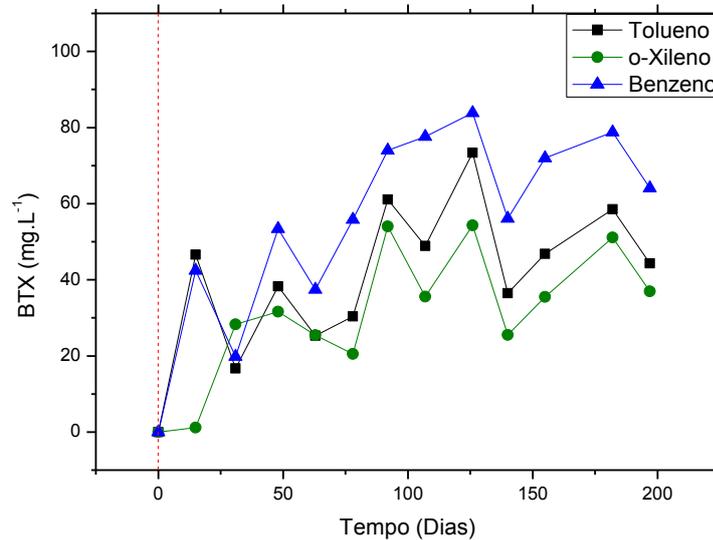
O aumento do carbono, decorrente da contaminação do meio, pode levar à depleção dos nutrientes (ALEXANDER, 1994 *apud* WILLIAM, 2007). Os baixos valores de nutrientes no ambiente dos microcosmos não admitem qualquer associação à presença, diversidade e abundância de grupos microbianos específicos.

## 5.2 Compostos benzeno, tolueno, o-xileno.

Nas análises de benzeno, tolueno, o-xileno, realizadas ao longo do tempo em dias, não foi observado decaimento da concentração destes contaminantes. A variação encontrada nos valores (Figura 14) pode ser derivada de uma série de erros experimentais associados à análise de uma única replicata. Como se trata de compostos voláteis, durante a adição dos compostos pode ter ocorrido alguma perda, ou alguma suspensão de ar presente na micro-seringa, ou calibração da mesma. Outra fonte de erro também associada às transferências de volumes, foi durante a retirada da alíquota, no processo de extração, pois foi preciso extrair pequenas quantidades varias vezes, até completar o volume necessário (10 mL) para a análise.

Outro fator que pode ter influenciado no comportamento observado no gráfico é a adsorção, caracterizada como uma interação do contaminante com partículas no solo, resultando em um lento deslocamento do contaminante para a água subterrânea, efeito conhecido como retardo (BEDIENT *et al.*, 1994). Ou ainda, nessa direção de raciocínio, o efeito de retardo poderia ser devido à adsorção no septo de borracha do vidro de penicilina. Embora, apesar de tratar-se de compostos menos densos que a água, as concentrações adotadas para o benzeno, tolueno e o-xileno encontravam-se abaixo do limite de solubilidade dos compostos.

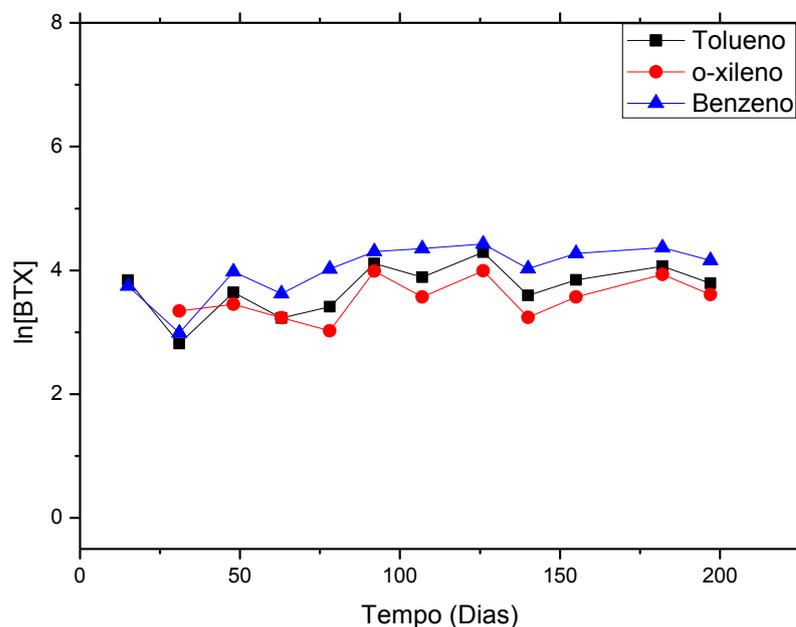
**Figura 15.** Concentração dos compostos Benzeno, Tolueno, e *o*-Xileno ao longo do tempo em dias.



\*Condições: Volume das amostras – 10 mL, em *headspace*. O método de análise utilizado para a detecção foi o EPA/5021A combinado com EPA/8015D (US EPA, 1997). Quantificado por curva analítica, com LD = 1 µg.L<sup>-1</sup>.

Para investigar se ocorreu degradação de algum composto presente no meio, o mais indicado seria realizar os cálculos de taxa de biodegradação. A determinação desta taxa é importante para avaliar processos de biorremediação (WIEDEMEIER, 1999). Usando a equação de cinética de biodegradação exposta na equação 1, na secção de 2.6 da Revisão bibliográfica, foi elaborado um gráfico de  $\ln[\text{BTX}]$  por tempo (dias) (Figura 16), tendo a inclinação da reta a constante de velocidade. Como se trata de uma reação de primeira ordem, a velocidade é diretamente proporcional à concentração do composto.

**Figura 16.** In da concentração de Benzeno, Tolueno e *o*-Xileno em função do tempo, em dias.



O tratamento matemático referente à cinética de degradação não mostrou um ajuste a equação de velocidade de primeira ordem, colaborando com as evidências de que não ocorreu degradação de nenhum dos três compostos adicionados ao meio.

### 5.3 Resultado Molecular (qPCR)

Duas amostras foram analisadas, uma contaminada e outra sendo o branco. Os resultados gerados de qPCR confirmaram a presença de bactérias totais nos microcosmos ( $2,06 \times 10^9$  e  $9,03 \times 10^7$ , respectivamente). Também, observou-se a presença de Arqueas no microcosmo contaminado ( $6,71 \times 10^8$ ), porém não foi detectado no branco. As análises realizadas para determinação das bactérias sulfato redutoras foram inconclusivas.

## 6 CONCLUSÃO

O uso de microcosmo para avaliação do presente trabalho permitiu um controle das temperaturas e pH, minimizando as intervenções e facilitando os estudos realizados no meio. A simulação realizada é capaz de replicar a eficácia de um projeto sem precisar realizar um estudo em grande escala e que, eventualmente, possa levar a grandes contaminações, caso o método aplicado não atinge os objetivos almejados.

Os resultados obtidos, não mostraram predominância significativa do processo de sulfatorredução nos microcosmos avaliados. O decaimento da concentração de sulfato foi inferior a quantidade relativa necessária para degradar a concentração dos BTX presentes, estimada pelo balanço estequiométrico para degradação do benzeno, assim como a quantidade de sulfeto presente não corresponde ao produto da sulfatorredução, inviabilizando uma conclusão sobre a eficiência desta rota de biodegradação para tratamento de aquíferos contaminados com derivados de petróleo.

Como o objetivo era a simulação de um aquífero, não foi feita alteração na água e no solo coletado para elaboração dos microcosmos. O solo *in natura* possivelmente apresentava alguma quantidade de matéria orgânica, que foi preferencialmente utilizada pelas bactérias como fonte de energia, no lugar dos compostos, benzeno, tolueno e *o*-xileno.

A biodegradação foi evidenciada pelos produtos metabólitos acetato e metano e pelo crescimento bacteriano ocorrido. A hipótese sustentada é a de que durante o processo para diminuir a concentração de oxigênio dissolvido no meio, o receptor de elétrons energeticamente mais favorável das bactérias, permaneceu vestígios de oxigênio no frasco, pois o borbulhamento precisou ser realizado antes do frasco ser lacrado. Com oxigênio presente e a matéria orgânica contida no solo, as bactérias iniciaram o seu desenvolvimento, gerando acetato como resultado desta degradação. Após o consumo do oxigênio, e uma produção de aproximadamente 17 mg.L<sup>-1</sup> de acetato, passou a ser pronunciado a via de degradação por metanogênese. Esta rota foi comprovada com o aumento da concentração de metano e de bactérias Arqueas.

A degradação dos compostos benzeno, tolueno, *o*-xileno pode ter sido inviabilizada devido a ausência de nutrientes. Trata-se de compostos aromáticos, em

que é preciso um maior gasto energético para a degradação, a ausência dos nutrientes: nitrato, nitrito, ferro e fosfato, pode ter inibido a função das bactérias no ambiente.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology – Fundamentals and Applications**. 2. Ed. Benjamin/Cummings: Menlo Park, CA. 533p. 1987.
- ATLAS, R.M. **Stimulated Petroleum Biodegradation**. Critical Reviews in Microbiology. v. 5, n. 4, p. 371–386. 1977.
- BAEDECKER, M. J.; COZZARELLI, I. M.; EGANHOUSE, R. P. SIEGEL, D. I.; BENNETT, P. C. **Crude oil in a shallow sand and gravel aquifer-III. Biogeochemical reactions and mass balance modeling in anoxic groundwater**. Applied Geochemistry, v. 8, n. 6, p.569–586. 1993.
- BELLER, H. R.; KANE, S. R.; LEGLER, T. C.; ALVAREZ, P. J. J.A Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Monitoring Anaerobic, Hydrocarbon-Degrading Bacteria Based on a Catabolic Gene. **Environmental Science Technology**. v. 36, p. 3977-3984, 2002.
- BERNER, R.A. Migration of iron and sulfur within anaerobic sediments during early diagenesis. **American Journal of Science**. v. 267, n. 1, p.19-42, 1969.
- BORDEN, R.C., GOMEZ, C. A., BECKER, M.T. Natural Bioremediation of a gasoline spill. In: HINCHEE, R.E., ALLEMAN, B.C., HOEPEL, R.E., MILLER, R.N. **Hydrocarbon Bioremediation**. New York: Lewis Publishers, p. 290-295, 1994.
- BORDEN, R. C.; DANIEL, R. A.; LEBRUN IV, L. E.; DAVIS, C. W. **Intrinsic biodegradation of MTBE and BTEX in gasoline-contaminated aquifer**. Water Resources Research, v. 33, n. 5, 1105 – 1115p. , 1997.
- BOWER, J. E.; ZEHNDER, A. J. B. 1993. Bioremediation of organic compound-putting microbial metabolism to work. **Bioremediation**, 11: 360-367.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Portaria Ministerial nº 518 de 25 de março de 2004**. Cap. IV – Padrão de Potabilidade. <[www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs)>. Acesso em 19/05/2015, 21h56min.
- CHAPELLE, F. H. **Ground-water microbiology and geochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 424 p.
- CHAPELLE, F.H. **Ground-Water Microbiology & Geochemistry**. 2nd Ed. New York, John Wiley & Sons, INC, 477 p. 2001.
- CHAPRA, S.C. **Surface Water-Quality Modeling**. New York: Waveland Press, 844p. 2008.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA (2008). Resolução nº396 de 3 de abril de 2008.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA (2009). Resolução nº420 de 28 de dezembro de 2009.

CORSEUIL, H. X. **Influência do receptor de elétrons na biorremediação de águas subterrâneas contaminadas por derramamento de gasolina.** In: VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1994, Florianópolis. Anais do VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e ambiental. Rio de Janeiro: **ABES**, 68-75, 1994.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. **Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina. O problema é grave?** Engenharia Sanitária e Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1997.

DA SILVA, M.L.B.; RUIZ-AGUILAR, G.M.L.; ALVAREZ, P.J.J. Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX- ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate. **Biodegradation**. v.16, p.105-114, 2005.

COZZARELLI, I.M.; EGANHOUSE, R.P.; BAEDECKER, M.J. Transformation of monoaromatic hydrocarbons to organic-acids in anoxic groundwater environment. **Environmental geology and water sciences**, v. 16, n. 2, p. 135-141, sep./oct. 1990.

COZZARELLI, I.M.; BEKINS, B.A.; EGANHOUSE, R.P.; WARRE, E.; ESSAID, H.I. **In situ measurements of volatile aromatic hydrocarbon biodegradation rates in groundwater.** Journal of Contaminant Hydrology, v. 111, n. 1–4, p. 48–64, 2010.

DOLFING, J.; XU, A.; GRAY, N.D.; LARTER, S.R.; HEAD, I.M. The thermodynamic landscape of methanogenic PAH degradation. **Microbial Biotechnology**. v. 2, n. 5, p. 566-574, Sep, 2009.

GOLDSTEIN, R. M.; MALLORY, L. M.; ALEXANDER, M. **Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation.** Applied Environmental Microbiology, v. 50, n. 4, p. 977-983, 1985.

GOMES, A.P.N. **Biodegradação de biodiesel de soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos.** 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FARHADIAN, M.; VACHELARD, C.; DUCHEZ, D.; LARROCHE, C. **In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review.** **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5296–5308. 2008.

FERNANDES, M. **Influência de etanol na solubilidade de hidrocarbonetos monoaromáticos em aquíferos contaminados com gasolina.** 192f. Dissertação (Mestrado em Engenharia ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 1997.

FERNANDES, M. **Atenuação Natural da Contaminação de aquíferos submetidos a derramamento de gasolina.** 212f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2002.

HINCHEE, Robert E. (Ed.). **Hydrocarbon bioremediation**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1994. 477 p.

HOLLIGER, C.; GASPARD, S.; GLOD, G.; HEIJMAN, C.; SCHUMACHER, W.; SCHWARZENBACH, R. P.; VAZQUEZ, F. **Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: Organic contaminants**. FEMS Microbiological Reviews, n. 20, p. 517– 523. 1997.

HUTCHINS, S. R.; MILLER, D. E. **Combined laboratory/field study on the use of nitrate for in situ bioremediation of a fuel-contaminated aquifer**. Environmental Science and Technology, v. 32, n. 12, p. 1832-1840, 1998.

JOHNSON, R.L., JOHNSON, P.C., McWhorter, D.B., HINCHEE, R.E., GOODMAN, I. An overview of air sparging. **Ground Water Monit. Remediation**, v. 13, n. 4, p.127-135, 1993.

KAO, C.M.; CHIEN, H.Y. SURAMPALLI, R.Y. ; CHIEN, C.C.; CHEN, C.Y. **Assessing of Natural Attenuation and Intrinsic Bioremediation Rates at a Petroleum-Hydrocarbon Spill Site: Laboratory and Field Studies**. Journal of Environmental Engineering, v. 136, n. 1, p. 54–57. 2010.

KOSCHORRECK, M. **Microbial sulphate reduction at a low pH**. FEMS Microbiology Ecology. v. 64, n. 3, p. 329–42. 2008.

KUIVILA, K. M.; MURRAY, J. W.; DEVOL, A. H.; NOVELLI, P. C. **Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington**. Geochimica et Cosmochimica Acta, v.53, n.2, p.409-416. 1989

LIEBEG, E.W.; CUTRIGHT, T.J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 44, n. 1, p. 55-64, Jul, 1999.

LOVLEY, D.R. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 259-287, June, 1991.

LOVLEY, D.R.; WOODWARD, J.C.; CHAPELLE, F.H. Rapid Anaerobic Benzene Oxidation with a Variety of Chelated Fe(III) Forms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 1, p. 288-291, Jan, 1996.

MELLO, J. M. M. **Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme**. 2007. 151f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

NANO, G.; BORRONI, A.; ROTA, R. Combined slurry and solid-phase bioremediations of diesel contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials, Amsterdam**, v. 100, n. 1-3, p. 79-94, Jun. 2003

NASCIMENTO, S.; RABELLO SUAREZ, E.; SILVA PINHAL, M.A. **Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica**. Revista Brasileira de Medicina. v. 67, 2010.

NANO, G.; BORRONI, A.; ROTA, R. **Combined slurry and solid-phase bioremediations of diesel contaminated soil**. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, v. 100, n. 1-3, p. 79-94, Jun. 2003.

NORRIS, R. D.; HINCHEE, R. E.; BROWN, R. et. al. **Handbook of Bioremediation**. New York: CRC Press, 1994.

NORRIS, R.D.; MATTHEWS, J.E. **Handbook of bioremediation**. Boca Raton, Fl: Lewis Publishers, 1994. 257 p.

PETROBRAS. <[www.petrobras.com.br](http://www.petrobras.com.br)> acesso em 19/05/2015, 22h46min

RAMOS, S. M. **Análise comparativa da influência do etanol em diferentes processos de remediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.  
RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova. v. 27, n. 5, p. 771–780. 2004.

REINHARD, M.; SHANG, S.; KITANIDIS, P. K.; ORWIN, E.; HOPKINS, G. D.; LEBRON, C. A. In situ BTEX biotransformation under enhanced nitrate- and sulfatereducing conditions. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 28-36, 1997.

SANTOS, R. C. F. **Impacto do etanol na biodegradação de compostos hidrocarbonetos monoaromáticos em aquíferos contaminados por derramamento de gasolina**. 1996. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 61, n.2, p. 262-280, Jun, 1997.

SCHROTH, M. H.; KLEIKEMPER, J.; BOLLIGER, C.; BERNASCONI, S. M, ZEYER, J.. **In situ assessment of microbial sulfate redution in a petroleum – contaminated aquifer using push – pull teste and stable sulfur isotope analyses**. Journal of contaminant Hudrilogy, v. 51, n. 3-4, p. 179-195. 2001.

SERBENT, M. P. **Influência do etanol e do sulfato na biodegradação de compostos aromáticos em águas subterrâneas contaminadas com misturas de combustíveis**. 2012. 191f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

SILVA, R. L. B.; MONTEIRO, T. C. N. **Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no município de Itaguaí. Rio de Janeiro, Brasil.** Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2002.

SMITH, R. L. Determining the terminal electron-accepting reaction in the saturated subsurface. In HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MC INERNEY, M. J.;

STARR, R. C.; GILLHAM, R. W. Denitrification and organic carbon availability in two aquifers. **Ground Water**, v. 31, n. 6, p. 934-947, Nov-Dec. 1993.

STETZENBACH, L. D. e WALTER, M. V. (eds.) **Manual of environmental microbiology.** Washington: ASM Press, 577-590p., 1997.

STOTZKY, G. Activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in soil. In: LASKIN, A. and LECHEVALIER, H. **Microbial ecology.** Cleveland: CRC Press, 1974. p. 57-135.

US EPA, United States Environmental Protection Agency . **Federal Water Pollution Control Act.** 1977. Disponível em: <http://www.epa.gov/npdes/pubs/cwatxt.txt>. Último acesso em Março de 2015.

ZEHNDER, A.J.B. Ecology of methane formation. In: MITCHELL, R.(ed). **Water Pollution Microbiology.** New York: Wiley & Sons, 1978. vol. 2, Chapter 13, p. 349-376.

WEINER, J.M.; LOVLEY, D.R. Rapid Benzene Degradation in Methanogenic Sediments from a Petroleum Contaminated Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 64, n. 5, p. 1937-1939, May, 1998.

WEISS, J.V.; COZZARELLI, I.M. **Biodegradation in Contaminated Aquifers: Incorporating Microbial/Molecular Methods.** Review Paper. *Ground Water*, v. 46, n. 2, p. 305–322. 2008.

WIEDEMEIER, T.H.; RIFAI, H.S.; NEWEL, C.J; WILSON, J.T. **Natural Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface.** New York: John Wiley & Sons, Inc. 617 p. 1999.

WILLIAMS, E. C. **Effect of Ethanol on BTEX Biodegradation in Aerobic Aquifer Systems.** Thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the thesis requirement for the degree of Master of Science in Earth Sciences. University of Waterloo, Ontário, Canadá, 105p. 2007.

YOUNG LY, CERNIGLIA CE. **Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals.** New York: Wiley; p. 77–125.1995.

## APÊNDICE 1

**Tabela 5.** Dados das Análises realizadas.

Amostras	Tempo (Dias)	Temperatura (°C)	Fe (II) (mg/L)	Sulfeto (mg/L)	Acetato (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Nitrito (mg/L)	Sulfato (mg/L)	Benzeno (mg/L)	Tolueno (mg/L)	Xileno (mg/L)	Metano (mg/L)
Branco	0	26,43	0,00	0	0,6410	N.D.	1,0023	N.D.	2,3653	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
1	15	23,30	0,28	0,037	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	42,4549	46,5943	1,1532	0,00000
2	31	22,70	0,00	0,041	N.D.	N.D.	1,3650	0,7660	9,5046	19,8317	16,7088	28,2979	N.A.
3	48	23,01	0,00	0,00	2,4623	N.D.	0,6870	0,5520	10,0426	53,3845	38,3000	31,6036	0,000
4	63	26,02	0,00	0,007	1,5790	0,3213	0,1010	0,1460	9,2316	37,4546	25,3115	25,4345	0,004
5	78	23,60	0,00	0,008	17,8033	N.D.	1,4613	N.D.	9,1250	55,8604	30,3698	20,5365	0,000
6	92	20,40	0,00	0,00	0,5160	N.D.	0,9133	N.D.	9,4570	73,9939	61,0994	54,0234	0,005
7	107	22,30	0,00	0,011	0,4590	N.D.	N.D.	N.D.	9,5047	77,5766	48,8752	35,5479	0,005
8	126	17,50	0,00	0,017	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,1154	83,8569	73,3526	54,2980	0,005
9	140	20,30	0,00	0,041	0,1747	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	56,0703	36,4450	25,5112	0,005
10	155	22,40	0,00	0,032	0,2450	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	71,9727	46,8231	35,5327	0,005
11	182	23,90	0,00	0,012	0,4393	N.D.	N.D.	0,0327	N.D.	78,7973	58,5501	51,0770	0,004
12	197	20,40	0,00	0,008	0,5437	N.D.	1,0419	N.D.	10,4651	64,0491	44,3283	36,9252	0,005

N.D. – Não Detectado; N.A. – Não Analisado.