

**IMPACTO DO ETANOL NA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS  
HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS EM AQUÍFEROS  
CONTAMINADOS POR DERRAMAMENTO DE GASOLINA**

**RUY CARLOS FERREIRA DOS SANTOS**

Orientador: Henry Xavier Corseuil

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Ciências em Engenharia Ambiental na área de Tecnologia de Saneamento Ambiental.

**FLORIANÓPOLIS**  
Estado de Santa Catarina - Brasil  
Agosto, 1996

**IMPACTO DO ETANOL NA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS  
HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS EM AQUÍFEROS  
CONTAMINADOS POR DERRAMAMENTO DE GASOLINA**

RUY CARLOS FERREIRA DOS SANTOS

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA AMBIENTAL

na Área de Tecnologia de Saneamento Ambiental.

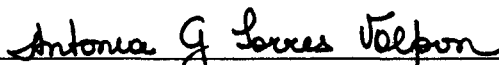
Aprovada por:




Prof. Henry Xavier Corseuil, Dr. (Presidente)



Profa. Dorothy Carmen Pinatti, Dra.



Profa. Antônia Garcia Torres Vblpon, Dra.



Prof. Fernando Soares Pinto Sant'Anna, Dr.

FLORIANÓPOLIS, SC - BRASIL  
AGOSTO DE 1996

Palavras escritas em papéis por mil mãos de uma só mão,  
não fica só em ti, não serve só para sonhos, cai por terra: ali permanece, ali poderá  
germinar....

Mesmo com as mãos cansadas do trabalho, tingidas de vermelho ou quando a boca ainda  
avalia a sílaba tardia procurando respostas muitas vezes não encontradas, o que fazer?

O procurar muitas vezes torna-se semelhante a liberdade.

Há como voar e para onde?.....

Muitas vezes sem asas, com imaginação, voar sem dúvida:

São passos que se caminha muitas vezes sem solução  
que muitas vezes não alcançam os pés do passageiro.

Há que procurar, que voar a cada instante buscando soluções, planando como  
pássaros, moscas e os dias, há de se pular muros, e estabelecer novos horizontes.

Sabendo-se que muitas vezes já não bastam os sapatos, nem os caminhos,  
já não serve mais a terra aos errantes, suas raízes já cruzaram noites.

A necessidade de conhecer novos caminhos, novas primaveras com novos perfumes  
característicos torna-se imprescindível para qualquer ser,  
mesmo que se somem a estes, as perdas.

Mesmo sem época definida, irá por outro o azul ser substituído, outras mãos, outros dedos,  
outras peles conhecerão a primavera...

Não se amarra a esta hora, porque se isto acontecer, o conhecido torna-se desconhecido,  
saberás então que feriu e fostes ferido e ninguém fala senão a sombra, a noite tempestuosa, o  
beijo da chuva arrastada pelo vento sul...

Se a procura cessar, o que acontecerá aos que tanto sonharam?

Buscaremos as antigas cinzas, ali ajoelharemos e recussitaremos  
esta flor murchada.

Amemos então esta coisa não bem definida que consumiu o fruto, desceu à  
terra sem configuração com poderio da luz fazendo parte da delicada teia da vida.

Ruy 18/08/96

## **AGRADECIMENTOS**

A trajetória de desenvolvimento desta dissertação, foi acompanhada por pessoas que, por terem sido fundamentais, merecem meus sinceros agradecimentos.

Agradeço especialmente ao meu orientador Dr. Henry Xavier Corseuil pelo incentivo, orientação e apoio durante o processo.

Aos professores da pós-graduação pela contribuição e enriquecimento de conteúdo transmitido durante o período de créditos.

Aos amigos e companheiros aos quais contraí muitas dívidas de gratidão que tão generosamente me ajudaram de diversas maneiras neste trabalho.

À banca examinadora pelas sugestões e avaliação.

À CAPES pela concessão de bolsa recebida durante todo o período de créditos e elaboração da pesquisa a qual culminou com a dissertação.

Ao CENPES/PETROBRÁS pelo financiamento do projeto, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I	
1 Introdução.....	1
CAPÍTULO II	
2 Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 Biorremediação.....	5
2.2 Compostos Químicos.....	6
2.3 Adaptação de populações microbianas.....	7
2.4 Disponibilidade de aceptores de elétrons.....	12
2.5 Biodegradação aeróbia.....	15
2.6 Biodegradação anaeróbia.....	19
2.7 Biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos.....	20
2.8 Fatores que afetam a biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos.....	23
2.9 Influência do etanol na biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos.....	24

	Página
CAPÍTULO III	
3 Material e Método.....	29
3.1 Equipamentos.....	29
3.2 Vidrarias.....	29
3.3 Outros materiais.....	30
3.4 Componentes para os experimentos (microcosmos).....	30
3.5 Métodos.....	32
CAPÍTULO IV	
4 Resultados e Discussão.....	37
4.1 Introdução.....	37
4.2 Biodegradação aeróbia dos compostos BTX na ausência de etanol.....	38
4.3 Biodegradação aeróbia dos compostos BTX na presença de 20 e 100 mg/l de etanol.....	45
4.4 Biodegradação aeróbia dos compostos BTX na presença de 300 mg/l de etanol.....	46
CAPÍTULO V	
5 Conclusões.....	54
CAPÍTULO VI	
6 Recomendações.....	57
APÊNDICE - Tabelas dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos e etanol. .	56
Referências Bibliográficas.....	97

## RELAÇÃO DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Anéis benzênicos.....	7, 31
Figura 2	Co-metabolismo entre bactérias, <i>Mycobacterium vaccae</i> e <i>Pseudomonas</i> (Bartha,1987).....	11
Figura 3	Modelo simplificado da biodegradação do anel benzênico via ciclo tricarboxílico através de <i>meta</i> ou <i>orto</i> clivagem (Bartha, 1987; Baggi, 1987; Chapelle, 1993).....	18
Figura 4	Derramamento de gasolina e etanol em águas subterrâneas.....	21
Figura 5	Repressão catabólica do crescimento celular de <i>E. coli</i> em meios de cultura contendo glicose e lactose.....	27
Figura 6	Microcosmo contendo 20g de material geológico, 50ml de solução nutritiva e 20mg/l de composto hidrocarboneto monoaromático.....	34
Figura 7	Cromatograma para curva padrão do etanol.....	35
Figura 8	Cromatograma da leitura dos compostos etanol e benzeno.....	36
Figura 9	Biodegradação de 20mg/l de benzeno.....	39
Figura 10	Biodegradação de 20mg/l de tolueno.....	40
Figura 11	Biodegradação de 20mg/l de <i>orto</i> -xileno.....	40
Figura 12	Biodegradação de 60mg/l de benzeno.....	41
Figura 13	Biodegradação de 60mg/l de tolueno.....	41
Figura 14	Biodegradação de 60mg/l de <i>orto</i> -xileno.....	42

Figura 15	Biodegradação de 20mg/l de benzeno, tolueno e <i>orto</i> -xileno associados.....	42
Figura 16	Biodegradação de 60mg/l de benzeno, tolueno e <i>orto</i> -xileno associados.....	43
Figura 17	Biodegradação de 20mg/l de benzeno associado a 20mg/l de etanol..	47
Figura 18	Biodegradação de 20mg/l de tolueno associado a 20mg/l de etanol...	48
Figura 19	Biodegradação de 20mg/l de <i>orto</i> -xileno associado a 20mg/l de etanol.....	48
Figura 20	Biodegradação de 20mg/l de benzeno associado a 100mg/l de etanol.	49
Figura 21	Biodegradação de 20mg/l de tolueno associado a 100mg/l de etanol..	49
Figura 22	Biodegradação de 20mg/l de <i>orto</i> -xileno associado a 100mg/l de etanol.....	50
Figura 23	Biodegradação de 20mg/l de benzeno associado a 300mg/l de etanol.	50
Figura 24	Biodegradação de 20mg/l de tolueno associado a 300mg/l de etanol..	51
Figura 25	Biodegradação de 20mg/l de <i>orto</i> -xileno associado a 300mg/l de etanol.....	51
Figura 26	Efeito de concentrações do etanol sobre a biodegração aeróbia do benzeno.....	53



**RELAÇÃO DE QUADROS**

	Página
Quadro I	Critérios internacionais de qualidade da água com relação a derramamentos de hidrocarbonetos monoaromáticos 31
Quadro II	Associações de concentrações em mg/l de etanol com compostos hidrocarbonetos monoaromáticos..... 33
Quadro III	Período de degradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos associados ao etanol..... 46

## RELAÇÃO DE TABELAS

		Página
Tabela I	Experimento - 20mg/l de Benzeno.....	60
Tabela II	Controle - 20mg/l de Benzeno.....	60
Tabela III	Experimento - 20mg/l de Tolueno.....	61
Tabela IV	Controle - 20mg/l de Tolueno.....	61
Tabela V	Experimento - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno.....	62
Tabela VI	Controle - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno.....	62
Tabela VII	Experimento - 60mg/l de Benzeno.....	63
Tabela VIII	Controle - 60mg/l de Benzeno.....	63
Tabela IX	Experimento - 60mg/l de Tolueno.....	64
Tabela X	Controle - 60mg/l de Tolueno.....	64
Tabela XI	Experimento - 60mg/l de <i>Orto</i> -xileno.....	65
Tabela XII	Controle - 60mg/l de <i>Orto</i> -xileno.....	65
Tabela XIII	Experimento - 20 mg/l de Benzeno associado a 20mg/l de Tolueno e <i>Orto</i> -xileno.....	66
Tabela XIII.1	Controle - 20mg/l de Benzeno associado a 20mg/l de Tolueno e <i>Orto</i> -xileno.....	66
Tabela XIII.2	Experimento - 20mg/l de Tolueno associado a 20mg/l de Benzeno e <i>Orto</i> -xileno.....	67
Tabela XIII.3	Controle - 20mg/l de Tolueno associado a 20mg/l de Benzeno e <i>Orto</i> -xileno.....	67
Tabela XIII.4	Experimento - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 20mg/l de Benzeno e Tolueno.....	68
Tabela XIII.5	Controle - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 20mg/l de Benzeno e Tolueno.....	69

Tabela XIV	Experimento - 60mg/l de Benzeno associado a 60mg/l de Tolueno e <i>Orto</i> -xileno.....	70
Tabela XV	Controle - 60mg/l de Benzeno associado a 60mg/l de Tolueno e <i>Orto</i> -xileno.....	71
Tabela XVI	Experimento - 60mg/l de Tolueno associado a 60mg/l de Benzeno e <i>Orto</i> -xileno.....	72
Tabela XVII	Controle - 60mg/l de Tolueno associado a 60mg/l de Benzeno e <i>Orto</i> -xileno.....	73
Tabela XVIII	Experimento - 60mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 60mg/l de Benzeno e Tolueno.....	74
Tabela XIX	Controle - 60mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 60mg/l de Benzeno e Tolueno.....	75
Tabela XX	Experimento - 20mg/l de Benzeno associado a 20mg/l de Etanol.....	76
Tabela XXI	Controle - 20mg/l de Benzeno associado a 20mg/l de Etanol.....	76
Tabela XXII	Experimento - 20mg/l de Tolueno associado a 20mg/l de Etanol.....	77
Tabela XXIII	Controle - 20mg/l de Tolueno associado a 20mg/l de Etanol.....	77
Tabela XXIV	Experimento - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 20mg/l de Etanol.....	78
Tabela XXV	Controle - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 20mg/l de Etanol.....	78
Tabela XXVI	Experimento - 20mg/l de Benzeno associado a 100mg/l de Etanol.....	79
Tabela XXVI.1	Experimento - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Benzeno.....	79
Tabela XXVII	Controle - 20mg/l de Benzeno associado a 100mg/l de Etanol.....	80
Tabela XXVII.1	Controle - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Benzeno.....	80
Tabela XXVIII	Experimento - 20mg/l de Tolueno associado a 100mg/l de Etanol.....	81
Tabela XXVIII.1	Experimento - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Tolueno.....	81
Tabela XXIX	Controle - 20mg/l de Tolueno associado a 100mg/l de Etanol.....	82

Tabela XXIX.1	Controle - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Tolueno.....	82
Tabela XXX	Experimento - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 100mg/l de Etanol.....	83
Tabela XXX.1	Experimento - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno.....	84
Tabela XXXI	Controle - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 100mg/l de Etanol.....	85
Tabela XXXI.1	Controle - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno.....	86
Tabela XXXII	Experimento - 20mg/l de Benzeno associado a 300mg/l de Etanol.....	87
Tabela XXXII.1	Experimento - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Benzeno.....	88
Tabela XXXIII	Controle - 20mg/l de Benzeno associado a 300mg/l de Etanol.....	89
Tabela XXXIII.1	Controle - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Benzeno.....	90
Tabela XXXIV	Experimento - 20mg/l de Tolueno associado a 300mg/l de Etanol.....	91
Tabela XXXIV.1	Experimento - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Tolueno.....	92
Tabela XXXV	Controle - 20mg/l de Tolueno associado a 300mg/l de Etanol.....	93
Tabela XXXV.1	Controle - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Tolueno.....	94
Tabela XXXVI	Experimento 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 300mg/l de Etanol.....	95
Tabela XXXVI.1	Experimento - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno.....	95
Tabela XXXVII	Controle - 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno associado a 300mg/l de Etanol.....	96
Tabela XXXVII.1	Controle - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de <i>Orto</i> -xileno.....	96

## RESUMO

Os derramamentos de petróleo e seus derivados como a gasolina têm ocorrido com muita frequência em solos, atingindo sistemas aquíferos em diversos países. Os compostos benzeno, tolueno e *orto*-xileno, produtos cancerígenos presentes na gasolina, podem atingir lençóis freáticos afetando reservas hídricas e impossibilitando o uso da água para o consumo humano. No Brasil o crescente aumento no número dos postos de gasolina, a partir da década de setenta, agravou ainda mais os problemas de poluição do solo causados pelos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos.

A adição de 22% de etanol na gasolina brasileira poderá causar um comportamento diferente no deslocamento de plumas dos compostos benzeno, tolueno e *orto*-xileno em sistemas aquíferos brasileiros em relação a derramamentos de gasolina observados em outros países. O etanol pode causar o efeito de co-solvência que tende a aumentar a solubilidade e o transporte dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos afetando, conseqüentemente, a biodegradação aeróbia destes compostos. A possibilidade do etanol ser utilizado como fonte de carbono pela população microbiana antes dos compostos benzeno, tolueno e *orto*-xileno poderá ser afetada pelas condições limitadas de oxigênio dos lençóis freáticos e inviabilizar o processo de biorremediação aeróbia no local contaminado.

Este trabalho apresenta e discute a influência do etanol na biodegradação aeróbia dos compostos BTX em microcosmos, utilizando-se solo com população nativa de microrganismos do material geológico da localidade de Jurerê, litoral norte da Ilha de Santa Catarina. As avaliações da biodegradação dos BTX na ausência e presença de etanol foram realizadas através de cromatografia gasosa. Os resultados obtidos destes experimentos demonstraram que a presença do etanol pode retardar e até limitar a biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos. Desse modo, a remediação de locais contaminados por derramamentos de gasolina no Brasil poderá ser mais dispendiosa do que em outros países onde o etanol não é adicionado à gasolina.

## ABSTRACT

The oil spreading and its derivatives such as gasoline has happened very often on soils, and covers the aquifers systems in several countries. Benzene, toluene and *orto*-xylene, cancerigeneous products present in gasoline, can cover water table affecting hydride reserves anable the use of water for human consume. In Brazil the increasing growth on the number of gas stations, since 70's, increased a lot the problem of soil pollution caused by monoaromatic hydrocarbons compounds.

The addition of 22% of ethanol in Brasilian gasoline can cause a different reaction on the plume removing of benzene, toluene and *orto*-xylene compounds in Brazilian aquiferous systems in relation to gasoline spreading observed in other countries. The ethanol can cause the effect of co-solvency that tends to increase the solubility and the transport of monoaromatic hydrocarbons compounds affecting, consequently, the aerobic biodegradation of these compounds. The possibility of ethanol be used as a carbon source by the microbial population before the benzene, toluene and *orto*-xylene compounds can be affected by oxygen limited conditions of the water table and interrupt the aerobic biorectification process on the contaminated place.

This work presents and dicusses the influence of ethanol on aerobic bodegradation of BTX compounds in microcosms, using soil with native population of geological material of Jurerê, which is located on the North of island of Santa Catarina. The BTX biodegradation assessments on absence and presence of this experiments show that the presence of ethanol can delay and even limit the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons compounds. In this way, the rectification of contaminated places by spreading gasoline in Brazil will be more expensive than in other countries where ethanol is not added to gasoline.

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico verificado nas últimas décadas na área da química orgânica tornou possível a síntese e produção de um número cada vez maior de compostos orgânicos. A crescente utilização destes compostos em vários aspectos da atividade humana tem levado à introdução progressiva no meio ambiente dos traços destes produtos, bem como outras substâncias formadas no processo de fabricação. Estes fatores têm preocupado a sociedade em geral, estimulando vários países a conceder caráter prioritário às pesquisas quanto à presença, monitoramento e toxicidade destes compostos em águas subterrâneas e superficiais para o consumo humano.

Derramamentos de petróleo ou seus derivados têm ocorrido com muita frequência tanto em solos, como em sistemas aquáticos em diversos países (Thiem et al, 1994). A gasolina, estando entre estes derivados, é uma mistura complexa onde encontram-se mais de duzentos compostos diferentes com características próprias. Entre estes compostos encontra-se o benzeno, produto cancerígeno facilmente encontrado em derramamentos de petróleo (Ridgway et al, 1990). Em países industrializados, admite-se atualmente que de 75 a 80% de incidência de câncer é de origem ambiental e que do total dos ensaios realizados em laboratório, 20% dos casos avaliados apresentaram alguma atividade carcinogênica. Nos Estados Unidos, diversos estudos de laboratório levaram ao conhecimento da população

sobre o efeito carcinogênico de vários compostos orgânicos sintéticos. Em 1972, com a definição da Lei PL 92-500 (Federal Water Pollution Control Act) pelo Congresso Americano, a EPA - Agência de Proteção Ambiental - foi incumbida de desenvolver um amplo programa para investigar e melhorar a qualidade das águas naquele país, formando uma relação de diversos poluentes encontrados em vários tipos de água entre eles o benzeno, tolueno e etilbenzeno.

No Brasil existem poucos dados sobre a ocorrência de compostos orgânicos no meio ambiente. Portanto, fica difícil saber quais poluentes estão presentes em sistemas aquáticos. Com o crescimento dos centros urbanos e o desenvolvimento de complexos industriais, aumentam conseqüentemente seus resíduos e riscos de poluição ao meio ambiente. As medidas preventivas e corretivas para preservação e proteção da flora e da fauna aquáticas basearam-se em estudos ecotoxicológicos, por meio dos quais foram estabelecidos limites permissíveis de poluentes na água. Assim, esses limites passaram a ser utilizados com freqüência no fornecimento de subsídios às ações de controle denominados padrões de qualidade de água e efluentes ( Environment Canadá, 1979). Porém, nem sempre a utilização desses padrões de qualidade, medidos através das análises físico-químicas, é suficiente para avaliar sistemas aquíferos contaminados. Devido à complexidade e variabilidade de compostos orgânicos e inorgânicos que podem estar presentes num corpo hídrico, há necessidade de se complementar sua caracterização.

No Estado de Santa Catarina, os derramamentos acidentais ou não de gasolina ferem o art. 3, seção II, Lei Estadual nº 14.250/1981 regulamentado pelo Decreto nº 5.793/1980, onde é especificado que a degradação da qualidade ambiental é a alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente causada por qualquer forma de energia, substâncias sólidas, líquidas, gasosas, ou a combinação de elementos produzidos por atividades humanas e em decorrência destas, em níveis capazes de direta ou indiretamente prejudicar a saúde, a segurança e o bem-estar da população (item I). Criar condições adversas às atividades sociais e econômicas (item II). Ocasionar danos relevantes à flora, à fauna e a outros recursos naturais. O mesmo Decreto, em sua subseção III, art. 31,



sobre emissão de substâncias odoríferas na atmosfera, limita a sua emissão em 4,68 PPM (Parte Por Milhão), de LPO ( Limite de Percepção de Odor).

As diversas análises de água, medidas para se saber sua qualidade, são necessariamente comparadas com valores limites recomendados para os múltiplos usos, em geral estabelecidos na forma de padrões nacionais e internacionais. A resolução brasileira Conama 20/86 fixa aproximadamente 70 padrões para águas doces, salobras e salinas. Os padrões para água de abastecimento (potável) foram reestudados pelo Ministério da Saúde e estão fixados na Portaria 36/GM/90. Inclui-se nesta Portaria a tabela I onde está fixado limite padrão de potabilidade para o benzeno de 10 ppb (parte por bilhão) em água destinada ao consumo humano.

Muitas alternativas surgiram para resolver problemas de contaminação de águas subterrâneas. Entre elas processos físicos, químicos e biológicos. Entre os processos biológicos, a biorremediação apresenta-se como uma alternativa economicamente viável que causa menor impacto ambiental, bem como atinge os padrões definidos em legislações. Entretanto, este processo biológico ainda exige estudos adequados para a definição de parâmetros de projeto para posteriormente utilizar-se da população microbiana disponível no subsolo, capaz de degradar compostos tóxicos (Konopka e Turco, 1991).

A utilização do etanol como nova alternativa de combustível nasceu em consequência da crise do petróleo entre os anos de 1973 e 1974, onde o preço do barril do petróleo de US\$ 3 subiu para US\$12 sob a ação da OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo). Especificamente no caso do setor de transportes, em 1973 o Brasil dependia de 98% de derivados de petróleo, sendo a gasolina responsável por 56% do consumo neste setor. Em 1979, a dependência brasileira em relação ao petróleo atingiu 37%, sendo que toda a energia importada era em forma de petróleo. Esta crise estimulou a criação do Programa Nacional do Alcool - PROÁLCOOL - definido em novembro de 1975 e estimulado em 1979 com o objetivo de substituir a gasolina (Melo e Pelin, 1984). Em virtude do excesso da produção de gasolina ocorrido desde a década de 80, tal expectativa não ocorreu e o etanol foi então adicionado à gasolina brasileira. Desde então o etanol, também denominado álcool de cana, é produzido em grandes quantidades pelas agro-

indústrias nacionais de fermentação, para ser adicionado à gasolina. As características das condições ambientais e a presença adicional de outros compostos orgânicos como o etanol podem influenciar diretamente na descontaminação de compostos tóxicos (Ingram e Buttke, 1984). A inexistência de dados sobre a contaminação de águas subterrâneas por gasolina associada ao etanol acrescenta mais uma justificativa para o estudo da influência do etanol sobre os compostos hidrocarbonetos monoaromáticos.

## CAPÍTULO II

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Biorremediação

Tecnologias para a recuperação de áreas contaminadas de águas subterrâneas utilizando-se microrganismos têm apresentado resultados significativos (Dibble e Bartha, 1979). A existência de microrganismos metabolicamente ativos e capazes de degradar diversos compostos químicos, possibilitam a recuperação de aquíferos contaminados comprovada pela biodegradação de alguns compostos como o ácido nutrilacético, acetona, etanol, naftaleno, e benzeno (Lee et al, 1988; Novak et al, 1984).

A biorremediação, sendo um processo natural que explora a habilidade de microrganismos como certas bactérias e determinados fungos capazes de degradar contaminantes químicos e compostos tóxicos, possibilita a despoluição de áreas contaminadas. A biorremediação pode ser trabalhada de duas formas: a natural e a artificial. A biorremediação natural é capaz de biodegradar contaminantes aeróbicamente na zona vadose e nas margens da pluma do contaminante. Em áreas onde o oxigênio foi totalmente consumido, a biorremediação natural também pode ser efetiva e diminuir significativamente a concentração de contaminantes tanto no material aquífero como na água subterrânea (Mormile e at, 1994). A diversidade microbiológica existente no solo influencia diretamente na degradação de um determinado composto (Corseuil e Weber, 1994). De acordo com Webster (1985), uma população média de  $10^6$  e  $10^7$  de célula por grama de solo seco pode viabilizar o uso de técnicas de biorremediação. A biorremediação artificial é um processo

que além de fazer o uso da população autóctone pode também adicionar populações alóctones. A introdução de populações alóctones torna-se necessária em casos drásticos de poluição onde a população microbiana foi totalmente eliminada ou o local contaminado encontra-se totalmente estéril justificando-se, portanto, a introdução de microrganismos com capacidade metabólica especializada em degradar contaminantes específicos. Pode ainda haver a necessidade da adição de vários nutrientes com fósforo (P) e nitrogênio (N) ou o oxigênio para acelerar a biodegradação e conseqüentemente elevar o custo da área a ser tratada.

A injeção de oxigênio através de bombas compressoras pode ser outra alternativa para estimular a biodegradação de contaminantes de forma aeróbia em zonas insaturadas (Corseuil e Weber, 1993). Estudos realizados por Wilson e Ward (1987), sugeriram que o bombeamento de oxigênio em áreas contaminadas pode ser mil vezes mais eficiente quando comparado com a adição da água em processos de biorremediação. Em áreas contaminadas por derramamentos de gasolina a injeção de oxigênio estimula a biodegradação de seus derivados proporcionada pelo aumento de aceptores de elétrons no meio e pelo aumento da temperatura no sistema subsuperficial (Corseuil, 1994a). A eficiência na renovação de oxigênio do sistema aquífero está diretamente relacionada com a permeabilidade do material litológico, uma vez que quanto mais permeável melhor o deslocamento do oxigênio entre as partículas.

## 2.2 Compostos Químicos

Em locais contaminados, a absorção pelo organismo humano dos compostos benzeno, tolueno e *orto*-xileno pode ocorrer através da pele, das vias respiratórias, ou quando ingeridos, podem atingir os alvéolos e o tecido hematopoético (Goodman, 1980; Rostagno, 1996). Em cobaias de laboratório observou-se outros efeitos negativos como aberrações em número, estruturas de cromossomos e danificações na morfologia da cabeça

de espermatozoides (Huff et al, 1989). Estes compostos facilmente identificáveis pelo cheiro característico, possuem anel benzênico sendo uma molécula planar com átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio (Figura - 1). A existente ligação entre os seis carbonos destes compostos condiciona uma estabilidade que lhes permite a condição de ser pouco solúvel em água. A densidade destes compostos de 0,874 kg para o benzeno, 0,881 kg para o tolueno e 0,890 kg para o *orto*-xileno faz com que estes compostos, em caso de derramamentos, permaneçam na superfície de lençóis freáticos. A solubilidade e a volatilidade tornam-se importantes propriedades uma vez que influenciam diretamente no transporte destes compostos em aquíferos.

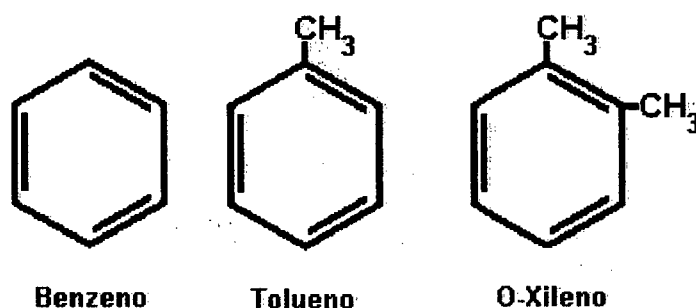


Figura - 1 Anéis benzênicos

### 2.3 Adaptação de populações microbianas

A utilização de bactérias e fungos para solucionar problemas causados por compostos que contaminam o solo e sistemas aquíferos, é um processo viável e tem obtido bons resultados mesmo com certos limites fisiológicos, onde as enzimas bacterianas podem aumentar a velocidade de conversão de produtos tóxicos em compostos não tóxicos (Young e Cerniglia, 1995). Um microecossistema pode ser visto como uma série de reações redox

integradas para a obtenção de energia por células microbianas, sendo que muitas reações catalíticas exercidas por microrganismos são fundamentais para a manutenção do balanço de elétrons no metabolismo celular (Alexander, 1985). A incorporação de um contaminante em reações redox contribui muitas vezes como doador ou receptor de elétrons sendo este oxidado ou reduzido (Dolfing et al, 1990).

O efeito de um composto tóxico sobre uma população microbiana pode variar consideravelmente dependendo da característica e quantidade do contaminante, período em que o composto permanece na área e as limitações das condições ambientais do local contaminado. As características físicas e químicas do solo poderão atuar amenizando os efeitos tóxicos sobre os microrganismos autóctones (Scow et al, 1986). Muitos microrganismos catalisam essas reações essenciais para a manutenção do balanço de elétrons do complexo microecossistema. Para um contaminante ser incorporado neste sistema redox de reações, ele precisa servir como doador ou receptor de elétrons, só então será oxidado ou reduzido a exemplo de muitos compostos orgânicos halogenados (Liu e Suflita, 1993).

Os microrganismos sobrevivem em seus habitats porque possuem condições metabólicas para explorar os recursos disponíveis freqüentemente encontrados em seu nicho. Os contaminantes são, em muitos casos, uma fonte de energia para microrganismos que exigem adaptações da microflora residente. As populações que sobrevivem ao contato com o poluente podem muitas vezes levar um certo período para se adaptar às novas condições, também conhecida como fase "lag". A eficiência e o tempo da degradação depende deste período de adaptação. Muitos outros fatores também influenciam no desenvolvimento da população autóctone após a introdução do contaminante no local, entre eles, fatores abióticos tais como pH, temperatura, características do solo e disponibilidade de nutrientes (Santos et al, 1996). Outros fatores bióticos como competição e predação também influenciam a degradação de compostos contaminantes (Bower e Zehnder, 1993).

Células procarióticas ou eucarióticas em contato com determinados agentes químicos podem ser consideradas subletais quando estas sobrevivem e tornam-se mais resistentes, suportando concentrações mais elevadas destes agentes. Este fenômeno pode ser considerado, a nível genético, como uma reparação adaptativa que pode ser explicada pelo

acúmulo intracelular de uma ou mais enzimas capazes de eliminar lesões provocadas no DNA da célula pelo contato com o composto. A resposta adaptativa tem sido descrita após o contato com diversos agentes químicos, incluindo o peróxido de hidrogênio, substância que atua tendo como intermediários determinados radicais livres especialmente a hidroxila (Caldwell, 1995).

A seleção de microrganismos pode vir a ocorrer sob altas concentrações do contaminante minimizando o número de espécies e favorecendo os indivíduos mais aptos em degradar o composto químico. A capacidade da população microbiana em superar o impacto de um contaminante e o tempo necessário para que o processo de adaptação ocorra, poderá influenciar diretamente na persistência do contaminante no ambiente (Arvin et al, 1989). A habilidade de comunidades microbiológicas em se adaptar e resistir a compostos químicos sintéticos é exemplificada pela resistência gradativa de bactérias em relação aos antibióticos nas últimas décadas (Goodman, 1980). A resistência bacteriana ao longo dos anos demonstra a capacidade que populações microbianas possuem em se adaptar a novos compostos sintéticos. A adaptação seletiva envolve mudanças na especificidade de enzimas e novos substratos ou até mesmo em atividades metabólicas. A evidência destes mecanismos genéticos de adaptação é usualmente comprovada por análise de proteínas ou seqüência de genes (Lajoie, et al 1992). Esta adaptação resulta em uma seleção de espécies e transformações específicas de enzimas oxidativas com o substrato envolvido no processo degradativo (Dixon e Webb, 1979; Jenkins et al, 1986; Chapelle, 1993).

Em alguns casos de contaminação por compostos tóxicos, a biodegradação poderá ser incompleta e uma população microbiana estará condenada uma vez que os microrganismos despendem energia no processo sem conseguir elementos para seu desenvolvimento (Riser-Roberts, 1992). Em cultura mista estas dificuldades podem ser superadas e a co-metabolização passar a ser um processo normal. Este processo pode ocorrer entre duas populações interagindo-se e o metabólito resultante da degradação de uma população poderá ser degradado por outra. Esta interação positiva entre populações microbianas possibilita a atuação de diferentes microrganismos na utilização de um substrato complexo de forma mais eficiente (Young e Cerniglia, 1995). Uma relação microbiana

positiva entre populações diferentes pode criar novas possibilidades para que estas ocupem novos nichos, o que poderia não ocorrer sob condições de isolamento de uma única espécie. As interações populacionais podem aumentar suas taxas metabólicas, o crescimento populacional e seus níveis de sobrevivência. Os efeitos benéficos sobre interações populacionais microbianas são amplamente conhecidos, onde uma população se beneficia do subproduto de uma reação de outra população sem prejudicar a primeira. Este processo conhecido como comensalismo também pode ser chamado de co-metabolismo (figura - 2).

O co-metabolismo, sendo um processo natural não freqüentemente usado para tratar resíduos orgânicos, é favorecido por populações mistas afetando favoravelmente a biodegradação de compostos orgânicos a serem degradados (Norris, 1993). A transformação de compostos orgânicos envolve basicamente dois processos: no primeiro, a biodegradação ocorre quando o organismo consome o substrato diretamente para satisfazer suas necessidades energéticas e de carbono orgânico; no segundo, o co-metabolismo, a biodegradação pode ocorrer de forma parcial envolvendo duas ou mais espécies de microrganismos. Para que este processo ocorra uma população deve possuir enzimas capazes de degradar um determinado produto em um outro subproduto, favorecendo uma segunda população na utilização deste subproduto. Outro fator importante na co-metabolização é a presença de outras fontes de carbono e de energia para manutenção e formação de organelas, uma vez que no processo de biodegradação os subprodutos não serão utilizados pela primeira população. A transformação do produto em subproduto pode ser observada na figura - 2, onde a bactéria *Mycobacterium vaccae* transforma o ciclo hexano no subproduto ciclo hexanol, favorecendo as bactérias do tipo *Pseudomonas* na obtenção de energia e finalizando o subproduto em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.



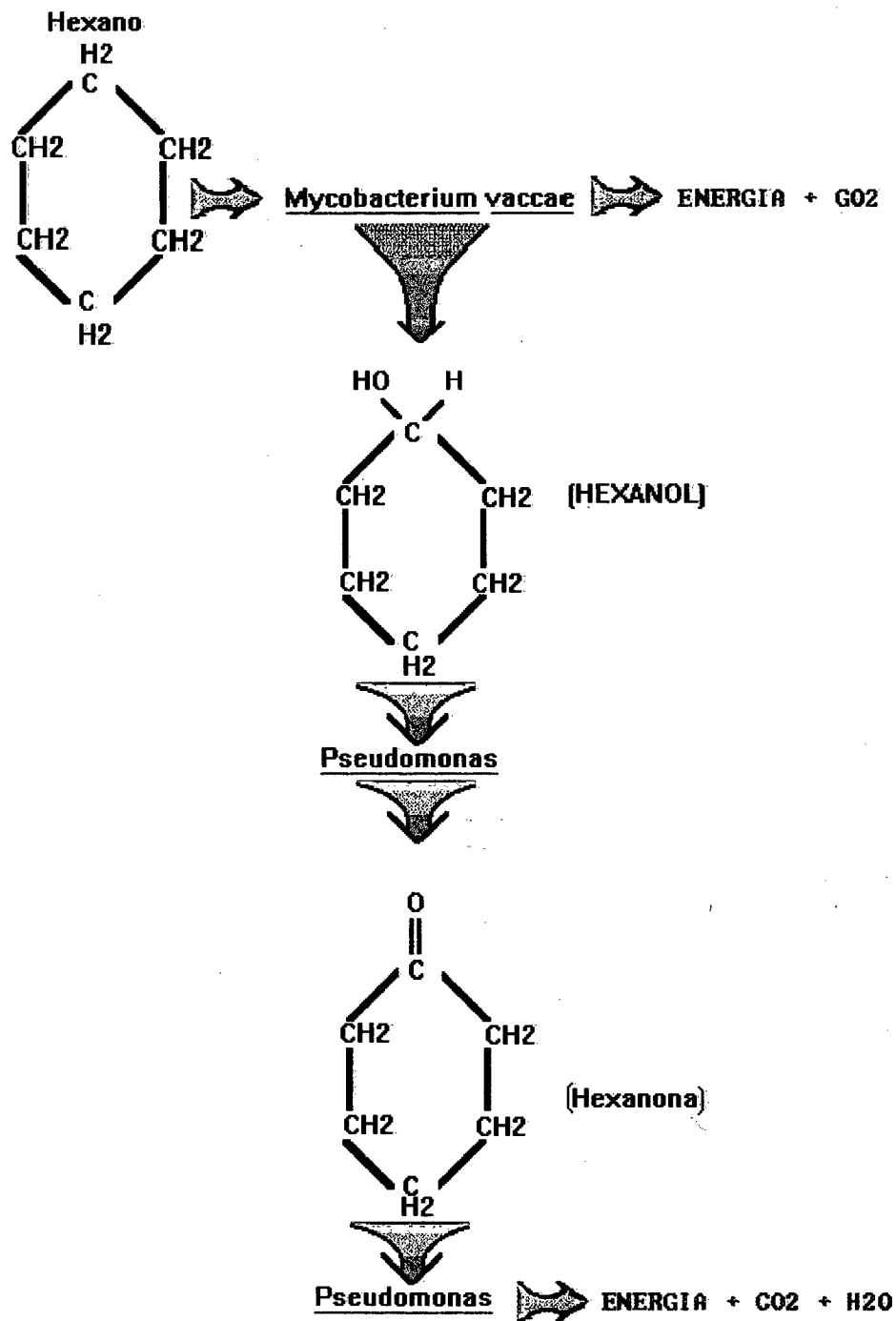


Figura - 2 Co-metabolismo entre bactérias, *Mycobacterium vaccae* e *Pseudomonas* (Atlas e Bartha, 1987)

## 2.4 Disponibilidade de aceptores de elétrons

O potencial de oxidação e redução de um solo é basicamente expressado pela disponibilidade de elétrons encontrando-se entre eles, o oxigênio ( $O_2$ ), nitrato ( $NO_3$ ), íons de ferro ( $Fe_3^+$ ), sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), e o dióxido de carbono ( $CO_2$ ). A variação na concentração destes potenciais redox afetam diretamente o catabolismo celular através de centenas de reações enzimáticas e de energia química, influenciando na biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos.

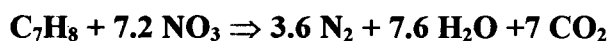
**Oxigênio** - Em solos arenosos, a presença de um grande número de macroporos favorecem a oxigenação e infiltração de água podendo facilitar a biodegradação aeróbia dos compostos BTX. Em reações de transferência de elétrons, a biodegradação aeróbia dos compostos benzeno, tolueno e *orto*-xileno ocorre rapidamente por necessitarem em média de 3 mg/l de oxigênio para consumir 1 mg/l de cada composto BTX (Corseuil e Alvarez, 1996b). Entretanto, em concentrações elevadas de contaminantes, a biodegradação aeróbia pode ser afetada uma vez que depende da diluição da pluma do composto (Wilson e Ward, 1987). A concentração geralmente de 6 a 12 mg/l de oxigênio encontrado em águas subterrâneas, bem como a presença de outros substratos, impõe limites na biodegradação dos compostos BTX (Alvarez e Vogel, 1995).

O uso do peróxido de hidrogênio como fonte alternativa para oxigenação de sistemas subsuperficiais apresenta-se como mais um recurso a ser aplicado na biorremediação. Entretanto, existem poucas pesquisas sobre seu potencial bem como as limitações quanto ao seu uso (Hinchee, 1994). Em uma área onde haja necessidade urgente de descontaminação, o peróxido de hidrogênio, em condições controladas, pode vir a ser um estimulador da biodegradação através da reação:



onde teremos uma molécula de água e ½ de oxigênio. Esta reação poderá ser catalisada por ferro, manganês ou por enzimas do tipo catálise produzidas por muitas bactérias. A catálise por metais do peróxido de hidrogênio pode, em muitos casos, modificar o *pH* do sistema aquífero e dificultar o ataque dos microrganismos aos compostos xenobióticos. O peróxido de hidrogênio pode ainda ser tóxico para os microrganismos quando em concentrações insuportáveis pelas populações microbianas autóctones. Portanto, antes de sua aplicação em um sistema subsuperficial, há a necessidade da realização de testes laboratoriais para se saber em que nível o peróxido de hidrogênio torna-se tóxico para população microbiana autóctone.

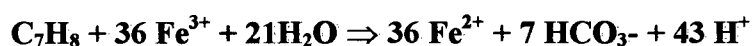
**Nitrato** - Depois do oxigênio, o nitrato é termodinamicamente o melhor receptor de elétrons, tendo sido considerado uma boa alternativa para a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos (Hutchins, 1991; Alvarez e Vogel, 1991). A sua utilização na biorremediação é atrativa porque o nitrato é altamente solúvel em água e, portanto, pode ser mais facilmente introduzido e misturado em uma pluma de contaminantes. A biodegradação do composto tolueno na presença de nitrato resulta em nitrogênio, água e dióxido de carbono (observado na seguinte reação).



No entantó, em caso de adição em excesso de nitrato há a possibilidade deste composto atingir níveis elevados em águas subterrâneas e tornar-se um poluente. Águas de abastecimento contendo quantidades excessivas de nitrato podem causar a metahemoglobinemia em crianças, sendo o limite estabelecido para este tipo de água de 45 mg/l sob forma de nitrato ou 10 mg/l sob a forma de nitrogênio. Porém a biodegradação do benzeno, o principal contaminante dentre os BTX, não foi comprovada em condições desnitrificantes. Todavia, quando o oxigênio não está mais disponível, a desnitrificação

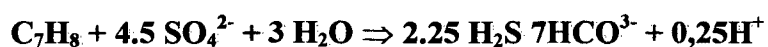
torna-se uma opção viável onde bactérias do gênero *Pseudomonas* juntamente com outras bactérias facultativas podem atuar e degradar os compostos hidrocarbonetos monoaromáticos. Os efeitos de interação entre substratos também são importantes mecanismos que devem ser compreendidos para a análise dos BTX no meio ambiente (Anid et al, 1993).

**Íons de ferro** - Após o término do oxigênio e o nitrato, a biodegradação ocorre através de algumas bactérias redutoras de ferro capazes de degradar os compostos hidrocarbonetos monoaromáticos. A presença abundante de íons de ferro em águas subterrâneas possibilitam a biodegradação dos compostos BTX, exemplificado pela reação abaixo com o composto tolueno:



Embora os íons de ferro seja uma importante fonte acceptora de elétrons, pouco se conhece sobre o envolvimento deste composto nos mecanismos da biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos. Estudos sobre os efeitos da transformação de Fe(III) para Fe(II), envolvendo os BTX com o objetivo de se conhecer melhor os fatores que afetam as condições nutricionais, do metabolismo e do crescimento de bactérias redutoras de ferro, são necessários para poder explorar este potencial (Norris et al, 1993).

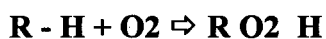
**Sulfato** - O uso do sulfato para degradação dos BTX sob condições de redução de sulfato também pode ocorrer (reação abaixo). Este processo, embora lento, é importante porque ocorre próximo do centro da pluma do contaminante (Corseuil e Alvarez, 1996a). Porém, em reações onde obtém-se subprodutos como o sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), o processo anaeróbio pode ser afetado uma vez que concentrações de sulfeto podem inibir o processo metanogênico (Hilton e Oleszkiewicz, 1988).



**Dióxido de carbono** - As bactérias metanogênicas têm em comum a capacidade de formar metano como produto final do seu metabolismo, apesar do mecanismo não ser totalmente conhecido. Segundo Oremland apud Montenegro (1994), as bactérias metanogênicas utilizam como fonte de energia e carbono, um número reduzido de compostos simples como hidrogênio, dióxido de carbono, acetato, formiato, metanol e aminas metiladas. Sob condições anaeróbias, a biodegradação de alguns compostos hidrocarbonetos monoaromáticos como o benzeno e tolueno podem ser reduzidos a CO<sub>2</sub> e metano (Grbic-Galic e Vogel, 1987).

## 2.5 Biodegradação aeróbia

Na presença de moléculas de oxigênio compostos como benzoatos, fenóis, anilinas e hidrocarbonetos monoaromáticos são inicialmente oxidados por enzimas mono ou dioxigenases e convertidos em catecol e posteriormente mineralizados (Zeyer, et al, 1986). As oxidações biológicas se processam por uma incorporação direta de moléculas de oxigênio em compostos orgânicos através de reações enzimáticas oxidativas. Estas oxidações são catalisadas por uma série de enzimas que ativam moléculas de oxigênio, conhecidas como oxigenases. Dependendo se apenas um ou ambos os oxigênios são introduzidos no substrato, estas oxigenases são subclassificadas como monoxigenases ou dioxigenases. Enquanto as dioxigenases inicialmente preferem substratos ativos funcionais com dois átomos de oxigênio, os quais são incorporados ao substrato orgânico observado na seguinte estequiometria:



As monoxigenases podem atuar quimicamente sobre compostos inertes como esteróides ou anéis aromáticos e convertê-los em alcóois e fenóis desempenhando um

importante papel na biodegradação. Catalisam reações nas quais apenas um átomo de oxigênio é incorporado na molécula do substrato orgânico. O outro átomo é reduzido a água. As monoxigenases necessitam de um substrato e um co-substrato que atuam como redutores de dois átomos de oxigênio. O substrato principal fornece dois átomos de oxigênio e o co-substrato fornece átomos de hidrogênio para reduzir o segundo átomo de oxigênio a água observada na equação abaixo:



O substrato principal que aceita um átomo de oxigênio é AH, enquanto BH<sub>2</sub> fornece átomos de hidrogênio para reduzir outro oxigênio. A maioria das monoxigenases que catalisam reações nas quais o substrato principal torna-se hidroxilado, são chamadas de hidrolases (Baggi, et al, 1987). Outro fator importante é o reconhecimento de que muitos sistemas contendo monoxigenases possuem o mesmo tipo de biocatalisadores caracterizados como hemoproteínas, denominadas citocromos.

O mecanismo mais energeticamente favorável para microrganismos oxidarem compostos orgânicos é o metabolismo aeróbio no qual o oxigênio molecular é usado como um aceptor terminal de elétrons. Dentre os vários caminhos para a célula produzir Adenosina Trifosfato (ATP) com redução de oxigênio encontra-se o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. O ciclo tricarboxílico é iniciado após a glicólise onde o ácido pirúvico é oxidado. O ácido pirúvico perde um dióxido de carbono passando a ácido acético na forma de acetil Coenzima A (Acetil-CoA). A descarboxilação oxidativa do piruvato para o Acetil-coA envolve basicamente três enzimas: a desidrogenase pirúvica, a transacetilase diidrolipóica, e desidrogenase diidrolipóica. A condensação do Acetil-Coa com o ácido oxalacético para formar ácido cítrico é catalisada pela enzima sintetase cítrica. Com a oxidação do ácido cítrico, composto por seis carbonos, é oxidado e libera o 2º dióxido de carbono reduzindo a adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) para NADH. A energia liberada nesta oxidação é capturada na forma de guanosina trifosfato (GTP). A sintetase do ácido cítrico ocorre através da atuação da enzima aconitase a qual adiciona H<sub>2</sub>O à dupla ligação do ácido

cís-aconítico formando um ácido cítrico e um ácido isocítrico. O ácido isocítrico é oxidado pela desidrogenase isocítrica formando o  $\alpha$ -cetogluturato e  $\text{CO}_2$ , a desidrogenase isocítrica é estimulada por moduladores positivos ADP e NAD. O  $\alpha$ -cetogluturato sofre a atuação da enzima desidrogenase isocítrica formando o succinil CoA e  $\text{CO}_2$ . O succinil-CoA, um tioester succínico de alta energia, perde seu grupo CoA pela reação de energia com a guanosina difosfato (GDP) e fosfato. A enzima envolvida nesta reação é a tioquinase succínica que produz a formação de ligação de fosfato rica de energia do GTP, a partir de GDP e Pi, derivado do tioester rica de energia do succinil-CoA. O GTP formado nessa reação pode doar seu grupo fosfato terminal ao ADP para formar o ATP, pela ação da nucleosídeo difosfatase. A formação de ATP acoplado à deacilação do succinil-CoA é muitas vezes chamada de fosforilação ao nível de substrato. O succinato é oxidado a fumarato pela flavoproteína do fumarato para L-malato que é catalisada pela enzima fumarase. E finalmente fechando o ciclo do ácido tricarboxílico, o malato é oxidado pela desidrogenase L-málica ligada ao NAD (Chapelle, 1993), (Figura 3). Os átomos de hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) produzidos durante o ciclo tricarboxílico, por oxidação de substratos ácidos, são despojados de seus elétrons que se dirigem para a cadeia de transporte de elétrons, na extremidade da qual o oxigênio é reduzido a água. Os íons  $\text{H}^+$  remanescentes são impulsionados através da membrana bacteriana por proteínas de transporte, produzindo um pH e uma diferença eletroquímica entre o interior e a parte de fora da célula. A energia livre estocada nesse gradiente é usada para a síntese de moléculas de ATP (Caldwel, 1995).

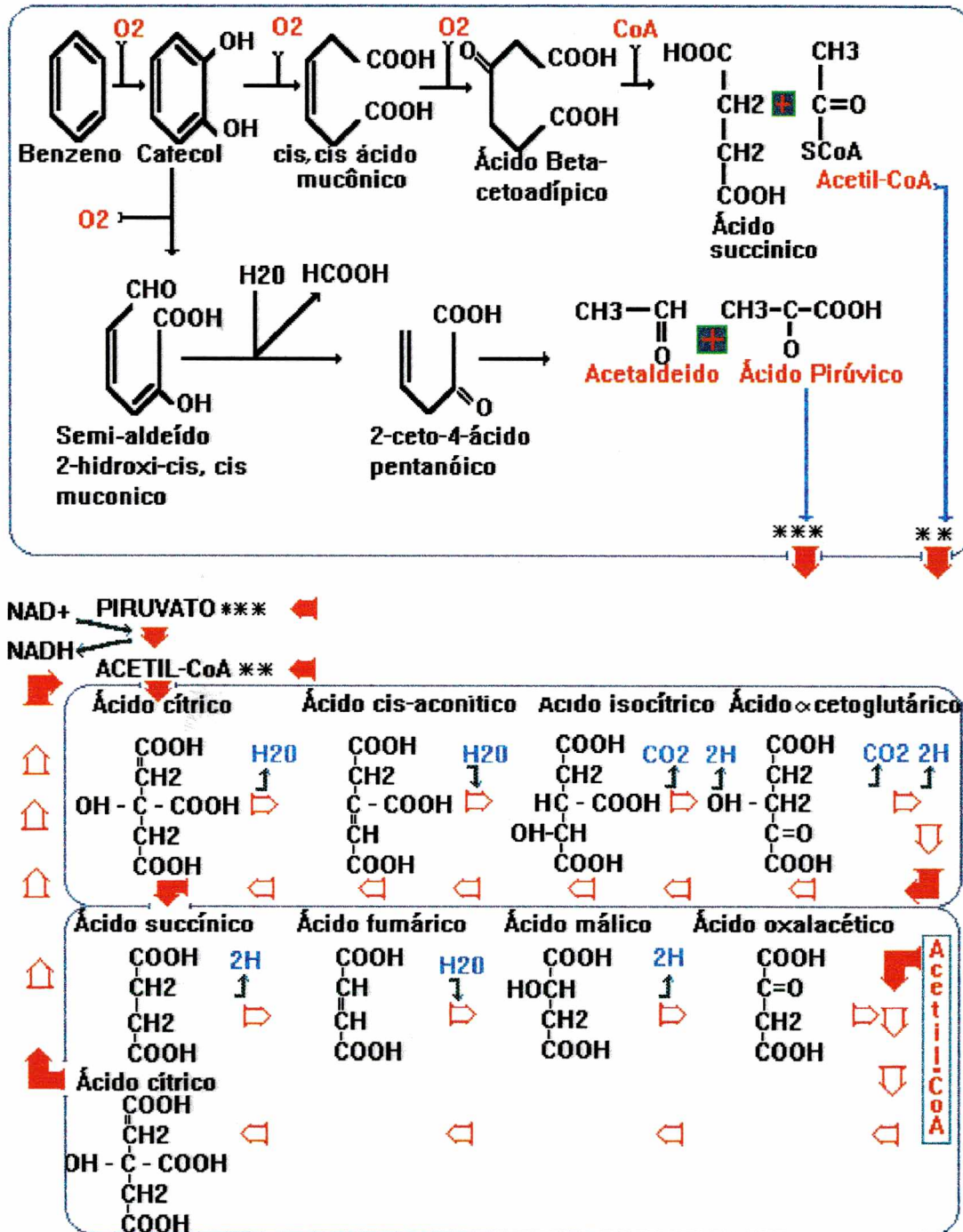


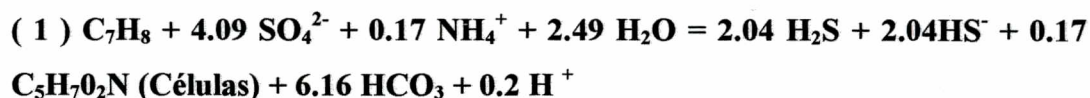
Figura 3 - Modelo simplificado da biodegradação do anel benzênico via ciclo tricarboxílico através de *meta* ou *orto* clivagem (Atlas and Bartha, 1987; Baggi et al, 1987; Chapelle, 1993).



## 2.6 Biodegradação anaeróbia

O metabolismo microbiano de compostos aromáticos em condições anaeróbias que envolvem condições denitrificantes, metanogênicas e redução de sulfato são fundamentalmente diferentes de condições aeróbias de biodegradação (Zeyer et al, 1986). Em ambientes anaeróbios os microrganismos são capazes de produzir enzimas especiais para degradarem os mais diversos tipos de substratos, bem como sintetizar o material essencial para sua manutenção e sobrevivência. Cada espécie tem seu papel dentro do processo da digestão anaeróbia e, em conjunto, as espécies bacterianas podem atuar de forma simbiótica, a fim de produzirem energia e matéria prima para a biossíntese, o metabolismo celular e conseqüentemente degradar compostos orgânicos. No processo anaeróbio, a oxidação do composto orgânico ocorre na ausência de oxigênio, porém na presença de cadeias transportadoras de elétrons específicos para cada microrganismo, com diferentes receptores finais de elétrons, tais como nitrato, sulfato, dióxido de carbono entre outros. Muitos estudos provaram que diferentes aceptores de elétrons podem ser usados na biodegradação de compostos monoaromáticos (Edwards et al, 1992; Alvarez e Vogel, 1995). Em condições anaeróbias compostos como fenóis, catecóis e ácidos halogenados podem ser degradados (Suflita et al, 1982). As condições empregadas pelos microrganismos em seus passos metabólicos são determinadas pelos tipos de reações disponíveis e pelas condições de crescimento destes. Comprovações práticas sobre a degradação anaeróbia do anel benzênico tendo conseqüentemente como derivados fenóis, ciclohexanos, ácido propanóico, dióxido de carbono e água na presença de enxofre e ferro são apresentadas nas reações abaixo. Os compostos hidrocarbonetos monoaromáticos e halogenados podem, portanto, ser degradados tanto de forma aeróbia como anaeróbia. A biodegradação anaeróbia de compostos halogenados está diretamente influenciada pela presença de outros aceptores de elétrons como íons de ferro e sulfeto (Edwards e Grbic-Galic, 1994). A adição de ácidos orgânicos ou alcóois como doadores de elétrons pode estimular a transformação redutiva de contaminantes haloaromáticos (Duetz et al, 1994).

Reação biótica com Tolueno envolvendo enxofre com crescimento celular



$(\Delta G^0) = -3,174 \text{ kJ/reacção}$  (Sem crescimento celular e com formação de magnetita)

(Adaptado de Beller et al, 1992)

## 2.7 Biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos

As tecnologias como conjunto de conhecimento científico para tratar áreas contaminadas envolvem vários processos físico-químicos que otimizam as transformações de um contaminante. Entre eles a adsorção em carvão ativado, torre de aeração, oxidação química e degradação biológica que são usados para remover contaminantes orgânicos de águas subterrâneas e de sistemas de solo subsuperficial (Corseuil, 1994b). Estes processos podem ser implementados para controlar o movimento de plumas (contaminantes), tratar águas subterrâneas e/ou descontaminar solos em zonas saturadas e não saturadas hipoteticamente representado na figura 4. A forma usada para a descontaminação de aquíferos envolve tecnologias que recalcam a água subterrânea para a superfície ou tratam a contaminação no local. Longos períodos de tempo e altos custos estão normalmente associados com esquemas de bombear e tratar águas subterrâneas para remediação de áreas contaminadas. As desvantagens destas tecnologias estão ligadas à grande quantidade de água subterrânea que deve ser removida para ser processada (Bauer e Capone, 1988). Em comparação as demais tecnologias de tratamento, a biorremediação no local, é economicamente mais viável que os demais, porém muitas vezes limitada pelas dificuldades

no transporte de nutrientes ou receptores de elétrons, no controle das condições para aclimatação e degradação dos contaminantes em sistemas subsuperficiais (Corseuil, 1994a).

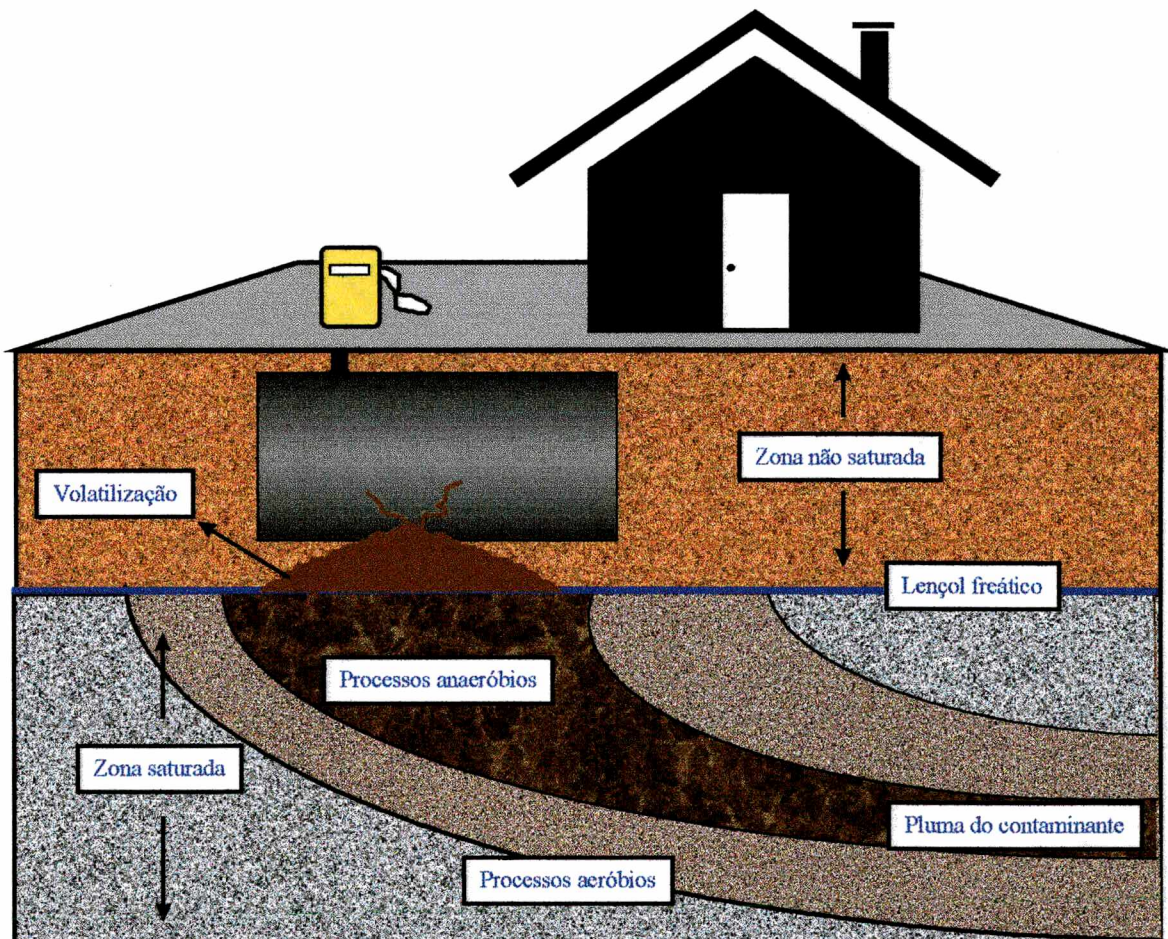


Figura 4 - Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina.

Em uma comunidade bacteriana, o fluxo de energia depende diretamente de fatores abióticos, da capacidade de biodegradarem compostos químicos, e do conhecimento das relações dose-resposta existente entre as concentrações dos contaminantes químicos e dos organismos envolvidos neste processo. Pouco se sabe sobre a relação de concentrações de nutrientes e a capacidade metabólica bacteriana em degradar hidrocarbonetos

monoaromáticos. Os compostos químicos tóxicos presentes no meio aquático geralmente são dependentes de equilíbrio químico e em alguns casos, podem estimular a produção de enzimas específicas por bactérias que por conseqüência podem aumentar a biodegradação dos compostos BTX (Kazumi et al, 1995).

No complexo ambiente subsuperficial, as bactérias representam o grupo microbiano mais abundante capaz de utilizar hidrocarbonetos aromáticos (Atlas e Bartha, 1987). Estes microrganismos tem uma grande diversidade metabólica e portanto tem um papel importante na degradação inicial de hidrocarbonetos. Os gêneros mais comumente isolados de locais contaminados são *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Micrococcus* e *Mycobacterium*. Bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem uma ampla capacidade de degradar benzeno, tolueno, etilbenzeno, benzoato, p-hidroxibenzoato, clorobenzeno, p-diclorobenzeno, fenol, sacilato, e naftaleno (Atlas e Bartha, 1987; Sikkema et al, 1995). A biodegradação sendo um mecanismo natural de remediação, pode rapidamente mineralizar o benzeno em ambientes aeróbios (Ramadan et al, 1990). Sob estas mesmas condições além do benzeno, o tolueno, o *orto*, *para* e *meta*-xileno também podem ser biotransformados (Gibson e Subramanian, 1984). Para mineralizar ou crescer em um substrato de pouca solubilidade em água, os microrganismos precisam sofrer algumas adaptações fisiológicas (Stucki e Alexander, 1987). As bactérias aeróbias iniciam a oxidação dos hidrocarbonetos aromáticos incorporando dois átomos de oxigênio molecular no anel aromático para formar um dihidrodiol com uma configuração *cis*. A continuação da oxidação dos *cis*-dihidrodiols leva a formação de catecóis que são substratos para as enzimas que catalisam a fissão do núcleo aromático via caminho *orto* ou *meta* (Renganathan e Johnston, 1989).

## 2.8 Fatores que afetam a biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos

Apesar da descoberta de que os hidrocarbonetos possam ser degradados rapidamente em condições aeróbias, alguns estudos mostram que os BTX persistem em sistemas subsuperficiais por longos períodos, mesmo após a adição de nutrientes e oxigênio (Barker et al., 1987; Aelion, 1987; Anderson, 1995). A completa mineralização dos hidrocarbonetos monoaromáticos em aquíferos arenosos ocorreu somente após 434 dias, sendo que o benzeno foi o contaminante com maior persistência (Barker et al., 1987). Experimentos em microcosmos com solos contaminados com combustível de aviação revelaram que benzeno e tolueno não foram degradados em um período de seis meses em presença de oxigênio (Aelion e Bradley, 1991). Possíveis explicações para estas observações foram a preferencial utilização de fontes de carbono mais facilmente disponíveis aos microrganismos e a toxicidade devido aos altos níveis de contaminação. Determinadas condições como a alta concentração de contaminantes podem limitar o desenvolvimento de microrganismos e conseqüentemente suas produções enzimáticas, podendo inviabilizar a biodegradação dos compostos contaminantes. Embora as características físicas e químicas dos contaminantes possam facilitar a biotransformação, as condições ambientais influenciam na atuação dos microrganismos (Spain e Veld, 1983).

Entre outros fatores que inibem a biodegradação, estão as características do solo. Análises do solo são da maior importância para se detectar problemas de deficiência ou toxidez de macro e micronutrientes. As análises químicas podem determiná-las permitindo a sua diminuição ou complementação de nutrientes para um melhor desenvolvimento de microrganismos. Entre nutrientes usados com maior frequência estão a amônia ( $\text{NH}_4$ ), nitrato ( $\text{NO}_3$ ), sódio (Na) e o potássio (K). A presença de íons de metais de magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) em soluções nutritivas tem aumentado a sobrevivência de bactérias *Pseudomonas putida* na presença de tolueno (Karlson e Frankenberger, 1989). A

disponibilidade de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P), deve encontrar-se em condições proporcionais de 250: 10: 3 (C: N: P), considerada ótima para a biodegradação. Entretanto, em condições proporcionais de 100: 10: 2 (C: N: P), tem permitido a biodegradação de contaminantes. Por outro lado concentrações altas de nutrientes podem inibir o processo. Por exemplo: Se o *Fe* e *Mn* são encontrados em altas concentrações ou em níveis tóxicos determinados por análise química, há necessidade de correção do solo ou do substrato a ser utilizado aumentando-se o *pH* para provocar insolubilização desses elementos. Dependendo do meio e do processo de biodegradação o *pH* ótimo pode variar devendo ser determinado experimentalmente. Outro fator importante é que esta medição possibilita avaliar a atividade de elétrons no meio, permitindo saber em que grau de redução está submetido o substrato. A presença de uma outra fonte de carbono poderia estimular a degradação dos compostos BTX através da indução de enzimas catabólicas (Alvarez e Vogel, 1991), ou poderia inibir a degradação destes contaminantes por causa de toxicidade, repressão catabólica ou depleção de receptores de elétrons. Por exemplo, a degradação de benzeno por uma população microbiana mista em um efluente de refinaria foi inibida pela presença de fenol (Meyer et al., 1981). No entanto, em estudos realizados por Bollag e Liu (1985), a degradação de fenóis foi aumentada pela presença de substratos facilmente degradáveis como os aminoácidos.

## **2.9 Influência do etanol na biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos**

No Brasil em derramamentos acidentais, o álcool hidratado (~ 95%) presente na proporção de 22% na gasolina brasileira, pode afetar a biodegradação dos BTX em águas subterrâneas. As interações entre o etanol e os compostos BTX podem causar um comportamento completamente diferente no deslocamento da pluma em relação a outros derramamentos acidentais observados em outros países onde não existe adição de etanol na gasolina. Entre as possibilidades que podem afetar o comportamento dos hidrocarbonetos

monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno em sistemas subsuperficiais na presença de etanol estão o aumento da mobilidade e da solubilidade destes compostos na água subterrânea e a diminuição da biodegradação natural por microrganismos, resultando no aumento da persistência destes compostos na água subterrânea (Butler et al, 1992).

O etanol é completamente miscível em água. Deste modo, a sua concentração deverá ser maior que a dos compostos BTX em águas subterrâneas contaminadas com misturas de etanol e gasolina. Compostos altamente solúveis tem um menor potencial de adsorção, neste caso, o etanol terá uma mobilidade maior que a dos compostos BTX na água subterrânea (Santos e Corseuil, 1995). O etanol quando presente em altas concentrações poderia também diminuir o retardo causado pela adsorção no solo, do benzeno, tolueno e *orto*-xileno em águas subterrâneas. O etanol pode também ser biodegradado em preferência aos BTX e consumir todo o oxigênio necessário para a degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos. Além disso, o etanol em alta concentração, pode ser tóxico ou inibitório para os microrganismos degradadores de BTX. Alguns compostos químicos alteram microecossistemas forçando populações microbianas a se adaptarem às novas condições estabelecidas, provocando mudanças que estimulam a produção de novas enzimas capazes de degradar os novos compostos.

Um exemplo clássico de indução de enzimas é a repressão catabólica causada pela presença de mais de um substrato. Estudos realizados por Monod appud Caldwell (1995) com *E. coli* e sua habilidade em degradar glicose e lactose, revelaram que estes microrganismos degradavam primeiramente glicose e posteriormente a lactose independente de um suporte nutricional. Para que ocorresse a biodegradação da lactose havia a necessidade da formação de algumas proteínas essenciais durante a biodegradação da lactose. O crescimento a *E. coli* no meio contendo glicose com posterior transferência para outro meio de cultivo contendo o mesmo substrato ocorria imediatamente após a transferência. O mesmo ocorria quando bactérias crescidas no meio contendo glicose e lactose eram transferidas para um meio contendo glicose. Entretanto, quando as células bacterianas cultivadas em glicose eram transferidas para o meio de cultura contendo lactose,

observava-se um período estacionário no crescimento celular. E finalmente quando se estudava a biodegradação em um meio contendo glicose e lactose observou-se que os microrganismos somente degradaram lactose após o término da glicose (Figura 4). Este estudo serviu para se entender melhor o processo de indução e repressão catabólica onde o metabolismo da glicose atua como controlador do metabolismo da lactose através da alteração na concentração de Adenosina Trifosfato (ATP), adenosina Difosfato (ADP), e do ciclo da Adenosina monofosfato (AMP), importante regulador do fenômeno da repressão catabólica (Caldwel, 1995).

O metabolismo de lactose da *E. coli* esclarece o sistema de regulação transcricional de genes procarióticos. São necessárias duas enzimas para o metabolismo de lactose nesse organismo: galactosídiopermease, responsável pelo transporte de lactose para dentro da célula bem como sua concentração, e a betagalactosidase, que catalisa a hidrólise de lactose em galactose e glicose. A *E. coli* do tipo selvagem produz estas enzimas e uma terceira enzima, a tiogalactosídeo-transacetilase, em quantidades muito pequenas, cerca de dez moléculas por células, na ausência de lactose. Quando em contato com lactose, a taxa de síntese destas enzimas aumenta até 1000 vezes. Pode se dizer que o tipo selvagem foi induzido a sintetizar as enzimas que funcionam no metabolismo da lactose, quando o substrato das enzimas ou a atividade enzimática estiver presente. Após alguma incerteza inicial sobre se foi a síntese de enzima ou a atividade enzimática que foi afetada pela lactose, tornou-se evidente que a presença de lactose realmente induzia a síntese de enzimas, na linhagem indutível. A lactose, o substrato, agiu neste caso como um indutor enzimático (Chapelle, 1993). As enzimas cuja produção é aumentada quando está presente um substrato, podem ser designadas como enzimas indutíveis (Hollaender et al, 1982). No cromossomo da *E. coli* estão incluídos 3 genes: *y*, *z* e *a*, referentes a betagalactosidase, galactosídeo-permease e tiogalactosídeo-transacetilase respectivamente encontrando-se em contiguidade e regulados juntos. O sistema genético que regula este complexo enzimático é chamado de operon. A informação genética desses três genes é transcrita em uma única molécula de mRNA que é subsequenteiramente traduzida em cadeias polipeptídicas das três



enzimas citadas acima. Os três genes juntos com os sítios promotor e operador formam o lac operon. A base da regulação da síntese das três enzimas reside em um outro sítio, o regulador, e na interação de seu produto proteico com a lactose e com o sítio operador. O sítio regulador produz uma proteína repressora com 360 aminoácidos. Na ausência da lactose, a proteína repressora se liga ao operador tipo selvagem, impedindo assim a ligação da RNA-polimerase ao promotor, não havendo portanto a transcrição dos três genes. Mas a lactose, caso presente liga-se ao repressor e altera sua forma, impedindo-o de se ligar ao operador. O resultado é que os três genes são transcritos. A lactose, substrato para a betagalactosidase e galactosídeo-permease, age portanto como um indutor do operon. Entretanto, outras linhagens do bacilo *E. coli*, derivadas por mutações a partir do tipo selvagem indutível, produzem enzimas continuamente, esteja ou não presente a lactose. A ativação do operon da lactose requer ainda moléculas de proteínas receptoras de catabólitos (CRP). No caso da presença da glicose, ocorre a interferência do ciclo adenosina-monofosfato (cAMP) o que resulta em um bloqueio da formação do complexo do cAMP-CRP bloqueando a transcrição do operon lac (Warth, 1991).

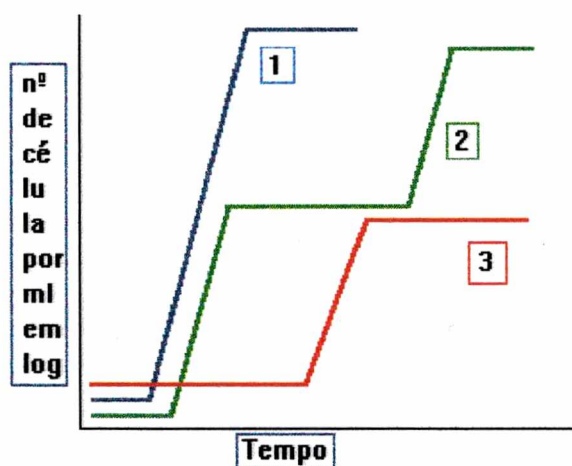


Figura 5 - Repressão catabólica do crescimento celular de *E. coli* em meios de cultura contendo glicose e lactose. (1) Bactérias crescidas em lactose e transferidas para um meio contendo uma mistura de glicose e lactose, (2) Bactérias crescidas em um meio contendo glicose e transferidas para um meio contendo glicose e lactose, (3) Bactérias crescidas em um meio contendo glicose e transferidas para outro meio contendo somente lactose.

No caso em estudo, ou seja, o efeito da presença do etanol na biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos em sistemas subsuperficiais, a repressão catabólica pode ser um dos mecanismos que poderiam afetar a transformação dos BTX. A indução permite que os microrganismos sintetizem enzimas degradativas específicas em presença de um determinado substrato. No entanto, a simples disponibilidade de um substrato não significa que a sua utilização seja do interesse dos microrganismos. A presença de repressão catabólica em populações microbianas é de grande importância para definir as estratégias de biorremediação. Embora muitas vezes seja importante estimular o crescimento de populações naturais para facilitar a degradação, sendo importante que não se adicione nutrientes que possam reprimir a degradação microbiana (Chapelle, 1993).

No caso da gasolina brasileira, por ser um problema específico, não existem estudos que relacionem o impacto do etanol na biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos. Entretanto, estudos com metanol associado aos compostos benzeno, tolueno e xileno indicam que a persistência destes compostos no meio aquífero é aumentada devido a alta concentração de metanol no meio e remoção do oxigênio (Kelley e Cerniglia, 1991).

## CAPÍTULO III

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Equipamentos

Os trabalhos em laboratório foram desenvolvidos com os seguintes equipamentos:

- Estufa bacteriológica operando com temperatura de 20 °C
- Balança marca Metter PC 4000
- Capela de fluxo laminar
- Cromatógrafo a gás - Modelo 2440D Marca Varian
- Coluna de aço inox de 2 metros de comprimento x 118” 5% SP-1200 + 1,75 de bentona 34 em Chromosorb W-HP 100/80 mesh para leitura dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos
- Coluna em aço inox 2 metros x 118” Porapak Q 100/80 mesh para a leitura do etanol
- Cilindro de gases - White Martins. Gases utilizados: nitrogênio, ar sintético, hidrogênio.
- Lacs de alumínio
- Tampas de borracha (20 mm de diâmetro)
- Septos de borracha (0,8 ml de diâmetro)
- Autoclave
- Soluções padrão preparadas com diversas concentrações de benzeno, tolueno, *orto*-xileno e etanol

#### 3.2 Vidrarias

Neste estudo foram utilizadas as seguintes vidrarias:

- Frascos de penicilina com capacidade para 100 ml
- Pipetas volumétricas de 20 e 50 ml
- Pipetas coulométricas de 50 ml
- Balões de fundo chato “pyrex” com capacidade de 250 ml e 500 ml.
- Erlenmeyers
- Funís de vidro “pyrex”

### 3.3 Outros materiais

- Seringas Hamilton (10 e 100 ul)
- Alicates de pressão

### 3.4 Componentes para os experimentos (microcosmos):

- Material do aquífero de Jurerê (20 gramas de solo/frasco)
- Solução de nutrientes (and Corseuil, 1992)

Sais	Concentração (mg/l)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200.00
CaCl <sub>2</sub>	100.00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.05
NaMoO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	43.60
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22.90
KNO <sub>3</sub>	50.00
Azida de Sódio (Controle abiótico)	1.000

- Compostos químicos (P. A.), Fonte: MERCK.

As estruturas moleculares dos compostos em estudo estão representados no figura 1.

No quadro I, abaixo, são apresentadas algumas propriedades químicas dos mesmos.

Quadro I. Critérios internacionais de qualidade da água com relação derramamentos de hidrocarbonetos monoaromáticos

AGÊNCIA	BENZENO						TOLUENO						XILENO								
	Categoria	valor (ppb)	Limite	P. E.	P. F.	D	S	Categoria	Valor (ppb)	Limite	P. E.	P. F.	D	S	Categoria	Valor (ppb)	Limite	P. E.	P. F.	D	S
CCME	Potabilidade	5	MAC	80 °C	5,5°C	0,874	1791	Potabilidade	24	AO	111°C	-95 °C	0,881	534,8	Potabilidade	300	AO	142 °C	-25 °C	0,89	175
	Ambiente	-	-	-	-	-	-	Ambiente	-	AWQC	-	-	-	-	Ambiente	-	-	-	-	-	-
CETESB	Potabilidade	10	AWQC	-	-	-	-	Potabilidade	-	-	-	-	-	-	Potabilidade	-	-	-	-	-	-
	Ambiente	10-	H-	-	-	-	-	Ambiente	-	-	-	-	-	-	Ambiente	-	-	-	-	-	-
ECC	Potabilidade	-	-	-	-	-	-	Potabilidade	-	-	-	-	-	-	Potabilidade	-	-	-	-	-	-
	Ambiente	-	-	-	-	-	-	Potabilidade	-	-	-	-	-	-	Ambiente	-	-	-	-	-	-
EPA	Potabilidade	5	MCL	-	-	-	-	Potabilidade	1000	MCL	-	-	-	-	Potabilidade	10000	MCL	-	-	-	-
	Ambiente	0,66	AWQC	-	-	-	-	Ambiente	14300	MCLG	-	-	-	-	Ambiente	-	-	-	-	-	-
OMS	Potabilidade	10	VP	-	-	-	-	Potabilidade	10	VP	-	-	-	-	Potabilidade	-	-	-	-	-	-
	Ambiente	-	-	-	-	-	-	Ambiente	-	-	-	-	-	-	Ambiente	-	-	-	-	-	-
H&W	Potabilidade	5	MAC	-	-	-	-	Potabilidade	24	AO	-	-	-	-	Potabilidade	300	AO	-	-	-	-
	Ambiente	-	-	-	-	-	-	Ambiente	24	AO	-	-	-	-	Ambiente	-	-	-	-	-	-

Fonte: Guiguer, N. 1996.

**NOTA**

CME - Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente  
 CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo  
 EPA - Agência de Proteção Ambiental - EUA  
 OMS - Organização Mundial da Saúde  
 H & W - Saúde e Bem-estar (Canadá)

EEC - Comunidade Econômica Européia  
 MAC - Concentração Máxima Aceitável (Canadá)  
 AWQC - Padrões de Qualidade da Água Ambiente (EPA)  
 MCL - Nível Máximo do Contaminante (EPA)  
 AO - Objetivos Estéticos (Canadá)  
 VP - Valores Padrão

H - Limites de Saúde  
 P.E. - Ponto de Ebulição  
 P.F. - Ponto de Fusão  
 D - Densidade (Kg)  
 S - Solubilidade

### 3.5 Métodos

O solo usado neste trabalho foi obtido de aquífero arenoso da localidade de Jurerê, parte norte da Ilha de Santa Catarina, a uma profundidade de aproximadamente 2 metros, nível do lençol freático, acondicionado em geladeira a 8°C. A análise físico-química revelou um conteúdo de 0,24% de matéria orgânica por peso seco da areia, pH 5,19; fósforo total 0,26 mg/l, nitrogênio total 16 ppm e amônia 11 ppm.

A escolha em se trabalhar com os compostos hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno e *orto*-xileno presentes na gasolina brasileira, foi devido ao perigo que estes compostos representam à saúde humana e ao meio ambiente. O benzeno (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), tolueno (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>) e o *orto*-xileno (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>), compostos pouco solúveis em água, e somados ao etanol, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH), provavelmente podem provocar um diferente comportamento em águas subterrâneas. Para evitar-se a contaminação e a interferência nos experimentos por outros compostos presentes na gasolina, utilizou-se compostos puros P.A. (Para Análise).

Para o estudo da biodegradação dos compostos monoaromáticos benzeno, tolueno, *orto*-xileno e etanol em subsolo arenoso, dividiu-se o trabalho em 3 etapas. Na primeira, utilizou-se os compostos monoaromáticos isolados e associados entre eles com concentrações de 20 e 60 mg/l sem a presença de etanol; na segunda, os compostos hidrocarbonetos com concentração de 20 mg/l foram associados às concentrações de 20 e 100 mg/l de etanol; e finalmente na terceira, os compostos BTX com concentrações de 20 mg/l foram associados às concentrações de 300 mg/l de etanol para que houvesse limitações de oxigênio nos microcosmos (Quadro II).

Quadro II. Associações de concentrações em mg/l de etanol com compostos hidrocarbonetos monoaromáticos

	Etanol			
	0	20	100	300
Benzeno				
20	x	x	x	x
60	x	-	-	-
Tolueno				
20	x	x	x	x
60	x	-	-	-
O-xileno				
20	x	x	x	x
60	x	-	-	-

Na montagem dos experimentos o material era homogeneizado antes de ser acondicionado nos frascos de vidro de penicilina com capacidade para 100 ml.

Definiu-se como padrão para todos os experimentos a utilização de 20 gramas de material geológico para cada microcosmo (figura 6), a concentração de 20 mg/l e 60 mg/l para os componentes aromáticos (benzeno, tolueno, *orto*-xileno) e 20, 100 e 300mg/l para o etanol. Utilizou-se 50 ml de solução de nutriente em cada experimento e 50 ml de solução de azida de sódio com concentração de 1000 mg/l empregada em um microcosmo nas mesmas condições experimentais, servindo como controle abiótico para as 3 triplicatas de cada solvente aplicado isoladamente ou associado aos outros solventes.

A vidraria e a solução de nutrientes foram esterilizadas em autoclave a 120 °C (1 atm de pressão), durante 20 minutos e em seguida realizada a secagem do material em estufa. O material geológico foi pesado e posteriormente adicionado nos frascos com o auxílio de funís, juntamente com a solução de nutrientes previamente medida em pipetas volumétricas de 50 ml. Com seringas Hamilton de 10 ul adicionou-se os valores correspondentes à concentração de 20 mg/l de cada componente hidrocarboneto monoaromático em frascos isolados e, em seguida, fechados com tampas de borracha,

lacrados sob pressão com lacres de alumínio e inoculados em uma estufa a uma temperatura constante de 20 °C.

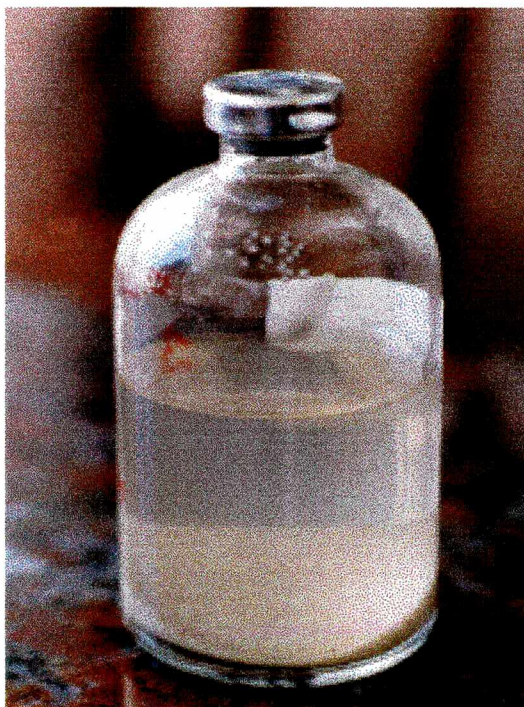


Figura 6 - microcosmo contendo 20 g de material aquífero, 50 ml de solução nutritiva e 20 mg/l de composto hidrocarboneto monoaromático.

Os experimentos foram montados em três etapas. Isoladamente: benzeno, tolueno, *orto*-xileno com concentrações de 20 mg/l, associados: benzeno, tolueno, *orto*-xileno com concentrações de 20 mg/l e 60 mg/l e benzeno, tolueno e *orto*-xileno com concentrações de 20 mg/l associados com etanol em concentrações de 20, 100 e 300 mg/l conforme quadro II.

As avaliações dos experimentos foram feitas em intervalos de 24 horas através de análises de cromatografia gasosa com injeções de 100  $\mu$ l da parte gasosa dos frascos para leitura dos solventes e 5  $\mu$ l da parte líquida para leitura do etanol. Esta metodologia foi adotada para se obter uma melhor precisão nos dados, uma vez que não foi encontrada uma coluna ideal para ler os quatro compostos juntos. A retirada das amostras dos microcosmos era feita através das tampas de borracha com o auxílio de micro-seringas Hamilton e injetadas no aparelho modelo 2440D Varian, para leitura dos solventes através da coluna de aço inox de 2 metros de comprimento x 1/8" 5% SP-1200 + 1,75 de bentona 34 em



Chromosorb W-HP 100/80 mesh e a leitura do etanol na coluna em aço inox 2 metros x 118” Porapak Q 100/80 mesh. Os dados foram obtidos pelo terminal de computador através do Hardware MQI12/8PCA, programa que proporcionou uma melhor compreensão dos gráficos alcançados.

A escolha da técnica de cromatografia gasosa foi devido à simplicidade de análise quantitativa, uma vez que é muito usada para identificação e quantificação de produtos de reação. O princípio analítico da cromatografia gasosa baseia-se no fato de que o tamanho do pico correspondente a um dado material num cromatograma é proporcional à quantidade de material injetado na coluna.

Soluções padrão com alto teor de pureza contendo diversas concentrações foram preparadas para obter-se melhor precisão dos dados. Estas soluções foram cromatografadas em condições semelhantes às amostras dos experimentos (Figura 7).

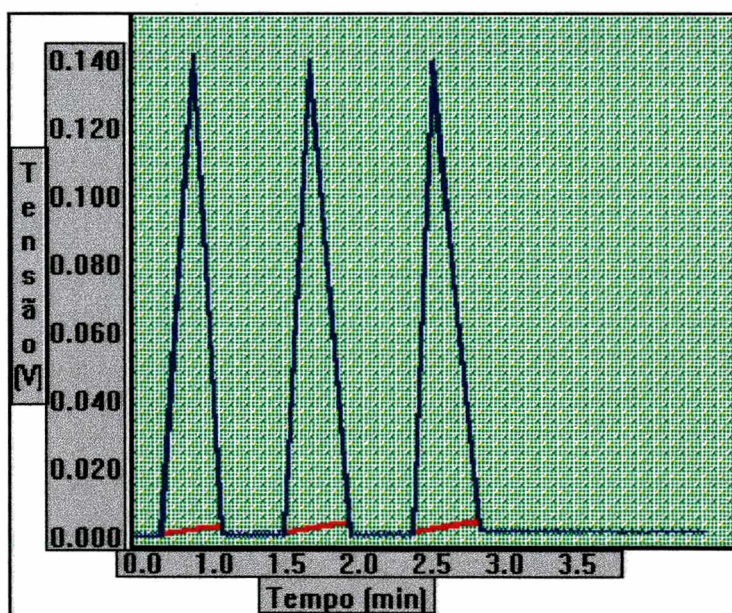


Figura 7 - Cromatograma para curva padrão do etanol.

A relação direta entre o tamanho do pico e a composição da amostra do experimento de um ou mais picos pôde então ser estabelecida. Os picos padrão obtidos

permitiram, portanto, uma melhor avaliação dos dados amostrados. Esta análise proporcionou, uma melhor determinação dos constituintes da amostra. A adição de um padrão pode auxiliar na compensação de vários erros analíticos. Nesta técnica injetou-se 3 repetições das substâncias escolhidas que produziram picos específicos referente a cada substância injetada, separando os constituintes amostrais que se desejou quantificar. A média dos dados de cada pico referente a cada substância foi utilizada como dado comparativo para se compensar todos os efeitos que possam alterar a área do pico, incluindo flutuações do volume da amostra injetada. Para calibração, as misturas foram preparadas somente com substâncias puras. Estas misturas, contendo várias relações de concentração, foram cromatografadas e a área de diversos picos foi determinada para cada componente exemplificado na Figura 8.

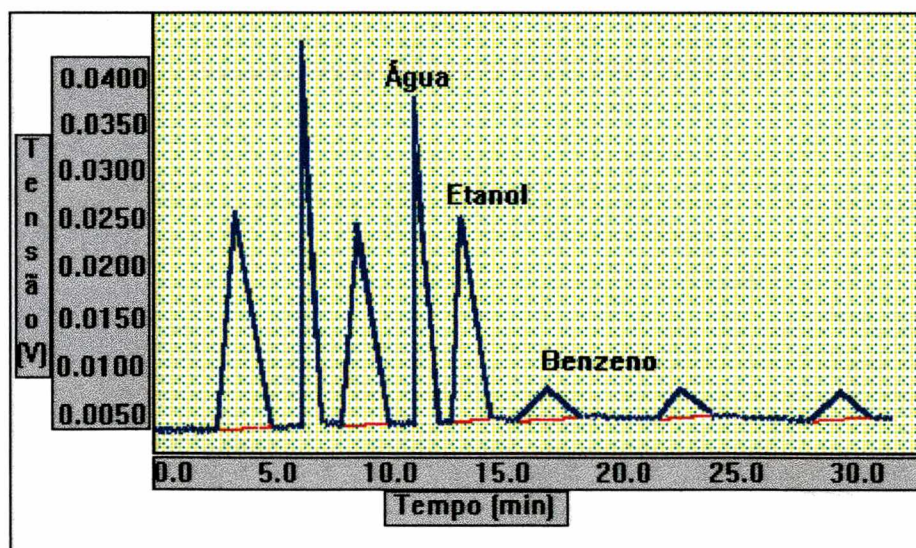


Figura 8 - Cromatograma da leitura dos compostos etanol e benzeno.

## CAPÍTULO IV

### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 Introdução

As análises químicas foram obtidas através de cromatografia gasosa. Este método físico-químico separa os constituintes da amostra particionando-os entre duas fases: uma estacionária e de grande área e a outra um fluido insolúvel que percola através da primeira. As concentrações foram obtidas através de determinação gráfica de área. Para cada substância analisada, um tempo característico de permanência na coluna é refletido na posição de registro de cada pico cromatográfico exemplificado nas figuras 7 e 8. Uma vez determinada a área dos picos, extraiu-se os valores proporcionais a cada área de pico transformando-os em miligrama/litro. Na primeira etapa do trabalho, para melhor obtenção dos dados na avaliação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos, usou-se a coluna em chromosorb SP:1200 + 1,75 de bentona 34. Nesta fase estudou-se o comportamento da biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e *orto*-xileno isolados e associados entre eles nas concentrações de 20 e 60 mg/l. Na segunda etapa, utilizou-se compostos BTX nas concentrações de 20 mg/l associados a concentrações de 20, 100 e 300 mg/l de etanol. Para que fosse possível analisar conjuntamente os compostos BTX nas concentrações de etanol utilizou-se uma coluna em aço inox 2 metros x 118” Porapak Q 100/80 mesh.

Os dados obtidos resultaram da média de três amostras, sendo que o desvio padrão não foi superior a 10% durante toda a realização deste trabalho, tanto para os experimentos como para os controles. Os desvios padrões estão apresentados nas tabelas do apêndice e

nas figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18 e 19. Nas demais figuras os desvios padrões não estão apresentados para facilitar a interpretação dos dados em vista da grande frequência de amostragem.

#### **4.2 Biodegradação aeróbia dos compostos BTX na ausência de etanol**

Os resultados experimentais na ausência de etanol e na presença de 20 mg/l de benzeno, tolueno e *orto*-xileno, avaliados em experimentos isolados, são apresentados nas figuras 8 a 10. Pode-se observar que os compostos benzeno, tolueno, e *orto*-xileno (BTX) foram degradados pela biomassa autóctone presente no material aquífero em um período inferior a 6 dias. O tolueno foi degradado mais rapidamente (tempo representado em horas para possibilitar uma melhor interpretação dos dados) seguido do benzeno e *o*-xileno (tempo representado em dias). Estes experimentos refletem a presença de uma alta população microbiana confirmada pela eficiência e afinidade biológica em degradar os BTX, caracterizados principalmente pelo experimento com o composto tolueno. Segundo Evans et al (1991a), alguns compostos químicos específicos podem freqüentemente ser biodegradados mais rapidamente que outros devido à afinidade existente entre o microrganismo no meio e o substrato incluindo-se os BTX. Os resultados dos experimentos isolados com concentrações iniciais de 60 mg/l para os compostos benzeno, tolueno e *orto* xileno isolados e na presença de oxigênio disponível nos frascos, foram avaliados em um período de 8 dias conforme figuras 12, 13 e 14. A degradação dos compostos benzeno e tolueno ocorreu imediatamente sem um período de adaptação, indicando a possibilidade de existir afinidade enzimática entre estes substratos e as enzimas produzidas pelas populações existentes nestes microcosmos. Na degradação do *o*-xileno (figura 14), ocorreu a “lag fase” antes do início de sua degradação. Este período, observado durante três dias, indicou que a população microbiana existente necessitou de um período de adaptação para iniciar a degradação do composto *o*-xileno. Este período é observado principalmente na

biodegradação de compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, onde o período de adaptação pode variar entre algumas horas e vários dias (Neff, 1979; Wiggins, et al, 1987; Bauer e Capone, 1988).

Nas figuras 15 e 16 estão apresentados os experimentos com substratos mistos, sendo os compostos benzeno, tolueno e o-xileno misturados a uma concentração inicial de 20 e 60 mg/l de cada composto. As curvas de degradação dos compostos BTX misturados nas concentrações de 20 mg/l seguiram as mesmas características dos experimentos individuais onde o tolueno foi degradado primeiro, seguido pelo benzeno e *orto*-xileno, (figura 14). Este experimento foi realizado na presença de excesso de aceptor de elétrons. No experimento apresentado na figura 16 os compostos foram degradados parcialmente em um tempo mínimo de 42 dias. A concentração de 60 mg/l do composto tolueno foi reduzida para aproximadamente 10mg/l; o benzeno e o-xileno reduzidos a aproximadamente 20 e 30 mg/l, respectivamente. A degradação parcial dos três compostos associados deve-se provavelmente à falta de aceptores de elétrons, uma vez que não havia oxigênio disponível para a completa degradação dos 180 mg/l de compostos BTX presentes nos microcosmos.

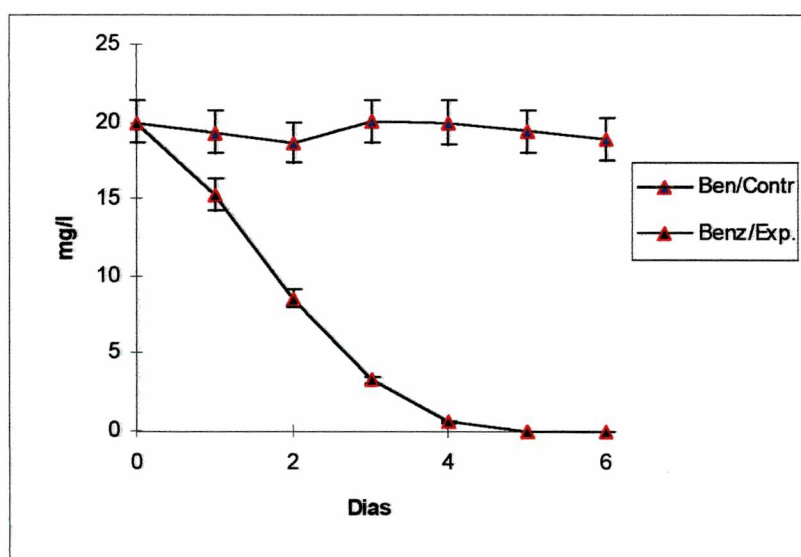


Figura 9 - Biodegradação de 20 mg/l de benzeno

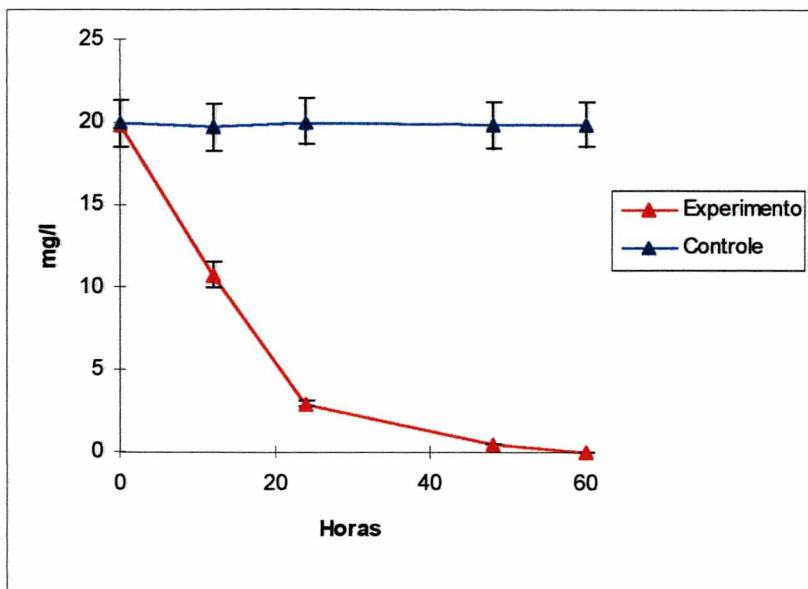
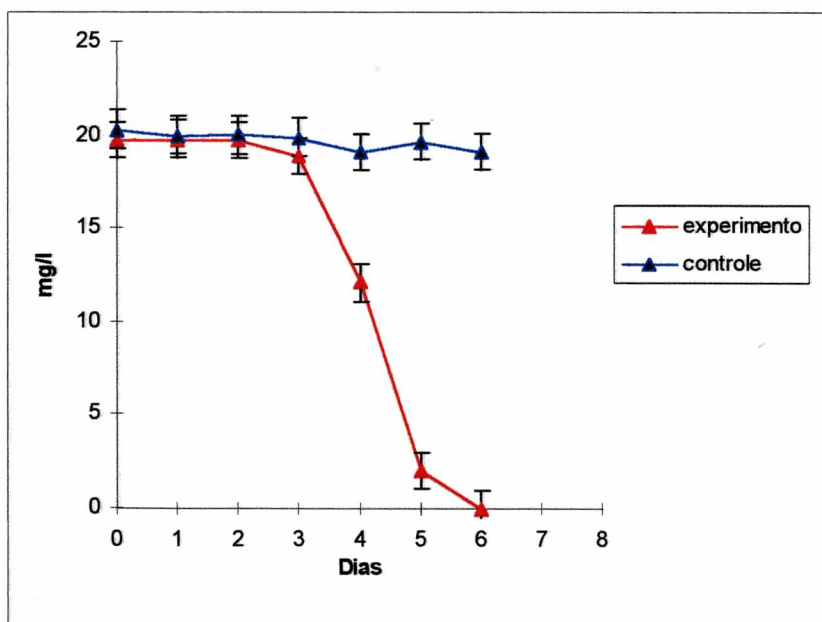


Figura 10 - Biodegradação de 20 mg/l de tolueno

Figura 11 - Biodegradação de 20 mg/l de *ortho*-xileno

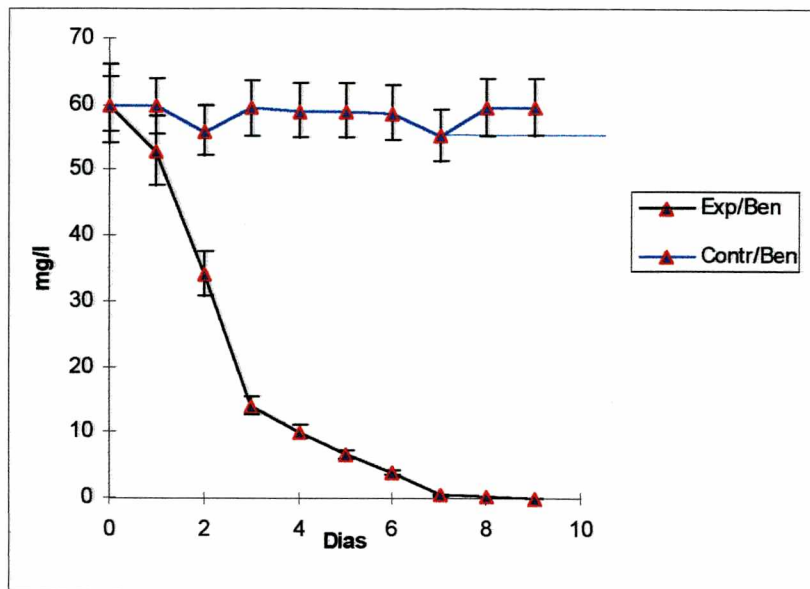


Figura 12 - Biodegradação de 60 mg/l de benzeno

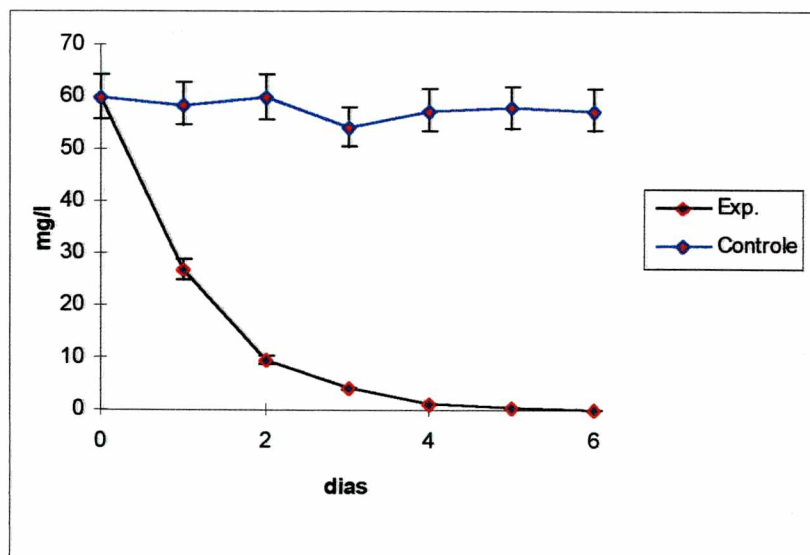


Figura 13 - Biodegradação de 60 mg/l de Tolueno

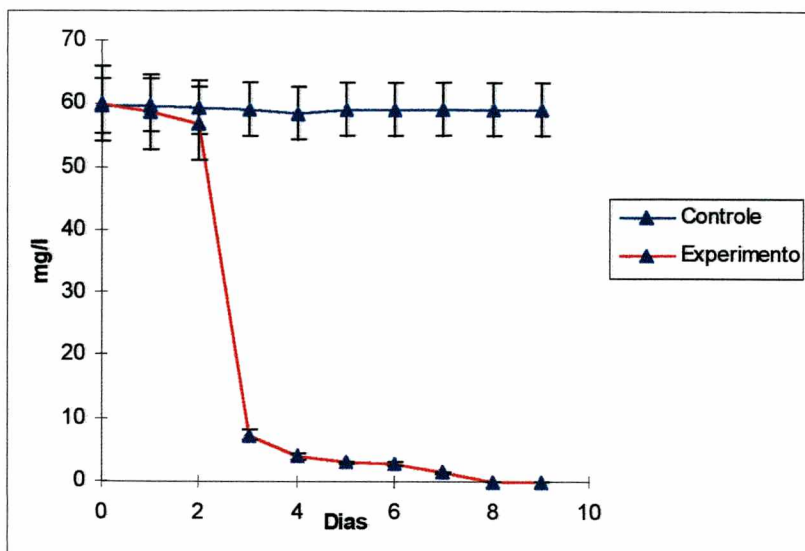


Figura 14 - Biodegradação de 60 mg/l de *orto*-xileno

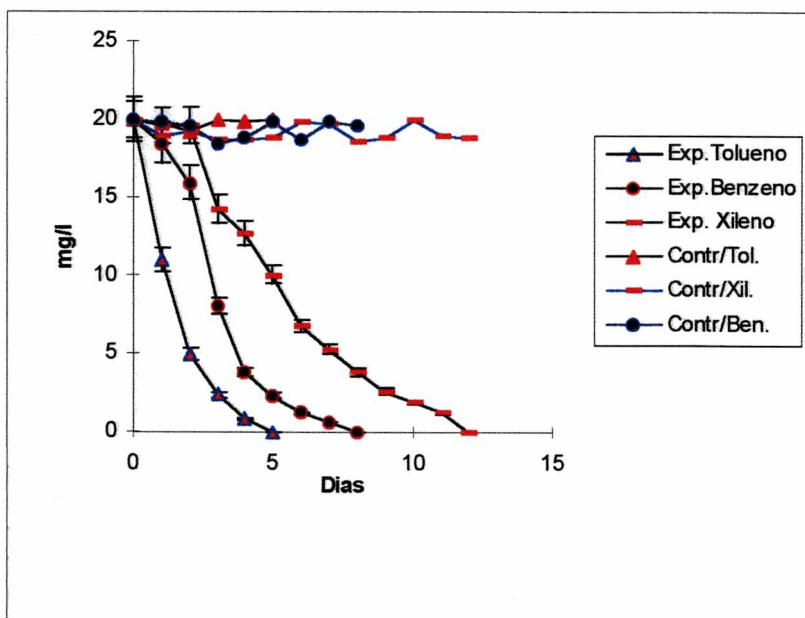


Figura 15 - Biodegradação de 20 mg/l de benzeno, tolueno e *orto*-xileno associados



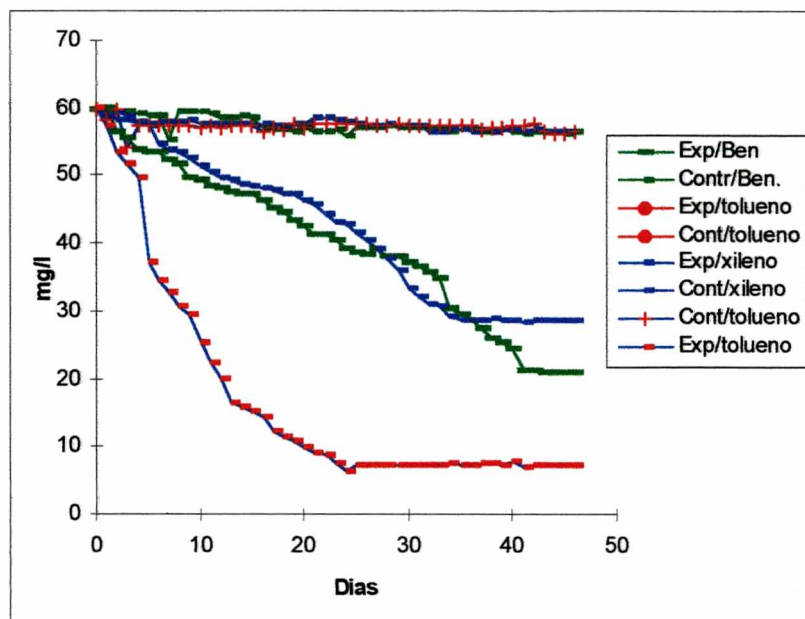


Figura 16 - Biodegradação de 60 mg/l de benzeno, tolueno e *orto*-xileno

A relação existente entre os experimentos na presença de um único substrato com os experimentos mistos está na preferência microbiana em degradar primeiro o tolueno, segundo o benzeno e terceiro o *o*-xileno. O *o*-xileno tanto nos experimentos isolados como nos experimentos associados foi o composto que mais demorou para ser completamente biodegradado. A preferência pelos compostos benzeno e tolueno sugere uma especificidade pelos dois compostos em relação ao *o*-xileno. Baggi et al (1987), observou através de estudos experimentais, que bactérias *Pseudomonas stutzeri* degradavam *o*-xileno mas eram incapazes de degradar o *m*-xileno, sendo a posição do grupo metil como um dos fatores responsáveis pela especificidade na degradação destes compostos. Nos experimentos de benzeno com concentrações de 20 mg/l isolado (figura 9), associado à presença de 20 mg/l de tolueno e 20 mg/l de *o*-xileno, totalizando 60 mg/l (figura 15), o período observado de biodegradação do benzeno mesmo sob a influência destes dois compostos, foi semelhante ao

do experimento com benzeno isolado. A mistura dos três compostos na presença suficiente de oxigênio, pode também favorecer a biodegradação do *orto*-xileno uma vez que existe a possibilidade do tolueno servir como um indutor enzimático deste composto. Bactérias do subtipo T1 eficazes na degradação de tolueno puderam degradar *o*-xileno quando este dois compostos encontravam-se juntos, entretanto, estas bactérias não degradavam o *o*-xileno quando este composto encontrava-se isolado (Hutchins, 1991). Alvarez e Vogel (1991), também constataram que o tolueno associado ao benzeno ou ao *p*-xileno favorecia a biodegradação destes e que estas interações podem ser benéficas para se entender o comportamento de degradação dos BTX no meio ambiente. Um processo que poderia estar ocorrendo quando os três compostos BTX encontram-se juntos é a indução enzimática, onde a biodegradação pode ocorrer de forma parcial envolvendo duas ou mais espécies de microrganismos. Para que este processo ocorra, uma população deve possuir enzimas capazes de degradar um determinado produto em um outro subproduto, favorecendo uma segunda população na utilização deste subproduto. Evans et al (1991b), apresentaram resultados em presença de nitrato como receptor de elétrons onde uma população microbiana que degradava o *o*-xileno era dependente da mineralização do tolueno realizada por outra população microbiana. Corseuil e Weber (1994), em experimentos semelhantes aos realizados neste trabalho, utilizando solos arenosos do norte de Michigan (EUA), concluíram que a ordem de degradação dos diferentes substratos, e o período anterior ao início da degradação era causado pelo tempo necessário para o desenvolvimento crítico das populações microbianas. Outra constatação foi que a ordem de degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos era correspondente ao número inicial de microrganismos presentes no solo capazes de degradar cada um dos substratos.

### 4.3 Biodegradação aeróbia dos compostos BTX na presença de 20 e 100 mg/l de etanol

Nesta etapa do trabalho foram avaliados os comportamentos de 20 mg/l dos compostos BTX (individualmente) na presença de etanol nas concentrações de 20, e 100 mg/l. Estas concentrações previamente calculadas foram escolhidas de modo que houvesse nos microcosmos oxigênio suficiente para a completa degradação de todos os substratos.

Nas figuras 17, 18 e 19 estão apresentados os experimentos com um único hidrocarboneto monoaromático associado a concentrações de 20 mg/l de etanol. A metabolização destes compostos ocorreu em um período máximo de 7 dias. A biodegradação ocorreu em 6 dias para o benzeno e em 7 dias para o tolueno e *orto*-xileno. O etanol foi degradado em menos de 24 horas (dados não apresentados). A fase “lag”, caracterizada como período de adaptação para os microrganismos, ocorreu em todos os experimentos com concentrações de 20 mg/l de benzeno, tolueno ou *orto*-xileno e em presença de etanol. Nos experimentos sem a adição de etanol a fase “lag” não foi observada para o benzeno e tolueno, sendo que para o *o*-xileno foi de aproximadamente 3 dias (figuras 9, 10 e 11). No experimento em presença de etanol a fase “lag” foi respectivamente para o benzeno, tolueno e *orto*-xileno de um, dois e três dias. Portanto, observou-se que a adição de 20 mg/l de etanol não alterou a biodegradação do benzeno, tolueno e *orto*-xileno. Como era de se esperar, nos controles abióticos com azida de sódio, não houve alterações nas concentrações dos compostos BTX.

Experimentos contendo um único hidrocarboneto monoaromático associado a 100 mg/l de etanol são apresentados nas figuras 19, 20 e 21. Nestas condições, mesmo com 100 mg/l de etanol, havia oxigênio suficiente para a completa degradação dos dois substratos presentes em cada microcosmo. O etanol foi degradado em 5 dias quando associado com benzeno e em 7 dias na presença de tolueno e *o*-xileno. No entanto, o completo desaparecimento de benzeno, tolueno e *o*-xileno ocorreu somente após 10, 13 e 17 dias respectivamente, melhor observado no quadro III.

Quadro III - Período de degradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos associados ao etanol

Concentração Etanol (mg/l)	Benzeno (mg/l)		Tolueno (mg/l)		<i>Orto</i> -xileno (mg/l)	
	20	60	20	60	20	60
0	6 dias	9 dias	60 horas	6 dias	6 dias	9 dias
20	7 dias	---	7 dias	---	7 dias	---
100	10 dias	---	13 dias	---	17 dias	---
300	---	---	---	---	---	---

Se comparado com os experimentos sem a presença de etanol, houve um aumento significativo no período para o completo desaparecimento dos compostos BTX em presença de 100 mg/l de etanol.

Uma característica importante que pode ser observada nestes experimentos é que os hidrocarbonetos monoaromáticos só foram degradados após o desaparecimento do etanol, pelo fato deste composto ser um substrato mais simples em relação ao benzeno, tolueno e *orto*-xileno. Se desconsiderarmos o tempo inicial da degradação do etanol, o período da completa biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e *o*-xileno foi de aproximadamente 5, 3 e 10 dias, respectivamente. Nos casos de benzeno e tolueno, os períodos para a completa biodegradação foram aproximados aos experimentos na ausência de etanol (Figuras 9 e 10). No caso do *o*-xileno o tempo para a completa biodegradação, mesmo desconsiderando o tempo para a degradação do etanol, foi superior em 4 dias.

#### 4.4 Biodegradação dos compostos BTX na presença de 300 mg/l de etanol

Ao contrário dos experimentos anteriores, a concentração de 300 mg/l de etanol foi escolhida para que houvesse limitações de receptor de elétrons (oxigênio), nos microcosmos. Deste modo, nos experimentos com um único hidrocarboneto monoaromático apresentados nas figuras 23 a 25 não havia oxigênio suficiente para a degradação de benzeno, tolueno e ou *o*-xileno associados a 300 mg/l de etanol.

Nos experimentos contendo 20 mg/l de benzeno associado com 300 mg/l de etanol (Figura 23), o etanol foi degradado em aproximadamente 12 dias, porém praticamente não houve a degradação do benzeno durante o período de incubação (35 dias). Os mesmos resultados foram obtidos para os experimentos com tolueno (figura 24) e *o*-xileno (figura 25) que apresentaram perdas devido provavelmente a volatilização ocorrido nos frascos porque houve diminuição de concentrações tanto nos controles contendo azida de sódio, quanto nos experimentos de biodegradação. Descontando-se as perdas em relação aos controles, pode-se dizer que também não houve degradação do benzeno e *o*-xileno em presença de 300 mg/l de etanol como foi observado para o tolueno.

A causa mais provável para a não degradação dos compostos BTX em presença de etanol deve-se a preferencial degradação dos microrganismos pelo etanol o que ocasionou uma demanda de oxigênio suficiente para tornar o meio anaeróbio. A comprovação deste fato foi feita em vários microcosmos através de análise de oxigênio dissolvido utilizando-se o método de Wincker. (Dados não apresentados em virtude da catástrofe ocorrida no dia 13/04/96).

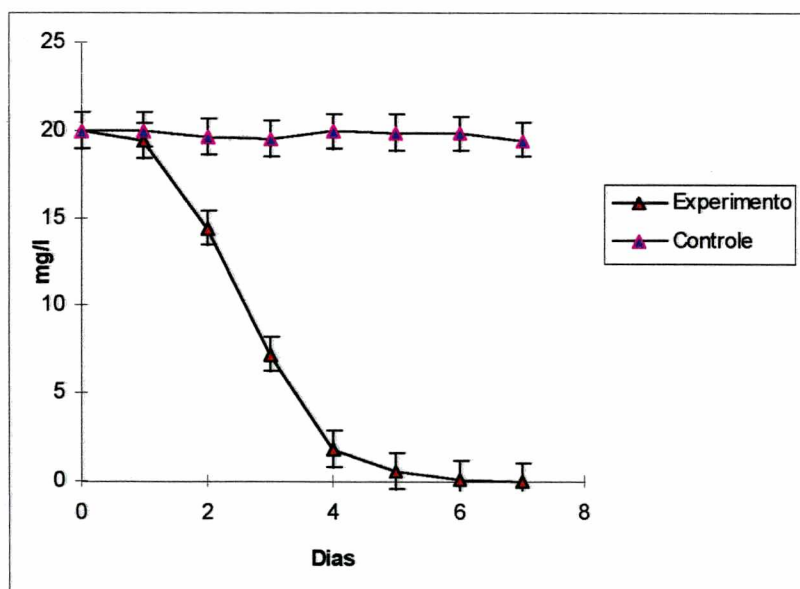


Figura 17 - Biodegradação de 20 mg/l de benzeno associado a 20 mg/l de etanol.

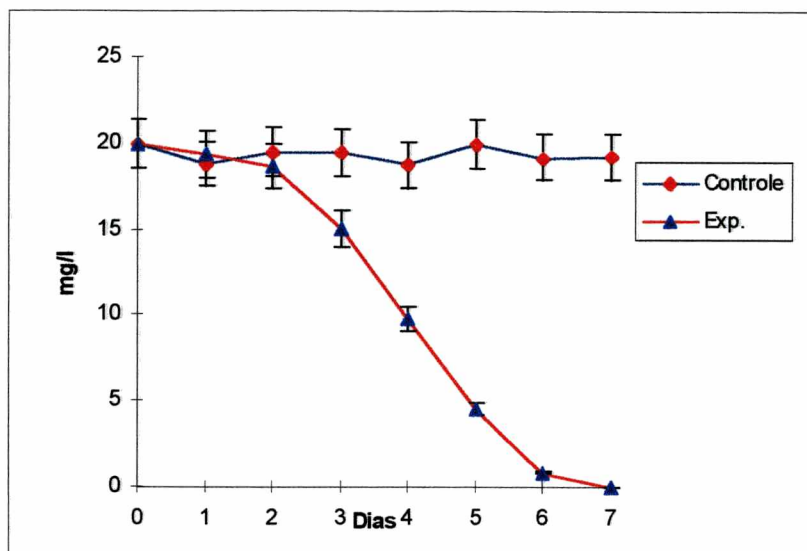


Figura 18 - Biodegradação de 20 mg/l de tolueno associado a 20 mg/l de etanol.

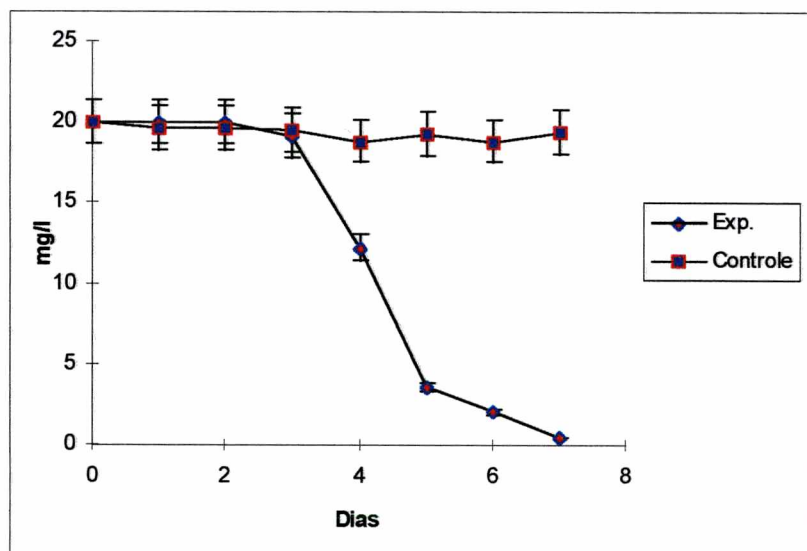


Figura 19 - Biodegradação de 20 mg/l de *orto*-xileno associado a 20 mg/l de etanol.

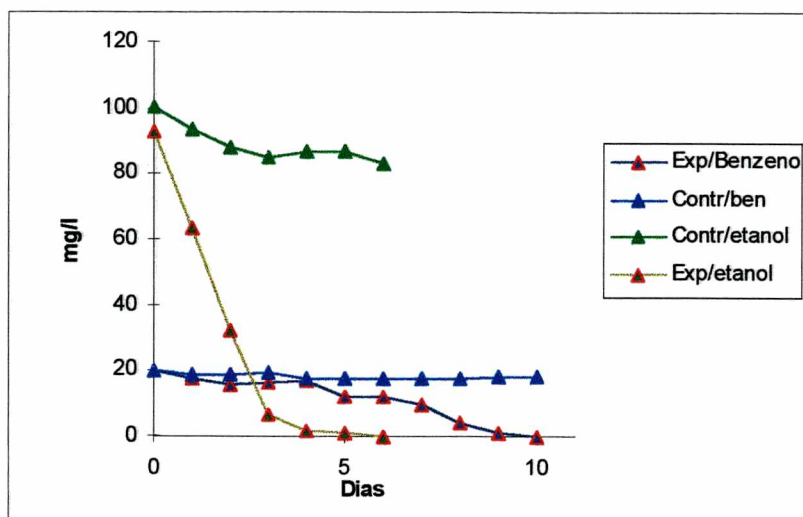


Figura 20 - Biodegradação de 20 mg/l de benzeno associado a 100 mg/l de etanol.

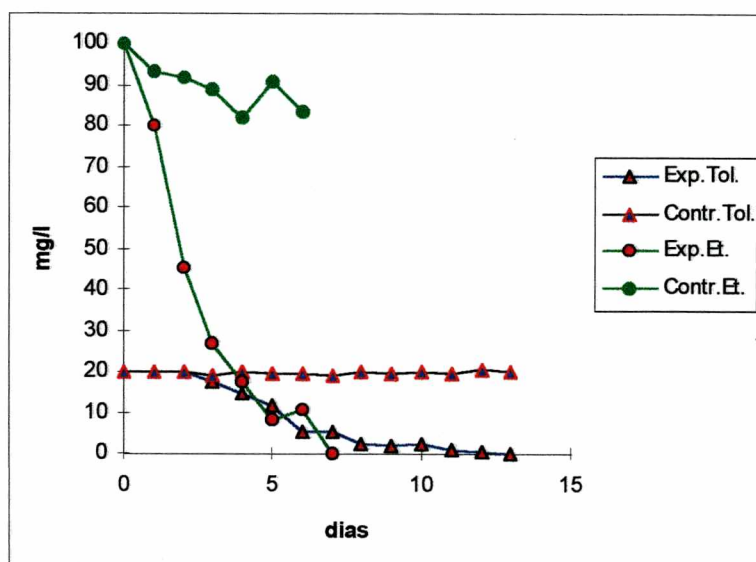


Figura 21 - Biodegradação de 20 mg/l de tolueno associado a 100 mg/l de etanol.

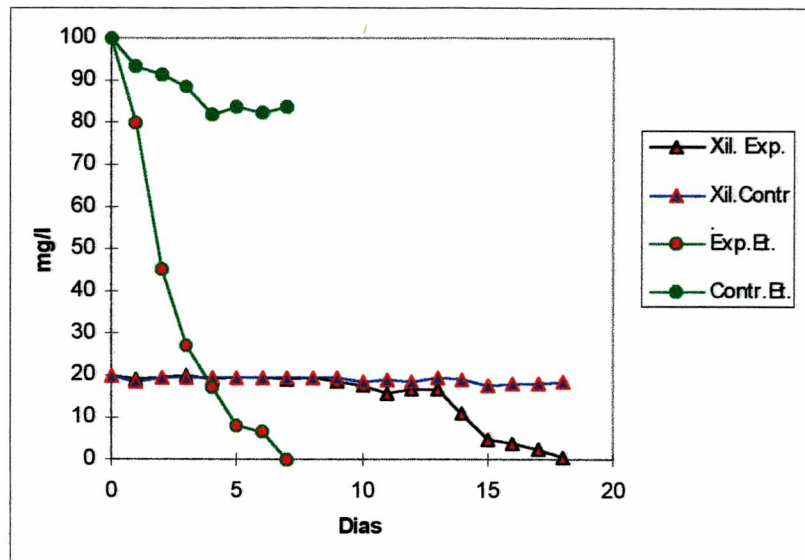


Figura 22 - Biodegradação de 20 mg/l de *orto*-xileno associado a 100 mg/l de etanol.

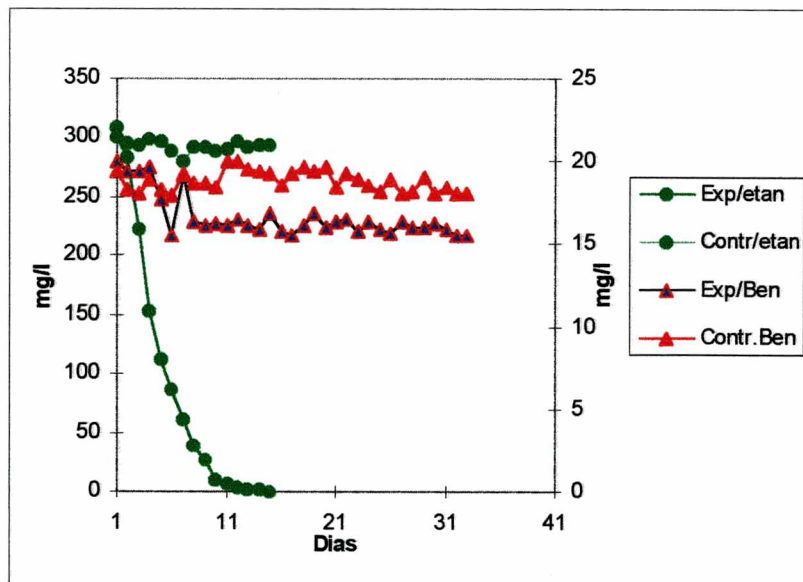


Figura 23 - Biodegradação de 20 mg/l de benzeno associado a 300 mg/l de etanol.



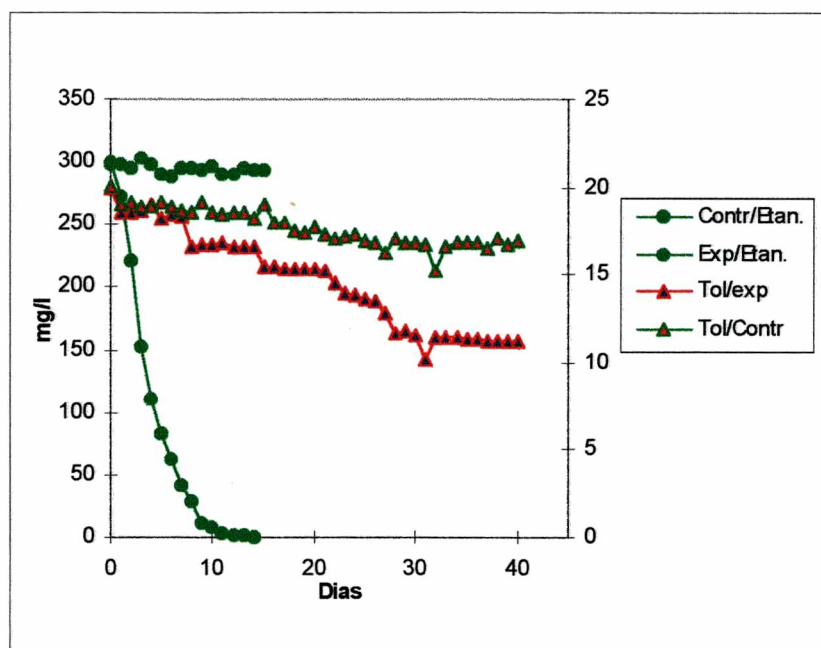


Figura 24 - Biodegradação de 20 mg/l de tolueno associado a 300 mg/l de etanol.

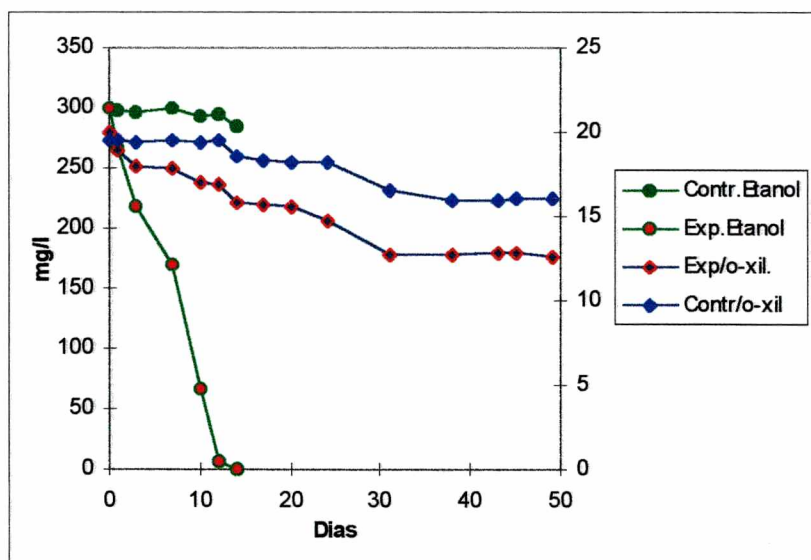


Figura 25 - Biodegradação de 20 mg/l de *orto*-xileno associado a 300 mg/l de etanol.

Ao contrário do observado por outros pesquisadores (Butler et al., 1992) o efeito do etanol na biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos não foi simplesmente causado pela competição pelo receptor de elétrons, neste caso o oxigênio. O aumento significativo no tempo para o completo desaparecimento dos BTX em experimentos associados a 20 e 100 mg/l de etanol está provavelmente ligado à preferência dos microrganismos pelo etanol em relação aos compostos BTX. Outro fator importante observado nos experimentos de BTX com etanol é a presença da fase “lag” melhor observada na figura 26, onde o etanol provoca um retardamento com concentrações de 20 e 100 mg/l e um boqueio em concentrações de 300 mg/l na biodegradação do benzeno. Esta fase, observada nos experimentos em presença de etanol, pode indicar a existência do processo de repressão catabólica. Este processo ocorre quando existem dois compostos disponíveis no meio (A e B), e um determinado microrganismo possui mais afinidade enzimática pelo composto A em relação ao composto B e somente degradando o composto B após o término de A. Um exemplo de repressão catabólica é a ativação de sítios operadores e promotores presente no DNA do bacilo *E. coli* para a quebra da lactose após o término da glicose no meio. A glicose quando presente, provoca a diminuição da concentração do cAMP inativando o operon da lactose, indutor necessário para que o processo de quebra da lactose ocorra (Dixon, et al, 1979). A ocorrência de um controle de atividade metabólica regulada através de sítios operadores e promotores de proteínas enzimáticas pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo período em que os compostos BTX não foram biodegradados na presença do etanol.

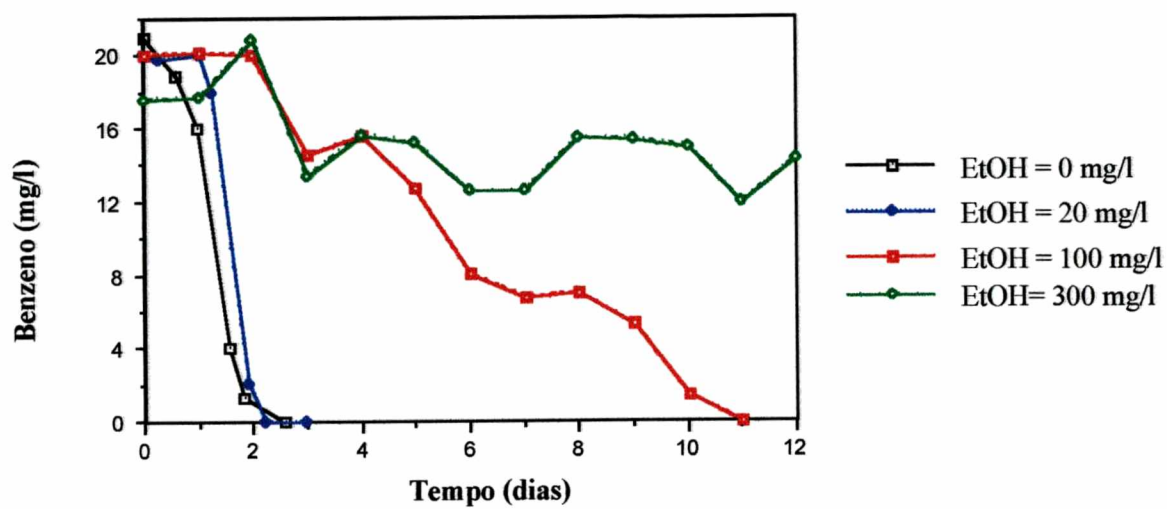


Figura 26 - Efeito de concentrações do etanol sobre a biodegradação aeróbia do benzeno

## CAPÍTULO V

### 5 CONCLUSÕES

Este estudo avaliou a degradação aeróbia dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, e *o*-xileno em presença de etanol. As principais conclusões obtidas foram:

Os resultados da degradação dos compostos BTX sem a presença de etanol no solo arenoso de Jurerê/SC mostraram que a população microbiana autóctone foi capaz de rapidamente (menos de duas semanas) transformar os contaminantes em compostos inócuos. Tanto nos experimentos em presença de um único substrato como em substratos combinados, o tolueno foi o contaminante que degradado mais rapidamente, seguido por benzeno e *o*-xileno. Na concentração de 60 mg/l dos três compostos combinados não ocorreu a completa degradação devido à limitação de oxigênio nos microcosmos. A causa provável da ordem de degradação dos BTX é a presença de uma biomassa inicial maior de microrganismos degradadores de tolueno, seguido pelo benzeno e *o*-xileno.

Os resultados dos experimentos de degradação dos BTX na presença de 20 mg/l de etanol não indicaram efeitos significativos no período de biodegradação dos contaminantes uma vez que etanol era completamente degradado em menos de 1 dia. Da mesma forma que nos experimentos sem a presença de etanol, benzeno, tolueno e *o*-xileno foram degradados em apenas 7 dias. Observou-se apenas o incremento de uma fase “lag” de um dia nas curvas de degradação dos compostos BTX.

Nos experimentos da degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e *orto*-xileno em presença de 100 mg/l de etanol o tempo para o

completo desaparecimento dos contaminantes aumentou para 10, 11 e 17 dias, respectivamente para o benzeno, tolueno e *o*-xileno. Por sua vez, o etanol foi degradado em aproximadamente 7 dias. Os resultados demonstraram que o início da degradação dos compostos BTX só ocorreu após o completo desaparecimento do etanol, e este efeito se verificou mesmo sem que houvesse limitações de oxigênio nos microcosmos.

Nos experimentos contendo 300 mg/l de etanol não havia oxigênio disponível para a degradação aeróbia de todos os substratos presentes. Nestas condições a degradação do etanol ocorreu em aproximadamente 12 dias. Em nenhum dos microcosmos os compostos BTX foram degradados durante o período de amostragem que foi de aproximadamente 50 dias. A causa da persistência dos contaminantes pode ser explicada pela demanda de oxigênio pelo etanol, que tornou o meio anaeróbio e limitou desta maneira a degradação aeróbia dos BTX.

A preferência dos microrganismos pelo etanol em relação aos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos poderia ser explicada termodinamicamente pela maior energia disponível do etanol. Além disso, o fato de que os compostos BTX só foram degradados após o desaparecimento do etanol, sugere a possibilidade da ocorrência do processo de repressão catabólica onde um substrato inibe a indução de enzimas para a degradação de outro substrato. Em águas subterrâneas, onde as condições de oxigênio são limitadas, a biodegradação do álcool poderá inviabilizar a degradação aeróbia conforme foi observado nos experimentos com concentrações de 300 mg/l de etanol. Nos processos de biorremediação o etanol poderá portanto, apresentar-se como um problema adicional para o tratamento de áreas contaminadas por derramamentos de gasolina, tendo em vista que no processo de biodegradação do etanol o oxigênio pode ser totalmente consumido e tornar o sistema subsuperficial anaeróbio.

Os resultados desta pesquisa mostraram que existe no solo de Jurerê microrganismos adaptados capazes de degradar etanol e os hidrocarbonetos monoaromáticos. Observou-se também o efeito negativo da presença do etanol comprovado pelo retardamento na biodegradação aeróbia dos BTX, uma vez que em todos os experimentos houve uma preferencial utilização do etanol em relação os BTX pelos microrganismos. Conseqüentemente, em uma contaminação de um aquífero com as

características do estudado, a competição por oxigênio será sempre vencida pelos microrganismos degradadores de etanol. Deste modo, a pluma de BTX tenderá a avançar muito mais em derramamentos de misturas de gasolina e etanol do que em derramamentos de gasolina pura.

## CAPÍTULO VI

### 6 RECOMENDAÇÕES

A inexistência de dados sobre a biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos associados ao etanol tornam os estudos fundamentais para se obter um melhor conhecimento para o tratamento de contaminação de águas subterrâneas por mistura de etanol e gasolina.

Para se conhecer melhor a biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos, estudos com novos aceptores de elétrons tais como nitrato, e sulfato são necessários para estudar novas alternativas de biorremediação.

A biodegradação do etanol associados aos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos em presença de outros aceptores de elétrons poderia servir como nova alternativa para a descontaminação de áreas contaminadas por gasolina.

O levantamento de bactérias consumidoras de hidrocarbonetos monoaromáticos poderá ajudar a conhecer melhor os processos metabólicos envolvidos na biodegradação destes compostos. A utilização de culturas puras em experimentos com etanol associados ao benzeno, tolueno e *orto*-xileno permitirá um melhor entendimento sobre as interações existentes nos processo de biodegradação.

A necessidade de melhores explicações sobre a biodegradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos associados ao etanol e na ausência de nutrientes poderiam apresentar alternativas de baixo custo para o tratamento de áreas contaminadas através dos processos de biorremediação passiva.

A continuação destes estudos em condições anaeróbias é importante para se verificar se os mesmos efeitos negativos observados em condições aeróbias irão ocorrer na ausência de oxigênio, uma vez que o etanol pode servir como substrato para a proliferação

de microrganismos anaeróbios que poderiam subseqüentemente acelerar a degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos na ausência de oxigênio.



## APÊNDICE

Tabelas dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos e etanol.

TABELA I. Experimento - 20 mg/l de Benzeno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,097	19,890	20,000	19,996	0,085
1	14,656	15,374	15,788	15,273	0,468
2	9,069	8,545	8,131	8,582	0,384
3	3,141	3,676	3,141	3,319	0,252
4	0,475	0,621	0,743	0,613	0,109
5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA II. Controle - 20mg/l de Benzeno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,343	19,988	19,002	19,379	0,409
1	19,343	19,513	19,209	19,373	0,125
2	19,343	19,209	19,002	19,063	0,140
3	19,343	20,061	20,207	20,152	0,378
4	19,343	20,426	19,866	19,933	0,442
5	19,343	19,744	19,854	19,872	0,220

TABELA III. Experimento - 20 mg/l de Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,979	20,156	19,647	19,927	0,211
12	10,156	11,194	11,007	10,786	0,452
24	2,544	3,645	2,721	2,970	0,483
48	0,478	0,405	0,592	0,492	0,077
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA IV. Controle - 20 mg/l de Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,021	19,875	20,093	19,997	0,091
12	19,543	19,408	20,197	19,716	0,345
24	20,447	19,823	19,844	20,038	0,289
48	20,062	20,125	19,387	19,858	0,334
60	19,855	19,969	19,834	19,886	0,059

TABELA V. Experimento - 20mg/l de Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,107	20,030	19,056	19,726	0,479
1	20,198	18,492	20,625	19,772	0,921
2	19,741	19,817	19,634	19,726	0,075
3	18,477	19,315	18,888	18,888	0,342
4	12,704	12,399	11,120	12,079	0,686
5	1,980	2,270	1,828	2,026	0,183
7	0,564	0,411	0,487	0,000	0,062

TABELA VI. Controle - 20mg/l de Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,564	19,970	20,427	20,320	0,254
1	20,960	19,452	19,604	20,005	0,678
2	19,634	20,823	19,604	20,020	0,567
3	19,513	19,954	20,198	19,888	0,284
4	19,939	20,518	16,877	19,111	1,597
5	19,634	19,680	18,020	19,111	0,772
6	19,634	19,665	20,442	19,914	0,374

TABELA VII. Experimento - 60 mg/l de Benzeno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	53,188	53,447	53,282	60,333	0,107
1	34,703	56,794	56,171	53,306	10,270
2	14,598	13,975	14,762	49,223	0,339
3	10,581	10,065	10,229	14,445	0,216
4	6,706	6,600	6,835	10,292	0,096
5	4,052	3,934	4,005	6,714	0,048
6	0,517	0,599	0,552	3,997	0,034
7	0,200	0,129	0,164	0,556	0,029
8	0,134	0,155	0,164	0,164	0,013
9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA VIII. Controle - 60mg/l de Benzeno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	60,070	59,789	60,423	60,094	0,259
1	59,636	60,035	59,730	59,800	0,131
2	57,087	58,462	57,205	57,585	0,526
3	59,777	59,448	59,366	59,530	0,067
4	59,014	59,131	59,166	59,104	0,026
5	59,084	59,495	59,683	59,421	0,110
6	59,718	59,248	59,436	59,468	0,097
7	59,342	59,554	59,800	59,565	0,114
8	59,636	59,930	59,683	59,749	0,104

TABELA IX. Experimento - 60mg/l de Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	59,456	59,123	60,23	59,603	0,464
1	26,756	25,781	27,563	26,700	0,729
2	9,672	8,891	9,443	9,335	0,328
3	4,138	3,845	4,037	4,007	0,122
4	1,096	1,254	1,121	1,157	0,069
5	0,298	0,411	0,346	0,352	0,046
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA X. Controle - 60mg/l de Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	59,302	60,121	60,334	59,919	0,445
1	58,696	58,908	59,181	58,928	0,199
2	59,909	60,303	60,030	60,081	0,165
3	59,970	60,273	59,697	59,980	0,235
4	59,909	59,727	60,334	59,990	0,254
5	58,999	59,333	57,968	58,766	0,581
6	58,908	58,574	59,060	58,847	0,203
7	59,029	59,333	58,756	59,039	0,235

TABELA XI. Experimento - 60mg/l de Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	58,487	61,155	60,358	60,000	1,118
1	59,283	60,159	56,576	58,673	1,525
2	57,173	55,222	58,328	58,908	1,282
3	7,087	7,644	7,525	7,419	0,240
4	3,543	3,942	4,101	4,035	0,234
5	2,588	3,942	2,429	2,986	0,679
6	1,234	1,871	1,274	1,460	0,291
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XII. Controle - 60mg/l de Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	58,789	59,945	60,112	59,615	0,588
1	60,231	59,711	59,009	59,650	0,501
2	59,689	59,045	59,564	59,433	0,279
3	58,652	59,761	59,009	59,141	0,462
4	58,932	58,971	57,781	58,561	0,552
5	59,781	58,789	59,049	59,206	0,420
6	59,847	58,896	58,692	59,145	0,503
7	59,067	59,782	58,936	59,262	0,372
8	59,125	59,564	59,091	59,260	0,215
9	58,978	59,1	59,103	59,060	0,058

TABELA XIII. Experimento - 20mg/l de Benzeno associado a 20mg/l de Tolueno e Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,755	20,564	19,963	20,094	0,343
1	17,169	17,439	17,549	17,386	0,160
2	16,752	16,752	17,304	16,936	0,260
3	16,140	16,103	16,593	16,279	0,223
4	15,551	16,066	16,054	15,891	0,240
5	10,490	10,760	12,108	11,119	0,708
6	4,877	5,588	5,453	5,306	0,308
7	1,850	1,360	1,532	1,581	0,230
8	1,275	0,760	1,091	1,042	0,213
9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XIII.1. Controle - 20mg/l de Benzeno associado a 20mg/l de Tolueno e Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,865	19,767	20,380	20,004	0,269
1	19,755	20,123	19,792	19,890	0,165
2	20,025	20,025	19,914	19,988	0,052
3	19,902	19,645	19,473	19,673	0,176
4	19,804	19,338	19,865	19,669	0,235
5	20,037	19,779	19,510	19,775	0,215
6	19,449	19,522	19,510	19,493	0,032
7	19,620	19,350	19,069	19,346	0,225
8	19,338	19,498	19,252	19,363	0,102
9	19,449	19,216	19,154	19,273	0,127



TABELA XIII.2. Experimento - 20mg/l de Tolueno associado a 20mg/l de Benzeno e Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,063	19,906	20,031	20,000	0,068
1	13,760	14,635	14,250	14,215	0,358
2	10,740	9,708	10,188	10,212	0,421
3	7,625	6,490	7,177	7,097	0,467
4	1,281	1,250	1,052	1,194	0,101
5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XIII.3. Controle - 20mg/l de Tolueno associado a 20mg/l de Benzeno e Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,125	20,031	19,990	20,069	0,057
1	20,042	20,052	20,115	20,056	0,032
2	20,125	20,073	19,969	19,896	0,065
3	19,948	19,854	19,885	19,851	0,039
4	19,906	19,948	19,698	19,455	0,109
5	19,552	19,688	19,083	18,566	0,259

TABELA XIII.4. Experimento - 20mg/l de Orto-xileno associado a 20mg/l de Benzeno e Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,782	19,872	19,682	19,779	0,078
1	19,587	19,652	19,683	19,641	0,040
2	19,783	19,564	19,432	19,593	0,145
3	19,188	18,546	18,783	18,839	0,265
4	17,992	17,843	17,453	17,763	0,227
5	16,871	17,610	16,983	17,155	0,325
6	14,895	15,056	14,976	14,976	0,066
7	7,040	6,561	6,743	6,781	0,197
8	5,952	5,784	5,968	5,901	0,083
9	5,010	5,120	5,204	5,111	0,079
10	2,211	3,513	3,123	2,949	0,546
11	2,032	2,157	1,976	2,055	0,076
12	0,256	0,389	0,289	0,311	0,057
13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XIII.5. Controle - 20mg/l de Orto-xileno associado a 20mg/l de Benzeno e Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,320	20,228	19,924	20,157	0,169
1	20,000	20,122	20,076	20,066	0,050
2	20,015	20,061	20,198	20,091	0,078
3	19,893	19,772	19,909	19,858	0,061
4	19,117	20,122	20,015	19,751	0,451
5	19,619	20,244	19,741	19,868	0,270
6	19,117	19,634	19,665	19,472	0,252
7	19,741	20,289	19,573	19,868	0,306
8	19,909	19,772	19,497	19,726	0,171
9	19,772	20,030	19,893	19,898	0,106
10	20,046	19,254	19,970	19,756	0,357
11	19,756	19,680	19,848	19,761	0,068
12	19,467	19,573	19,711	19,584	0,100
13	19,513	19,467	19,970	19,650	0,227

TABELA XIV. Experimento - 60mg/l de Benzeno associado a 60mg/l de Tolueno e Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	60,232	59,768	60,031	60,010	0,190
2	56,458	56,945	56,734	56,712	0,199
4	54,112	53,914	53,918	53,981	0,092
6	53,235	53,571	53,871	53,559	0,260
9	49,211	49,561	50,612	49,795	0,595
11	48,645	48,112	49,571	48,776	0,603
13	47,645	47,567	47,847	47,686	0,118
15	47,378	47,312	47,457	47,382	0,059
17	45,156	45,911	45,213	45,427	0,343
19	43,594	43,841	43,694	43,710	0,101
21	40,817	42,082	41,728	41,542	0,533
23	40,564	40,321	40,778	40,554	0,187
25	38,597	39,114	39,010	38,907	0,223
27	39,209	39,788	39,126	39,374	0,294
29	37,845	38,461	38,594	38,300	0,326
31	36,789	36,579	36,544	36,637	0,108
33	34,511	35,648	34,874	35,011	0,474
35	29,564	29,654	29,561	29,593	0,043
37	27,316	27,847	27,512	27,558	0,219
39	25,458	25,659	25,312	25,476	0,142
41	21,094	21,901	21,412	21,469	0,332
43	21,032	21,243	21,148	21,141	0,086
45	21,050	21,065	20,984	21,033	0,035
47	21,096	20,957	21,041	21,031	0,057

TABELA XV. Controle - 60mg/l de Benzeno associado a 60mg/l de Tolueno e Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	60,451	59,782	60,321	60,185	0,290
2	59,678	58,939	59,982	59,533	0,438
4	59,245	59,458	59,654	59,452	0,167
6	59,158	58,648	58,897	58,901	0,208
9	59,481	59,624	59,647	59,584	0,073
11	58,234	60,102	59,841	59,392	0,826
13	58,645	58,756	59,118	58,840	0,202
15	58,841	58,548	58,413	58,601	0,179
17	56,871	56,995	56,891	56,919	0,054
19	56,241	56,948	57,054	56,748	0,361
21	56,451	56,648	56,987	56,695	0,221
23	57,101	56,871	56,854	56,942	0,113
25	57,181	57,164	57,458	57,268	0,135
27	57,119	57,435	57,245	57,266	0,130
29	57,058	57,146	57,968	57,391	0,410
31	57,311	57,326	57,478	57,372	0,075
33	56,922	56,786	56,924	56,877	0,065
35	56,964	57,090	56,710	56,921	0,158
37	56,523	56,785	56,734	56,681	0,113
39	56,782	56,893	56,935	56,870	0,065
41	56,342	56,126	56,469	56,312	0,142
43	56,672	56,734	56,854	56,753	0,076
45	56,476	56,233	56,678	56,462	0,182
47	56,678	56,869	56,549	56,699	0,131

TABELA XVI. Experimento - 60mg/l de Tolueno associado a 60mg/l de Benzeno e Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	59,832	60,040	60,543	60,138	0,298
2	53,247	54,279	53,891	53,806	0,426
4	49,511	49,782	50,456	49,916	0,397
6	34,856	33,965	34,946	34,589	0,443
9	29,678	29,780	29,347	29,602	0,185
11	22,683	22,655	22,567	22,635	0,049
13	16,684	16,856	16,222	16,587	0,268
15	15,452	15,856	15,034	15,447	0,336
17	12,580	12,689	12,324	12,531	0,153
19	10,850	11,116	10,768	10,911	0,149
21	9,157	9,342	9,056	9,185	0,118
23	7,792	7,843	7,917	7,851	0,051
25	7,659	7,081	7,201	7,314	0,249
27	7,532	7,067	7,456	7,352	0,204
29	7,234	7,750	7,457	7,480	0,211
31	7,546	7,453	7,340	7,446	0,084
33	7,232	7,451	7,432	7,372	0,099
35	7,344	7,863	7,456	7,554	0,223
37	7,784	7,457	7,654	7,632	0,134
39	7,568	7,568	7,478	7,538	0,042
41	6,875	6,978	7,114	6,989	0,098
43	7,674	7,234	7,564	7,491	0,187
45	7,346	7,457	7,456	7,420	0,052
47	7,238	7,438	7,456	7,377	0,099

TABELA XVII. Controle - 60mg/l de Tolueno associado a 60mg/l de Benzeno e Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	59,043	60,401	60,122	59,855	0,586
2	60,169	59,783	60,079	60,010	0,165
4	57,872	57,568	57,346	57,595	0,216
6	57,393	57,433	57,989	57,605	0,272
9	57,244	57,782	57,932	57,653	0,295
11	57,453	57,888	57,598	57,646	0,181
13	57,586	57,534	57,689	57,603	0,064
15	57,430	57,756	57,345	57,510	0,177
17	57,231	57,113	57,078	57,141	0,065
19	57,365	57,789	57,982	57,712	0,258
21	57,672	57,620	57,984	57,759	0,161
23	57,871	57,976	57,743	57,863	0,095
25	57,678	57,658	57,893	57,743	0,106
27	57,892	57,561	57,456	57,636	0,186
29	57,789	57,682	57,892	57,788	0,086
31	57,452	57,689	57,683	57,608	0,110
33	57,581	57,557	57,568	57,535	0,056
35	57,423	57,689	57,433	57,515	0,123
37	56,981	57,032	56,894	56,969	0,057
39	56,933	57,892	56,873	57,233	0,467
41	57,578	57,679	57,789	57,682	0,086
43	56,891	56,830	56,373	56,698	0,231
45	56,231	56,451	56,532	56,405	0,127
47	56,892	56,783	56,679	56,785	0,087

TABELA XVIII. Experimento - 60mg/l de Orto-xileno associado a 60mg/l de Benzeno e Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	60,345	59,789	60,012	60,049	0,228
2	58,456	58,122	58,834	58,471	0,291
4	58,825	57,344	57,436	57,868	0,678
6	54,642	54,271	55,539	54,817	0,532
9	52,012	53,132	52,678	52,607	0,460
11	50,576	50,683	50,672	50,644	0,048
13	49,781	49,254	49,451	49,495	0,217
15	48,568	48,923	48,035	48,509	0,365
17	47,341	48,562	48,091	47,998	0,503
19	47,341	47,562	47,256	47,386	0,129
21	46,163	45,935	45,620	45,906	0,223
23	44,467	44,345	43,451	44,088	0,453
25	41,802	41,776	41,682	41,753	0,052
27	39,227	40,091	39,546	39,621	0,357
29	36,137	36,457	36,245	36,280	0,133
31	33,102	33,447	33,221	33,257	0,143
33	30,568	30,654	30,821	30,681	0,105
35	28,749	29,031	28,921	28,900	0,116
37	28,789	28,971	28,625	28,795	0,141
39	28,771	28,956	28,673	28,800	0,117
41	28,871	28,763	28,246	28,627	0,273
43	28,834	28,764	28,874	28,824	0,045
45	28,723	28,823	28,321	28,622	0,217
47	28,650	28,987	28,751	28,796	0,141



TABELA XIX. Controle - 60mg/l de Orto-xileno associado a 60mg/l de Benzeno e Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	60,191	59,940	60,020	60,050	0,105
2	59,671	59,542	59,431	59,548	0,098
4	58,124	58,564	58,781	58,490	0,273
6	57,855	58,781	58,184	58,273	0,383
9	58,452	58,451	58,222	58,375	0,108
11	57,999	57,872	57,734	57,868	0,108
13	57,823	57,745	57,671	57,746	0,062
15	57,328	57,245	57,880	57,484	0,282
17	57,566	57,891	57,404	57,620	0,202
19	57,634	57,834	57,991	57,820	0,146
21	58,936	59,068	58,823	58,942	0,100
23	58,554	58,564	58,356	58,491	0,096
25	57,784	57,971	57,934	57,896	0,081
27	57,865	57,784	57,668	57,772	0,081
29	57,358	57,348	57,577	57,428	0,106
31	57,448	57,642	57,648	57,579	0,093
33	56,456	56,673	56,689	56,606	0,106
35	56,752	56,894	56,945	56,864	0,082
37	56,899	56,834	56,784	56,839	0,047
39	56,876	56,345	56,873	56,698	0,250
41	56,783	56,845	56,881	56,836	0,040
43	56,456	56,642	56,734	56,611	0,116
45	56,557	56,457	56,891	56,635	0,186
47	57,891	57,456	57,962	57,770	0,224

TABELA XX. Experimento - 20mg/l de Benzeno associado a 20mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,837	20,065	20,098	20,000	0,116
1	18,807	19,078	18,666	18,850	0,171
2	14,544	14,685	14,046	14,425	0,275
3	2,289	1,692	1,573	1,851	0,313
4	0,369	0,586	0,705	0,553	0,139
5	0,130	0,369	0,000	0,166	0,153
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXI. Controle - 20mg de Benzeno associado a 20mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,000	19,946	20,021	19,989	0,032
1	20,021	19,839	19,850	19,904	0,083
2	19,625	19,839	19,679	19,714	0,091
3	19,507	20,118	19,721	19,782	0,253
4	20,225	19,882	19,957	20,021	0,147
5	19,893	19,882	19,796	19,857	0,043
6	19,829	19,775	19,893	19,832	0,048
7	19,464	19,646	19,625	19,579	0,081

TABELA XXII Experimento - 20mg/l de Tolueno associado a 20mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,743	19,576	21,893	20,404	1,055
1	18,910	18,819	19,546	19,092	0,323
2	14,534	14,353	15,140	14,676	0,337
3	7,873	8,191	7,918	7,994	0,140
4	3,770	4,133	3,830	3,911	0,159
5	1,742	2,063	1,531	1,780	0,219
6	0,318	0,394	0,469	0,394	0,062
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXIII Controle - 20 mg/l de Tolueno associado a 20mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,138	18,594	21,829	20,000	1,414
1	17,506	18,912	19,501	19,854	0,837
2	19,410	19,289	19,380	18,639	0,051
3	19,184	19,350	19,486	19,360	0,124
4	18,186	18,760	18,881	19,340	0,303
5	16,780	18,322	18,216	18,609	0,703
6	19,453	19,798	20,043	19,899	0,405
7	18,987	18,141	19,955	19,854	0,741

TABELA XXIV. Experimento - 20mg/l de Orto-xileno associado a 20 mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,384	19,315	20,301	20,000	0,485
1	20,000	19,890	20,082	19,991	0,079
2	16,164	18,301	18,247	17,571	0,995
3	16,219	16,466	19,014	17,233	1,263
4	10,219	13,151	13,260	12,210	1,408
5	0,438	0,521	0,466	0,475	0,034
6	0,245	0,311	0,263	0,273	0,028
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXV. Controle - 20mg/l de Orto-xileno associado a 20mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,174	19,975	19,851	20,000	0,133
1	19,254	20,050	21,020	20,100	0,722
2	15,597	16,617	17,264	16,493	0,686
3	17,214	16,368	16,119	16,567	0,468
4	17,736	17,662	16,940	17,438	0,359
5	18,333	18,632	18,483	18,483	0,122
6	17,090	16,368	16,891	16,791	0,304
7	15,448	18,234	19,303	18,930	1,625

TABELA XXVI. Experimento - 20mg/l de Benzeno associado a 100mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,120	20,359	19,532	20,003	0,347
1	15,289	20,886	17,321	17,832	2,314
2	20,080	11,285	17,122	16,162	3,654
3	19,094	14,851	15,936	16,627	1,800
4	16,952	20,050	15,189	17,397	2,009
5	12,570	8,406	15,159	12,045	2,782
6	11,305	12,968	11,793	12,022	0,698
7	11,833	10,886	7,530	10,083	1,846
8	5,329	3,964	3,297	4,197	0,846
9	1,504	1,305	1,116	1,308	0,159
10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXVI.1. Experimento - 100 mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Benzeno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	91,087	92,195	96,790	93,358	1,951
1	66,765	63,985	59,983	63,578	1,799
2	35,919	31,114	30,999	32,677	0,765
3	7,547	5,560	6,974	6,693	0,611
4	2,207	1,891	1,366	1,821	0,233
5	1,442	0,974	0,755	1,057	0,128
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXVII. Controle - 20mg/l de Benzeno associado a 100mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,881	18,075	21,034	19,997	1,361
1	17,998	17,864	21,762	19,208	1,807
2	18,678	17,739	20,948	19,122	1,347
3	20,852	17,739	20,948	19,847	1,491
4	17,950	17,950	17,883	17,928	0,032
5	18,362	16,772	18,123	17,752	0,700
6	17,261	16,753	19,052	17,688	0,986
7	17,644	18,123	17,979	17,915	0,201
8	18,180	17,577	17,136	17,631	0,428
9	18,190	18,640	18,420	18,416	0,184
10	18,123	18,410	18,649	18,394	0,215

TABELA XXVII.1. Controle - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Benzeno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	100,817	100,115	101,087	100,673	0,409
1	95,341	91,803	93,037	93,394	1,466
2	89,678	87,142	87,142	87,987	1,196
3	84,228	88,134	83,641	85,334	1,994
4	88,072	85,920	86,562	86,851	0,902
5	88,267	87,990	84,555	86,937	1,688
6	82,862	83,131	84,237	83,410	0,595

TABELA XXVIII. Experimento - 20mg/l de Tolueno associado a 100mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,791	20,084	20,115	19,997	0,146
1	20,311	19,891	20,211	20,137	0,179
2	19,812	20,428	20,084	20,108	0,252
3	20,011	20,050	19,877	19,979	0,074
4	16,658	17,838	18,360	17,619	0,712
5	16,311	15,791	15,861	15,987	0,230
6	15,279	14,924	14,110	14,771	0,490
7	10,893	12,742	11,624	11,753	0,760
8	11,711	11,918	12,132	11,920	0,172
9	4,836	4,950	5,629	5,138	0,350
10	2,433	2,809	2,559	2,601	0,156
11	1,420	1,629	1,702	1,584	0,119
12	0,700	0,961	0,543	0,735	0,172
13	0,240	0,251	0,324	0,272	0,037
14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXVIII.1. Experimento - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	99,276	103,743	100,457	101,159	1,894
1	80,280	79,320	79,764	79,788	0,392
2	45,501	45,254	45,872	45,542	0,101
3	27,247	26,763	28,034	27,348	0,198
4	17,412	17,284	18,922	17,873	0,052
5	10,128	10,109	10,873	10,370	0,007
6	6,298	7,120	6,798	6,739	0,336
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXIX. Controle - 20mg/l de Tolueno associado a 100mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,791	20,084	20,115	19,997	0,146
1	19,540	20,522	19,593	19,885	0,451
2	18,360	20,292	21,410	19,600	1,260
3	18,642	19,624	18,621	20,021	0,468
4	20,522	19,279	20,543	18,963	0,591
5	19,603	18,621	19,770	20,115	0,507
6	18,695	20,324	19,624	19,332	0,667
7	18,475	19,436	19,499	19,547	0,468
8	19,802	20,418	20,084	19,137	0,252
9	19,634	18,684	20,480	20,101	0,734
10	19,864	19,613	20,113	19,863	0,204
11	20,326	20,091	19,952	20,123	0,154
12	20,092	20,041	19,884	20,005	0,089
13	19,784	20,115	20,092	19,997	0,151

TABELA XXIX.1. Controle - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	99,734	99,039	100,000	99,591	0,405
1	95,781	100,190	98,874	98,282	1,848
2	99,239	97,884	96,845	97,989	0,980
3	90,576	93,761	89,456	91,264	1,824
4	98,891	98,453	97,767	98,404	0,419
5	91,570	90,673	91,113	91,119	0,366



TABELA XXX. Experimento - 20mg/l de Orto-xileno associado a 100mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,350	20,030	19,634	20,005	0,293
1	19,071	18,903	18,873	19,056	0,087
2	19,832	19,695	19,071	19,533	0,331
3	19,467	20,274	20,030	19,924	0,338
4	18,964	19,711	18,827	19,167	0,388
5	19,634	20,015	19,619	19,756	0,183
6	19,665	19,604	19,360	19,543	0,132
7	18,660	19,360	19,101	19,040	0,289
8	18,614	19,406	19,954	19,325	0,550
9	18,873	18,142	18,020	18,345	0,377
10	17,700	17,852	17,913	17,822	0,090
11	15,826	16,725	14,791	15,781	0,790
12	17,487	15,750	16,314	16,517	0,723
13	17,639	16,283	15,887	16,603	0,750
14	10,388	12,079	10,160	10,876	0,856
15	4,615	4,981	4,539	4,712	0,193
16	4,326	3,641	3,671	3,879	0,316
17	2,117	2,574	2,361	2,351	0,187
18	0,350	0,289	0,472	0,371	0,076
19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXX.1. Experimento - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	107,486	108,271	104,364	106,707	0,638
1	83,783	82,782	83,282	83,282	0,409
2	47,486	47,229	47,358	47,358	0,105
3	28,437	27,931	28,184	28,184	0,206
4	18,172	18,039	18,106	18,106	0,055
5	10,569	10,550	10,560	10,560	0,008
6	6,573	7,431	11,571	8,525	0,799
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXXI. Controle - 20mg/l de Orto-xileno associado a 100mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,244	20,091	19,634	19,990	0,259
1	18,203	19,101	18,157	18,487	0,435
2	19,040	19,589	19,619	19,416	0,266
3	19,604	19,634	19,939	19,726	0,151
4	19,756	19,634	19,573	19,655	0,076
5	19,970	19,497	19,619	19,695	0,200
6	19,772	19,604	19,452	19,609	0,131
7	18,934	20,107	19,665	19,568	0,484
8	18,126	20,107	19,619	19,284	0,842
9	19,634	19,619	19,467	19,573	0,076
10	17,822	18,446	19,299	18,522	0,606
11	19,985	17,411	19,543	18,979	1,124
12	18,324	18,294	19,330	18,649	0,481
13	19,634	19,924	19,467	19,675	0,189
14	17,898	19,528	19,680	19,035	0,807
15	17,243	18,096	18,111	17,817	0,406
16	17,441	18,446	18,248	18,045	0,435
17	17,959	18,111	18,081	18,050	0,066
18	18,172	18,324	18,492	18,330	0,131

TABELA XXXI.1. Controle - 100mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	100,000	99,304	100,267	99,857	0,406
1	85,090	100,458	92,283	92,610	6,278
2	99,504	86,435	86,435	90,791	6,161
3	83,545	97,339	82,963	87,949	6,644
4	76,457	85,224	82,228	81,303	3,638
5	87,551	98,188	83,869	89,869	6,071
6	82,190	82,457	83,554	82,734	0,590
7	83,832	87,168	85,151	85,384	1,372
8	81,990	89,202	85,205	85,465	2,950

TABELA XXXII. Experimento - 20mg/l de Benzeno associado a 300mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	19,610	20,414	20,000	20,008	0328
1	20,901	18,917	19,424	19,747	0842
2	21,631	17,955	19,432	19,673	1510
3	20,146	21,363	19,675	20,395	0711
4	17,492	17,663	17,671	17,609	0082
5	15,740	13,865	15,557	15,054	0844
6	19,574	20,828	19,144	19,849	0714
7	16,348	15,484	16,336	16,056	0405
8	15,727	16,080	16,084	15,964	0167
9	15,301	14,985	16,235	15,507	0531
10	16,007	15,740	16,133	15,960	0164
11	15,849	16,080	16,474	16,134	0258
12	16,080	15,934	16,141	16,052	0087
13	15,569	15,435	15,926	15,643	0207
14	16,567	16,920	16,847	16,778	0152
15	16,080	15,107	15,740	15,642	0403
16	15,155	15,289	15,500	15,315	0142
17	15,557	16,056	16,174	15,929	0,267
18	16,080	17,054	16,835	16,657	0,417
19	15,046	16,324	16,048	15,806	0,549
20	16,421	15,472	16,360	16,084	0,434
21	16,506	16,214	16,502	16,408	0,137
22	15,873	15,569	15,719	15,721	0,124
23	15,557	16,506	16,324	16,129	0,411
24	15,691	15,959	15,938	15,863	0,122
25	15,472	15,654	15,622	15,583	0,080
26	16,214	16,032	16,352	16,199	0,131
27	15,813	16,117	15,963	15,964	0,124
28	15,666	16,312	16,044	16,007	0,265
29	15,959	16,153	16,299	16,137	0,140
30	15,910	15,569	15,873	15,784	0,153
31	15,618	15,350	15,504	15,491	0,110
32	15,569	15,472	15,496	15,512	0,041
33	15,423	16,884	15,423	15,910	0,689
34	13,597	14,741	14,741	14,360	0,539
35	13,268	14,717	14,607	14,198	0,659

TABELA XXXII.1. Experimento - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Benzeno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	309,226	298,456	299,657	302,446	4,819
1	296,553	272,128	280,423	283,035	10,141
2	226,183	224,196	218,647	223,009	3,189
3	154,871	152,114	150,057	152,348	1,972
4	108,352	113,431	115,545	112,443	3,018
5	8,445	90,591	85,489	85,842	3,742
6	6,294	65,625	58,640	61,853	2,879
7	34,995	39,189	42,693	38,959	3,147
8	25,540	32,100	24,552	27,397	3,350
9	9,341	10,466	10,972	10,260	0,682
10	7,778	7,135	6,859	7,257	0,385
11	3,114	3,424	3,470	3,336	0,158
12	1,505	1,723	2,332	1,854	0,350
13	0,816	1,172	0,781	0,923	0,177
14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXXIII. Controle - 20mg/l de Benzeno associado a 300mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	17,373	20,602	20,174	19,383	1,432
1	15,799	19,711	19,421	18,310	1,780
2	15,729	19,850	18,727	18,102	1,739
3	20,069	18,322	18,542	18,978	0,777
4	20,903	16,447	17,731	18,360	1,873
5	18,021	18,299	17,581	17,967	0,295
6	18,935	19,491	19,375	19,267	0,239
7	18,958	21,667	15,289	18,638	2,613
8	17,118	18,322	20,602	18,681	1,445
9	20,093	15,729	19,525	18,449	1,937
10	19,595	20,625	19,803	20,008	0,445
11	19,606	19,780	20,648	20,012	0,456
12	18,403	20,081	20,081	19,522	0,791
13	18,449	20,081	19,653	19,394	0,691
14	18,160	20,625	19,120	19,302	1,015
15	17,731	18,322	19,803	18,619	0,871
16	19,421	19,549	19,039	19,336	0,216
17	20,081	19,815	19,005	19,633	0,458
18	19,931	20,694	17,604	19,410	1,314
19	19,954	20,035	19,120	19,703	0,413
20	18,958	16,794	19,421	18,391	1,145
21	19,988	18,264	19,549	19,267	0,732
22	17,373	19,329	19,919	18,873	1,088
23	15,799	20,093	19,884	18,592	1,977
24	17,813	18,102	18,727	18,214	0,382
25	20,012	18,322	18,542	18,958	0,750
26	19,965	16,447	17,731	18,048	1,454
27	16,863	18,333	19,479	18,225	1,071
28	18,935	19,803	18,530	19,090	0,531
29	18,958	20,000	15,289	18,083	2,020
30	17,118	18,322	20,000	18,480	1,182
31	20,012	15,729	18,368	18,036	1,764
32	17,627	18,264	18,183	18,025	0,283
33	19,606	19,780	19,838	19,742	0,098
34	18,403	19,977	19,873	19,417	0,719
35	18,449	19,954	19,653	19,352	0,650
36	18,160	19,942	19,120	19,074	0,728

TABELA XXXIII.1. Controle - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Benzeno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	310,894	310,894	305,848	309,212	2,379
1	295,451	295,451	300,824	297,242	2,533
2	301,671	301,671	288,734	297,358	6,099
3	292,211	292,211	311,436	298,619	9,063
4	289,479	289,479	305,874	294,944	7,729
5	284,117	284,117	299,842	289,358	7,413
6	280,809	280,809	279,421	280,346	0,655
7	292,437	292,437	294,017	292,963	0,745
8	289,603	289,603	297,471	292,226	3,709
9	291,759	291,759	290,032	291,183	0,814
10	292,267	292,267	296,117	293,550	1,815
11	302,292	302,292	291,048	298,544	5,300
12	293,419	293,419	291,048	292,628	1,118
13	289,874	289,874	301,084	293,611	5,284
14	294,548	294,548	295,789	294,961	0,585



TABELA XXXIV. Experimento - 20mg/l de Tolueno associado a 300mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,360	20,554	19,077	19,997	0,655
1	18,192	19,349	18,251	18,597	0,532
2	18,241	18,688	18,824	18,584	0,249
3	18,280	19,155	18,571	18,669	0,364
4	18,882	19,009	19,077	18,989	0,081
5	18,086	18,552	18,017	18,218	0,238
6	18,358	18,542	18,513	18,471	0,081
7	18,086	18,319	18,465	18,290	0,156
8	16,297	16,365	17,318	16,660	0,466
9	16,463	17,473	16,414	16,783	0,488
10	16,608	17,104	16,443	16,718	0,281
11	17,872	16,239	16,356	16,822	0,744
12	16,288	16,142	17,328	16,586	0,528
13	16,210	17,386	16,424	16,673	0,511
14	16,239	16,910	16,851	16,667	0,303
15	16,667	13,188	16,579	15,478	1,620
16	16,433	13,605	16,472	15,504	1,342
17	16,550	13,188	16,414	15,384	1,554
18	16,220	13,294	16,560	15,358	1,466
19	16,113	13,401	16,560	15,358	1,396
20	16,550	13,032	16,424	15,335	1,629
21	16,365	13,129	16,395	15,296	1,532
22	14,091	15,151	14,363	14,535	0,449
23	13,217	13,887	14,966	14,023	0,721
24	14,247	13,965	13,236	13,816	0,426
25	13,479	13,304	14,266	13,683	0,418
26	13,421	13,693	13,499	13,537	0,114
27	12,235	13,751	12,420	12,802	0,675
28	12,080	12,206	12,892	12,393	0,357
29	13,980	13,632	13,781	13,798	0,143
30	11,769	12,784	12,783	12,445	0,478
31	12,879	11,986	12,973	12,613	0,445
32	12,783	12,783	12,768	12,778	0,007
33	12,672	12,874	12,534	12,693	0,140
34	12,785	12,764	12,674	12,741	0,048
35	12,783	12,345	12,783	12,637	0,206
36	12,785	12,783	12,770	12,779	0,007
37	12,854	11,965	12,683	12,501	0,385
38	11,186	11,263	12,789	11,746	0,738
39	12,678	12,567	12,557	12,601	0,055
40	12,886	12,456	12,567	12,636	0,182
41	12,843	12,893	13,094	12,943	0,108
42	12,784	12,874	12,783	12,814	0,043
43	11,986	12,767	12,678	12,477	0,349
44	12,789	12,124	12,784	12,566	0,312
45	12,781	12,634	12,772	12,729	0,067
46	12,562	12,765	12,873	12,733	0,129

TABELA XXXIV.1. Experimento - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	297,133	298,871	300,781	298,928	1,490
1	298,871	260,817	260,004	273,230	18,134
2	211,225	220,854	230,867	220,982	8,020
3	158,867	156,610	144,350	153,276	6,378
4	108,948	113,373	111,669	111,330	1,822
5	82,645	84,305	85,366	84,105	1,120
6	60,147	64,019	64,820	62,995	2,041
7	44,659	41,452	37,264	41,125	3,028
8	27,669	30,841	30,231	29,580	1,374
9	9,799	11,040	10,521	10,453	0,509
10	7,405	7,405	7,609	7,473	0,096
11	3,319	3,240	3,093	3,217	0,094
12	1,784	1,648	1,851	1,761	0,084
13	0,948	0,756	0,768	0,824	0,088
14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXXV. Controle - 20mg/l de Tolueno associado a 300mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,379	20,418	19,310	20,036	0,513
1	19,388	18,523	19,310	19,074	0,391
2	19,242	18,756	19,291	19,096	0,241
3	18,727	18,989	19,038	18,918	0,137
4	19,086	18,727	19,028	18,947	0,158
5	19,320	18,853	19,291	19,155	0,213
6	19,125	18,581	18,970	18,892	0,229
7	18,727	18,474	18,921	18,707	0,183
8	18,416	18,630	18,513	18,520	0,087
9	19,184	19,329	18,902	19,138	0,177
10	18,251	19,057	18,416	18,575	0,348
11	19,038	17,930	18,435	18,468	0,453
12	19,417	18,338	17,823	18,526	0,664
13	18,698	18,445	18,552	18,565	0,104
14	18,173	18,649	17,998	18,273	0,275
15	18,921	18,941	19,281	19,048	0,165
16	17,949	17,969	18,212	18,043	0,119
17	17,444	18,581	17,843	17,956	0,471
18	17,590	17,901	17,123	17,538	0,320
19	17,512	17,357	17,357	17,408	0,073
20	17,775	17,843	17,707	17,775	0,056
21	17,415	17,843	16,803	17,353	0,427
22	16,579	17,055	17,638	17,091	0,433
23	18,047	16,307	17,085	17,146	0,712
24	17,085	17,357	17,347	17,263	0,126
25	17,153	16,968	16,939	17,020	0,095
26	16,832	17,153	16,395	16,793	0,311
27	15,705	16,900	16,181	16,262	0,491
28	16,638	17,386	17,221	17,081	0,321
29	16,200	17,123	17,259	16,861	0,471
30	16,132	16,239	18,086	16,819	0,897
31	16,084	17,988	16,249	16,774	0,862
32	16,744	16,822	12,060	15,209	2,227
33	16,754	16,861	16,307	16,641	0,240
34	16,220	17,114	17,308	16,880	0,474
35	16,210	16,861	17,386	16,819	0,481
36	17,201	16,239	17,065	16,835	0,425
37	16,346	16,395	16,744	16,495	0,177
38	17,318	17,065	16,861	17,081	0,187
39	17,065	16,657	16,414	16,712	0,269
40	17,201	16,501	17,094	16,932	0,308
41	16,346	16,317	18,163	16,942	0,864
42	16,647	16,395	17,036	16,693	0,264
43	16,414	16,414	17,328	16,718	0,431
44	17,065	16,861	16,404	16,777	0,276
45	16,453	16,696	16,997	16,715	0,223
46	16,706	16,628	16,744	16,693	0,048

TABELA XXXV.1. Controle - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Tolueno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	298,374	305,848	293,272	299,165	5,164
1	294,751	300,824	300,519	298,698	2,794
2	299,131	288,734	297,505	295,123	4,567
3	298,058	311,436	300,305	303,266	5,849
4	294,152	313,772	286,611	298,179	11,448
5	294,807	299,842	276,282	290,310	10,130
6	293,701	279,421	293,227	288,783	6,623
7	294,852	294,017	298,611	295,827	1,998
8	295,180	297,471	292,899	295,183	1,866
9	293,159	290,032	298,781	293,991	3,620
10	296,489	296,117	298,645	297,084	1,115
11	298,329	291,048	280,978	290,119	7,114
12	282,333	291,048	297,550	290,310	6,234
13	299,932	301,084	284,896	295,304	7,375
14	292,019	295,789	291,929	293,246	1,799
15	300,756	290,901	287,627	293,095	5,580

TABELA XXXVI. Experimento - 20mg/l de Orto-xileno associado a 300mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,548	20,046	19,482	20,025	0,436
1	19,985	18,370	18,568	18,974	0,719
3	17,334	19,177	19,071	18,528	0,845
7	17,913	18,248	17,350	17,837	0,371
10	16,862	16,816	17,304	16,994	0,220
12	15,826	17,487	17,319	16,877	0,746
14	16,405	15,689	15,537	15,877	0,379
17	15,339	16,222	15,415	15,659	0,400
20	14,760	16,954	15,217	15,644	0,945
24	13,694	15,034	15,552	14,760	0,783
31	13,404	11,881	12,871	12,719	0,631
38	12,704	12,871	12,536	12,704	0,137
43	12,551	12,734	13,237	12,841	0,290
45	12,582	12,932	12,978	12,831	0,177
49	12,582	12,399	13,039	12,673	0,269

TABELA XXXVI.1. Experimento - 300mg/l de etanol associado a 20mg/l de Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	300,815	298,653	299,909	299,792	0,887
1	265,740	258,878	276,835	267,151	7,398
3	216,138	223,395	213,217	217,583	4,279
7	175,209	177,439	156,878	169,842	9,212
10	66,732	64,921	66,370	66,007	0,783
14	7,235	6,646	6,182	6,688	0,431
17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

TABELA XXXVII. Controle - 20mg/l de Orto-xileno associado a 300mg/l de Etanol.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	20,122	19,695	18,781	19,533	0,559
1	19,208	19,604	19,665	19,492	0,203
2	19,177	19,558	19,543	19,426	0,176
3	19,909	19,208	19,436	19,518	0,292
4	19,528	19,482	19,330	19,447	0,085
5	19,467	19,132	20,107	19,568	0,404
6	18,172	17,974	29,558	18,568	0,705
7	18,081	17,944	19,071	18,365	0,502
8	18,355	18,401	17,883	18,213	0,234
9	18,599	17,822	18,294	18,238	0,320
10	15,126	15,263	15,110	15,166	0,068
11	16,725	16,055	15,080	15,953	0,675
12	15,842	15,598	16,420	15,953	0,345
13	16,603	16,725	14,851	16,060	0,856
14	15,583	16,420	16,177	16,060	0,352

TABELA XXXVII.1. Controle - 300mg/l de Etanol associado a 20mg/l de Orto-xileno.

<b>Dias</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	299,547	299,558	300,894	300,000	0,211
1	295,845	299,887	299,479	298,404	1,669
3	290,795	299,536	298,030	296,120	3,597
7	300,521	299,264	299,162	299,649	0,526
10	301,778	281,805	297,860	293,814	8,209
14	294,328	295,392	296,796	295,505	0,530
17	288,168	286,300	281,839	285,436	1,140

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AELION, C. M.; SWINDOLL, M.; PFAENDER, P. K. 1987. Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(9): 2212-2217.
- \_\_\_\_\_.; BRADLEY, P. M. 1991. Aerobic biodegradation potential of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(1): 57-63.
- ALEXANDER, M. 1985. Biodegradation of organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 18(2).
- ALVAREZ, P. J. J.; VOGEL, T.M. 1991. Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(10): 2981-2985.
- \_\_\_\_\_. 1995. Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate reducing conditions. *Wat. Sci. Tech.* 31(1): 15-28.
- ANDERSON, W. C. 1995. Bioremediation; innovative site remediation technology, Alexandria, American Academy of Environmental Engineers. 288p.
- ANID, P. J.; ALVAREZ, P. J. J.; VOGEL, T. M. 1993. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen peroxide and nitrate. *Water Research*, 27: 685-691.
- ARVIN, E.; JENSEN, B. K.; GUNDERSEN, A.T. 1989. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(12): 3221-3225.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. 1987. Microbial ecology fundamentals and applications, 2. ed., California, The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- BAGGI, G.; BARBIERI P.; GALLI, E.; TOLLARI, S. 1987. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(9): 2129-2132.

- BARKER, J. F.; PATRICK, G. C.; MAJOR, D. 1987. Natural attenuation of aromatic hydrocarbons in a shallow sand aquifer. *Ground Water Monitor*. Rev. 7:64-71.
- BAUER, J. E.; CAPONE, D. G. 1988. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(7): 1649-1655.
- BELLER, H. R.; GRBIC-GALIC, D.; REINHARD, M. 1992. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(3): 786-793.
- BOLLAG, J. M.; LIU S. Y. 1985. Copolymerization of halogenated phenols and syringic acid. *Pestic Biochem. Physiol.* 23: 261-272.
- BOWER, J. E.; ZEHNDER, A. J. B. 1993. Bioremediation of organic compound-putting microbial metabolism to work. *Bioremediation*, 11: 360-367.
- BUTLER, B. J.; GRIENDT, M. V.; BARKER, J. F. . 1992. Impact of methanol on the biodegradative activity of aquifer microorganisms. *In: SETAC 13<sup>th</sup> Annual Meeting*, November 8-12, Cincinnati, OH.
- CALDWELL, D. R. 1995. Microbial physiology & metabolism. Iowa, WCB. 353p.
- CASTRO, C. E.; BELSER, N. O. 1990. Biodehalogenation: Oxidative and reductive metabolism of 1, 1,2-trichloroethane by *Pseudomonas putida* - Bioregeneration of vinyl chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* 9:707-714.
- CHAPELLE, F. H. 1993. Ground-water microbiology & geochemistry. *John Wiley & Sons*. 424p.
- CORSEUIL, H. X. 1992. Enhanced degradation of monoaromatic hydrocarbons in sandy aquifer materials by microbial inoculation using biologically active carbon reactors, Ph.D. Dissertation, The University of Michigan, Ann Arbor, MI, EUA.
- \_\_\_\_\_. 1994a. Influência do receptor de elétrons no tratamento de águas subterrâneas contaminadas por derramamentos de gasolina. *Anais: VI Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Florianópolis, v. I, Tomo II, p. 68-75.
- \_\_\_\_\_. 1994b. Limitações da biomassa autóctone na degradação de compostos tóxicos em solos. *Revista BIO*, Ano III, n. 3, jul./ago., p. 46-56.
- CORSEUIL, H. X. 1994c. Biorremediação acelerada em solos contaminados através da inoculação microbiana. *Revista BIO*, Ano III, n. 4, set./dez., p. 60-67.



- \_\_\_\_\_.; WEBER Jr., W. J. 1993. Enhanced degradation of monoaromatic hydrocarbons in sandy aquifer materials. IAWQ, Third International Conference on Waste Management in the Chemical and Petrochemical Industries, Pre-Prints, v. I, p. 189-195.
- \_\_\_\_\_.; WEBER Jr., W. J. 1994. Potential biomass limitations on rates of degradation of monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils, *Water Research*, 28:1415-1423.
- \_\_\_\_\_.; ALVAREZ, P. J. J. 1996a. Natural bioremediation of aquifer material contaminated with gasoline-ethanol mixtures. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 27(1): 19-26.
- \_\_\_\_\_.. 1996b. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil. Proceedings 18<sup>th</sup> IAWQ Conference Biennial International Conference, Singapore.
- DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. 1979. Rehabilitation of oil-inundated agricultural land: a case history. *Soil Sci.*, 128(56).
- DIXON, M.; WEBB, E. C. 1979. Enzymes. 3. ed. New York: Academic Press. 1.116 p.
- DOLFING, J.; ZEYER, J.; BINDER-EICHER, P.; SCHWARZENBACH, R. P. 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* 154:336-341.
- DUETZ, W. A.; JONG, C. de; WILLIAMS, P. A.; Van ANDEL, J. G. 1994. Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* Strains that use different pathways for the degradation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(8): 2858-2863.
- EDWARDS, E. A.; GRBIC-GALIC, D. 1994. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(1): 313-322.
- \_\_\_\_\_.; WILLS, L. E.; REINHARD, M.; GRBIC-GALIC, D. 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(3): 794-800.
- ENVIRONMENT Canada. A guide to water quality parameter. *Water Quality Sourcebook*, 88 p, 1979.
- EVANS, P. J.; MANG, D. T.; KIM, K. S.; YOUNG, L. Y. 1991a. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(4): 1139-1145.

- \_\_\_\_\_.; MANG, D. T.; YOUNG, L. Y. 1991b. Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(2): 450-454.
- GIBSON, D. T.; SUBRAMANIAN. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. *In: Microbial degradation of organic compounds*. Dekker, New York. p. 181-252
- GOODMAN; GILMAN. 1990. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 8. ed. Guanabara Koogan.
- GRBIC-GALIC, D.; VOGEL, T. M. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(2): 254-260.
- GUIGER, N. 1996. Poluição de águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento, Ontario Waterloo hydrogeologic. 356p.
- HILTON, B. L.; OLESZKIEWICZ, J. A. 1988. Sulfide-induced inhibition of anaerobic digestion. *J. Environ. engineering*, 114: 1377-1391.
- HINCHEE, R. E. 1994. Hydrocarbon bioremediation. Boca Ranton, Lewis. 477p.
- HOLLAENDER, A., DeMOSS, R. D.; KAPLAN S.; KONISKI, J.; SAVAGE, D. and WOLFE, R. 1982 Genetic engineering of microorganisms form chemicals, ed. Plenum Press, New York, N. Y.
- HUFF, J. E.; DEMARINI, D. M.; EUSTIS, S. MARONPOT, R. R.; PETERS, A. C.; PERSING, R. L.; CHRISP, C. E.; JACOBS, A. C. 1989. Multiple-site carcinogenicity of benzene in Fisher 344 rats and B6C3F, mice. *Environ Health Perspect*, 82:125-163.
- HUTCHINS, S. R. 1991. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(8).
- INGRAM, L. O'NEAL, BUTTKE, T. M. 1984. Effects of alcohols on microorganisms. *Advances in microbial Physiology*, 25: 254-290
- JENKINS, R. O.; STEPHENS, G. M.; DALTON, H. 1986. Production of toluene cis-glycol by *Pseudomonas putida* in Glucose fed-batch culture. *Biotec. & Bioeng.*, 29: 873-883.
- KARLSON, J.; FRANKENBERGER Jr., W. T. 1989. Microbial degradation of benzene and toluene in groundwater. *Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 505-510.

- KAZUMI, J.; HÄGGBLUM, M. M.; YOUNG, L. Y. 1995. Degradation of monochlorinated and nonchlorinated aromatic compounds under iron-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(11): 4069-4073.
- KELLEY, I.; CERNIGLIA, C. E. 1991. The metabolism of fluoranthene by a species of *mycobacterium*. *J. Ind. Microbiol.* 7: 19-26.
- KONOPKA, A.; TURCO, R. 1991. Biodegradation of organic compounds in vadose zone and aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(8): 2260-2268.
- LAJOIE, C.A.; CHEN, S. Y.; OH, K. C.; STROM, P. F. 1992. Development and use of field application vectors to express non-adaptive foreign genes in competitive environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 655-663.
- LEE, M. D.; THOMAS, J. M.; BORDEN, R. C.; BEDIENT, P. B.; WILSON, J. T.; WARD, C. H. 1988. Bioremediation of aquifers contaminated with organic compounds. *Issue 1*, 18: 29-89.
- LIU, S.; SUFLITA, J. M. 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Bioremediation*, 11: 344-352.
- MELLO, F. H.; PELIN, E. R. 1984. As soluções energéticas e a economia brasileira. São Paulo: Hucitec, 146 p.
- MEYER, U. 1981. Biodegradation of synthetic organic colorants. *In*: Leisinger T, Hutter R, Cook AM & Nuesch J (Eds) *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds* (pp. 371-385). Academic Press, London.
- MONTENEGRO, M. A. P. Avaliação da comunidade microbiana em reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) submetido a aumentos progressivos da concentração do íon sulfato. 1994. Dissertação (Mestrado-Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- MORMILE, M. R.; LIU, S.; SUFLITA, J.M. 1994. Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates: extrapolation of information to multiple sites and redox conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 28(9).
- NEFF, J. M. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. *Appl. Sci. Publ.*, London.
- NORRIS, R.D. 1993. Handbook of bioremediation. Boca Raton, Lewis. 257p.

- NORRIS, R. D.; HINCHEE, R. E.; BROWN, R.; McCARTY, P. L.; SEMPRINI, L.; WILSON, J. T.; KAMPBELL, D. H.; REINNHARD, M.; BOUWER, J. E.; BORDEN, R. C.; VOGEL, T. M. THOMAS, M. J.; WARD, C. H. 1993. In situ bioremediation of groundwater and geological material: a review of technologies. *EPA*.
- NOVAK, J. T.; GOLDSMITH, C. D.; BENOITT, R. E.; O'BRIAN, J. H. 1984. Biodegradation of alcohols in subsurface systems, in Semin. Prog. Degradation, Retention as Dispersion of Pollutants in Groundwater, Copenhagen, Denmark.
- QUALITY criteria for water. U.S.EPA., Washington. DC 20460, 256 p, 1976.
- RAMADAN, M. A.; EL-TAYEB, O. M.; ALEXANDER, M. 1990. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(5): 1392-1396.
- RENGANATHAN, V.; JOHNSTON, J. B. 1989. Catechols of novel substrates produced using the toluene ring oxidation pathway of *Pseudomonas* sp. strain T-12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 419-424.
- RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D.; CARL, P.; CLARK, D. 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degradation bacteria from a contaminated aquifer., *Applied Environ. Microbiol.*, 56: 3565-3575.
- RISER-ROBERTS, E. 1992. Bioremediation of petroleum contaminated sites. Boca Raton: C. K. Smoley. 264 p.
- ROSTAGNO, H. F. 1996. Benzeno. *Caderno Informativo de Prevenção de Acidentes*. Ano XVII, n. 195.
- SANTOS, R.C.F. dos; MONTENEGRO, M. A. P.; LUZ, L. B.; CORSEUIL, H. X. 1996. Influência do etanol na biodegradação do benzeno em aquíferos contaminados com derramamentos de gasolina. In: 3º Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (SIBESA), Gramado, jun./96.
- SCOW, K. M.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. 1986. Kinetics of mineralization of organic compounds at low concentrations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(5): 1028-1035.
- SHRINER, R. L., FUSON, R. C.; CURTIN, D. Y.; MORRIL, T. C. 1983. Identificação sistemática dos compostos orgânicos. Rio de Janeiro, Guanabara Dois. 520 p.

- SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2): 201-222.
- SPAIN, J. C.; VELD, P. A. V. 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(2): 428-435.
- STUCKI, G.; ALEXANDER, M. 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(2): 292-297.
- SUFLITA, J. M.; HOROWITZ, A.; TIEDJE, J. M. 1982. Dehalogenation: A novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science* 218: 1115-1117.
- THIEM, S. M.; KRUMME, M. L.; SMITH, L. R.; TIEDJE, J. M. 1994. Use of molecular techniques to evaluate the survival of a microorganism injected into an aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(4): 1059-1067.
- WARTH, A. D. 1991. Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*: effects on glycolytic levels, energy production, and intracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3410-3414.
- WEBSTER, J. J., et al. 1985. Determination of microbial cell numbers in subsurface samples. *Ground Water*, 23(17).
- WIGGINS, B. A.; JONES, S. H.; ALEXANDER, M. 1987. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(4): 791-796.
- WILSON, J. T., WARD C. H. 1987. Opportunities for bioreclamation of aquifers contaminated with petroleum hydrocarbons, *J. Ind. Microbiol.*, 27-109
- YOUNG, L. Y.; CERNIGLIA, C. E. 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. New York, John Wiley & Sons. 654p.
- ZEYER, J.; KUHN, E. P.; SCHWARZENBACH, R. P. 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(4): 944-947.