

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Débora Toledo Ramos

**BIOESTIMULAÇÃO DE PROCESSOS METANOGÊNICOS
COM ACETATO DE AMÔNIO PARA DEGRADAÇÃO
ACELERADA DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM
ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADAS COM DIESEL B20**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Dr. Henry Xavier Corseuil
Coorientador: Dr. Márcio Luís Busi da Silva

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ramos, Débora Toledo

Bioestimulação de processos metanogênicos com acetato de amônio para degradação acelerada de hidrocarbonetos de petróleo em águas subterrâneas contaminadas com diesel B20 / Débora Toledo Ramos ; orientador, Henry Xavier Corseuil ; co-orientador, Márcio Luís Busi da Silva. - Florianópolis, SC, 2013.
263 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Acetato. 3. Biodiesel. 4. Bioestimulação. 5. Metanogênese. I. Corseuil, Henry Xavier. II. da Silva, Márcio Luis Busi. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Débora Toledo Ramos

**BIOESTIMULAÇÃO DE PROCESSOS METANOGENICOS
COM ACETATO DE AMÔNIO PARA DEGRADAÇÃO
ACCELERADA DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM
ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADAS COM DIESEL B20**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Engenharia Ambiental” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental.

Florianópolis, 22 de Março de 2013.

Prof. William Gerson Matias, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Henry Xavier Corseuil, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos, Dr.^a
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Marcelo Zaiat, Dr.
Universidade de São Paulo

Prof. Hugo Moreira Soares, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Rejane Helena Ribeiro da Costa, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. William Gerson Matias, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esta tese aos meus queridos pais, Jussara e Joel e ao meu avô, Dino Baptista de Toledo (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Henry Xavier Corseuil, pela oportunidade de ingressar neste grupo de pesquisa, pelo conhecimento, por seu nível de exigência e pelas orientações.

Ao meu coorientador, Márcio Luís Busi da Silva, que me acompanhou desde o início do doutorado, pelo entusiasmo (compartilhado) pela microbiologia, pela capacidade de descomplicar os problemas e estímulo à pesquisa científica.

À Helen Simone Chiaranda, pela parceria, infindáveis discussões sobre biodiesel, por todo o conhecimento que prontamente dividiu comigo e pelas inúmeras orientações e contribuições a este trabalho.

Ao Professor Pedro Alvarez, por ter me recebido durante o Doutorado Sanduíche, por seu comprometimento, admirável profissionalismo, pela atenção e criteriosas correções na elaboração do artigo científico.

Às minhas bolsistas, Renata Martins Pacheco, Débora Yumi de Oliveira e Greice Wolkan, pela seriedade, agilidade e genuíno interesse pelas atividades relacionadas a esta tese.

À equipe REMAS: Marcelo Bento, Luana Borges, Marlon Benincá, Lucas Coelho, Mariana Angeloni, Suhita Ramos, Pilar Serbent, Márcia Farias, Lorena Guimarães, Cássio Schambeck, Ana Schneider, Camila Muller, Karina Joussef, Bruna Vargas, Cristina Nunes, José Carlos de Oliveira e Mário do Rosário por suas contribuições para este trabalho. À Marilda Fernandes, por compartilhar sua experiência com análises químicas em experimentos de campo e pela confiança depositada em mim para realizar as análises cromatográficas. À Melissa Mezzari pelas orientações com as análises de biologia molecular.

Aos meus pais, Jussara e Joel e minha irmã, Elissa, pelo amor, carinho, paciência, generosidade, indescritível apoio e cumplicidade durante as inúmeras dificuldades que enfrentei ao longo do doutorado. Obrigada por tornarem minhas escolhas possíveis!

Ao meu querido avô, Dino Baptista de Toledo (*in memoriam*), a quem presto uma homenagem pelo exemplo de persistência, superação e inabalável otimismo que já faz muita falta para aqueles que tiveram o privilégio de conhecer e conviver.

Ao meu namorado, Luís Filipe Strobel Guimarães, pela paciência (muita!) e por compreender minha ausência e ansiedade patológica durante estes 4 anos.

À Penny Lane, por trazer alegria para a casa e renovar as energias da família.

Aos amigos que tive a grande oportunidade de conhecer na pós-graduação: Wanderli Leite, Jorge Tavares, Tiago Belli, Tiago Vítor Akaboci, Jamile Wagner, Pilar Serbent, Karina Joussef, Cristiane Maria de Leis, Isabela Bonatto e Hugo Rohden. Em especial, agradeço aos queridos amigos Lorena Guimarães, Cássio Schambeck, Guilherme Zanghelini e Edivan Cherubini pela cumplicidade, inesquecíveis momentos de descontração e amizade nas diferentes fases do curso.

Por fim, agradeço minhas companheiríssimas “nanoamigas” Juliana Muller e Franciele Fedrizzi, pelo privilégio da convivência dentro e fora do departamento, por compreenderem meu mau humor e impaciência (sempre justificados!) e, principalmente pela amizade de vocês que contribuiu muito para minimizar a “solidão do doutorando” e para a finalização desta etapa da minha vida.

*“See first that the design is wise and just, that
ascertained, pursue it resolutely, do not for
one repulse forego the purpose that
you resolved to effect”.*

William Shakespeare

RESUMO

O estímulo à utilização de biocombustíveis como biodiesel, fomentado pelos riscos ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis, faz com que aumente a incidência de contaminações com este biocombustível e torna necessário o desenvolvimento de tecnologias de remediação específicas. Para tanto, um experimento de campo foi conduzido para avaliar o potencial da bioestimulação anaeróbia na aceleração da degradação dos compostos presentes na mistura B20 (20% biodiesel de soja e 80% diesel v/v). Foram liberados 100L de B20 diretamente sobre lençol freático em uma área de 1m² rebaixada até 1,7m de profundidade. Um mês após a liberação, injeções semanais de acetato de amônio foram conduzidas na área experimental, com duração de 1,25 anos, para promover a estimulação da biomassa total e micro-organismos específicos. Condições anaeróbias foram estabelecidas pela presença do B20 e do acetato de amônio, tendo sido a metanogênese o processo predominante e de maior contribuição para a degradação dos compostos do B20, especialmente dos aromáticos. Limitações termodinâmicas foram impostas pelo acúmulo de metabólitos de degradação (acetato e hidrogênio) produzidos, em um primeiro momento, pela degradação preferencial dos ésteres de biodiesel, resultando no retardo da degradação dos BTEX e HPAs. Porém, micro-organismos específicos foram estimulados pela introdução de acetato de amônio, incluindo gêneros associados a processos sintróficos e à degradação anaeróbia de compostos aromáticos, tendo sido capazes de consumir os metabólitos que se acumularam no sistema, superando as limitações termodinâmicas e culminando na rápida degradação dos BTEX e HPAs (em 0,7 e 1,0 ano, respectivamente), quando comparada a processos de atenuação natural. Portanto, a bioestimulação metanogênica demonstrou acelerar a degradação dos compostos presentes no B20, podendo ser considerada para remediação de aquíferos contaminados com este biocombustível, especialmente em regiões próximas à fonte de contaminação que possuem maior propensão à anaerobiose e inviabilizam a aplicação de técnicas aeróbias de remediação.

Palavras-chave: Acetato; Biodiesel; Bioestimulação; BTEX; HPA; Metanogênese.

ABSTRACT

Environmental concerns associated with fossil fuels have encouraged the use of renewable fuels, such as biodiesel. The increasing use of biodiesel can lead to a higher frequency of groundwater contamination by accidental releases, which motivates the development of specific strategies for remediation of this biofuel. Therefore, a field experiment was conducted to assess the potential for anaerobic biostimulation to enhance biodiesel blends B20 (20% soybean biodiesel and 80% diesel v/v) biodegradation under methanogenic conditions in groundwater. B20 (100L) was released in the groundwater and after one month, ammonium acetate was added weekly over 1.25 years, to promote stimulation of total biomass and putative anaerobic degraders. Anaerobic conditions were developed by the presence of B20 and ammonium acetate addition. Methanogenesis predominated over time and greatly contributed to the remediation of B20 compounds degradations, especially BTEX and PAHs. Thermodynamic constraints were established by acetate and hydrogen accumulation to inhibitory thresholds, which were, at first, possibly produced by biodiesel preferential degradation, leading to a transient decrease in aromatic compounds consumption. However, biostimulation fortuitously enhanced the growth of putative anaerobic BTEX degraders and associated commensal microorganisms that consume acetate and H₂ and were able to offset this negative effect as acetate and hydrogen were consumed below inhibitory thresholds, enhancing the thermodynamic feasibility of aromatic compounds degradation, which is conducive to faster degradation rates, as observed by BTEX and PAH degradation at 0.7 and 1.0 years after the release, respectively. Overall, this study demonstrated the potential for stimulating anaerobic methanogenic conditions to enhance the cleanup of groundwater contaminated with biodiesel blends (B20), and suggests that this approach should be considered for source zone bioremediation when the high BOD encountered at these contaminated sites makes aerobic biostimulation unfeasible.

Keywords: Acetate; Biodiesel; Biostimulation; BTEX; PAH; Methanogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1. A evolução dos biocombustíveis no Brasil.....	2
FIGURA 5.1. Reação de transesterificação de triglicerídeos com álcool.	9
FIGURA 5.2. Estrutura química de hidrocarbonetos do grupo BTEX..	14
FIGURA 5.3. Principais HPAs recomendados para monitoramento. ...	16
FIGURA 5.4. Representação esquemática da degradação anaeróbia de compostos orgânicos.....	26
FIGURA 5.5. Estágios da reação de beta oxidação de ácidos graxos..	32
FIGURA 5.6. Rota metabólica de degradação de compostos monoaromáticos em condições anaeróbias, convergindo na produção do metabólito benzoil-CoA.....	35
FIGURA 5.7. Mecanismo de degradação proposto para a biotransformação anaeróbia do fenantreno.....	37
FIGURA 5.8 Mecanismo de degradação (via carboxilação) proposto para a biotransformação anaeróbia do naftaleno.	38
FIGURA 6.1 - Localização da Fazenda Experimental da Ressacada, visualização da área experimental e poço de monitoramento com identificação dos diferentes níveis de profundidade pelas cores amarelo, azul, verde, vermelho e preto.	43
FIGURA 6.2. (A) Dimensões, distância entre poços de monitoramento da área experimental; (B) profundidade dos níveis de coleta representados pelo corte transversal A – A'.....	44
FIGURA 6.3 (A) Área onde foi realizada a liberação controlada da mistura B20, com 1m ² e profundidade de 1,7m; (B) cobertura da área com solo original após liberação do B20; (C) cobertura da área escavada com lona e brita.	46
FIGURA 6.4. (A) Localização dos piezômetros utilizados para medição do nível do lençol freático ao redor da área experimental (destacada em preto). (B) Monitoramento da pluviometria e do nível do lençol freático até o momento da liberação controlada do B20 (destacada em cinza).	47
FIGURA 6.5 Sondagens na região de fonte e PM28 da área experimental, com destaque para camada argilosa presente na fonte de contaminação (profundidade de 1,00 – 1,66m).	48

FIGURA 6.6. (A) Sistema de injeção de acetato de amônio com tubos de PVC contendo 1L da solução de acetato de amônio, previamente preparada no barrilete e conectada às mangueiras diferenciadas por cores e correspondentes aos diferentes níveis de profundidade. (B) Localização dos poços de injeção e da fonte de contaminação.....	52
FIGURA 6.7. Área experimental e poços selecionados para a caracterização da área destacados em vermelho.....	58
FIGURA 6.8. Amostrador passivo utilizado na análise de H ₂ dissolvido em água subterrânea.	65
FIGURA 6.9. Sistema de filtração a vácuo para amostras de água subterrânea.....	67
FIGURA 6.10 Representação esquemática do princípio da técnica de pirosequenciamento com as enzimas envolvidas no processo – polimerase (azul), apirase (rosa), luciferase (amarelo) e sulfurilase (verde).....	73
FIGURA 7.1. Localização da área experimental (em vermelho) e piezômetros (em branco) utilizados para as medições do nível do lençol freático e para avaliar a direção do fluxo.	75
FIGURA 7.2. Representação do perfil litológico da área experimental na região da fonte e PM28.....	76
FIGURA 7.3. Difratoograma de raios-X das amostras da área experimental.	80
FIGURA 7.4. Representação da área experimental com destaque (em vermelho) para os poços de monitoramento selecionados para demonstração dos resultados.	89
FIGURA 7.5. Concentrações de oxigênio (A, B e C) e potencial de oxidação-redução (D, E e F) ao longo do tempo nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 (níveis 2 e 6m)..	93
FIGURA 7.6. Faixas de valores de pH (A, B e C) e temperatura (°C) (D, E e F) ao longo do tempo nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 (níveis 2 e 6m).....	94
FIGURA 7.7. Concentrações de nitrato (A, B, C), nitrito (D, E, F) e Fe ²⁺ (G, H, I) nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 ao longo do tempo.	96
FIGURA 7.8. Concentrações de sulfato (A, B, C), sulfeto (D, E, F) e metano (G, H, I) nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 ao longo do tempo.....	97

FIGURA 7.9. Concentrações de acetato (A, B, C), BTEX (D, E, F) e HPAs (G, H, I) nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 ao longo do tempo.....	98
FIGURA 7.10. Acetato consumido na fonte de contaminação por diferentes processos de oxidação e redução, ao longo do tempo.	107
FIGURA 7.11. Acetato consumido no PM9 (A) e PM15 (B) por diferentes processos de oxidação e redução, ao longo do tempo.	109
FIGURA 7.12. Concentração de bactérias totais (A), ferro-redutoras (B), sulfato-redutoras (C) e arqueas (D) na fonte de contaminação, níveis 2 e 6m.....	111
FIGURA 7.13. Concentração de bactérias totais (A), ferro-redutoras (B), sulfato-redutoras (C) e arqueas (D) no PM9, níveis 2 e 6m.	112
FIGURA 7.14. Concentração de bactérias totais (A), ferro-redutoras (B), sulfato-redutoras (C) e arqueas (D) no PM15, níveis 2 e 6m.	113
FIGURA 7.15. Relação entre a concentração microbiana na Fonte, PM9 e PM15 (níveis 2 e 6m) e concentração dos BTEX e acetato, ao longo do tempo.	117
FIGURA 7.16. Variações das comunidades de bactérias e arqueas (em nível de filo) na fonte de contaminação, ao longo do tempo.	121
FIGURA 7.17. Variações das comunidades de bactérias (em nível de gênero) na fonte de contaminação, ao longo do tempo, com destaque (em cinza) para os gêneros mais abundantes.	124
FIGURA 7.18. Variações das comunidades de arqueas (em nível de gênero) na fonte de contaminação, ao longo do tempo..	129
FIGURA 7.19. Abundância relativa dos gêneros microbianos predominantes e, possivelmente em relações sintróficas, encontrados na área experimental ao longo do tempo. ...	134
FIGURA 7.20. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio na fonte de contaminação, nível = 2m.	144
FIGURA 7.21. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio na fonte de contaminação, nível 6m.	146

FIGURA 7.22. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio na fonte de contaminação, nível 2m.....	147
FIGURA 7.23. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio na fonte de contaminação, nível = 6m.....	148
FIGURA 7.24. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM9, nível = 2m.....	149
FIGURA 7.25. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM9, nível = 6m.....	150
FIGURA 7.26. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM9, nível = 2m.....	151
FIGURA 7.27. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM9, nível = 6m.....	152
FIGURA 7.28 Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM15, nível = 2m.....	154
FIGURA 7.29. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM15, nível = 6m.....	155
FIGURA 7.30. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM15, nível = 2m.....	156
FIGURA 7.31. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM15, nível = 6m.....	157

FIGURA 7.32. Concentração de bactérias totais, ferro-redutoras, sulfato-redutoras e arqueas, na fonte de contaminação (níveis 2 e 6m) do experimento de atenuação natural (A e B) e bioestimulação (C e D).	161
FIGURA 7.33. Concentração de BTEX e HPAs (mg.L^{-1}) na fonte de contaminação, níveis 2 e 6m, no experimento de atenuação natural (A e B) e bioestimulação (C e D), ao longo do tempo.	162
FIGURA 7.34. Concentração de benzeno ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na fonte de contaminação, níveis 2 e 6m, nos experimentos de atenuação natural e bioestimulação, ao longo do tempo.	163

LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1. Percentual de ácidos graxos provenientes de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel.....	15
TABELA 5.2. Composição química do biodiesel puro de soja e mamona.	15
TABELA 5.3. Propriedades físico-químicas dos principais ésteres metílicos presentes no biodiesel de soja.	13
TABELA 5.4. Tipos de hidrocarbonetos presentes no óleo diesel.....	14
TABELA 5.5. Propriedades físico-químicas dos principais hidrocarbonetos presentes na composição do diesel.....	17
TABELA 5.6. Potencial de Rendimento de Energia em Diferentes Processos de Oxidação.	22
TABELA 5.7. Espécies de micro-organismos e substratos utilizados para a metanogênese.	27
TABELA 5.8. Reações envolvidas no processo de biodegradação do biodiesel, representadas pela degradação do AGLC oleato	31
TABELA 5.9. Bactérias degradadoras de AGCL, micro-organismos em simbiose e AGCL utilizado.	33
TABELA 5.10. Programação de Temperatura do Forno para Análises de BTEX, metano, HPAs e AOVs.....	62
TABELA 5.11. Tipos e sequências de oligonucleotídeos dos iniciadores utilizados nas análises de biologia molecular pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	70
TABELA 7.1. Análises granulométricas das camadas de solo coletadas na área experimental e apresentadas na Figura 7.2.....	77
TABELA 7.2. Resultado de análise de teor de matéria orgânica e carbono orgânico do solo.....	78
TABELA 7.3. Valores da superfície específica e capacidade de troca catiônica de minerais (argilominerais e areias).....	79
TABELA 7.4. Análise da concentração de micro e macronutrientes do solo.	82
TABELA 7.5. Resultado de Análise de Variáveis Físico-Químicas e Geoquímicas do Aquífero.....	85
TABELA 7.6. Resultado da caracterização microbiológica da água subterrânea.....	94
TABELA 7.7. Períodos das campanhas de monitoramento realizadas neste experimento.	88

TABELA 7.8. Reações de oxidação-redução via respiração aeróbia do íon palmitato, compostos BTEX e acetato.	99
TABELA 7.9. Reações de oxidação de acetato com os balanços estequiométricos do processo via respiração aeróbia, nitrato-redução, ferro-redução, sulfato-redução e metanogênese.	105
TABELA 7.10. Testes estatísticos com estimadores de abundância e índices de diversidade encontrados nas amostras de bactérias e arqueas, em diferentes períodos amostrais ..	123
TABELA 7.11. Reações de degradação anaeróbia de benzeno e naftaleno, via oxidação sintrófica do acetato e rotas metanogênicas com seus respectivos valores ΔG° de reação.	151
TABELA 7.12. Rotas acidogênicas representadas pelo consumo de propionato e butirato para produção de acetato e hidrogênio.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT –	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACE –	<i>Abundance-based Coverage Estimator</i>
AGCL –	Ácidos graxos de cadeia longa
ANP –	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOVs	Ácidos orgânicos voláteis
ASTM –	<i>American Society for Testing Materials</i>
ATP –	Adenosina trifosfato
ADP –	Adenosina difosfato
ATSDR –	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
B20 –	Biocombustível composto pela mistura de diesel (80%) e biodiesel (20%), em volume
BFR –	Bactérias ferro-redutoras
BSR –	Bactérias sulfato-redutoras
BTEX –	Hidrocarbonetos monoaromáticos: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (orto, meta e para-xileno)
CIDASC –	Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
CO	Carbono orgânico
CoA –	Co-enzima A
CONAMA –	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CQFS –	Comissão Química de Fertilidade do Solo
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
EPA –	<i>Environmental Protection Agency</i>
FID –	Detector de Ionização de Chama (do inglês, <i>Flame Ionization Detector</i>)
HPAs –	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
ICS –	Cromatógrafo de íons (do inglês, <i>Ion Chromatography System</i>)
LNAPL –	Líquido leve de fase não aquosa (do inglês, <i>light non-aqueous phase liquids</i>)
MO	Matéria orgânica

NAPL	Líquido de fase não aquosa (do inglês, <i>non-aqueous phase liquids</i>)
NBR –	Norma Brasileira
OSA –	Oxidação sintrófica do acetato
PAH –	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
PI	Poço de injeção
PM	Poço de monitoramento
PMF	Poço de monitoramento fonte de contaminação
POR –	Potencial de oxidação e redução
PVC –	Policloreto de vinila
RT-qPCR –	Reação em cadeia da polimerase, quantitativo e em tempo real (do inglês, <i>Real time - quantitative polymerase chain reaction</i>)
SBCS –	Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
SDS –	Detergente aniônico (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPE –	Extração em fase sólida (do inglês, <i>Solid phase extraction</i>)
sp. –	Nomenclatura para designar uma espécie (singular)
spp. –	Nomenclatura para designar várias espécies (plural)
TCD –	Detector de condutividade térmica (do inglês, <i>Thermal Conductivity Detector</i>)
TGSC –	The Good Scent Company
TOXNET –	<i>Toxicology Data Network</i>
UFMT –	Universidade Federal de Mato Grosso
US EPA –	<i>United States – Environmental Protection Agency</i>
v/v –	Relação volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	JUSTIFICATIVAS	6
3	HIPÓTESE	7
4	OBJETIVOS	8
4.1	OBJETIVO GERAL.....	8
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
5	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
5.1	BIODIESEL	9
5.2	DIESEL	13
5.3	BIODEGRADAÇÃO	18
5.3.1	Biodegradação Anaeróbia.....	21
5.3.2	Sintrofia	28
5.4	BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO BIODIESEL.....	30
5.5	BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS	34
5.6	BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	36
5.7	INFLUÊNCIA DO BIODIESEL SOBRE A DEGRADAÇÃO DO DIESEL	38
5.8	TECNOLOGIAS DE REMEDIAÇÃO	39
6	MATERIAIS E MÉTODOS	41
6.1	ÁREA EXPERIMENTAL.....	41
6.2	LIBERAÇÃO CONTROLADA DO B20	45
6.3	CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE BIOESTIMULAÇÃO COM ACETATO DE AMÔNIO	49
6.4	CARACTERIZAÇÃO HIDROGEOLÓGICA	53
6.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO AQUÍFERO	57

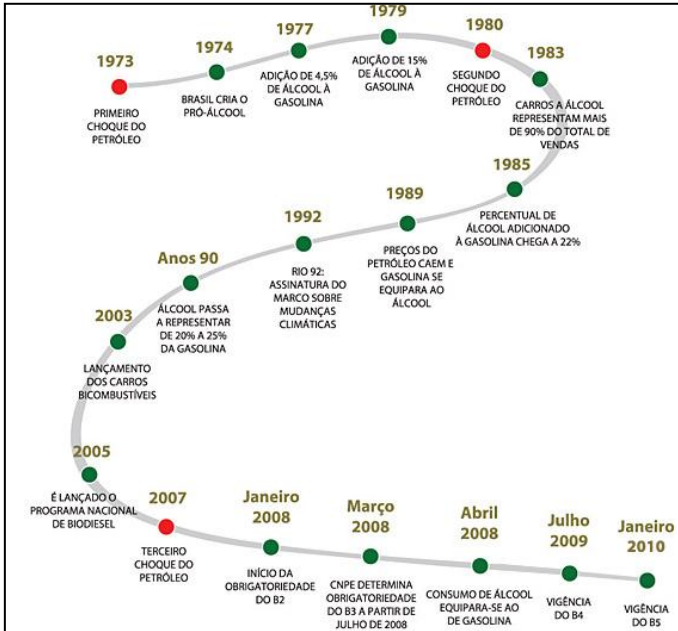
6.5.1	Amostragens e Determinações Físico-Químicas	59
6.5.2	Amostragem e Análise de Hidrogênio (H ₂) Dissolvido em Água Subterrânea	63
6.5.3	Amostragens e Análises Microbiológicas	65
6.5.4	Análise de Sequenciamento de DNA (Pirosequenciamento)	71
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
7.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ORIGINAIS DO SOLO E DA ÁGUA SUBTERRÂNEA	74
7.1.1	Caracterização Hidrogeológica do Aquífero	74
7.1.2	Caracterização Físico-Química da Água Subterrânea	83
7.1.3	Caracterização Microbiológica da Água Subterrânea	86
7.2	ALTERAÇÕES GEOQUÍMICAS NA ÁGUA SUBTERRÂNEA APÓS A LIBERAÇÃO DO B20 E INJEÇÕES DE ACETATO DE AMÔNIO	88
7.3	INVESTIGAÇÃO DA ESTIMULAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL E MICRO-ORGANISMOS ESPECÍFICOS ASSOCIADOS À DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO E PROCESSOS SINTRÓFICOS.....	110
7.3.1	Monitoramento das Variáveis Microbiológicas.....	110
7.3.2	Análise de Sequenciamento de DNA (Pirosequenciamento).....	119
7.4	AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES TERMODINÂMICAS IMPOSTAS PELO ACÚMULO DE METABÓLITOS DE DEGRADAÇÃO DO B20.....	136
7.4.1	Avaliação das limitações termodinâmicas e cinéticas das reações de degradação do benzeno e naftaleno na fonte de contaminação.....	143
7.4.2	Avaliação das limitações termodinâmicas e cinéticas das reações de degradação do benzeno e naftaleno no PM9.....	148
7.4.3	Avaliação das limitações termodinâmicas e cinéticas das reações de degradação do benzeno e naftaleno no PM15.....	153
7.5	AVALIAÇÃO DA BIOESTIMULAÇÃO COM ACETATO DE AMÔNIO NA DEGRADAÇÃO ACELERADA DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS COMPARADO À ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA	159

8	CONCLUSÕES.....	165
9	RECOMENDAÇÕES.....	168
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
	APÊNDICE A – Cálculos Elaborados para Determinação do Consumo de Acetato Via Diferentes Processos Redox	207
	APÊNDICE B – Cálculos Elaborados para Determinação do Consumo de Oxigênio e Produção de Nitrato Via Oxidação Completa do Íon Amônio (NH ₄ ⁺) no PM15.....	211
	APÊNDICE C – Cálculos Termodinâmicos Elaborados para as Diferentes Reações de Degradação nas Condições Padrão	212
	APÊNDICE D – Cálculos Elaborados nas Condições Ambiente para Verificação da Viabilidade Termodinâmica das Reações de Degradação do Benzeno e Naftaleno	214
	APÊNDICE E – Cálculos Elaborados para Quantificação de Micro-Organismos na Curva de Calibração e nas Amostras de Água Subterrânea.....	216
	ANEXO A - LAUDO ANALÍTICO DO BIODIESEL DE SOJA.....	219
	ANEXO B - FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO (FISPQ) - DIESEL.....	220

1 INTRODUÇÃO

A utilização de combustíveis fósseis na matriz energética mundial está se tornando um problema do ponto de vista ambiental e econômico, visto que sua disponibilidade vem reduzindo ao longo do tempo e, considerando que os custos associados a sua comercialização estão aumentando consideravelmente, torna-se cada vez mais inviável a sua utilização. Estas questões estimulam a busca por combustíveis alternativos e, a fim de reduzir a dependência que existe atualmente por combustíveis fósseis, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para produzir combustíveis renováveis a partir de matérias-primas de origem vegetal como, por exemplo, a cana de açúcar, soja, mamona, milho, entre outras, as quais podem ser utilizadas para produção de etanol e biodiesel. Portanto, assim como ocorreu com a introdução do etanol na matriz energética brasileira, chegando ao percentual de 20 a 25% de etanol na mistura da gasolina já na década de 90, o mesmo perfil comportamental vem ocorrendo com o biodiesel (FIGURA 1). No ano de 2005, o biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira (Lei 11.097) e desde 2010 vem sendo adicionado o percentual de 5% de biodiesel ao diesel (ANP, 2011). As projeções do cenário para os próximos anos sugerem que até o ano de 2014 entre em vigor a mistura B10 e, em 2020, passe a ser utilizada a mistura B20, uma vez que o Brasil está demonstrando possuir potencial e estrutura para atender a esta demanda do mercado. Com a crescente demanda que já vem sendo observada e, baseando-se nas projeções de cenários futuros com relação à utilização do biodiesel, é esperado um aumento da incidência de contaminações com este biocombustível em virtude de derramamentos acidentais durante as etapas de produção, transporte, distribuição e utilização.

FIGURA 1. 1. A evolução dos biocombustíveis no Brasil.



FONTE: ANP, 2011.

O biodiesel é um combustível renovável obtido através de fontes orgânicas, como óleos vegetais ou gordura animal. É produzido principalmente através da transesterificação do óleo ou da gordura. As propriedades físico-químicas do biodiesel são semelhantes às do diesel e, portanto, pode substituí-lo total ou parcialmente (PASQUALINO et al., 2006). Utilizado na formulação de diversas misturas, do B2 (2% de biodiesel e 98% de diesel) ao B100 (100% biodiesel), a grande vantagem da utilização do biodiesel em comparação ao diesel, deve-se ao fato de ser um produto renovável, possuir uma maior disponibilidade no ambiente, concentrações inferiores de enxofre e compostos aromáticos (em virtude da diminuição do percentual de diesel) e, também, pelo fato de ser biodegradável quando comparado aos combustíveis fósseis. O biodiesel se mistura facilmente com diesel, em virtude de ambos possuírem natureza hidrofóbica e outras propriedades físico-químicas semelhantes, o que viabiliza a utilização de misturas de diesel e biodiesel como combustível. Assim, a incorporação de biodiesel

à composição do diesel vem sendo adotada cada vez mais em diferentes países como Estados Unidos da América, Malásia, Indonésia, Brasil, Alemanha, França, Itália, entre outros países europeus. Nos Estados Unidos, a mistura B20 (diesel 80% / biodiesel 20% v/v) tem sido uma opção muito popular nos postos de combustíveis, enquanto que na França a mistura B30 tem sido mais utilizada em virtude da capacidade de redução de emissões atmosféricas (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). A maioria dos veículos é capaz de utilizar a mistura B20 sem ou com pouca necessidade de modificações no motor. Um dos critérios considerados na escolha da matéria-prima vegetal utilizada nas misturas de diesel e biodiesel é a viscosidade, uma vez que esta propriedade pode provocar danos aos motores e falhas na performance de combustão. A viscosidade do óleo vegetal varia de acordo com a matéria-prima utilizada, i.e., a viscosidade do óleo de mamona ($13,5 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (ALBUQUERQUE et al., 2009) é consideravelmente superior à da soja ($3,97 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (ALPTEKIN e CANAKCI, 2008), o que faz com que haja uma preferência pela utilização de biodiesel de soja em relação ao de mamona.

A utilização de misturas de diesel e biodiesel representa uma série de vantagens, como o fato de ser mais biodegradável, reduzir os teores de BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos) e HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), os quais estão presentes no diesel, minimizar as emissões atmosféricas, principalmente aquelas relacionadas ao enxofre (NATIONAL STANDARD FOR BIODIESEL, 2003; PASQUALINO et al., 2006), além de estabelecer um equilíbrio entre o desenvolvimento agrícola, econômico e ambiental (MEHER et al., 2006; MURUGESAN et al., 2009). Embora o biodiesel ainda enfrente resistências em virtude de seu valor de mercado, atualmente os governos estão fornecendo subsídios para viabilizar sua utilização em misturas de diesel e biodiesel e assim estimular seu consumo (MURUGESAN et al., 2009).

Segundo o Anuário Estatístico de 2012 elaborado pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), o Brasil conta com 39.027 postos de combustíveis, sendo que somente na região sul do país há 8.032 postos. Tendo conhecimento do número de postos de combustíveis no Brasil e, sabendo-se que muitos destes postos possuem tanques de armazenamento que podem conter rachaduras causadas por processos de corrosão, resultando no derramamento de combustíveis na água subterrânea, o problema torna-se ainda mais grave já que a probabilidade e incidência de derramamento de combustíveis ou biocombustíveis aumentam significativamente (CORSEUIL e

MARINS, 1997). Existem milhares de tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis que, mesmo em uso ou abandonados, podem representar uma ameaça à qualidade das águas subterrâneas. Estima-se que os postos de combustíveis podem perder aproximadamente 11 milhões de galões por ano de combustíveis devido aos vazamentos existentes nos tanques de armazenamento (RISER-ROBERTS, 1992). Estes fatos evidenciam a necessidade de tecnologias de remediação capazes de rapidamente promover a atenuação destes contaminantes na água subterrânea.

A remediação pode ser feita pela aplicação de tecnologias de remediação específicas para cada contaminante e para as condições geoquímicas da área afetada. Em locais onde há disponibilidade de nutrientes e receptores de elétrons, a utilização da técnica de remediação passiva, como a atenuação natural monitorada, pode ser considerada como uma alternativa viável (WIEDEMEIER, 1999a). No entanto, em locais onde a disponibilidade desses é limitada e o cenário não é favorável, tecnologias de remediação ativa podem superar as limitações existentes na área impactada, seja pela introdução de receptores de elétrons termodinamicamente mais favoráveis ou pelo fornecimento de nutrientes.

Em virtude da crescente introdução de misturas de diesel e biodiesel na matriz energética brasileira e, considerando que há probabilidade de entrarem em contato com a água subterrânea por meio de derramamentos, o desenvolvimento de tecnologias específicas para remediação destes contaminantes torna-se necessário para a recuperação de áreas impactadas por estes biocombustíveis. Para que seja possível aplicar e desenvolver tecnologias adequadas para remediação de misturas de diesel e biodiesel especificamente, é importante estudar o comportamento destas misturas no ambiente subsuperficial, bem como as mudanças geoquímicas resultantes de sua introdução no sistema e os fatores que podem influenciar nos processos de degradação dos contaminantes, já que estas informações podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para otimizar os processos de remediação e acelerar a degradação dos contaminantes presentes no ambiente impactado.

No caso de derramamentos contendo biocombustíveis, em virtude de sua estrutura química mais suscetível ao ataque microbiano, a presença de biodiesel ou etanol pode retardar a degradação dos compostos aromáticos (CORSEUIL et al., 1996; POWERS et al., 2001; RUIZ-AGUILAR et al., 2003; CORSEUIL et al., 2004; MACKAY et

al., 2006; CHIARANDA, 2011; CORSEUIL et al., 2011a; CORSEUIL et al., 2011b), por ser preferencialmente degradado. Quando ocorrem derramamentos em águas subterrâneas com biocombustíveis, a alta demanda bioquímica de oxigênio, exercida pela presença de biodiesel ou etanol em misturas com combustíveis fósseis, faz com que zonas anaeróbias se desenvolvam no local afetado (MACKAY et al., 2006; FERIS et al., 2008; CORSEUIL et al. 2011b). Para uma mesma massa liberada, a demanda bioquímica de oxigênio exercida pelo biodiesel é duas vezes maior do que a demanda exercida pelo etanol (GOMES, 2008), fazendo com que condições metanogênicas predominem em áreas contaminadas com estes biocombustíveis (DA SILVA et al., 2005; MACKAY et al., 2006; FREITAS et al., 2010; CORSEUIL et al., 2011a). Embora a degradação de compostos aromáticos do diesel possa ocorrer em condições metanogênicas (GRBIC-GALIC e VOGEL, 1987; WEINER e LOVLEY 1998; ULRICH e EDWARDS 2003; REINHARD et al. 2005) estes processos costumam ser mais lentos, o que faz com que a maioria dos estudos foque em processos termodinamicamente mais favoráveis. Porém, técnicas aeróbias de degradação podem não ser viáveis nestas condições, uma vez que a alta demanda bioquímica de oxigênio exercida pelos combustíveis pode dificultar a manutenção destas condições geoquímicas no meio. Portanto, a aplicação de estratégias anaeróbias pode ser mais adequada para a remediação de áreas contaminadas com misturas de diesel e biodiesel.

2 JUSTIFICATIVAS

1) O estímulo à utilização de biocombustíveis como biodiesel, fomentado pelos riscos ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis e pela redução de sua disponibilidade ao longo dos anos, faz com que aumente o risco de derramamentos de misturas de biodiesel e diesel. Para tanto, é necessário o estudo e desenvolvimento de tecnologias de remediação ativa, específicas para derramamentos deste biocombustível em águas subterrâneas.

2) A alta demanda bioquímica de oxigênio exercida pela presença de biocombustíveis, como biodiesel, faz com que condições fortemente anaeróbias (metanogênicas) sejam estabelecidas, sugerindo que aquíferos impactados por estes combustíveis possuam tendência a entrar em metanogênese. Apesar de a biodegradação dos BTEX em condições anaeróbias ser um processo mais lento e exigir a presença de microorganismos específicos, técnicas aeróbias de remediação não são universalmente aplicáveis, uma vez que a alta demanda bioquímica de oxigênio inviabiliza sua utilização por demandar a constante injeção de oxigênio ao aquífero e, pela grande produção de biomassa resultar na colmatação do solo e dificultar sua propagação no meio líquido. Portanto, torna-se relevante o estudo e desenvolvimento de tecnologias anaeróbias para remediação de aquíferos impactados com misturas de diesel e biodiesel (B20), especialmente em regiões próximas à fonte de contaminação, onde existe uma maior propensão à anaerobiose.

3) Não existe na literatura dados sobre a estimulação de processos metanogênicos para acelerar os processos de atenuação de hidrocarbonetos de petróleo em experimentos de campo com misturas de diesel e biodiesel. Assim, o tema do presente estudo irá contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de remediação específica que poderá ser aplicada em eventos reais de derramamentos com misturas B20 em águas subterrâneas.

3 HIPÓTESE

Considerando o comportamento de misturas de diesel e biodiesel (B20) na água subterrânea e a influência da bioestimulação metanogênica com acetato de amônio, a seguinte hipótese foi formulada:

A introdução da mistura B20 e o início das injeções de acetato de amônio farão com que condições metanogênicas sejam estabelecidas na água subterrânea. Nos processos de degradação anaeróbia dos compostos do B20, o biodiesel será preferencialmente consumido, produzindo acetato e hidrogênio como metabólitos e, o acúmulo destes, poderá inibir as reações de degradação dos BTEX e HPAs por razões termodinâmicas. No entanto, esta inibição pode ser superada pela ação de micro-organismos específicos (estimulados pela adição de acetato de amônio) que, atuando em cooperações sintróficas, irão consumir os metabólitos de degradação (acetato e hidrogênio) e ao impedir que estes se acumulem no meio, a degradação dos BTEX e HPAs poderá proceder. Portanto, a estimulação destas comunidades microbianas irá culminar na aceleração do processo de degradação dos BTEX e HPAs.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial da bioestimulação metanogênica com acetato de amônio para aceleração da degradação de hidrocarbonetos de petróleo (BTEX e HPAs), presentes em águas subterrâneas contaminadas com misturas de diesel e biodiesel de soja (B20).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para avaliar a influência da bioestimulação metanogênica com acetato de amônio na aceleração da degradação dos compostos BTEX e HPAs, os seguintes objetivos específicos foram formulados:

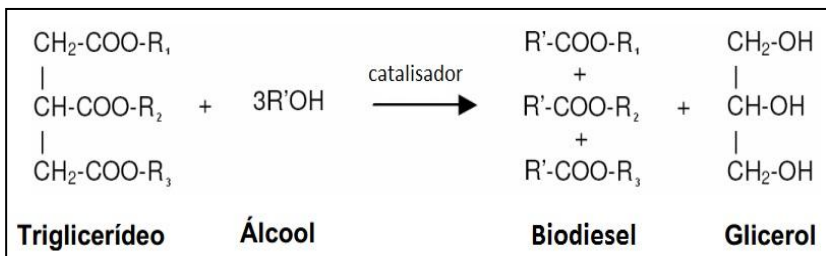
- ✓ Avaliar as alterações geoquímicas no ambiente subterrâneo, causadas pela liberação controlada do biocombustível (B20) e pelas injeções de acetato de amônio, realizadas para promover a bioestimulação metanogênica.
- ✓ Investigar se micro-organismos específicos, associados à degradação anaeróbia de hidrocarbonetos de petróleo e processos sintróficos foram estimulados pela bioestimulação metanogênica.
- ✓ Avaliar se as limitações termodinâmicas, impostas pelo acúmulo de metabólitos de degradação, foram superadas pela existência de cooperações sintróficas entre micro-organismos.
- ✓ Avaliar se a adição de substrato orgânico (acetato de amônio) beneficiou a degradação de hidrocarbonetos de petróleo (BTEX e HPAs), quando comparado à técnica de atenuação natural monitorada.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 BIODIESEL

O biodiesel é um combustível renovável obtido através de fontes orgânicas como óleos vegetais ou gordura animal. Entre as matérias-primas utilizadas para obtenção de biodiesel estão: soja, mamona, girassol, amendoim, gergelim, canola, dendê, algodão, babaçu e etc. O biodiesel é produzido principalmente através da transesterificação de óleos ou de gorduras, a qual se trata de uma reação química entre triglicerídeos e álcool na presença de um agente de catálise (FIGURA 5.1). A transesterificação consiste em uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis onde os triglicerídeos são convertidos a diglicerídeos e estes então são convertidos a monoglicerídeos, seguidos da conversão a glicerol. Em cada passo ocorre produção de um éster, então três moléculas de ésteres são produzidas a partir de uma molécula de triglicerídeo. A reação de transesterificação requer um agente de catálise como, por exemplo, NaOH ou KOH, para melhorar o rendimento e a velocidade da reação. Esta reação faz com que a viscosidade do biodiesel seja reduzida de maneira a torná-la semelhante à viscosidade do diesel, viabilizando sua aplicação em veículos com motor a diesel (DEMIRBAS, 2009).

FIGURA 5.1. Reação de transesterificação de triglicerídeos com álcool.



FONTE: Adaptado de LEUNG et al. (2006).

O biodiesel é composto por diferentes ésteres de ácidos graxos e, o percentual destes irá variar dependendo da matéria-prima vegetal utilizada. A composição destes ácidos graxos tem influência direta sobre as características do combustível, uma vez que diferentes ésteres de ácidos graxos possuem propriedades físico-químicas distintas (KNOTHE, 2005). Para representar os diferentes ésteres de ácidos graxos, utiliza-se o número total de átomos de carbonos na estrutura do composto e o número de insaturações (SCRIMGEOUR, 2005; GERPEN et al., 2004), i.e., o ácido oléico possui 18 átomos de carbono e uma insaturação (18:1). Estudos de caracterização dos ésteres do biodiesel revelam perfis diferentes destes compostos de acordo com a matéria-prima utilizada (TABELA 5.1). Gomes (2008) analisou o perfil de ésteres de uma amostra de biodiesel de soja e de mamona e observou a predominância de linoleato no biodiesel de soja e ricinoleato no biodiesel de mamona (TABELA 5.2). A presença de hidroxilas na estrutura do ricinoleato confere ao biodiesel de mamona uma alta viscosidade e estabilidade (KNOTHE e STEIDLEY, 2007), quando comparado à outros óleos vegetais. Esta característica representa uma desvantagem ao uso do óleo de mamona para produção de biodiesel, fazendo com que outras matérias-primas sejam tecnicamente mais viáveis para produção de biocombustíveis, como por exemplo, a soja que não contém em sua composição a presença de ricinoleato.

TABELA 5.1. Percentual de ácidos graxos provenientes de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel.

Matéria-prima	Mirístico (14:0)	Palmítico (16:0)	Estearico (18:0)	Oléico (18:1)	Linoléico (18:2)	Linolênico (18:3)
¹ Soja		6-10	2-5	20-30	50-60	5-11
¹ Milho	1-2	8-12	2-5	19-49	34-62	
² Palma	0,4	51,1	1,8	44,8	1,6	

FONTE: ¹Gerpen et al. (2004); ²Reis et al. (2005).

TABELA 5.2. Composição química do biodiesel puro de soja e mamona.

Ésteres	Óleo de Soja (%)	Óleo de Mamona (%)
Palmitato (C16:0)	12,1	2,6
Estearato (C18:0)	4,4	1,6
Oleato(C18:1)	28,1	6,7
Linoleato (C18:2)	42,0	12,0
Linolenato (C18:3)	13,3	1,2
Ricinoleato (C18:1-OH)	---	76,0

FONTE: Gomes (2008).

A soja vem se destacando como a principal matéria-prima para produção de biodiesel no Brasil - aproximadamente 90% do biodiesel produzido no Brasil é proveniente da soja - em virtude da capacidade de cultivo, potencial de aproveitamento que esta oleaginosa representa à economia brasileira (CAVALETT e ORTEGA, 2010) e pela baixa viscosidade quando comparada às outras matérias-primas vegetais (ALPTEKIN e CANAKCI, 2008). A produção do biodiesel por meio da reação de transesterificação é normalmente conduzida via rota metílica (reação com álcool metílico). Embora seja possível conduzir a reação com etanol ou propanol, a utilização do metanol é um processo economicamente e tecnicamente mais viável, por oferecer menor custo e melhor separação do glicerol (FREEDMAN et al., 1986; DEMIRBAS, 2005). Assim, as reações via rota metílica irão produzir ésteres metílicos de ácidos graxos e, com relação ao biodiesel proveniente da soja, os principais ésteres de ácidos graxos presentes são Metil Palmitato (16:0), Metil Estearato (18:0), Metil Oletato (18:1), Metil Linoleato (18:2) e Metil Linolenato (18:3) (GERPEN et al., 2004; GOMES, 2008).

Quando o biodiesel entra em contato com a água, como por exemplo, por meio de derramamentos acidentais em águas subterrâneas, os ésteres presentes em sua composição irão exercer influência sobre a qualidade das águas, o que faz com que o conhecimento de suas propriedades químicas seja importante para avaliar seu comportamento na água (TABELA 5.3). Observa-se que, de uma maneira geral, estes compostos possuem baixa polaridade, longas cadeias carbônicas, alta massa molecular, baixa solubilidade em água e densidade inferior à da água. Os baixos valores de solubilidade e a densidade inferior à da água, sugerem que estes compostos irão se comportar como LNAPLs (*light non-aqueous phase liquids*) e possuir a tendência de permanecer nas camadas mais superficiais da zona saturada. Além disso, a alta massa molecular dos principais ésteres do biodiesel de soja ($>200 \text{ g.mol}^{-1}$) é um indicativo de que processos de volatilização não serão significativos no ambiente impactado por estes compostos. Considerando estas propriedades físico-químicas, quando os ésteres do biodiesel entram em contato com a água subterrânea, irão se concentrar nas camadas mais superficiais e se comportar como fontes fixas e persistentes de contaminação, pelo fato de sua baixa solubilidade culminar na lenta transferência destes compostos para a fase aquosa (CORSEUIL et al., 2011b; CHIARANDA, 2011).

TABELA 5.3. Propriedades físico-químicas dos principais ésteres metílicos presentes no biodiesel de soja.

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	Densidade (g.cm ⁻³)	Solubilidade 25°C (mg.L ⁻¹)
Metil Palmitato (16:0)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,45	0,852 ⁽¹⁾	0,00905 ⁽³⁾
Metil Estearato (18:0)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,5	0,8498 ⁽²⁾	0,00093 ⁽³⁾
Metil Oleato (18:1)	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,5	0,874 ⁽²⁾	0,0056 ⁽³⁾
Metil Linoleato (18:2)	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294,5	0,889 ⁽²⁾	0,0198 ⁽³⁾
Metil Linolenato (18:3)	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,45	0,895 ⁽¹⁾	0,058 ⁽³⁾

FONTE: ⁽¹⁾Sigma-Aldrich (2012); ⁽²⁾Toxnet (2012); ⁽³⁾TGSC (2012).

5.2 DIESEL

O óleo diesel é proveniente das diversas etapas de processamento do petróleo bruto e, como todo combustível fóssil, consiste em uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos os quais possuem uma quantidade de átomos de carbonos variando de 8 a 30 (LEE et al., 1992). Dentre os compostos presentes na composição do diesel, estão os hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno) (FIGURA 5.2), os quais são preocupantes do ponto de vista ambiental e de saúde, com destaque para a presença do benzeno - conhecido por seu potencial carcinogênico (US EPA, 1998). Ao entrar em contato com os corpos hídricos, os compostos BTEX podem afetar a qualidade da água do ambiente atingido (ALVAREZ e HUNT, 2002) e representar um risco à saúde humana.

Segundo a Resolução n° 396/08 do CONAMA, que dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para águas subterrâneas e a Portaria n° 2.914/11 do Ministério da Saúde, que dispõe sobre qualidade

da água para consumo humano e padrões de potabilidade, a concentração máxima permitida, para águas destinadas ao consumo humano, é de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o benzeno (em virtude de seu potencial carcinogênico) e, para tolueno, etilbenzeno e xilenos, a concentração máxima permitida é de 170, 200 e $300 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Além disso, dentre os hidrocarbonetos presentes na composição do diesel, os monoaromáticos são os compostos capazes de causar maiores riscos, uma vez que estão presentes em quantidades superiores (TABELA 5.4) e possuem maior solubilidade aquosa (TABELA 5.5), o que lhes confere uma maior capacidade de migração na água subterrânea, quando comparados aos outros compostos aromáticos.

FIGURA 5.2. Estrutura química de hidrocarbonetos do grupo BTEX.

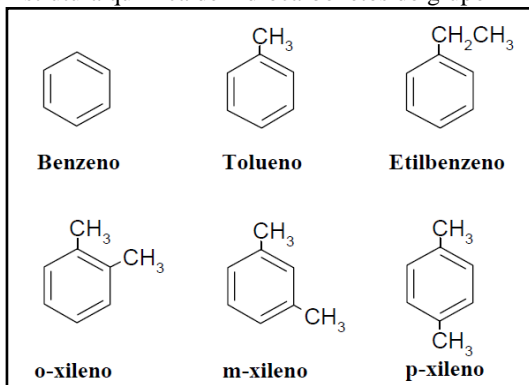


TABELA 5.4. Tipos de hidrocarbonetos presentes no óleo diesel.

HIDROCARBONETOS	(% MASSA)
Saturados	74,8
Olefinas	0,4
Monoaromáticos	17,7
Diaromáticos	5,0
Poliaromáticos	2,1
Aromáticos Totais	24,8

FONTE: Kaipper (2003).

Outros compostos presentes no diesel que possuem interesse ambiental são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os quais são formados por 2 ou mais anéis benzênicos, podendo ser provenientes de fontes naturais ou antropogênicas (HARITASH e KAUSHIK., 2009). A contribuição das fontes naturais é muito limitada restringindo-se, praticamente, à queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas. As fontes antropogênicas, como a queima de combustíveis e seus derivados (carvão, madeira, gás de carvão, etc) podem produzir HPAs, sendo introduzidos predominantemente por derramamentos ou pela combustão incompleta de combustíveis fósseis nas emissões veiculares, entre outras. Existem mais de 100 diferentes HPAs, porém dentre estes, 16 foram considerados ambientalmente relevantes devido às suas propriedades carcinogênicas, recalcitrância (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1983) e pela maior incidência destes compostos em locais contaminados, são eles: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno (1,2,3-cd) pireno, fenantreno, pireno (ATSDR, 1995)

A composição do diesel é variável uma vez que depende da fonte de obtenção, dos processos de craqueamento e métodos de separação, porém de uma maneira geral, sua composição segue o perfil apresentado na TABELA 5.4. Para que o comportamento dos compostos do diesel (BTEX e HPAs) no ambiente subterrâneo possa ser estimado, é importante conhecer algumas de suas propriedades físico-químicas (TABELA 5.5). É possível verificar que os hidrocarbonetos de maior massa molecular (HPAs) são praticamente insolúveis em água o que torna sua mobilidade na água subterrânea relativamente limitada. Além disso, dentre os componentes do diesel, aqueles que possuem peso molecular mais baixo têm a tendência de volatilizar e serem mais rapidamente degradados, enquanto que os compostos de maior peso molecular tendem a ser recalcitrantes por serem moléculas mais complexas e mais difíceis de serem degradadas (LEE et al., 1992; HARITASH e KAUSHIK, 2009).

FIGURA 5.3. Principais HPA's recomendados para monitoramento.

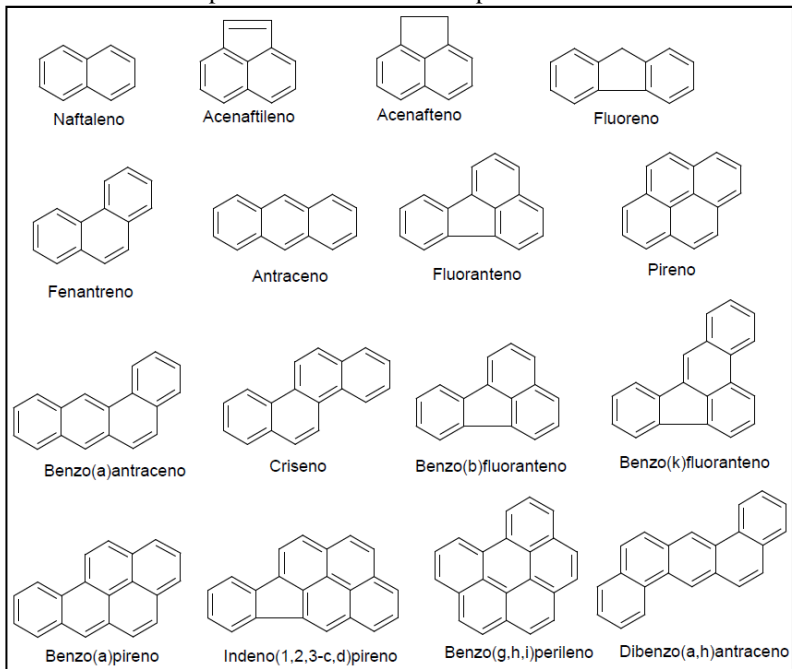


TABELA 5.5. Propriedades físico-químicas dos principais hidrocarbonetos presentes na composição do diesel.

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	Densidade (g.cm ⁻³)	Solubilidade 25°C (mg.L ⁻¹)
Benzeno	C ₆ H ₆	78,1	0,88 ⁽²⁾	1780 ⁽²⁾
Tolueno	C ₇ H ₈	92,1	0,87 ⁽²⁾	515 ⁽²⁾
Etil-benzeno	C ₈ H ₁₀	106,2	0,87 ⁽²⁾	152 ⁽²⁾
(m)Xileno	C ₈ H ₁₀	106,2	0,88 ⁽⁵⁾	178 ⁽⁴⁾
(o)Xileno	C ₈ H ₁₀	106,2	0,88 ⁽²⁾	175 ⁽²⁾
(p)Xileno	C ₈ H ₁₀	106,2	0,86 ⁽⁴⁾	162 ⁽⁴⁾
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	128,2	1,03 ⁽²⁾	33 ⁽²⁾
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	152,2	0,8988 ⁽⁴⁾	3,93 ⁽¹⁾
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	154,2	-	3,4 ⁽³⁾
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	166,2	-	1,98 ⁽¹⁾
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	178,2	1,25 ⁽⁴⁾	0,073 ⁽¹⁾
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	178,2	1,18 ⁽⁴⁾	1,29 ⁽¹⁾
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	202,2	-	0,26 ⁽¹⁾
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	202,2	1,18 ⁽⁴⁾	0,135 ⁽¹⁾
Benzo(a) antraceno	C ₁₈ H ₁₂	228,3	-	0,014 ⁽¹⁾
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	228,3	1,274 ⁽⁴⁾	0,002
Benzo(b) fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	252,3	-	0,0015 ⁽⁴⁾
Benzo(a) pireno	C ₂₀ H ₁₂	252,3	1,351 ⁽⁴⁾	0,000049 ⁽²⁾
Benzo(k) fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	252,3	-	0,00076 ⁽¹⁾
Benzo(g,h,i) perileno	C ₂₂ H ₁₂	276,3	-	0,00026 ⁽¹⁾
Dibenzo(a,h) antraceno	C ₂₂ H ₁₄	278,3	-	0,0005 ⁽³⁾
Indeno(1,2,3, cd) pireno	C ₂₂ H ₁₂	276,3	-	0,062 ⁽⁴⁾

FONTE: ⁽¹⁾Mackay e Shiu (1977); ⁽²⁾Schnoor (1996); ⁽³⁾Manoli e Samara (1999); ⁽⁴⁾Toxnet (2012).

5.3 BIODEGRADAÇÃO

A biodegradação é um termo utilizado para descrever processos de transformações, mediadas por micro-organismos, que ocorrem na estrutura de compostos orgânicos fazendo a ruptura das ligações moleculares (RISER-ROBERTS, 1998). A capacidade que os micro-organismos possuem de degradar contaminantes ambientais tem sido reconhecida há muitos anos, sendo o mecanismo mais importante na atenuação de contaminantes orgânicos dissolvidos na água subterrânea (WIEDEMEIER et al., 1996; NAIDU et al., 2012). Os micro-organismos frequentemente utilizam compostos orgânicos como fonte de obtenção de energia para síntese celular e a biodegradação destes compostos geralmente resulta em produtos com menor toxicidade (MARGESIN e SCHINNER, 2001; LOVLEY, 2003). No entanto, para desempenhar suas funções biológicas os micro-organismos irão depender de uma série de fatores físicos, químicos e biológicos e, portanto, a viabilidade e aplicabilidade de técnicas de biorremediação em um determinado cenário de contaminação serão também dependentes destes fatores.

A biodegradação de contaminantes ambientais poderá ocorrer quando houver no sistema condições favoráveis ao crescimento de micro-organismos degradadores específicos e ao bom funcionamento de suas enzimas. A presença de micro-organismos que possuam enzimas capazes de catalisar a conversão de um determinado composto por meio de uma via metabólica é importante para conferir-lhes um potencial para biodegradação (LOVLEY, 2003). O processo de degradação de contaminantes envolve a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano. Enzimas que estão sempre presentes, independente da condição ambiental da área, são conhecidas como enzimas constitutivas, enquanto que, aquelas sintetizadas a partir da influência de fatores externos são conhecidas como enzimas induzidas. Quando um indutor está presente, o qual pode ser o substrato (contaminante) a ser degradado, se inicia uma cascata de reações bioquímicas que resultam na transcrição de genes que codificam a síntese das enzimas necessárias para conduzir o processo de biodegradação (ALVAREZ e PÉREZ, 2003).

Para que os micro-organismos possam se desenvolver em determinados ambientes, é necessário que haja disponibilidade de nutrientes para produção de componentes celulares, como por exemplo, nitrogênio para sintetizar aminoácidos e enzimas, fósforo para produção

de ATP, enxofre para síntese de algumas co-enzimas, cálcio para formação de paredes celulares, e magnésio para estabilização dos ribossomos. Também necessitam de micronutrientes, como traços de ferro, níquel, cobalto, molibdênio e zinco, para a realização de funções metabólicas. De uma maneira geral, uma proporção de C-N-P (carbono-nitrogênio-fósforo) de aproximadamente 100:15:3 (33:5:1) é suficiente para assegurar o crescimento microbiano em aquíferos (RISER-ROBERTS, 1998; ALVAREZ e PÉREZ, 2003; ZUCCHI et al., 2003; EVANS et al., 2004). Esta proporção é usualmente utilizada para calcular a demanda nutricional de um determinado aquífero para que haja estimulação microbiana e, conseqüentemente, a degradação do contaminante orgânico. Entre outros fatores capazes de influenciar a dinâmica dos micro-organismos em sistemas subsuperficiais estão o pH e a temperatura. Com relação ao pH, em águas subterrâneas a faixa comumente observada fica entre 4 e 5, sendo dificilmente encontradas faixas de pH menores do que esta em aquíferos não contaminados (NORRIS e MATTHEWS, 1994; CHAPELLE, 2001). A maioria dos micro-organismos presentes na água subterrânea são capazes de se desenvolver em faixas de pH de 4 a 9 (CHAPELLE, 2001), havendo micro-organismos capazes de se desenvolver em ambientes ainda mais ácidos (pH entre 3,0 e 3,8) (KOTSYURBENKO et al., 2007; GILOTEAUX et al., 2010). A determinação da condição ideal de pH irá depender da composição da água subterrânea e das características de especiação do contaminante (SCHERER et al., 2000).

Além da presença de micro-organismos, enzimas degradadoras e faixas de pH específicas, a temperatura também é um dos fatores que influencia o crescimento microbiano, uma vez que esta irá selecionar as espécies microbianas que irão participar das reações de degradação. Micro-organismos que crescem a uma temperatura de 0 a 20°C são denominados psicrófilos; aqueles que possuem afinidade e tolerância à baixas temperaturas e possuem condições ideais de crescimento em 15°C, sendo incapazes de crescer em 20°C são denominados psicotróficos; e, por fim, micro-organismos que se desenvolvem em uma faixa de 20 a 40°C são denominados mesófilos (MARGESIN e SCHINNER, 2001). De uma maneira geral, os psicrófilos possuem o metabolismo mais lento do que dos mesófilos, uma vez que a temperatura está fortemente associada à atividade enzimática e, conseqüentemente, quanto mais elevada a temperatura do sistema, mais intensa a atividade enzimática (BRADLEY e CHAPELLE, 1995; WIEDEMEIER et al., 1999b). No entanto, quando micro-organismos já estão adaptados a baixas temperaturas, podem ter um crescimento tão ou

mais rápido do que os mesófilos, dependendo da disponibilidade de nutrientes no meio (BRADLEY e CHAPELLE, 1995). A maioria das bactérias presentes em ambientes subsuperficiais é caracterizada como mesófila e, apesar de possuírem crescimento ótimo em faixas de temperatura acima daquelas normalmente encontradas na água subterrânea, estes micro-organismos são capazes de atuar ativamente nos processos de degradação na água subterrânea (CHAPELLE, 2001; ALVAREZ e PÉREZ, 2003).

Compostos orgânicos cuja presença não é comumente observada na natureza (i.e., xenobióticos) tornam o processo de atenuação mais complexo, em virtude da ausência de ferramentas bioquímicas para conduzir as reações de degradação. Porém, devido aos processos evolutivos e à capacidade de adaptação, determinados micro-organismos podem passar a adquirir atividades metabólicas específicas, tornando-os capazes de degradar estes compostos (SPRINGAEL e TOP, 2004; HENDRICKX et al., 2005). Os hidrocarbonetos têm estado em contato com micro-organismos durante longos períodos geológicos e por este motivo nota-se que muitas bactérias adquiriram a habilidade de utilizá-los como fonte de energia para síntese celular (SPRINGAEL e TOP, 2004). A existência de micro-organismos metabolicamente adaptados à presença de determinados contaminantes não é suficiente para garantir a ocorrência do processo de degradação, uma vez que, a energia necessária para que os micro-organismos desempenhem suas funções vitais é obtida através de uma sequência complexa de reações de oxidação e redução, por meio da qual ocorre a transferência de elétrons de um composto doador a um receptor (CHAPELLE et al., 2002; LOVLEY, 2003). A disponibilidade de doadores e receptores de elétrons trata-se de um fator fundamental para o processo de degradação. Compostos presentes na composição de combustíveis e biocombustíveis, como por exemplo, benzeno, tolueno, naftaleno, etanol, ácidos graxos de cadeia longa e etc., podem atuar como doadores de elétrons que podem ser oxidados por diversos receptores de elétrons como oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-), manganês (Mn^{4+}), ferro férrico (Fe^{3+}), sulfato (SO_4^{2-}) e dióxido de carbono (CO_2^-), dependendo das condições geoquímicas predominantes no sistema (WIEDEMEIER et al., 1999b).

5.3.1 Biodegradação Anaeróbia

A presença de biocombustíveis na água subterrânea irá exercer uma alta demanda bioquímica de oxigênio, acarretando no desenvolvimento de condições fortemente anaeróbias (MACKAY et al., 2006; FERIS et al., 2008; CORSEUIL et al., 2011b). Gomes (2008) utilizou o modelo energético de McCarty (McCARTY, 1969) para calcular a demanda teórica de oxigênio necessária para degradar 1L de biodiesel, 1L de etanol e 1L de gasolina. A demanda de oxigênio para degradar o biodiesel é duas vezes maior do que a do etanol e oito vezes maior do que a necessária para degradar os compostos BTEX presentes na composição da gasolina (10% v/v). Assim, os processos de degradação dos contaminantes irão ocorrer predominantemente em condições anaeróbias.

A degradação de compostos orgânicos consiste em uma sequência complexa de reações de oxidação e redução, onde a matéria orgânica é oxidada (perde elétrons) por um receptor de elétrons que por sua vez é reduzido (recebe elétrons). A transferência de elétrons de um composto doador a um receptor ocorre através de um transportador biológico de elétrons e, com estas reações, é produzida energia na forma de moléculas de adenosina trifosfato (ATP). O tipo de receptor de elétrons utilizado irá estabelecer o modo de metabolismo (aeróbio ou anaeróbio) e determinar quais reações específicas poderão ocorrer (ALVAREZ e PÉREZ, 2003). Para oxidar a matéria orgânica, receptores de elétrons vão sendo utilizados e esgotados de maneira sequencial, de acordo com a hierarquia termodinâmica, ou seja, os receptores de elétrons que fornecerem maior rendimento de energia livre para o metabolismo microbiano serão preferencialmente utilizados. Apesar de as reações aeróbias serem termodinamicamente mais favoráveis e proporcionarem maior rendimento energético aos micro-organismos, em aquíferos contaminados com biocombustíveis, o oxigênio disponível é rapidamente exaurido, o que dificulta a manutenção de condições aeróbias no sistema e faz com que processos anaeróbios sejam predominantes.

A oxidação anaeróbia de compostos orgânicos pode ser realizada por duas vias distintas: respiração anaeróbia e fermentação. Quando receptores de elétrons externos e inorgânicos (NO_3^- , SO_4^{2-} , Fe^{3+} , etc) estiverem disponíveis no sistema, o processo irá ocorrer via respiração anaeróbia e, considerando o potencial de rendimento de energia livre, a ordem preferencial de utilização dos receptores de

elétrons inorgânicos para oxidação da matéria orgânica ocorrerá da seguinte maneira: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^-$ (TABELA 5.6).

TABELA 5.6. Potencial de Rendimento de Energia em Diferentes Processos de Oxidação.

Reações de Oxidação e Redução	Potencial de Energia Livre (kJ / H₂)
$2\text{NO}_3^- + 5\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	224
$2\text{Fe}(\text{OH})_3 \rightarrow 2\text{Fe}(\text{OH})_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	50
$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	38
$\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	34

FONTE: Chapelle (2001).

No processo de respiração anaeróbia, a produção de energia ocorre pelo processo de fosforilação oxidativa, onde elétrons são transferidos do composto orgânico, através de uma série de carreadores, que fazem parte de um complexo sistema de transporte de elétrons, a um receptor final diferente do oxigênio (nitrato, ferro férrico ou sulfato), por se tratar de um processo anaeróbio. A energia liberada pela transferência de elétrons entre os diferentes carreadores é utilizada para produção de ATP pelo processo denominado de quimiosmose (fluxo de prótons através da membrana celular, via ATP sintase, que cria um gradiente de concentração eletroquímico, capaz de gerar energia suficiente para combinar uma molécula fosfato inorgânico com ADP, resultando na produção de ATP) (LEHNINGER et al., 1993, LENGELER, 1999).

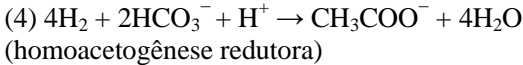
Na ausência destes receptores de elétrons inorgânicos e externos, a oxidação do composto orgânico irá ocorrer por meio da utilização de receptores de elétrons internos (endógenos), via processos fermentativos. Nestes processos, os compostos orgânicos podem servir tanto como doadores como receptores de elétrons e, a geração de energia na forma de ATP ocorre pelo processo de fosforilação em nível de substrato, no qual a clivagem de um determinado substrato culmina na transferência de um grupamento fosfato que, por sua vez, irá fosforilar moléculas de ADP (adenosina difosfato). Quando os receptores de elétrons inorgânicos externos forem exauridos, os receptores disponíveis serão dióxido de carbono (bicarbonato) e prótons (H^+), o que caracterizará um ambiente metanogênico (WIEDEMEIER et al., 1999b; CHAPELLE, 2001; STAMS et al., 2006).

Em condições metanogênicas, a degradação anaeróbia de compostos orgânicos é composta pelas seguintes etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (FIGURA 5.4). Para que os compostos orgânicos possam ser transportados através da membrana celular microbiana eles necessitam ser transformados em moléculas orgânicas mais simples e este processo irá ocorrer por meio de reações de hidrólise. Nesta etapa inicial, os compostos orgânicos complexos sofrem ação de enzimas extracelulares excretadas por micro-organismos que fazem com que sejam convertidos em compostos orgânicos simples, capazes de serem transportados pela membrana celular microbiana. Sendo assim, carboidratos são convertidos em açúcares solúveis, proteínas em aminoácidos e lipídeos transformados em ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e glicerol (SOUSA, 2006; HATTORI, 2008). A reação abaixo se refere a um composto orgânico complexo – lipídeo – sendo hidrolisado pela ação de lipases, gerando um composto orgânico simples - ácido graxo de cadeia longa (ácido oléico) e glicerol (ANGELIDAKI et al., 1999).



Os compostos formados durante a etapa de hidrólise são posteriormente convertidos em substratos solúveis dentro da célula microbiana em um processo denominado de acidogênese. Neste processo ocorre a formação de ácidos orgânicos voláteis como acetato, propionato, butirato, entre outros compostos. A próxima etapa é denominada de acetogênese e é caracterizada pela produção de acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Bactérias sintróficas acetogênicas são capazes de operar o processo acetogênico por 2 vias distintas: homoacetogênese oxidativa e redutora. Na homoacetogênese oxidativa, hidrogênio e dióxido de carbono podem ser produzidos a partir do acetato e, na homoacetogênese redutora, moléculas de acetato são produzidas a partir de hidrogênio e dióxido de carbono (HATTORI, 2008; DEMIREL e SCHERER, 2008). As reações abaixo correspondem à etapa acetogênica, onde uma molécula de butirato é convertida a acetato (2) (DOLFING, 2001) e, à homoacetogênese oxidativa (3) e redutora (4) (HATTORI, 2008).





Os compostos formados durante a acetogênese irão atuar como substratos para a metanogênese. Esta etapa poderá ocorrer por meio de duas vias – metanogênese acetoclástica e hidrogenotrófica. Na metanogênese acetoclástica o acetato é clivado nos grupamentos metil e carboxílico, sendo o grupamento metil convertido diretamente em metano através de uma série de reações bioquímicas, enquanto que o grupamento carboxílico é oxidado a CO_2 . Esta reação ocorre pela formação do complexo metil-monóxido de carbono ($\text{CH}_3\text{-CO}$), dando origem à metil coenzima M (CoM-CH_3) e monóxido de carbono (CO). Este por sua vez é convertido a dióxido de carbono e, por meio da ação da metil-coenzima M redutase¹, o complexo metil coenzima M é convertido em metano (CHAPELLE, 2001). Os principais gêneros de arqueas metanogênicas conhecidos por atuar nestas rotas bioquímicas são *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, as quais possuem as seguintes atividades metabólicas: *Methanosaeta* utiliza exclusivamente acetato como substrato enquanto que *Methanosarcina* pode crescer em meios contendo diversos substratos que não necessariamente acetato (HATTORI, 2008).



Na metanogênese hidrogenotrófica o hidrogênio produzido durante a etapa acetogênica é utilizado como doador de elétrons enquanto que o dióxido de carbono atua como receptor de elétrons, sendo posteriormente reduzido até a formação de metano (CHAPELLE, 2001; CONRAD, 1999; REEVE et al., 1997). A redução do dióxido de carbono é realizada em diversas etapas (ao menos 4), sendo caracterizada pela formação do complexo metil-coenzima M com posterior redução à metano (CHAPELLE, 2001), via metil-coenzima M redutase. Tais reações são medidas por arqueas hidrogenotróficas e, a associação destes micro-organismos com bactérias sintróficas que conduzem a homoacetogênese é de extrema importância, já que há necessidade de micro-organismos capazes de consumir o hidrogênio produzido nas etapas anteriores (pelas bactérias sintróficas) para

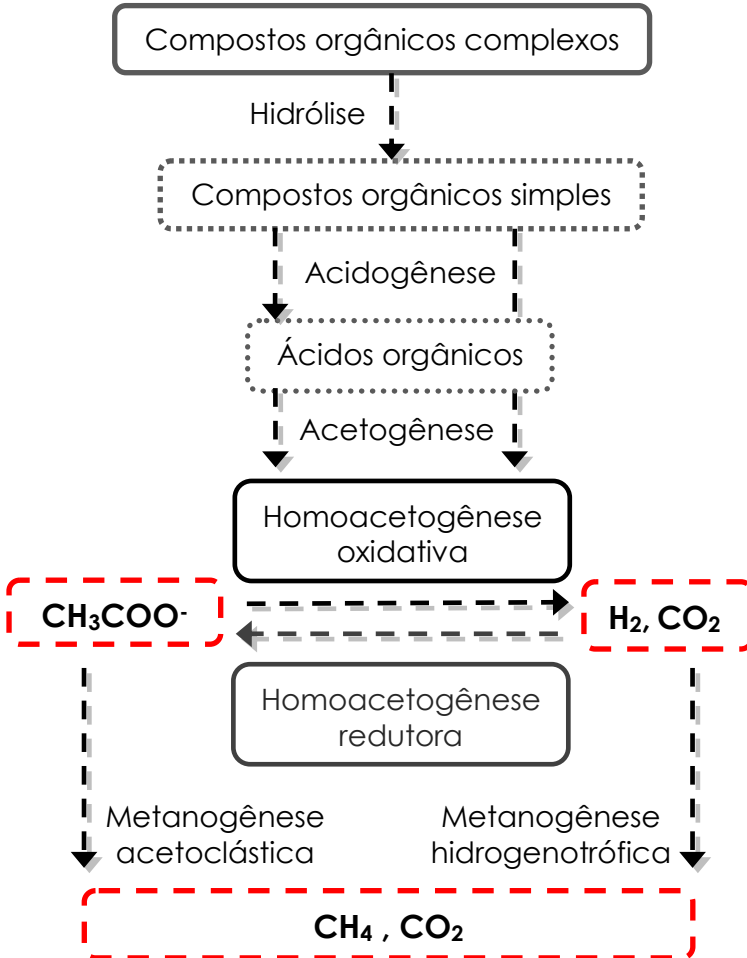
¹ A metil-coenzima M redutase é uma enzima conservativa, presente em todos os gêneros de arqueas metanogênicas e é responsável por mediar a redução da metil coenzima M com formação de metano e produção de ATP.

permitir a continuidade das reações (HATTORI, 2008; LALMAN, 2000; SCHINK, 1997).



Os micro-organismos metanogênicos são estritamente anaeróbios e pertencem ao reino das arqueas. São capazes de utilizar substratos como hidrogênio, dióxido de carbono, monóxido de carbono, metanol, compostos metilados e acetato (STAMS e PLUGGE, 2010) (TABELA 5.7). Existem diversas espécies de micro-organismos associados aos processos metanogênicos e a presença destes pode fornecer informações a respeito dos processos predominantes no sistema, uma vez que determinados micro-organismos possuem afinidade por substratos específicos, logo, a predominância de determinados gêneros pode fornecer evidências dos processos decorrentes no sistema. Caso estes micro-organismos não estejam presentes e atuando em simbiose com bactérias específicas, o hidrogênio pode se acumular no sistema, resultando na possível inibição da metanogênese, já que é necessária a manutenção de baixas concentrações de hidrogênio para que as reações não se tornem termodinamicamente desfavoráveis (LALMAN, 2000; WIEDEMEIER, 1999a).

FIGURA 5.4. Representação esquemática da degradação anaeróbia de compostos orgânicos.



FONTE: Adaptado de Demirel e Scherer (2008).

TABELA 5.7. Espécies de micro-organismos e substratos utilizados para a metanogênese.

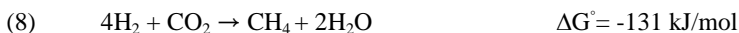
Micro-organismos metanogênicos	Substrato consumido
<i>Methanobacterium bryantii</i>	H ₂ / CO ₂
<i>Methanobacterium formicum</i>	H ₂ / CO ₂ , formato
<i>Methanobacterium thermoalcaliphilum</i>	H ₂ / CO ₂
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicum</i>	H ₂ / CO ₂
<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	H ₂ / CO ₂
<i>Methanothermus fervidus</i>	H ₂ / CO ₂ , formato
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	H ₂ / CO ₂ , formato
<i>Methanococcus voltaei</i>	H ₂ / CO ₂ , formato
<i>Methanococcus vannielii</i>	H ₂ / CO ₂ , formato
<i>Methanomicrobium mobile</i>	H ₂ / CO ₂ , formato
<i>Methanospirillum hungatei</i>	H ₂ / CO ₂ , formato
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Metanol e acetato
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H ₂ / CO ₂ , metanol, metilaminas e acetato
<i>Methanosarcina mazeii</i>	Metanol, metilaminas e acetato
<i>Methanosarcina thermophila</i>	H ₂ / CO ₂ , metanol, metilaminas e acetato
<i>Methanococcoides methylutens</i>	Metanol
<i>Methanosaeta concilii (soehngenii)</i>	Acetato
<i>Methanosaeta thermophila</i>	Acetato

FONTE: Adaptado de Demirel e Scherer (2008).

5.3.2 Sintrofia

A sintrofia pode ser definida como um tipo de cooperação simbiótica onde micro-organismos metabolicamente distintos dependem um do outro para a degradação de determinados substratos e, geralmente, este processo ocorre por meio da transferência de um ou mais metabólitos entre os micro-organismos envolvidos. Relações sintróficas são particularmente importantes quando o acúmulo de metabólitos produzidos nos processos de degradação passa a desencadear limitações termodinâmicas no sistema. A existência de cooperações sintróficas entre micro-organismos, especialmente em ambientes metanogênicos, poderá tornar as reações de degradação de compostos orgânicos termodinamicamente favoráveis, considerando que os compostos gerados em uma determinada etapa do processo de degradação servirão como substratos para as etapas subsequentes, impedindo seu acúmulo no sistema (SCHINK e STAMS, 2006; McINERNEY et al., 2008).

Um dos primeiros relatos sobre a existência deste tipo de relação simbiótica entre micro-organismos foi descrito por Bryant et al. (1967), quando foi observada uma relação sintrófica entre os micro-organismos *Methanobacterium bryantii* e “micro-organismo S”, envolvidos no processo de fermentação do etanol. O “micro-organismo S” atuou na fermentação do etanol produzindo acetato e hidrogênio (reação 7), enquanto que *Methanobacterium bryantii* utilizou o hidrogênio produzido na etapa anterior para reduzir dióxido de carbono, produzindo metano e água (reação 8). Quando relações sintróficas passam a ocorrer (representadas pela combinação das reações 7 e 8), a fermentação do etanol torna-se termodinamicamente favorável (reação 9) (BRYANT et al., 1967). A ausência de cooperações sintróficas resultaria no acúmulo de hidrogênio no sistema e, como consequência, no aumento de sua pressão parcial, resultando na inibição da degradação do etanol, uma vez que a reação permaneceria endergônica (reação 7).



Em condições metanogênicas, onde o rendimento energético atua próximo ao limite mínimo necessário para o metabolismo microbiano ($\approx -20 \text{ kJ. reação}^{-1}$), torna-se essencial a presença de micro-organismos capazes de conduzir as reações com esta disponibilidade energética (SCHINK, 1990). Micro-organismos anaeróbios, atuando em cooperações sintróficas, são considerados especialistas na exploração de potenciais energéticos mínimos para manutenção de seu metabolismo (SCHINK, 1997). Ao associar estas informações aos resultados observados em Bryant et al. (1967), a existência de relações sintróficas passou a ser considerada um processo fundamental na degradação de determinados compostos orgânicos. Além disso, foram desenvolvidos diversos trabalhos em que foi observada a existência de micro-organismos atuando em cooperações sintróficas para degradação de determinados substratos orgânicos como ácidos graxos, etanol e hidrocarbonetos aromáticos (SCHINK, 1997; CHAUHAN et al., 2004; LUEDERS et al., 2004; BECKER et al., 2004; GRABOWSKI et al., 2005; KATO et al., 2012), demonstrando o papel fundamental que as cooperações sintróficas desempenham nos processos de biodegradação.

Para que os processos de biodegradação possam ocorrer de maneira sequencial, os elétrons e metabólitos gerados durante as diversas etapas precisam ser transferidos entre os micro-organismos para a manutenção de seu metabolismo. Os processos anaeróbios de degradação de contaminantes orgânicos irão produzir metabólitos como: acetato, hidrogênio, dióxido de carbono, formato, entre outros. A transferência destes metabólitos pode ser realizada por meio da interação entre micro-organismos acetogênicos, hidrogenotróficos e acetoclásticos, onde o acetato e hidrogênio produzidos na etapa acetogênica, são consumidos por metanogênicos acetoclásticos e hidrogenotróficos, respectivamente. O hidrogênio excretado como metabólito de degradação em uma determinada etapa pode, dependendo do micro-organismo atuante, ser transferido e utilizado em uma segunda etapa (CORD-RUWISCH et al., 1998), garantindo a continuidade do processo de degradação (ACHTNICH et al., 1995; SCHINK e STAMS, 2006).

Em ambientes anaeróbios a concentração de hidrogênio pode variar dependendo do processo de oxidação-redução decorrente, sendo a faixa de concentração comumente encontrada em ambientes sob condições metanogênicas (5-15nM) superior a outros processos como sulfato-redução (1-4nM), ferro-redução (0,2-0,8nM) e nitrato-redução ($<0,1\text{nM}$) (CHAPELLE, 2001). Portanto, micro-organismos capazes de conduzir a transferência e consumo deste metabólito em processos

anaeróbios, principalmente em condições metanogênicas (onde as concentrações de hidrogênio são mais elevadas), são particularmente importantes para prevenir o estabelecimento de limitações termodinâmicas no sistema.

5.4 BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO BIODIESEL

O biodiesel é composto basicamente por hidrocarbonetos na forma de ésteres e, em virtude destes compostos possuírem átomos de oxigênio em sua estrutura molecular, isso faz com que seja mais suscetível ao ataque enzimático de micro-organismos (ZHANG et al., 1998). Quando estes ésteres sofrem o ataque microbiano, ocorre a hidrólise do éster por uma esterase, produzindo um ácido graxo de cadeia longa (AGCL) que acaba sendo clivado até a produção de Acetil-CoA (CHAPELLE, 2001; OWSIANIAK, et al., 2009; LALMAN e BAGLEY, 2002). Este mecanismo é conhecido como β -oxidação de ácidos graxos, o qual se trata de uma via metabólica que rompe a cadeia linear do ácido graxo, pela oxidação do carbono da posição beta, produzindo moléculas de Acetil-CoA (fragmentos de dois carbonos). Durante as reações de β -oxidação, cada molécula de Acetil-CoA produzida dá origem a uma molécula de ácido acético (FIGURA 5.5).

Em ambientes subsuperficiais, onde condições metanogênicas podem ser predominantes, os receptores de elétrons disponíveis são prótons e dióxido de carbono, o que faz com que a transferência interespécies de hidrogênio seja um mecanismo importante na degradação de AGCL. Nestas condições, os compostos são degradados por bactérias sintróficas acetogênicas as quais convertem os ácidos graxos de cadeia longa em acetato e hidrogênio. As arqueas metanogênicas hidrogenotróficas consomem o hidrogênio produzido e convertem dióxido de carbono em metano (SOUSA, 2006), sendo, portanto, a interação entre bactérias sintróficas e arqueas metanogênicas um fator determinante para a degradação de AGCL (CHAPELLE, 2001; McLNERNEY et al., 2008).

Neste tipo de interação, a degradação dos ácidos graxos é termodinamicamente desfavorável a menos que o hidrogênio produzido pelas bactérias acetogênicas sintróficas seja mantido em baixas concentrações por ação de arqueas metanogênicas hidrogenotróficas. Tomando como exemplo a degradação do oleato, a energia livre de Gibbs da reação de conversão deste composto em acetato e hidrogênio

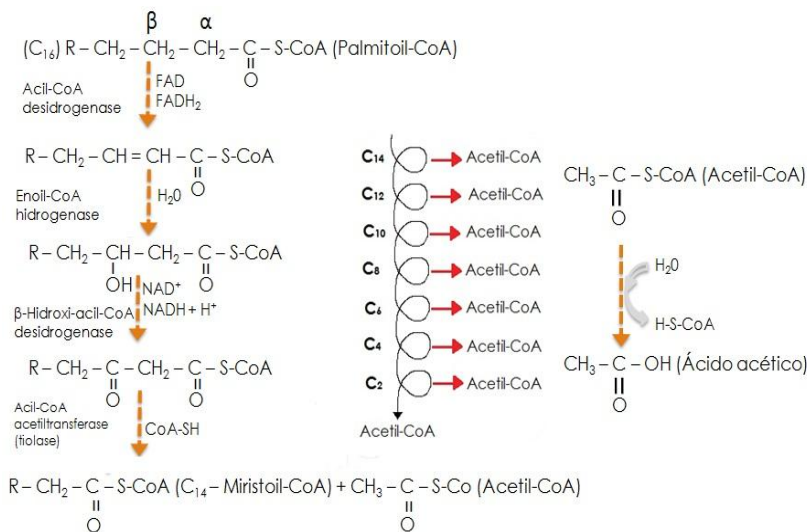
tem valor positivo (+390,8 kJ.mol⁻¹), porém quando o hidrogênio produzido nas etapas anteriores é consumido por micro-organismos hidrogenotróficos, a reação torna-se exergônica (-469,02 kJ.mol⁻¹) e favorece a continuidade da reação, permitindo que o composto seja degradado até a etapa final de mineralização.

TABELA 5.8. Reações envolvidas no processo de biodegradação do biodiesel, representadas pela degradação do AGLC oleato.

Reações envolvidas na degradação do oleato (C_{18:1}): (1) β-oxidação; (2) oxidação sintrófica do acetato e (3) metanogênese hidrogenotrófica:	ΔG°' reação* (kJ.mol⁻¹)
(1) C ₁₈ H ₃₃ O ₂ + 16H ₂ O → 9CH ₃ COO ⁻ + 8H ⁺ + 15H ₂	+390,80
(2) 9CH ₃ COO ⁻ + 8H ⁺ + 18H ₂ O → 35,5H ₂ + 18CO ₂	+ 814,39
(3) 50,5H ₂ + 12,5CO ₂ → 12,5CH ₄ + H ⁺ + 25H ₂ O	-1674,21
Soma: C ₁₈ H ₃₃ O ₂ + 9H ₂ O → 12,5CH ₄ + 5,5CO ₂ + H ⁺	- 469,02

*Nota: O cálculo do ΔG°' das reações foi realizado utilizando valores extraídos de Lalman (2000) para o oleato e Thauer et al. (1977) para os demais compostos. Foram consideradas condições padrão (concentração de 1M concentração, temperatura de 25°C, pressão parcial de 1 atm e pH = 7).

FIGURA 5.5. Estágios da reação de beta oxidação de ácidos graxos.



FONTE: Adaptado de Sousa et al. (2009) e Lehninger et al. (1993).

Diversos micro-organismos capazes de degradar ácidos graxos em condições anaeróbias já foram identificados (TABELA 5.9) e pertencem às famílias *Syntrophomonadaceae* e *Syntrophaceae* as quais atuam em simbiose com arqueas metanogênicas hidrogenotróficas e bactérias sulfato-redutoras durante a degradação dos ácidos graxos (SOUSA, 2006). Embora a degradação destes compostos seja mais comumente observada por meio de cooperações simbióticas entre micro-organismos, foi constatada que as reações de degradação destes compostos podem ser mediadas também por micro-organismos ferro-redutores como *Desulfuromonas palmitatis* sp. nov. (COATES et al., 1995). Colleran et al. (1995) demonstrou também a possibilidade de bactérias sulfato-redutoras conduzirem a degradação anaeróbia de AGCL contendo de 10 à 16 carbonos, utilizando a rota de β-oxidação.

TABELA 5.9. Bactérias degradadoras de AGCL, micro-organismos em simbiose e AGCL utilizado.

Bactérias acetogênicas degradadoras de AGCL	Microorganismo em simbiose	Faixa de utilização do AGCL	
		Saturado	Insaturado
<i>Syntrophomonas wolfei</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1 <i>Desulfovibrio</i> sp. G11	C4-C8	
<i>Syntrophomonas bryantii</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i> M1h <i>Desulfovibrio</i> sp. E70	C4-C8	
<i>Syntrophomonas sapovorans</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	C4-C18	C18:1; C18:2
<i>Syntrophomonas wolfei saponavida</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i> SK <i>Desulfovibrio</i> sp. G11	C4-C18	
<i>Thermosyntropho lipolytica</i>	<i>Methanobacterium</i> JW/VS-M29	C4-C18	C18:1; C18:2
<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF1 <i>Desulfovibrio</i> sp. G11	C4-C8; C16; C18	
<i>Syntrophomonas curvata</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i> MF	C11-C18	C18:1
<i>Syntrophomonas erecta</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	C4-C8	

FONTE: Adaptado de Sousa (2006).

5.5 BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS

Os anéis benzênicos presentes na estrutura dos hidrocarbonetos aromáticos lhes conferem uma grande estabilidade química, dificultando sua degradação pelo fato de os micro-organismos encontrarem dificuldade em quebrar as ligações do anel para utilizar o carbono como fonte de energia. No entanto, em virtude da persistência dos hidrocarbonetos aromáticos no ambiente, micro-organismos desenvolveram mecanismos bioquímicos para degradá-los. As rotas metabólicas de degradação aeróbia do benzeno puderam ser elucidadas quando uma cepa de *Pseudomonas putida* foi isolada e observou-se que esta era capaz de crescer em um meio contendo etilbenzeno e tolueno e capaz de oxidar a molécula de benzeno. A presença das enzimas denominadas dioxigenases foi determinante para quebrar a estabilidade do anel aromático, já que estas atuam de maneira a incorporar moléculas de oxigênio na estrutura do anel, tornando-a mais suscetível ao ataque microbiano (RAMOS et al., 1995; RÜEGG et al., 2007). Após reações sequenciais, o anel benzênico é transformado em catecol até a completa mineralização a dióxido de carbono.

Muito do que se sabe sobre a degradação microbiológica de hidrocarbonetos de petróleo se refere a processos aeróbios de degradação. No entanto, os sistemas de águas subterrâneas possuem baixa disponibilidade de oxigênio e, por este motivo, tendem a entrar em anaerobiose, no caso de um evento de contaminação com compostos orgânicos, devido à alta demanda bioquímica de oxigênio, principalmente na região da fonte de contaminação (MACKAY et al., 2006; FERIS et al., 2008; YU et al., 2008; RAMOS et al., 2013).

Grbic-Galic e Vogel (1987) conduziram um dos primeiros estudos sobre a degradação de benzeno e tolueno em condições metanogênicas e avaliaram as possíveis rotas metabólicas de degradação (FIGURA 5.6), sugerindo que os processos de oxidação podem ocorrer por meio de hidroxilação do anel benzênico gerando metabólitos como fenol, cresol, alcoóis aromáticos, entre outros compostos. Ficker et al., (1999) associaram a presença das espécies de micro-organismos *Desulfotomaculum* spp., *Methanosaeta* e *Methanospirillum* spp., (bactérias redutoras de sulfato e arqueas metanogênicas, respectivamente) com a degradação anaeróbia de tolueno. Além das espécies de bactérias sulfato-redutoras e arqueas, os micro-organismos

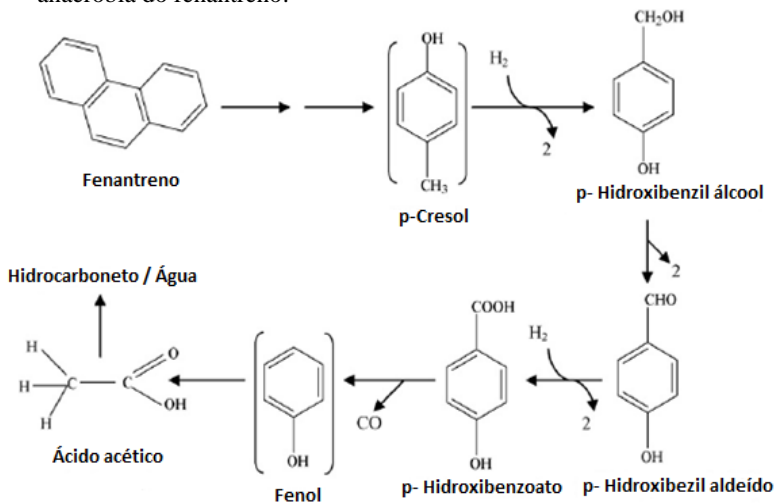
5.6 BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

A presença de HPAs na composição do diesel faz com que este se torne um combustível com características ainda mais recalcitrantes, agravando problemas ambientais e exigindo estratégias de remediação específicas para a atenuação destes compostos. De uma maneira geral, a estratégia para degradação dos HPAs ocorre pela clivagem dos anéis, formando produtos intermediários que podem ser utilizados em outros processos bioquímicos. Ambrosoli et al. (2005) relataram que HPAs com até 4 anéis aromáticos em sua estrutura podem ser degradados em condições anaeróbias. Os HPAs podem ser degradados em diferentes condições anaeróbias – nitrato (ERIKSSON et al., 2003), ferro (RAMSAY et al., 2003), sulfato-redução (MECKENSTOCK et al., 2000) e condições metanogênicas (CHANG et al., 2006), tendo relacionado a presença de arqueas, bactérias pertencentes aos gêneros *Geobacter*, *Burkholderia* e, até mesmo, espécies contidas no filo *Firmicutes*, aos processos de degradação anaeróbia dos HPAs (HEIDER e FUCHS, 1997; ANDERSON et al., 1998; WATANABE, 2001; RAMSAY et al., 2003; JOHNSEN et al., 2005; CHANG et al., 2006; HARITASH e KAUSHIK, 2009; TSAI et al., 2009). Normalmente, compostos HPAs de maior peso molecular (4 ou mais anéis), como pireno, benzo (b) fluoranteno e benzo (g,h,i) perileno, possuem uma forte tendência a permanecerem aderidos à partículas de sólidos suspensos e, portanto, isto reduz sua mobilidade e o risco que representam ao local impactado. Já os HPAs de baixo peso molecular (2 ou 3 anéis aromáticos), como naftaleno, fluoreno e fenantreno por serem mais solúveis e possuírem capacidade de migração são mais preocupantes do ponto de vista ambiental (TSAI et al., 2009).

O mecanismo de degradação dos compostos HPAs ainda não foi completamente elucidado, porém, para aqueles de menor peso molecular, alguns mecanismos foram propostos. A degradação do fenantreno e fluoreno demonstrou ocorrer via transformação em diversos metabólitos (p-cresol, p-hidroxibenzil álcool, p-hidroxibenzilaldeído e p-hidroxibenzoato) até a produção de moléculas de fenol, as quais são posteriormente convertidas em ácido acético (FIGURA 5.7), sendo este facilmente utilizado como substrato por diversos micro-organismos, resultando no processo final de degradação anaeróbia de compostos orgânicos – a metanogênese (CALLISTER et

al., 2010; LI-PING et al., 2011). No caso do naftaleno, diversos mecanismos foram propostos como; hidroxilação (BEDESSEM et al., 1997), carboxilação (ANNWEILER et al, 2002; FUCHS et al., 2011) e hidrogenação (ZHANG et al., 2000).

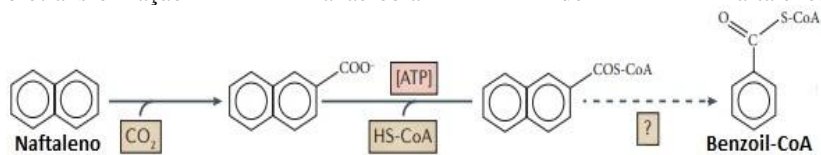
FIGURA 5.7. Mecanismo de degradação proposto para a biotransformação anaeróbia do fenantreno.



FONTE: Adaptado de Haritash e Kaushik (2009) e Tsai et al. (2009).

A via carboxílica parece ter sido mais comumente observada e o processo ocorre pela introdução de um radical COO^- ao anel aromático do naftaleno (carbono na posição 2), dando origem ao ácido 2-naftóico. Fuchs et al. (2011) apresentam a formação do metabólito naftoil-CoA a partir do ácido 2-naftóico e, apesar de não se conhecer as reações intermediárias, moléculas de benzoil-CoA são produzidas (FIGURA 5.8). As reações subsequentes são análogas à rota de degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos (FIGURA 5.6). Já Annweiler et al. (2002) sugerem que após a formação do ácido 2-naftóico, este é reduzido à ácido 5,6,7,8- tetrahydro-2-naftóico e à ácido octahydro-naftóico até a clivagem do anel aromático e, apresentam as reações sequenciais, a partir destes metabólitos, dando origem à moléculas de ciclohexano.

FIGURA 5.8 Mecanismo de degradação (via carboxilação) proposto para a biotransformação anaeróbia do naftaleno.



FONTE: Adaptado de Fuchs et al. (2011).

5.7 INFLUÊNCIA DO BIODIESEL SOBRE A DEGRADAÇÃO DO DIESEL

A crescente utilização de misturas contendo biodiesel e diesel e o aumento da possibilidade de contaminação ambiental por estes combustíveis fazem com que a influência que estes combustíveis exercem um sobre o outro no ambiente subsuperficial seja importante para determinar as conseqüências desta interação nos processos de biodegradação. No caso de gasolina, que contém etanol em suas formulações, foi observado que no ambiente subsuperficial o etanol exerce influência sobre os compostos da gasolina, sendo preferencialmente consumido e retardando temporariamente a degradação dos outros compostos, porém, em um segundo momento, ao ser degradado o etanol estimula a biomassa do aquífero, beneficiando a degradação dos compostos da gasolina (CÁPIRO et al., 2008; CORSEUIL et al., 2011a). Da mesma forma, no caso de misturas de diesel/biodiesel, o biodiesel promove a degradação dos componentes do diesel pelo processo de cometabolismo² (ZHANG et al., 1998; PASQUALINO et al., 2006).

Estudos concluíram que o biodiesel pode promover a aceleração da degradação do diesel e, quanto maior a quantidade de biodiesel presente numa mistura biodiesel/diesel, maior a taxa de degradação (PASQUALINO et al., 2006; MELLO et al., 2007; ZHANG, et al. 1998). Taylor e Jones (2001) estudaram a degradação dos HPAs na presença de biodiesel e observaram que a adição de biodiesel e de nutrientes inorgânicos acarretou no aumento da degradação dos HPAs,

² Utilização de um substrato facilmente biodegradável como fonte de carbono para estimular a biomassa e viabilizar a degradação do outro substrato que contém compostos mais recalcitrantes.

que pode ser justificado pela degradação do biodiesel ocasionar um aumento da biomassa bacteriana, fazendo com que atue positivamente na degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes no diesel. No entanto, para que o biocombustível possa exercer efeitos positivos sobre o combustível fóssil, é necessário haver uma concentração significativa. Neste sentido, Mello et al. (2007) conduziram experimentos laboratoriais com misturas de diesel e biodiesel e não observaram influência do biodiesel em misturas com frações inferiores a 20% (em volume) deste composto. Diante destas observações, para que o biodiesel possa promover efeitos positivos sobre a degradação do diesel, é necessário que esteja presente em frações iguais ou superiores a 20% nas misturas de diesel/biodiesel, já que frações inferiores não demonstraram exercer influência sobre os processos de biodegradação do diesel.

5.8 TECNOLOGIAS DE REMEDIAÇÃO

As tecnologias de remediação podem ser classificadas como: *ex-situ* (ou *off-site*), realizado fora do local onde ocorreu a contaminação e, por isso, é um tratamento que requer escavação e remoção do material contaminado para outro local e, *in-situ* (ou *on-site*), tratamento feito no próprio local da contaminação, o qual normalmente acarreta em menores impactos por não transferir o material contaminado para posterior tratamento em outro local (NANO et al., 2003). A biorremediação *in situ* de águas subterrâneas é amplamente utilizada em ambientes contaminados com compostos orgânicos derivados de petróleo. Existem várias técnicas para a remediação de ambientes contaminados, tais como, bioventilação, *air sparging*, bioestimulação com receptores de elétrons, atenuação natural, bioaumentação, *land-farming* entre outras (HINCHEE et al., 1994; NORRIS e MATTHEWS, 1994), sendo a escolha da técnica baseada no cenário de contaminação e no tempo necessário/disponível para realizar e concluir a remediação.

Em locais onde há disponibilidade de nutrientes e receptores de elétrons é possível utilizar a técnica de remediação de atenuação natural monitorada. Nesta técnica estão envolvidos processos físico-químicos e biológicos para a redução de massa, toxicidade ou concentração de contaminantes no ambiente. Estes processos *in situ* incluem biodegradação, dispersão, diluição, sorção, volatilização e transformação ou eliminação de contaminantes (WIEDEMEIER, 1999a). No entanto, em locais onde a disponibilidade de nutrientes e

receptores de elétrons é baixa, a atenuação natural dos contaminantes pode ocorrer de maneira limitada. Para tanto, existem tecnologias de remediação ativa que podem ser utilizadas para acelerar o processo e superar as limitações decorrentes da falta de nutrientes e receptores de elétrons na área.

A bioestimulação caracteriza-se por ser uma tecnologia de remediação ativa que consiste na introdução de nutrientes e/ou receptores de elétrons (LIEBEG e CUTRIGHT, 1999), podendo ser feita em condições aeróbias ou anaeróbias. Na bioestimulação aeróbia os micro-organismos utilizam oxigênio como receptor de elétrons para oxidar um determinado composto orgânico. Apesar de esta técnica ser vantajosa do ponto de vista energético (maior fornecimento de energia para células microbianas) e menor tempo necessário para degradação de compostos, sua aplicação em aquíferos subsuperficiais apresenta certas limitações como: a baixa solubilidade do oxigênio na água, o rápido consumo deste pelos micro-organismos aeróbios e as dificuldades em manter o seu fornecimento para as subsuperfícies (DA SILVA, 2005; HUTCHINS et al., 1998). Tais limitações fazem com que outras técnicas de bioestimulação, como a anaeróbia, sejam consideradas mais atrativas para este tipo de ambiente (REINHARD et al., 1997).

Na bioestimulação anaeróbia são geralmente utilizados receptores de elétrons para promover a biodegradação dos contaminantes. Uma das vantagens da bioestimulação anaeróbia é o fato de a aplicação de receptores de elétrons anaeróbios ser economicamente vantajosa e por serem compostos quimicamente mais estáveis do que o oxigênio (DA SILVA et al., 2005). As reações biológicas de transferência de elétrons envolvem a oxidação dos doadores de elétrons, i.e. hidrocarbonetos e, redução dos receptores de elétrons, com produção de energia³. A bioestimulação anaeróbia *in situ* em aquíferos contaminados por derramamento de combustível tem recebido grande destaque como tecnologia alternativa devido ao fato de ser uma metodologia economicamente mais viável do que as tecnologias convencionais de remedição e por não apresentar as limitações da bioestimulação aeróbia (REINHARD et al., 1997; DA SILVA et al., 2005).

³ A produção de energia pode ser quantificada por meio da energia livre de Gibbs (ΔG°_r).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estabelecimento da parte experimental deste trabalho, foram preparados 100L de uma mistura contendo 80% de diesel puro e 20% de biodiesel de soja (v/v), liberados diretamente no lençol freático a fim de estudar o processo de remediação na água subterrânea. A escolha pela mistura B20 se deu pelo fato de que em misturas onde a proporção de biodiesel é inferior a 20%, não é possível observar a influência do biodiesel sobre os compostos do diesel (MELLO et al., 2007). Desta forma, os processos que ocorreram no experimento estariam associados somente aos compostos presentes no diesel, não permitindo o estudo da presença concomitante do biodiesel. Levando em consideração o aumento contínuo da proporção de biodiesel que vem sendo acrescentada às misturas com diesel e, que a tendência é permanecer aumentando, justifica-se então a escolha pelo estudo com a mistura B20. Além disso, o fato de se dispor de um experimento semelhante com B20, no qual a atenuação natural deste biocombustível foi avaliada (CHIARANDA, 2011), possibilitou a comparação entre os resultados obtidos com as técnicas de atenuação natural e bioestimulação.

6.1 ÁREA EXPERIMENTAL

O experimento está situado em uma área conhecida como Fazenda Experimental da Ressacada, propriedade da Universidade Federal de Santa Catarina, localizada no sul da ilha de Florianópolis, próxima ao aeroporto Hercílio Luz (FIGURA 6.1). A área experimental possui aproximadamente 330m², sendo relativamente plana com declividades entre 0 a 3%. Foram instalados 47 poços multiníveis, sendo 42 destinados ao monitoramento da água subterrânea e 5 para realização das injeções semanais do agente de bioestimulação – acetato de amônio (FIGURA 6.2). Os poços foram confeccionados com canos de PVC e no interior destes, foram colocadas mangueiras de polietileno utilizadas para a coleta das amostras de água subterrânea. A extremidade inferior das mangueiras contém um filtro constituído de tela de aço inoxidável para evitar entupimentos, entrada excessiva de sólidos e produtos em fase livre, capazes de interferir nas análises. Os poços instalados 1,5m à

montante da região da fonte foram utilizados como poços de injeção, ou seja, através deles foram realizadas as injeções de acetato de amônio e por isso não serviram para fins de monitoramento. Para os poços de injeção foi designada uma fileira de 5 poços horizontais a uma distância de 1m entre si. Os poços localizados à jusante da fonte de contaminação foram destinados ao monitoramento da água subterrânea. As dimensões da área, distâncias entre os poços de monitoramento e os diferentes níveis de monitoramento estão ilustrados na Figura 6.2. Cada poço de monitoramento possui cinco níveis de profundidade diferentes em relação à cota do terreno, sendo diferenciados por cores. Assim, os níveis 2, 3, 4, 5 e 6m correspondem às cores amarelo, azul, verde, vermelho e preto, respectivamente.

FIGURA 6.1 - Localização da Fazenda Experimental da Ressacada, visualização da área experimental e poço de monitoramento com identificação dos diferentes níveis de profundidade pelas cores amarelo, azul, verde, vermelho e preto.

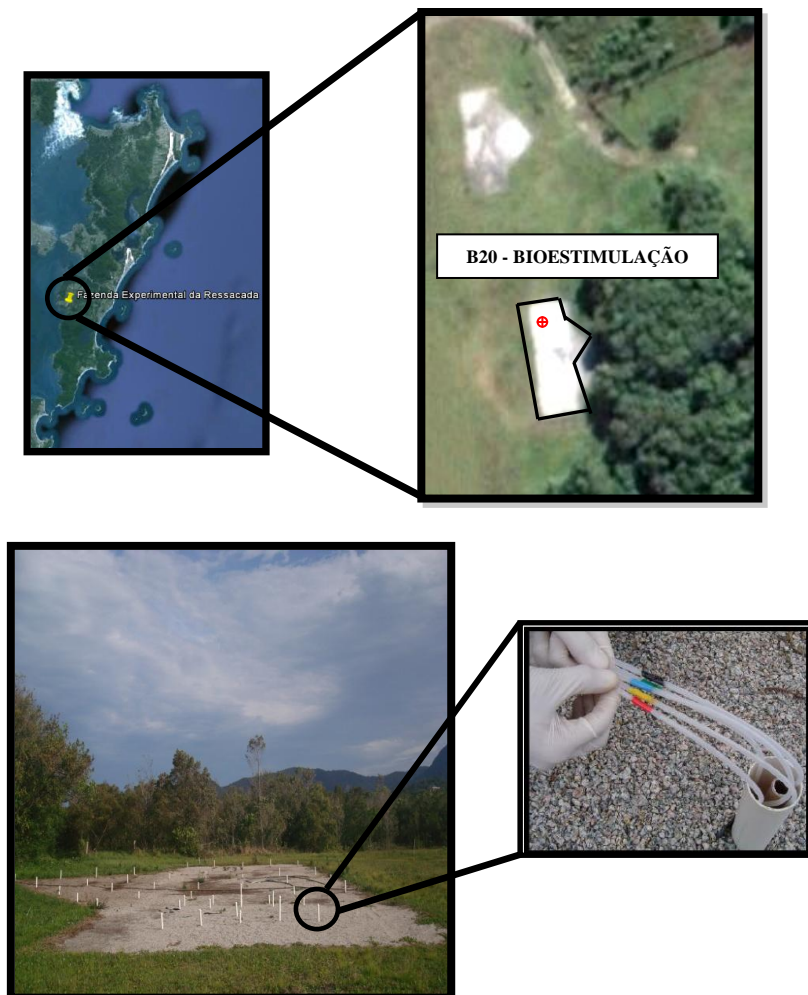
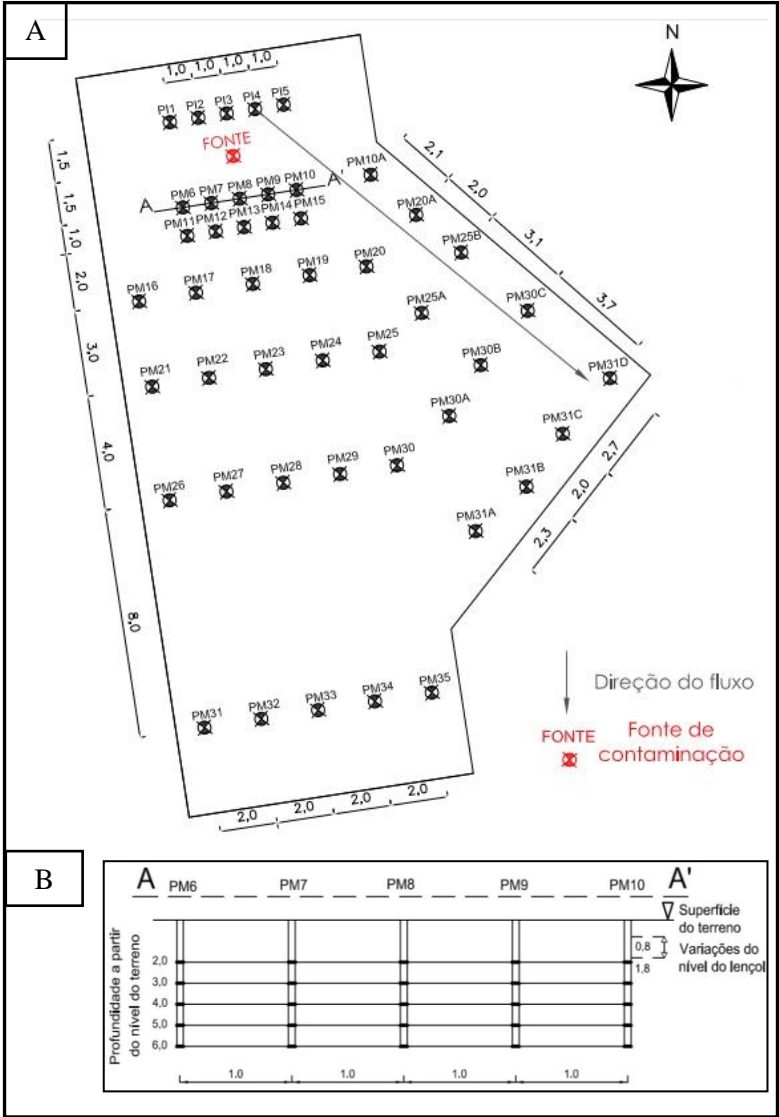


FIGURA 6.2. (A) Dimensões, distância entre poços de monitoramento da área experimental; (B) profundidade dos níveis de coleta representados pelo corte transversal A – A’.



6.2 LIBERAÇÃO CONTROLADA DO B20

No dia 08/07/2010 foi realizada a liberação controlada de 100L da mistura B20 (80% em volume de diesel e 20% em volume biodiesel) diretamente sobre o lençol freático, juntamente com 3 kg de brometo de potássio (previamente dissolvido em água subterrânea coletada na própria área experimental) para permitir o monitoramento do fluxo advectivo. A liberação da mistura foi realizada com condição de sol e aproximadamente às 11 horas da manhã.

Para fazer a liberação foi necessário aguardar o término do período de chuvas, já que este interfere diretamente nos processos de recarga do aquífero. Esta questão deve ser considerada, pois se no momento da liberação o nível do lençol freático estiver alto, quando a precipitação reduzir e o nível do lençol baixar, há possibilidade de a mistura B20 permanecer adsorvida na zona não saturada e com isso, a concentração do B20 na zona saturada seria inferior e ainda, liberações intermitentes do B20 para a zona saturada poderiam ocorrer, dificultando a análise e interpretação dos resultados. A profundidade ideal para a liberação do B20 no lençol freático seria de aproximadamente 1,5m abaixo da cota do terreno, uma vez que o lençol esteja neste nível, os problemas acima mencionados poderão ser minimizados.

O nível do lençol freático medido no dia da liberação foi de aproximadamente 1,3m a partir da cota do terreno e rebaixado até 1,7m (FIGURA 6.3). Optou-se por escavar o solo e rebaixar o lençol até esta profundidade em virtude de haver, de acordo com análises de sondagens realizadas no local, uma camada argilosa até a profundidade de 1,66m (FIGURA 6.5) que poderia atuar como uma barreira física para o acesso da mistura B20 até a zona saturada. Após a liberação dos combustíveis da mistura, a região da fonte de contaminação foi coberta novamente com o solo original, lona plástica e pedriscos de 5 mm de diâmetro com o objetivo de minimizar processos de volatilização dos compostos e reduzir a influência dos processos de recarga sobre o nível do lençol freático.

FIGURA 6.3 (A) Área onde foi realizada a liberação controlada da mistura B20, com 1m^2 e profundidade de 1,7m; (B) cobertura da área com solo original após liberação do B20; (C) cobertura da área escavada com lona e brita.

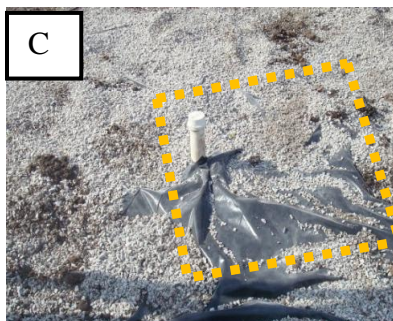
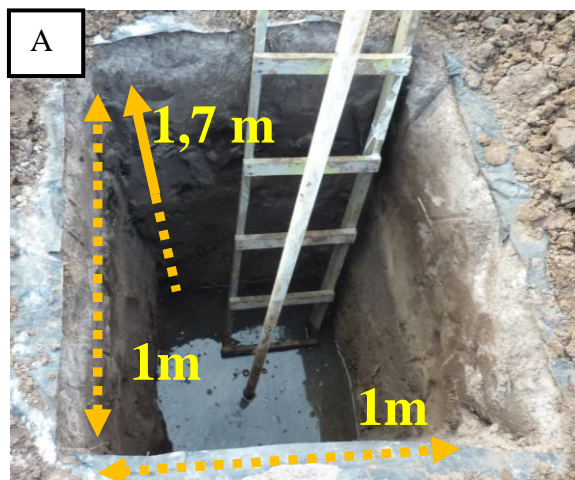


FIGURA 6.4. (A) Localização dos piezômetros utilizados para medição do nível do lençol freático ao redor da área experimental (destacada em preto). (B) Monitoramento da pluviometria e do nível do lençol freático até o momento da liberação controlada do B20 (destacada em cinza).

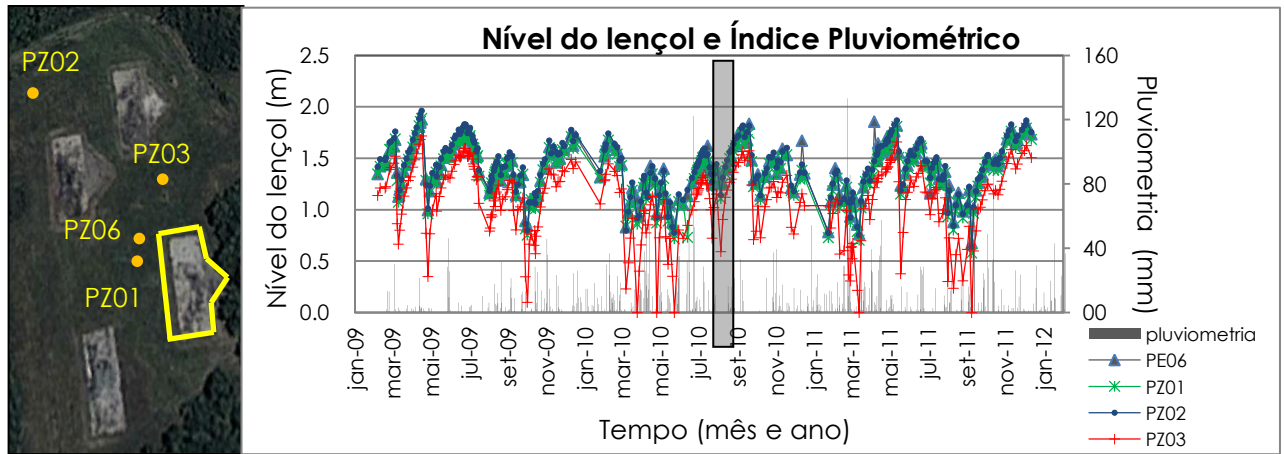
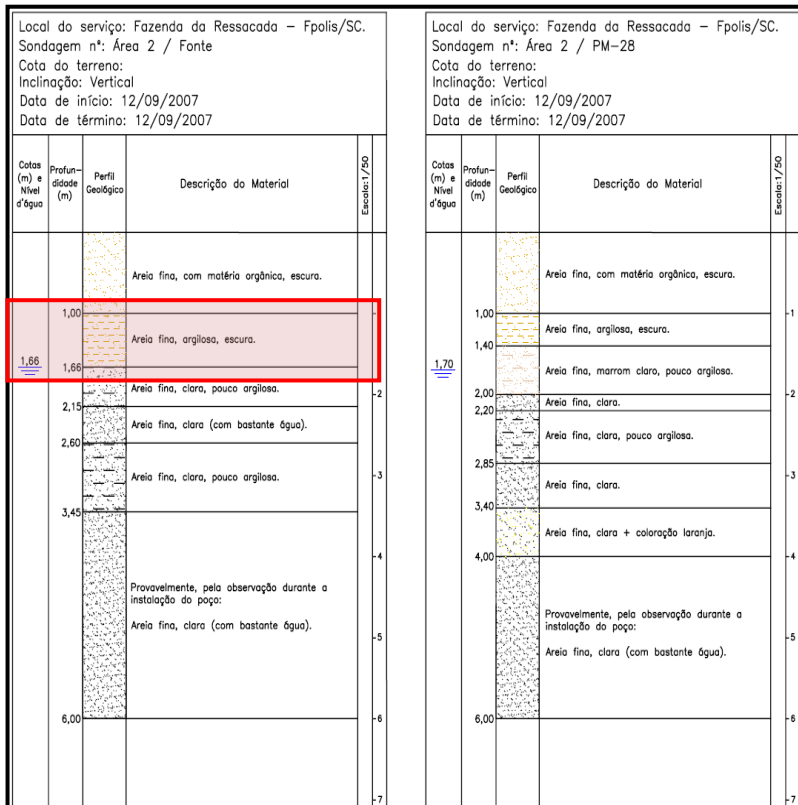


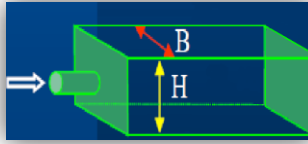
FIGURA 6.5 Sondagens na região de fonte e PM28 da área experimental, com destaque para camada argilosa presente na fonte de contaminação (profundidade de 1,00 – 1,66m).



6.3 CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE BIOESTIMULAÇÃO COM ACETATO DE AMÔNIO

O processo de bioestimulação metanogênica foi realizado utilizando acetato de amônio como substrato orgânico. A opção por este sal foi baseada no fato de este composto se tratar de uma fonte de carbono assimilável capaz de estimular o crescimento de microorganismos específicos associados à degradação anaeróbia de compostos orgânicos monoaromáticos (RODEN e LOVLEY, 1993) e possuir elevada solubilidade aquosa (1.480 g.L^{-1}), o que viabiliza sua injeção na água subterrânea. O acetato de amônio pode contribuir também pelo fornecimento de nutrientes, na forma de nitrogênio amoniacal o qual pode ser prontamente assimilado no metabolismo microbiano (LIEBERG e CUTRIGHT, 1999). Embora não esteja dentro do escopo deste trabalho determinar a contribuição do acetato e do amônio, individualmente, um estudo conduzido para otimizar processos fermentativos utilizando acetato de amônio, acetato de sódio e cloreto de amônio observou que a eficiência do processo foi favorecida somente na presença de acetato de amônio (GU et al., 2009). Portanto, conclui-se que tanto o acetato como o amônio individualmente, não são eficientes para aprimorar os processos fermentativos mas, a presença concomitante de ambos permite que o processo proceda de maneira otimizada e promova efeitos benéficos sobre o processo fermentativo (MONOT et al., 1982; LADISCH, 1991; GU et al., 2009).

A definição da concentração de acetato de amônio a ser injetada no sistema foi baseada nos resultados observados no trabalho de Nunes (2006), onde foi avaliada a liberação controlada de gasolina na água subterrânea e, no momento em que a concentração de acetato na água subterrânea atingiu valores próximos a 300 mg.L^{-1} , condições metanogênicas foram estabelecidas na área experimental. Sendo assim, esta concentração foi tomada como base para sustentar condições metanogênicas no presente experimento. Para determinar a massa de acetato de amônio a ser injetada no aquífero, foi elaborado um cálculo para reatores que se comportam como fluxo de pistão em que o regime do fluxo é definido pela geometria do aquífero. Assim, a carga que entra (corte longitudinal) depende da geometria da fonte, da velocidade da água subterrânea e da concentração do composto de interesse.



$W(t) = Q \times C_{\text{entrada}}$, em que:

C_{entrada} = concentração do composto;

Q = vazão ($Q = A \times v$);

A = área da secção transversal ($A = B \times H$)

B = comprimento;

H = altura;

v = velocidade da água subterrânea

Dados de entrada:

Comprimento (B) = 4m

Altura (H) = 5m

Velocidade (v) = 6 m.ano⁻¹

$C_{\text{entrada}} = 300 \text{ mg.L}^{-1} = 0,3 \text{ g.L}^{-1}$

$Q = A \times v = 120 \text{ m}^3.\text{ano}^{-1} = 329\text{L}.\text{dia}^{-1}$

Com estes valores é possível calcular a carga semanal a ser injetada na área, multiplicando-a pela concentração de acetato de amônio desejada:

$$W(t) = Q \times C_{\text{entrada}} = \left(\frac{329\text{L}}{\text{dia}}\right) \times \left(\frac{0,3\text{g}}{\text{L}}\right)$$

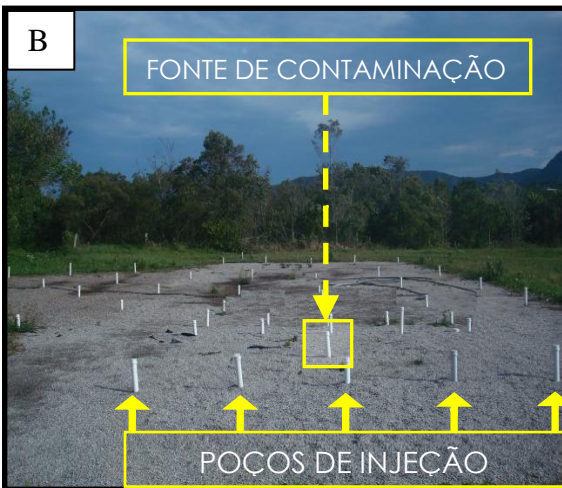
$$W(t) = 98,7\text{g}.\text{dia}^{-1} \rightarrow \approx 700\text{g}.\text{semana}^{-1}$$

O sistema de injeção foi realizado com uma solução de acetato de amônio contendo 700g do sal diluídos em 25L de água coletados em uma bombona plástica, sendo esta água bombeada diretamente de um poço piezométrico afastado da área experimental e, em seguida, o preparo da solução foi conduzido diretamente em um barrilete com 50L de capacidade. Foram confeccionados 5 tubos de PVC de aproximadamente 1L de capacidade com uma mangueira de teflon acoplada na saída, a fim de conectar estas com as mangueiras correspondentes aos diferentes níveis de profundidade (FIGURA 6.6).

As injeções foram iniciadas em 09/08/2010, aproximadamente 1 mês após a liberação controlada da mistura B20 e, o procedimento consistiu em medir 1L da solução de acetato de amônio transferindo-a para os tubos de PVC previamente conectados aos diferentes níveis de profundidade, fazendo a transferência da solução por ação da gravidade. Este procedimento foi realizado em 5 poços localizados à 1,5 metros à montante da fonte de contaminação, totalizando um volume de 25L de solução de acetato de amônio injetados semanalmente na área.

As injeções foram interrompidas no dia 02/12/2011 em virtude de ter sido detectado um acúmulo de acetato na área experimental durante este período. Conforme mencionado anteriormente, apesar de o acetato ser capaz de estimular o crescimento microbiano por fornecer uma fonte de carbono prontamente assimilável, seu acúmulo no sistema pode ser prejudicial aos processos de degradação anaeróbia dos BTEX pelo estabelecimento de fenômenos como degradação preferencial do acetato e limitações termodinâmicas as quais, dependendo da concentração de acetato no meio, podem tornar as reações de degradação endergônicas. Sendo, portanto, necessário o monitoramento contínuo das injeções para impedir que elevadas concentrações de acetato inibam as reações de biodegradação.

FIGURA 6.6. (A) Sistema de injeção de acetato de amônio com tubos de PVC contendo 1L da solução de acetato de amônio, previamente preparada no barrilete e conectada às mangueiras diferenciadas por cores e correspondentes aos diferentes níveis de profundidade. (B) Localização dos poços de injeção e da fonte de contaminação.



6.4 CARACTERIZAÇÃO HIDROGEOLÓGICA

Previamente à realização deste estudo, no ano de 2007, análises de caracterização hidrogeológica (condutividade hidráulica, direção do fluxo da água subterrânea, perfil litológico, porosidade específica, percentual de argilominerais, carbono orgânico, macro e micronutrientes) foram conduzidas de forma a obter informações sobre as características do local onde o experimento foi instalado, as quais são relevantes para a compreensão da dinâmica dos processos que ocorrem no ambiente subsuperficial. Os resultados desta caracterização foram acrescentados neste trabalho, uma vez que são fundamentais para a avaliação da dinâmica dos contaminantes dissolvidos na água subterrânea.

Um dos parâmetros mais importantes para avaliar o transporte dos compostos na água subterrânea é a condutividade hidráulica, a qual consiste em uma medida da habilidade do aquífero em transmitir água (FETTER, 1994), sendo a velocidade da água subterrânea e da migração da contaminação dissolvida diretamente relacionadas à condutividade hidráulica da zona saturada. A condutividade hidráulica do local foi determinada por Lage (2005), por meio de testes de *slug* utilizando 14 piezômetros existentes na região de entorno da área experimental, os quais consistem em tubos abertos nas duas extremidades para permitir a passagem da água. O teste de *slug* envolve o monitoramento da variação de pressão induzida artificialmente no aquífero e a operação do ensaio consiste na introdução ou remoção de um volume de água conhecido através de um cilindro sólido (*slug*) no piezômetro.

O conhecimento da direção do fluxo da água subterrânea possibilita estabelecer a posição dos poços de monitoramento presentes na área experimental. Para avaliar a direção do fluxo da água subterrânea foi realizada i) a leitura dos níveis de água dos piezômetros, ii) cálculo da carga potenciométrica de cada poço, iii) interpolação dos valores de carga potenciométrica utilizando o Software Sufer 8.0 para gerar um mapa de contorno da superfície potenciométrica e iv) verificação da direção do fluxo da água subterrânea. Outro fator que deve ser considerado para avaliar a migração dos contaminantes na água subterrânea, bem como para permitir a alocação adequada dos poços de monitoramento, é o cálculo da velocidade da água subterrânea na região da área experimental. Para estimar a velocidade da água subterrânea em

uma das áreas da Fazenda Experimental da Ressacada, Costa (2008) utilizou brometo de potássio como traçador do fluxo advectivo por ser uma substância conservativa e encontrou uma velocidade que variou entre 5,2 a 6,2 m.ano⁻¹.

O escoamento dos fluidos é influenciado pelas características geológicas do aquífero e, conseqüentemente, é uma propriedade que também pode interferir na migração da pluma de contaminantes. Por este motivo, foram realizadas análise do perfil litológico, granulometria, porosidade efetiva, análise de argilominerais e análise de carbono orgânico. As análises do perfil litológico foram realizadas pelo Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas por meio de sondagens na área experimental conduzidas durante a instalação dos poços de monitoramento (CHIARANDA, 2011) e, consistem em análises visuais realizadas com o intuito de detectar horizontes com características diferentes. As análises de porosidade efetiva, as quais representam a porcentagem de um volume de solo ou formação aquífera disponível para armazenamento temporário de água, correspondendo à relação entre o volume de vazios ocupáveis pela água e o volume total do solo ou a formação aquífera, foram realizadas por Chiaranda (2011) com colaboração do Laboratório de Irrigação e Drenagem do Centro de Ciência Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina e o método utilizado foi *Mesa de Tensão*. Neste método, a amostra fica sob uma tensão (coluna de água) para o escoamento da água. As amostras de solo são protegidas na parte inferior por um papel filtro e colocadas em uma bandeja com água para saturar durante um pernoite. Em seguida, as amostras são retiradas da água, deixando-se escorrer, são pesadas e colocadas sobre a mesa de tensão a qual retira a água dos macroporos (poros com diâmetro $\varnothing \geq 0,05$ mm). Após esse período, as amostras são novamente submetidas à pesagem, levadas à estufa a 110°C por 24h e, então são novamente pesadas para determinação do peso seco das amostras analisadas (UFMT, 2010). Além disso, análises granulométricas também foram realizadas na área experimental, pelo método de peneiramento, segundo norma regulamentada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 7181. Tal método consiste em realizar peneiramento e sedimentação para obtenção de uma curva granulométrica cujos resultados permitem fazer uma classificação dos solos analisados. Tais análises foram realizadas pelo Laboratório de Mecânica dos Solos do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Santa Catarina.

A análise de carbono orgânico é fundamental para avaliar o transporte de contaminantes, uma vez que pode influenciar fatores como sorção e retardo dos contaminantes na água subterrânea. A sorção é definida como uma interação (adsorção ou absorção) entre um determinado contaminante e partículas de solo, fazendo com que os contaminantes se desloquem mais lentamente na água subterrânea, sendo este efeito conhecido como retardo (BEDIENT et al., 1994). Além da influência que o carbono orgânico exerce sobre o transporte de contaminantes, sua presença é também importante para a estimulação da biomassa do aquífero (HARVEY et al., 1992). As amostras de solo destinadas à análise de matéria orgânica foram enviadas ao Laboratório Físico Químico e Biológico da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), tendo sido analisadas pelo método de colorimetria utilizando espectrofotômetro UV-visível ($\lambda = 645$ nm). Tradicionalmente, a conversão de matéria orgânica em carbono orgânico é realizada por meio da divisão do percentual de matéria orgânica pelo fator de conversão 1,72; assumindo que a matéria orgânica contém 58% de carbono orgânico (REYES-JARAMILLO, 1996). No entanto, este fator de conversão pode variar dependendo da profundidade da camada de solo. Em virtude da possibilidade de variações e, sabendo que as amostras de solo enviadas para análise foram provenientes de camadas (profundidades) distintas, para solos superficiais utiliza-se o fator de conversão 1,9 e para os subsuperficiais 2,5 (BROADBENT, 1953). De acordo com a ASTM (2000), solos situados a uma profundidade de até 1m são considerados superficiais e aqueles abaixo desta profundidade consideram-se como subsuperficiais. Portanto, para as amostras de solo coletadas na profundidade de até 1m abaixo da cota do terreno foi utilizado o fator de conversão 1,9 e para aquelas coletadas em profundidades maiores do que 1m utilizou-se o fator de conversão 2,5.

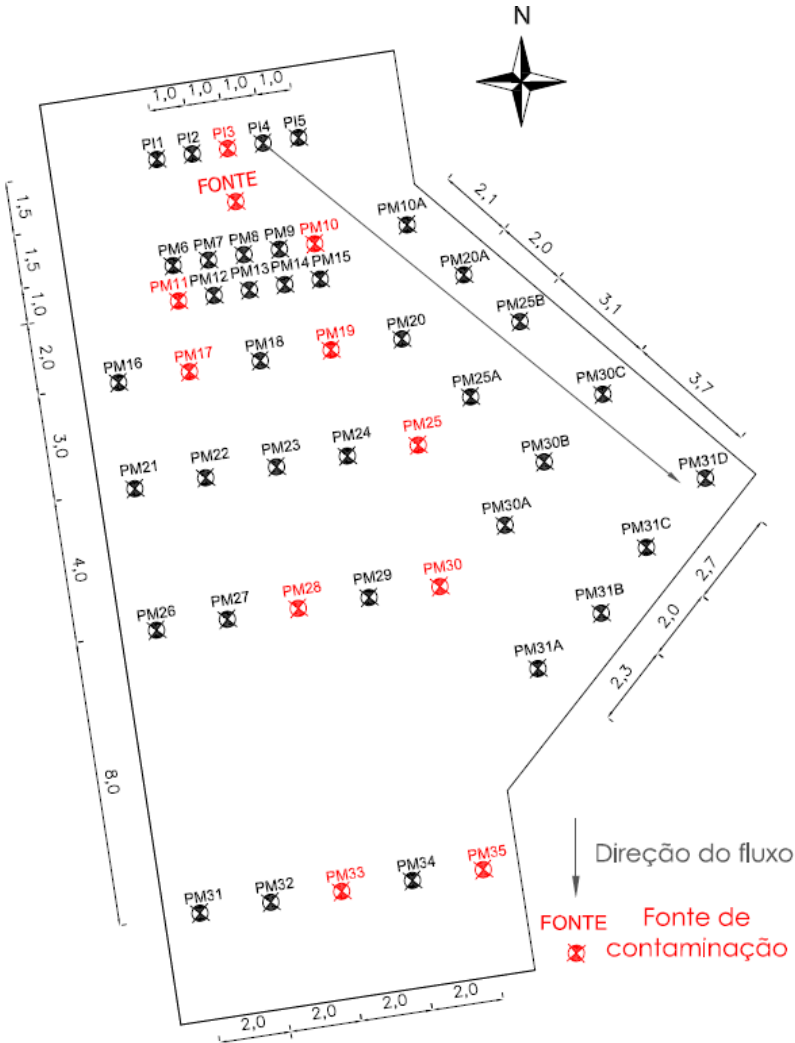
Para determinar propriedades mineralógicas das camadas de solo coletadas durante as sondagens, os argilominerais foram analisados pelo método de Difractometria de Raios X, o qual é utilizado para obter informações sobre características estruturais de um determinado composto. Estas informações são geradas quando ocorre a penetração do raio na estrutura cristalina dos argilominerais, fazendo com que os átomos difratem os raios X, produzindo um novo conjunto de ondas esféricas que se combinam e o ângulo desta frente de ondas é detectado e registrado pelo equipamento, possibilitando identificar os diferentes

argilominerais presentes nas amostras (OLIVEIRA, 2001). Por fim, em virtude de a composição nutricional do solo exercer influência sobre a densidade e diversidade da biomassa do aquífero, informações a respeito da disponibilidade de macro e micronutrientes são importantes para avaliar as condições originais da área (*background*) e verificar a existência de limitações nutricionais que podem dificultar o crescimento de micro-organismos no local e, conseqüentemente, desfavorecer os processos de biodegradação no aquífero. Para tanto, amostras de solo foram submetidas à análise dos nutrientes: nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, zinco, manganês, alumínio, sódio, boro e cobre, pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica, realizada pelo Laboratório Físico Químico e Biológico da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC).

6.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO AQUÍFERO

Previamente à liberação controlada da mistura B20, foi necessário realizar a caracterização físico-química e microbiológica do aquífero com o intuito de avaliar as características da área antes da introdução do contaminante e possibilitar a análise das variações que possam eventualmente ocorrer em virtude da presença do biocombustível. Para a caracterização físico-química, foram coletadas amostras nos níveis de profundidade 2 e 6 metros, provenientes de 11 poços de monitoramento: PMF, PM3, PM10, PM11, PM17, PM19, PM25, PM28, PM30, PM33 e PM35 (FIGURA 6.7). As análises realizadas em campo foram: temperatura, pH, condutividade específica, oxigênio dissolvido, potencial de oxidação-redução e salinidade. As análises realizadas em laboratório por técnicas de espectrofotometria, titulometria e cromatografia foram: ferro (Fe^{2+}), sulfeto, acidez, alcalinidade, ânions (acetato, cloreto, nitrito, brometo, nitrato, fosfato e sulfato). Para a caracterização microbiológica foram analisados os mesmos 11 poços de monitoramento, no entanto, somente no nível 2 m (detalhes no item 6.5.3). As variáveis analisadas nesta etapa de caracterização foram: bactérias totais, ferro e sulfato-redutoras e arqueas, respectivamente. Os métodos de análise para as variáveis físico-químicas e microbiológicas estão descritos nos itens 6.5.1 ao 6.5.3.

FIGURA 6.7. Área experimental e poços selecionados para a caracterização da área destacados em vermelho⁴.



⁴ Os poços de monitoramento PM10A, 20A, 25A, 25B, 30A, 30B, 30C, 31A, 31B, 31C e 31D foram instalados, após a liberação do B20, para readequar a área experimental no sentido da direção preferencial do fluxo da água subterrânea.

6.5.1 Amostragens e Determinações Físico-Químicas

A coleta das amostras de água subterrânea foi conduzida por bombeamento com auxílio de uma bomba peristáltica marca *Millipore* (modelo Easy-Load) e, para cada poço de monitoramento amostrado foi utilizada uma mangueira *Masterflex® Tygon*, que não possui reatividade aos contaminantes estudados neste trabalho. A fim de evitar problemas de contaminação cruzada, a amostragem foi realizada no sentido dos pontos de menor concentração para os mais concentrados. No momento da coleta foram conduzidas as medições em campo de temperatura, pH, condutividade específica, oxigênio dissolvido, potencial de oxidação-redução e salinidade, utilizando um analisador *Micropurge® Flow Cell*, (modelo MP20) previamente calibrado em laboratório, de acordo com as especificações do fabricante. A água retida no interior das mangueiras dos diferentes níveis de profundidade foi descartada, já que possui características distintas da condição do aquífero no momento da coleta e, quando a amostra representativa da realidade do aquífero passou a ser bombeada (evidenciada pelo equilíbrio dos valores pH, POR, oxigênio dissolvido, etc) a coleta das amostras destinadas ao laboratório foi realizada, tendo sido acondicionadas em caixas térmicas com gelo até o momento da análise.

Para análises de Fe^{2+} e sulfeto, as amostras de água subterrânea foram coletadas em frasco âmbar de 250 mL e conduzidas ao laboratório. Para ambas as análises, as amostras foram homogeneizadas e um volume de 25 mL foi retirado para análise. As determinações de Fe^{2+} e sulfeto foram realizadas em espectrofotômetro de bancada marca HACH (modelo DR/2500), sendo a análise de Fe^{2+} baseada no método 1,10 fenantrolina 3500 – Fe D e de sulfeto conduzida de acordo com o método de azul de metileno 4500 – S^{2-} D; A absorvância das amostras foi analisada nos comprimentos de onda de 510 e 664nm para Fe^{2+} e sulfeto, respectivamente (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998). O limite de detecção para Fe^{2+} é de $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para sulfeto $2 \mu\text{g.L}^{-1}$.

As análises de acidez e alcalinidade foram realizadas pela técnica de titulometria baseando-se nos métodos 2310B e 2320B (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998). As amostras foram coletadas em frasco âmbar de 250 mL, homogeneizadas e, então foram retirados 50 mL para as análises. A titulação foi conduzida com

bureta digital (*Brinkmann*) e o ponto de viragem foi monitorado com auxílio de um pHmetro (marca *Orium*; modelo 9107BN). Para a determinação de acidez foi utilizada uma solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,02M e o ponto de viragem estabelecido em pH = 8,3 e para alcalinidade utilizou-se uma solução padronizada de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,01M e ponto de viragem em pH = 4,3. Os resultados de ambas as análises são expressos em mg CaCO₃.L⁻¹.

A análise de ânions foi realizada por cromatografia de íons utilizando cromatógrafo marca Dionex (modelo ICS-1000) equipado com detector de condutividade iônica, coluna AS22, utilizando como fase móvel soluções de carbonato de sódio (4,5mM) e bicarbonato de sódio (1,4mM). Foi utilizado o método 4110 B “*Ion Chromatography with Chemical Suppression of Eluent Conductivity*” (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998), tendo sido analisados os seguintes ânions: acetato, cloreto, nitrito, brometo, nitrato, fosfato e sulfato. As amostras foram coletadas em frascos de 30 mL, acondicionadas em geladeira com temperatura de aproximadamente 5°C e analisadas logo após a coleta em virtude de o tempo de conservação do nitrato, nitrito e fosfato ser inferior a 48 horas, já que estes ânions podem ser consumidos como nutrientes por determinados micro-organismos e, portanto, produzir resultados inferiores à concentração da amostra no momento da coleta. O limite de detecção foi de 8 µg.L⁻¹ para o ânion brometo e de 1 µg.L⁻¹ para os demais ânions.

Para a análise dos BTEX e metano, a amostragem da água subterrânea foi feita em frascos de 40 mL contendo HCl (1:1) para conservação. O método de análise utilizado para a detecção de ambos foi o EPA/5021A combinado com EPA/8015D (US EPA, 1996a). As amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás HP (modelo 6890 – série II) com *HeadSpace Autosampler* HP – estático (modelo 7694) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida HP 1 (metil siloxano) com 0,53mm de diâmetro interno, 30m de comprimento e 2,65µm de espessura. A temperatura do injetor e detector para análise de BTEX foi de 260°C e 280°C, respectivamente. Para a análise de metano, a temperatura do injetor e detector foi de 160°C e 250°C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹. A programação de temperatura para estes analitos foi conduzida de acordo com a TABELA 5.10. e o limite de detecção para cada um dos compostos BTEX e para metano foi de 1 µg.L⁻¹ e 10 µg.L⁻¹, respectivamente.

A realização da análise de HPAs requer primeiramente um processo de extração em virtude de sua baixa solubilidade em água. As amostras para análise de HPAs foram coletadas em frascos de 100 mL contendo tiosulfato de sódio como preservante. Para o processo de extração foi utilizado o método EPA 525.2 - extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*). Para tanto, foram utilizados cartuchos de SPE (Spe-ed™, 0,2 g/3 mL, marca *Applied Separations*) de Octadecil (C₁₈/18%C), acoplado a um sistema de vácuo tipo "manifold". A primeira etapa do processo de extração consiste na ativação da fase sólida do cartucho com 3 mL de metanol e em seguida 3 mL de água. As amostras foram percoladas através do cartucho em um fluxo de aproximadamente 10 mL.min⁻¹, sendo a eluição conduzida com o solvente diclorometano (CH₂Cl₂). Em seguida, as amostras tiveram seus volumes concentrados para 1 mL, utilizando-se secagem com gás nitrogênio. Os extratos foram armazenados em geladeira até o momento da análise, tendo sido acondicionado em geladeira dentro de um período de até 40 dias, conforme recomendação do método. Por fim, as amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás HP (modelo 6890 – série II) equipado com detector de ionização de chama (FID). A temperatura do injetor e detector foi de 260°C e 320°C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo de 3mL.min⁻¹ e a coluna capilar utilizada foi HP-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) de 30m x 0,32 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 mm. A programação de temperatura no forno foi conduzida de acordo com a TABELA 5.10. A quantificação dos HPAs foi realizada de acordo com método EPA 8015, sendo a curva de calibração preparada com padrões certificado da Dr. Ehrenstorfer (PAH – Mix 9) em solução de diclorometano. Os 14 HPAs detectados sequencialmente e seus respectivos limites de detecção foram: naftaleno (7 µg.L⁻¹), metil-naftaleno (5 µg.L⁻¹), dimetil-naftaleno (7 µg.L⁻¹), acenafetileno (8 µg.L⁻¹), acenafteno (8 µg.L⁻¹), fluoreno (8 µg.L⁻¹), fenantreno (9 µg.L⁻¹), antraceno (9 µg.L⁻¹), fluoranteno (10 µg.L⁻¹), pireno (9 µg.L⁻¹), benzo(a)antraceno (9µg.L⁻¹), criseno (10µg.L⁻¹), dibenzo(A,H)antraceno (12µg.L⁻¹), benzo(b)fluoranteno (12 µg.L⁻¹), benzo(k)fluoranteno (31µg.L⁻¹), benzo(a)pireno (36 µg.L⁻¹), indeno(1,2,3-CD)pireno (28 µg.L⁻¹) e benzo(G,H,I)pireno (11 µg.L⁻¹).

Conforme mencionado no item 5.10, os ácidos orgânicos voláteis (AOVs) podem ser produzidos na etapa acidogênica e, portanto, sua análise torna-se importante para verificar as rotas e os processos de

degradação no ambiente subsuperficial. A coleta das amostras para análise de ácidos orgânicos voláteis foi realizada em frasco âmbar de 30 mL contendo ácido oxálico (0,83 M) para manter o pH baixo e os ácidos em sua forma não ionizada. Após coletadas, as amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás HP (modelo 6890 – série II) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar HP- *Innowax* Polietilenoglicol de 30m x 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 mm. A temperatura do injetor e detector para análise de ácidos orgânicos voláteis foi de 220°C e 250°C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo de 5,0 mL.min⁻¹. A programação de temperatura para estes analitos foi conduzida de acordo com a TABELA 5.10. Para preparação da curva de calibração foi utilizado um padrão (marca *Supelco Volatile Acid Standard Mix*) contendo uma mistura de ácidos orgânicos voláteis com os seguintes compostos: ácido acético, ácido butírico, ácido fórmico, ácido heptanóico, ácido hexanóico, ácido isobutírico, ácido isocapróico, ácido isovalérico, ácido propiônico e ácido valérico. O limite de detecção foi de aproximadamente 0,1 mg.L⁻¹ para cada ácido.

TABELA 5.10. Programação de Temperatura do Forno para Análises de BTEX, metano, HPAs e AOVs.

Analito	Taxa de aquecimento (°C.min⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
BTEX	-	70	2,00
	5	120	0,00
	30	210	0,00
Metano	-	40	3,00
	30	250	2,00
HPAs	-	40	3,00
	8	80	0,00
	12	300	2,00
AOVs	-	100	3,00
	10	185	3,00
	30	240	2,00

6.5.2 Amostragem e Análise de Hidrogênio (H₂) Dissolvido em Água Subterrânea

A análise de H₂ dissolvido em água subterrânea é fundamental para a determinação dos processos de oxidação e redução predominantes em águas subterrâneas impactadas por contaminantes orgânicos, bem como para a caracterização das comunidades microbianas atuantes nos processos de degradação (CHAPELLE et al., 1997; VROBLESKY et al., 2007; HEIMANN et al., 2010). Em virtude da limitada solubilidade do H₂ em água (concentração de saturação em água = 0,73mM ou $\approx 10^{-3}$ M) (KRASIKOVA et al., 1999) e por ser altamente volátil, as etapas de amostragem, armazenamento e transporte até o laboratório tornam sua coleta e análise extremamente complexas.

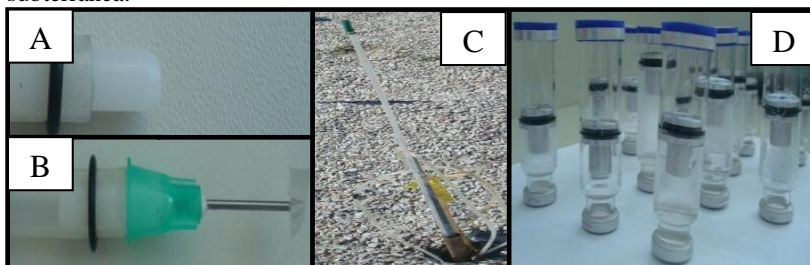
Pelo fato de o hidrogênio dissolvido ser observado em baixíssimas concentrações na água subterrânea (até $\approx 10^{-9}$ M), há necessidade de utilizar métodos bastante precisos e capazes de detectar tais concentrações. O método conhecido como “*bubble stripping*” é frequentemente utilizado para realizar estas medições. Porém, este método requer o bombeamento das amostras o que provoca perturbações no sistema resultando no favorecimento da dissolução do dióxido de carbono (comumente presente nas amostras) que, por sua vez, prejudica a detecção do H₂. Recentemente foi desenvolvido um método utilizando amostradores passivos, que consiste no emprego de seringas específicas para gases (*gastight*) conectadas a mangueiras de silicone que permitem a difusão dos gases da fase aquosa para o interior da seringa (FIGURA 6.4). O equilíbrio entre as fases se dá pela imersão dos amostradores na água subterrânea que pode variar de 4 a 7 dias, sendo que o período de 4 dias de imersão demonstrou ser suficiente para promover o equilíbrio (SPALDING e WATSON, 2008). Este método dispensa a necessidade de bombeamento já que os amostradores são imersos na água subterrânea e analisados em seguida, evitando perturbações no sistema e perdas por volatilização (SPALDING e WATSON, 2008; McLEISH et al., 2007; SPALDING e WATSON, 2006). Considerando que o método por amostradores passivos se mostrou mais eficiente para detecção de H₂ dissolvido em águas subterrâneas quando comparado ao tradicional método de *bubble stripping* (SPALDING e WATSON, 2006), as amostragens na água subterrânea foram conduzidas por amostradores passivos e as análises em laboratório foram realizadas por cromatografia a gás, baseadas na metodologia descrita nos artigos supracitados.

Em virtude da dificuldade em encontrar laboratórios capazes de analisar H_2 dissolvido em água subterrânea (com limites de detecção de $\approx 10^{-9}$ M), a realização do serviço foi possível somente em novembro de 2012, período referente a 2,4 anos após a liberação do B20. O método foi baseado nos artigos de Spalding e Watson, (2006 e 2008) e, a validação deste, assim como a confecção dos amostradores passivos, foram realizados pela empresa Construmaq. Os poços selecionados para esta análise foram Fonte, PM9 e PM15 (níveis 2 e 6m).

O método de amostragem consistiu em imergir os amostradores em profundidades pré-definidas na água subterrânea, onde permaneceram por 5 dias para permitir que o H_2 dissolvido na água se difundisse pela membrana de silicone do amostrador até atingir o equilíbrio (FIGURA 6.8). Após transcorridos os 5 dias de imersão na água subterrânea, os amostradores passivos foram retirados para coleta das amostras. Neste procedimento, o septo de silicone foi retirado da ponta da agulha incorporada à extremidade superior da mangueira de silicone e esta foi introduzida no septo de borracha de frascos de coleta com capacidade de 40 mL. Estes frascos contêm um êmbolo, o qual promoveu a sucção da amostra contida no amostrador passivo para seu interior, sendo posteriormente enviado para análise no laboratório.

A análise foi conduzida em cromatógrafo à gás portátil (modelo U-13 Construmaq São Carlos), equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna empacotada *HayeSepD*. Para o injetor e o forno foi utilizada temperatura ambiente (entre 24,2 a 27,2 °C). Foi utilizado nitrogênio (N_2) como gás de arraste a uma vazão de 33 a 34 mL.min⁻¹ e o tempo de retenção do hidrogênio foi determinado em 30 segundos. A curva de calibração foi realizada utilizando concentrações variáveis de H_2 dissolvido em água ultrapura, provenientes de cilindro de gás padrão analítico e o limite de detecção desta análise foi de 10^{-9} M.

FIGURA 6.8. Amostrador passivo utilizado na análise de H_2 dissolvido em água subterrânea.



Nota: Detalhe da vedação das extremidades inferior (A) e superior (B) do amostrador. Introdução e imersão do amostrador na água subterrânea (C). Frascos contendo amostras na fase gasosa coletadas da área experimental (D).

6.5.3 Amostragens e Análises Microbiológicas

Para a caracterização microbiológica do aquífero, foram selecionados os mesmos poços de monitoramento designados para caracterização físico-química (FIGURA 6.7), porém foram coletadas amostras somente no nível mais superficial (nível 2,0 m). Isto se justifica pelo fato de a distribuição dos micro-organismos na água subterrânea estar fortemente relacionada com a presença de carbono orgânico e nutrientes no aquífero (HARVEY et al., 1984; HARVEY et al., 1992; LEHMAN et al., 2001) e, considerando que estes se encontram predominantemente nas camadas mais superficiais (na zona não saturada), optou-se por analisar somente o nível 2,0 m na etapa de caracterização do aquífero. Já nas campanhas de monitoramento que sucederam a liberação controlada do B20, foram analisados os níveis 2 e 6 metros para investigar o efeito da distribuição vertical da pluma de NAPLs – *non-aqueous phase liquids* - na concentração e composição das comunidades bacterianas de interesse. O processo de amostragem envolveu a coleta de 1 litro de água subterrânea em frascos âmbar e após a coleta foram acondicionados em geladeira (aproximadamente 5°C) até o início das etapas de análise. O volume amostral (1 litro) foi estabelecido levando em consideração a distribuição dos micro-organismos no ambiente subsuperficial, uma vez que a maior parte

destes encontra-se adsorvida na superfície de sólidos suspensos ao invés de dispersos na água (LEHMAN et al., 2001), havendo a necessidade de coletar um volume significativo de água subterrânea para uma quantificação representativa do DNA microbiano presente no aquífero.

As análises microbiológicas foram realizadas pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) que se refere a uma técnica de biologia molecular empregada para obtenção de amplificações exponenciais de DNA *in vitro*, utilizando elementos do processo natural de replicação do DNA. PCR quantitativo foi utilizado para quantificar bactérias totais, redutoras de ferro (gêneros *Geobacter* e *Pelobacter*), redutoras de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfuromusa* e *Desulfuromonas*) e arqueas (Crenarchaeota e Euriarchaeota). A escolha por estes micro-organismos foi baseada em estudos que observaram sua associação com a biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos (LOVLEY, 1997; CALDWELL e SUFLITA, 2000; COATES et al., 2001; ULRICH e EDWARDS, 2003; DA SILVA e ALVAREZ, 2004; MUYZER e STAMS, 2008). A quantificação das bactérias totais foi determinada utilizando os iniciadores BACT1369F e PROK1492R (BELLER et al., 2002; DA SILVA e ALVAREZ, 2004), para análise de bactérias redutoras de sulfato foram utilizados os iniciadores 361F e 685R (STULTS et al., 2001), para as bactérias redutoras de ferro foram utilizados os iniciadores 561F e 825R (STULTS et al., 2001) e, para arqueas foram utilizados os iniciadores ARCH1-1369F, ARCH2-1369F, PROK 1514R (DA SILVA e ALVAREZ, 2004) (TABELA 5.11). Os iniciadores são sequências de oligonucleotídeos que possuem a função de localizar a sequência alvo por meio de complementaridade entre as sequências e duplicá-la. As sequências de nucleotídeos codificam genes que por sua vez são traduzidos e expressos na forma de proteínas. Tais genes podem ser característicos de determinadas espécies bacterianas e, a presença destes pode fornecer informações a respeito da atividade metabólica dos micro-organismos. Portanto, os iniciadores selecionados devem possuir sequências complementares àquelas que codificam os genes pesquisados no DNA alvo. Para estimar a concentração das comunidades microbianas, foram preparadas curvas de calibração com diluições seriadas contendo DNA proveniente dos seguintes micro-organismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Geobacter metallireducens* e *Methanococcus maripaludis* para quantificação de bactérias totais, ferro e sulfato-redutoras e arqueas, respectivamente. Os cálculos para a

quantificação microbiana na curva de calibração foram disponibilizados no apêndice E.

A análise pelo método de biologia molecular requer a realização de diversas etapas até realizar a quantificação de DNA. A primeira etapa consiste na filtração das amostras de água subterrânea para concentrar os sólidos suspensos na água subterrânea cujo DNA será extraído. Para tanto, a filtração das amostras de água subterrânea foi conduzida utilizando um sistema de filtração composto por kitassato, bomba a vácuo, aparatos para encaixe dos filtros *Millipore* 0,22 μm e para incorporação da amostra (FIGURA 6.9). Os filtros *Millipore* foram pesados antes e após a filtração das amostras para possibilitar o cálculo da massa de sólidos retida, uma vez que a quantidade de sólidos suspensos nas amostras coletadas nos níveis 2 e 6 metros é bastante variável e, como podem influenciar nos resultados da análise, estes fatores foram considerados no cálculo dos resultados. Após a etapa de filtração, os filtros foram transferidos para tubos *PowerBead* (2mL), provenientes do kit de extração de DNA *MoBio Power Soil*TM (Carlsbad, CA), contendo uma solução tampão para conservar e evitar a decomposição dos ácidos nucleicos. Estes tubos contendo os filtros com o material retido foram acondicionados em freezer (marca *Summit commercial*, modelo FCL-44), a uma temperatura de aproximadamente -20°C, até o momento da análise.

FIGURA 6.9. Sistema de filtração a vácuo para amostras de água subterrânea.



Concluído o processo de filtração, o material retido foi submetido à etapa de extração que envolve uma série de procedimentos e emprega diversas soluções para que o DNA da amostra seja extraído, sendo a execução desta etapa conduzida de acordo com as recomendações do kit DNA *MoBio Power Soil™ kit* (Carlsbad, CA). A primeira etapa consiste na lise das células por meio de agentes químicos como detergentes aniônicos (SDS – dodecil sulfato de sódio) e agitação mecânica (vótex). Na segunda etapa ocorre a precipitação de compostos como substâncias húmicas, proteínas e materiais inorgânicos, tais compostos devem ser removidos para não comprometer as próximas etapas e para obtenção de DNA com maior nível de pureza. Na terceira etapa, quando na presença de alta concentração de sal, o DNA se liga à membrana de sílica (contida nos tubos *Spin filter*), enquanto que os outros compostos eventualmente presentes na amostra são eluídos, fazendo com que apenas o DNA permaneça adsorvido à membrana. Na quarta etapa é utilizada uma solução de etanol para remoção de contaminantes que possam ainda estar presentes, enquanto que o DNA permanece fixo à membrana de sílica. Por fim, na etapa final uma solução aquosa e estéril (livre de nucleases) é adicionada à membrana para que o DNA previamente fixado a esta seja eluído, produzindo uma solução de 100µL de volume de DNA os quais são armazenados em freezer (marca *Summit commercial*, modelo FCL-44), a uma temperatura de aproximadamente -20°C, até a próxima etapa.

O DNA obtido no processo de extração foi introduzido na placa de PCR (com capacidade para 96 amostras), juntamente com uma solução composta por (i) iniciador senso e anti-senso (*primer forward; reverse*), (ii) água Milli-Q autoclavada, (iii) sonda de oligonucleotídeos e (iv) SYBR[®] Green ou Taqman Universal PCR MasterMix[®] (Applied Biosystems) (dependendo da análise), sendo esta solução referida como *MasterMix*. Nas placas de PCR, foi adicionado 2 µL do DNA alvo (extraído) e 23 µL da solução *MasterMix*, totalizando um volume de 25 µL em cada um dos 96 poços. Com relação à concentração dos componentes do *MasterMix*, os iniciadores (senso e anti-senso) foram inicialmente diluídos para uma concentração de 50 µM e, na solução *MasterMix*, a concentração destes foi de 0,5 µM. As sondas foram adicionadas na concentração de 0,25 µM e 1xTaqMan / SybrGreen (equivalentes a um volume de 12,5 µL) e, para completar o volume final de 23 µL, água Milli-Q autoclavada foi adicionada.

Após a preparação das placas de PCR contendo o DNA alvo e a solução alvo e a solução *MasterMix*, foi realizada a análise no termociclador (*Mastercycler ep Realplex*). A reação em cadeia da polimerase ocorre em 3 etapas distintas: desnaturação, anelamento e extensão. A primeira etapa consiste na abertura da fita de DNA alvo, por meio do processo de desnaturação térmica, o qual ocorre na faixa de temperatura de 92-96°C. Na etapa seguinte, é feito um resfriamento no equipamento para temperaturas de aproximadamente 56°C, com o objetivo de permitir o anelamento dos iniciadores. Na etapa final ocorre a polimerização das fitas de DNA, pela ação da enzima Taq DNA polimerase, em uma faixa de temperatura semelhante à etapa de anelamento. No presente trabalho, a programação de temperatura para as análises de PCR iniciou em 50°C durante 2 minutos com o objetivo de ativar a atividade da DNA polimerase, o processo de desnaturação foi realizado a uma temperatura de 95°C por 10 minutos e tanto o anelamento como o processo de extensão foram conduzidos a 58°C durante 1 minuto. Em virtude de os micro-organismos encontrarem-se, em maior parte, adsorvidos à superfície de sólidos suspensos, os resultados foram expressos em número de cópias de gene por grama de sólidos suspensos totais. Os detalhes dos cálculos foram disponibilizados no apêndice E e os limites de detecção para as análises de bactérias totais, ferro redutoras, sulfato redutoras e arqueas foram de $9,34 \times 10^2$; $5,6 \times 10^2$; $3,5 \times 10^2$ e $4,5 \times 10^2$ cópias de gene.g⁻¹, respectivamente.

TABELA 5.11. Tipos e sequências de oligonucleotídeos dos iniciadores utilizados nas análises de biologia molecular pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Alvo	Sequência Iniciador Senso	Sequência Iniciador Anti-senso	Sonda
Bactérias Totais	5'CGGTGAATACGTTCYCG G3' (BACT 1369F)	5'GGWTACCTTGTTACGACTT3' (PROK1492R)	FAM- 5'CTTGTACACACCGCCCGTC3' -BHQ-1 (TM1389F)
Ferro- redutoras	5'-GCG TGT AGG CGG TTT CTT AA -3' (561F)	5'-TAC CCG CRA CAC CTA GTT CT -3' (825R)	Gbc2 5'-/56-FAM/CTC AAC CCA GGA AGT GCA TTG GAT AC/36-TAMSp/ -3'
Sulfato- redutoras	5'-AAG CCT GAC GCA SCA A -3' (361F)	5'-ATC TAC GGA TTT CAC TCC TAC A -3' (685R)	EUB1 5'/56-FAM/GTA TTA CCG CGG NTG CTG GC/36-TAMSp/ - 3'
Arqueas	5'CGGTGAATACGTCCCTGC 3' (ARCH1-1369F) 5'CGGTGAATATGCCCTGC 3' (ARCH2-1369F)	5'AAGGAGGTGATCCTGCCGC A3' (PROK1541R)	FAM- 5'CTTGTACACACCGCCCGTC3' -BHQ-1 (TM1389F)

6.5.4 Análise de Sequenciamento de DNA (Pirosequenciamento)

A análise de PCR foi conduzida com o intuito de identificar os principais grupos de micro-organismos relevantes para o processo de degradação anaeróbia dos BTEX. No entanto, esta análise abrange somente os grupos predominantes, sem mencionar a existência de outras comunidades microbianas que podem também contribuir para os processos de degradação. Portanto, as análises de sequenciamento de DNA foram realizadas com o objetivo de obter informações detalhadas a respeito das comunidades microbianas existentes nas amostras, principalmente com relação à classificação taxonômica (de Reino à Gênero), possibilitando relacionar os gêneros de micro-organismos detectados com suas atividades metabólicas.

Estas análises consistem na determinação da sequência de nucleotídeos presentes no DNA que se pretende sequenciar. O método tradicional de sequenciamento foi desenvolvido por Sanger et al. (1977), utilizando a técnica de dideoxynucleotídeos, baseando-se na síntese enzimática de uma fita complementar do DNA cujo crescimento é interrompido pela ação de um dideoxynucleotídeo. Porém, a existência de limitações associadas a esta técnica, como custo elevado e tempo necessário para sequenciar o DNA, acabaram incentivando o desenvolvimento de outras técnicas que pudessem suplantar tais limitações (NOSSA et al., 2010). Desta forma, o sequenciamento de DNA foi realizado pela técnica de pirosequenciamento, lançada comercialmente no ano de 2006 pela empresa *454 LifeSciences* (de propriedade da Roche), que permite analisar 1,2 milhões de sequências, com fragmentos contendo até 400 pares de bases, num período de aproximadamente 10 horas. O fato de todas as sequências poderem ser detectadas em apenas uma corrida faz com que seu custo seja inferior à maioria das técnicas existentes (NOSSA et al., 2010; AHMADIAN et al., 2006).

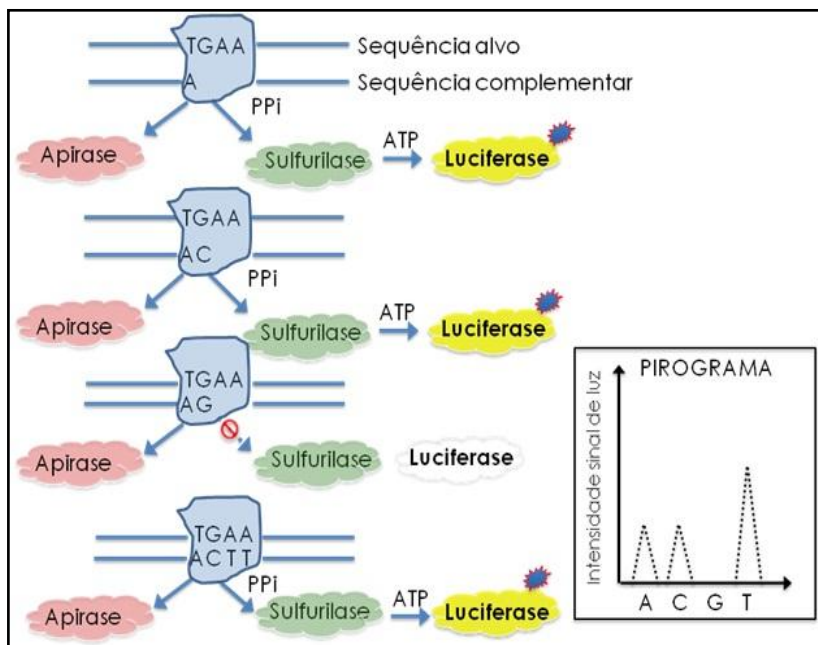
Esta técnica de sequenciamento é dividida em 3 etapas: preparo da amostra, PCR em emulsão e sequenciamento. Na primeira etapa, o DNA é fragmentado nas regiões específicas que se deseja sequenciar. Estes fragmentos, por sua vez, são ligados à microesferas magnéticas por meio de pareamento com sequências complementares presentes na

superfície da esfera. Cada esfera com um fragmento é isolada em uma gotícula de água em emulsão com óleo, na etapa denominada de PCR em emulsão, obtendo milhões de cópias do fragmento de DNA. As microesferas são então depositadas em uma placa contendo 1,6 milhões de poços microscópicos, cada poço armazena apenas uma esfera. Em seguida, são adicionados os reagentes da análise, como as enzimas polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase e os substratos adenosina 5' fosfosulfato (APS) e luciferina. Nesta reação, os desoxirribonucleotídeos (dNTPs) contendo as bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina e timina são adicionados em ordem pré-definida e, se o nucleotídeo adicionado formar pares de bases com os da sequência do DNA alvo, a enzima DNA polimerase fará a incorporação do nucleotídeo e, como consequência, moléculas de pirofosfato são liberadas. A enzima ATP sulfúrilase irá converter o pirofosfato liberado em ATP, na presença do substrato APS. Este ATP será posteriormente utilizado pela enzima ATP luciferase para conversão da luciferina em oxiluciferina que irá produzir luminescência. A intensidade do sinal luminoso observado no pirograma é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados e, aqueles que não forem incorporados, serão degradados pela enzima ATP apirase e não produzirão sinal luminoso (AHMADIAN et al., 2006) (FIGURA 6.10).

Estas análises foram realizadas no Departamento de Ecologia e Biologia Evolucionária da *Rice University* (Houston, TEXAS, EUA) no período entre 09 a 16/05/2012, utilizando a plataforma 454 do Sequenciador Genômico da Roche (*GS Junior System - Titanium*). Foram submetidas à análise de pirosequenciamento, amostras de DNA ($\approx 100\mu\text{L}$) acondicionadas em frascos *ependorf* (2 mL). Para preservação do DNA durante o deslocamento entre os laboratórios, as amostras foram submetidas à secagem utilizando cilindro de nitrogênio (N_2) e foram armazenadas em freezer -80°C ao chegar no laboratório e até o momento da análise. Foram utilizadas amostras provenientes da fonte de contaminação (nível 6m), coletadas antes e após a liberação do B20 (até 1,6 anos), para avaliar a sucessão ecológica dos micro-organismos ao longo do tempo, bem como observar o comportamento destes na presença de misturas de diesel e biodiesel (B20) e associá-los aos processos geoquímicos decorrentes no aquífero. Esclarecimentos a respeito do critério de seleção do poço de monitoramento e nível de profundidade analisados estão disponíveis na seção de resultados e discussão (item 7.3). Os iniciadores utilizados para a análise de bactérias

foram obtidos no trabalho de Nossa et al., 2010 e para arqueas foram utilizados os iniciadores contidos em Baker, et al., 2003.

FIGURA 6.10 Representação esquemática do princípio da técnica de pirosequenciamento com as enzimas envolvidas no processo – polimerase (azul), apirase (rosa), luciferase (amarelo) e sulfúrilase (verde).



Nota: Adaptado de Ahmadian et al. (2006).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstrados neste trabalho fornecem informações a respeito das condições originais do solo e da água subterrânea na área experimental (*background*) e das condições que se estabeleceram após a liberação controlada do B20, bem como a influência da bioestimulação metanogênica nos processos que ocorreram no ambiente subsuperficial e na aceleração da degradação dos compostos BTEX e HPAs.

7.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ORIGINAIS DO SOLO E DA ÁGUA SUBTERRÂNEA

7.1.1 Caracterização Hidrogeológica do Aquífero

Para a caracterização hidrogeológica do aquífero foram analisadas a condutividade hidráulica, direção preferencial do fluxo, perfil litológico, sondagens do solo, porosidade efetiva, granulometria, carbono orgânico, argilominerais, macro e micronutrientes. Primeiramente, com o intuito de fazer a correta alocação da área experimental e dos poços de monitoramento, análises da direção preferencial do fluxo da água subterrânea foram realizadas.

A análise do fluxo preferencial da água subterrânea foi conduzida, em um primeiro momento, com piezômetros localizados próximos à área experimental, porém ao fazer a análise de maneira regional, não somente utilizando piezômetros instalados no entorno da área experimental, foi constatada a necessidade de readequar a área experimental e, para tanto, os poços PM10A, 20A, 25A, 25B, 30A, 30B, 30C, 31A, 31B, 31C e 31D [(todos com 5 níveis de profundidade (2, 3, 4, 5 e 6m), totalizando uma área de 330,25m²] foram instalados na área (FIGURA 6.7).

FIGURA 7.1. Localização da área experimental (em vermelho) e piezômetros (em branco) utilizados para as medições do nível do lençol freático e para avaliar a direção do fluxo.



A determinação da condutividade hidráulica realizada por Lage (2005), a qual é uma medida importante para avaliar a velocidade da água subterrânea e a migração da contaminação dissolvida, revelou valores de condutividade de aproximadamente $10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$ e, segundo Fetter (1994), esta faixa é característica de areias siltsosas a finas. Da mesma forma, as sondagens do solo revelaram características semelhantes ao longo da área experimental (região da fonte e PM28), com predominância de camadas arenosas (FIGURA 7.2 e TABELA 7.1). Nas camadas mais superficiais (até 1,66 m) foi detectada a presença de matéria orgânica e lentes de argila, sendo que, na região da fonte a camada de argila demonstrou possuir uma espessura maior (66 cm) do que na região do PM28 (40 cm). Diante destas informações é possível concluir que as camadas superiores apresentam uma permeabilidade menor quando comparadas com as camadas inferiores, sendo tais dados importantes para avaliar a permeabilidade e o escoamento dos fluidos na área. Além disso, os resultados das análises granulométricas corroboraram com os resultados das sondagens, revelando a existência de solo predominantemente arenoso (TABELA 7.1). A porosidade efetiva é outro fator importante na dinâmica dos

processos subsuperficiais e na migração da pluma de contaminantes. O resultado desta análise revelou valores que variaram de 16,8 a 19%. Tal porosidade, segundo Fetter (1994), é característica de solos arenosos, o que é condizente com os resultados de análise granulométrica e sondagens do solo.

FIGURA 7.2. Representação do perfil litológico da área experimental na região da fonte e PM28.

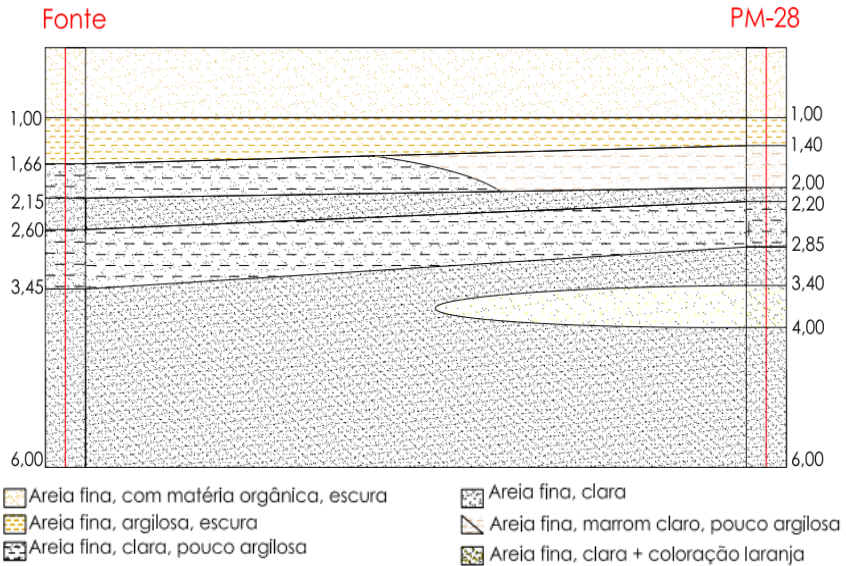


TABELA 7.1. Análises granulométricas das camadas de solo coletadas na área experimental e apresentadas na Figura 7.2.

Camadas	Argila (%)	Silte (%)	Areia Fina (%)	Areia Média (%)	Areia Grossa (%)
Areia fina, com matéria orgânica escura	6,53	4,28	73,10	16,10	0,00
Areia fina, argilosa, escura	11,58	3,95	70,14	13,84	0,49
Areia fina, clara, pouco argilosa	6,21	3,02	83,18	7,59	0,00
Areia fina, clara, com bastante água	2,73	2,35	82,06	12,86	0,00
Areia fina, clara	4,86	3,64	82,70	8,80	0,00
Areia fina, marrom clara, pouco argilosa	15,10	3,14	68,97	12,59	0,20
Areia fina, clara, coloração alaranjada	4,86	3,64	82,70	8,80	0,00

Os resultados das análises de teor de matéria orgânica demonstram que o solo da área experimental possui baixo teor de carbono orgânico (de 0,16 a 0,68%), o que é condizente com o perfil de solos arenosos os quais costumam possuir um percentual de carbono orgânico inferior a 1% (SPARKS, 2003). Diante destas informações, acredita-se que processos de sorção que poderiam resultar em retardo da pluma de contaminantes não foram significativos neste experimento. Além disso, os resultados sugerem que, previamente à liberação dos contaminantes, a biomassa do aquífero se encontrava relativamente baixa em virtude da limitada disponibilidade de carbono orgânico no solo.

TABELA 7.2. Resultado de análise de teor de matéria orgânica e carbono orgânico do solo.

Profundidade da camada (m)	Fator de conversão	MO (%)	CO (%)
0,5	1,9	1,30	0,68
1,2	2,5	0,90	0,36
2,5	2,5	0,50	0,20
3,0	2,5	0,4	0,16

Nota: MO = matéria orgânica; CO = carbono orgânico.

A caracterização dos argilominerais realizada pelo método de difratometria de raios X revelou a presença dos seguintes argilominerais: vermiculita, illita, caolinita, clorita, cristobalita, gibbsita e quartzo, os quais podem ser observados nos difratogramas (FIGURA 7.3). É possível prever o comportamento dos argilominerais no sistema água-argila através de propriedades como a expansividade, capacidade de troca iônica e o tamanho da área superficial. A expansividade se refere a uma variação volumétrica dos minerais argilosos devido aos diferentes teores de água absorvidos na estrutura do composto. A capacidade de troca iônica está relacionada aos íons fixados na superfície dos argilominerais entre as camadas e dentro dos canais da estrutura cristalina, podendo influir nas propriedades físico-químicas dos argilominerais (plasticidade, resistência mecânica, etc). A porosidade das partículas que constituem o solo irá influenciar no tamanho da área superficial. Solos compostos por microporos possuem elevada área superficial (GREGG e SING, 1982) e podem contribuir para a redução de sua permeabilidade. A área superficial específica é uma medida de área por unidade de peso ($m^2.g^{-1}$) e é diretamente proporcional à capacidade de retenção de água do material (TABELA 7.3).

TABELA 7.3. Valores da superfície específica e capacidade de troca catiônica de minerais (argilominerais e areias).

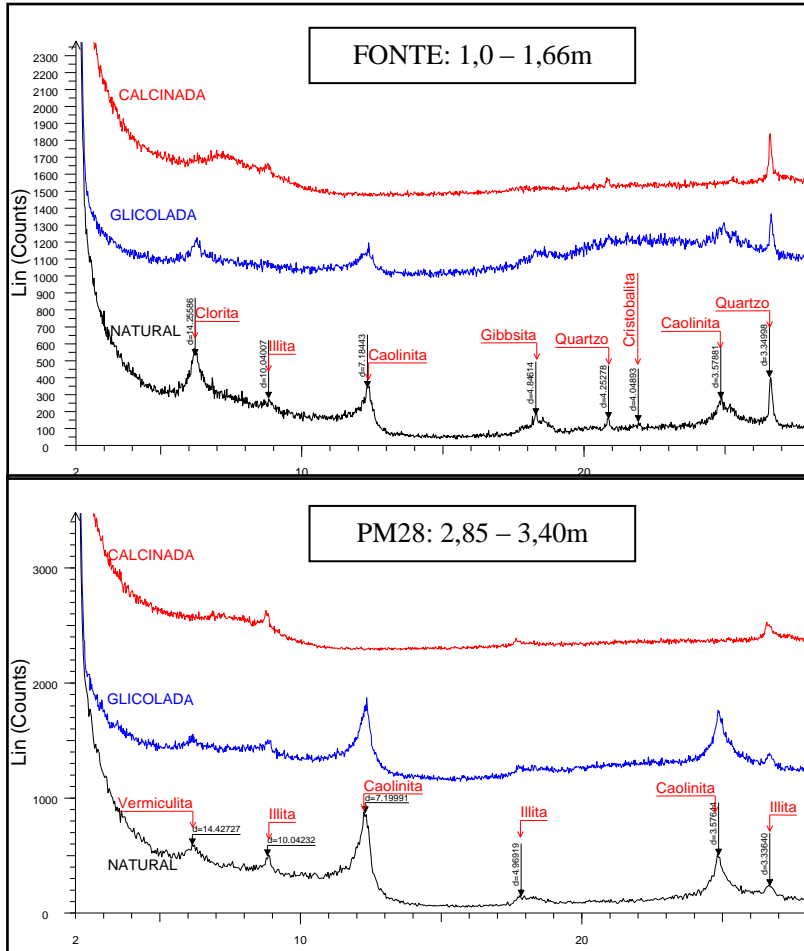
Mineral	Superfície específica¹ (m².g⁻¹)	Capacidade de Troca Catiônica² (cmol.kg⁻¹)
Caulinita	10 – 20	3 – 15
Ilita	70 – 120	10 – 40
Clorita	79 – 150	10 – 40
Vermiculita	300 – 500	100 – 150
Esmectita	700 – 800	60 – 150
Silte	< 1	muito pequena
Areia fina	< 0,1	muito pequena
Areia grossa	< 0,01	muito pequena

FONTE: ¹ Russell (1973); Bohn et al. (1979); Grim (1968)².

Com relação aos argilominerais detectados nas amostras, a vermiculita é conhecida por seu potencial de expansividade quando em contato com a água e, por possuir área superficial superior aos outros argilominerais (TABELA 7.3), possui uma maior capacidade de retenção de água, o que faz com que o solo se torne menos permeável e dificulte o processo de drenagem. A ilita também possui um potencial de expansividade, ainda que inferior ao da vermiculita, e baixa capacidade de troca catiônica, o que faz com que a adsorção de água seja baixa também. Já os argilominerais caulinita e clorita são silicatos pouco expansivos quando em contato com a água e possuem baixa capacidade de troca catiônica, conferindo ao solo propriedades de baixa plasticidade e permeabilidade. A gibbsita trata-se de um mineral de hidróxido de alumínio com características de pouca expansividade e baixa capacidade de troca catiônica, assemelhando-se ao comportamento da caulinita e clorita. A cristobalita e o quartzo são caracterizados como areia fina e, portanto não possuem capacidade de troca iônica ou expansividade, o que faz com que sua influência no escoamento dos fluidos seja de origem mecânica, uma vez que a areia pode se acumular nos poros existentes na superfície do solo (GRIM, 1968; SPARKS, 2003). Observa-se que, em função da presença do mineral argiloso vermiculita detectado na amostra referente ao PM28, o processo de drenagem poderia ser um fator preocupante. Porém, as argilas somente tornam-se predominantes se estiverem presentes numa proporção acima de 40%, a qual seria suficiente para influenciar a

hidrodinâmica dos fluidos (OLIVEIRA, 2001). No entanto, o percentual de argila encontrado nas amostras, de acordo com as análises granulométricas, permaneceu entre 2,73 e 15,1%.

FIGURA 7.3. Difratoograma de raios-X das amostras da área experimental.



A análise de macro e micronutrientes demonstrou que o solo possui uma baixa concentração de nutrientes (TABELA 7.4). Sabe-se que a presença de micronutrientes é importante para produção de aminoácidos, enzimas e paredes celulares microbianas. Da mesma forma, os macronutrientes são igualmente essenciais para a manutenção do metabolismo microbiano e fertilidade do solo. De acordo com os valores estabelecidos para interpretação da fertilidade do solo (SBCS – CQFS, 2004), foi possível observar que os micronutrientes ferro, boro e manganês estavam presentes em baixas concentrações, enquanto que as concentrações de zinco e cobre foram classificadas como média e alta, respectivamente. Os macronutrientes potássio, cálcio, magnésio e enxofre foram observados em uma faixa de concentração entre baixa e muito baixa. As concentrações de fósforo variaram nas diferentes camadas de profundidade, sendo que na camada superior (0,5m) a presença deste foi considerada muito alta e nas camadas mais profundas, a concentração detectada foi classificada como muito baixa e baixa. Por fim, o nitrogênio foi detectado em concentrações significativamente baixas, mesmo para um aquífero com percentual de matéria orgânica inferior a 2%. Portanto, a julgar pela concentração destes nutrientes no solo, observa-se que, de uma maneira geral, o sistema possui uma limitação nutricional, havendo a necessidade de ajustes para melhorar as condições originais do sistema e permitir a estimulação da biomassa.

TABELA 7.4. Análise da concentração de micro e macronutrientes do solo.

AMOSTRA	PROF. (m)	MICRONUTRIENTES (mg.kg solo ⁻¹)						
		FeT	Zn	Mn	Al	Na	B	Cu
PM28	0,5	N.A.	N.A.	N.A.	98,9	N.D.	N.A.	N.A.
	1,2	600	0,76	1,16	251,8	14	N.D.	0,88
	2,5	300	0,24	0,76	143,9	38	N.D.	0,56
	3,0	N.A.	N.A.	N.A.	269,8	12	N.A.	N.A.
		MACRONUTRIENTES (mg.kg solo ⁻¹)						
		NT	P	K	Ca	Mg	S	
	0,5	N.A.	>50	6,0	40,1	12,2	N.A.	
	1,2	400	7,9	30	140,3	36,5	0,2	
	2,5	500	5,4	21	80,2	24,3	0,2	
	3,0	N.A.	4,5	24	60,1	24,3	N.A.	

Notas: PROF. = profundidade; N.A. = não analisado; N.D = não detectado; FeT = ferro total; NT = nitrogênio total.

7.1.2 Caracterização Físico-Química da Água Subterrânea

A caracterização físico-química da água subterrânea, realizada em Outubro de 2009 (TABELA 7.5), forneceu informações a respeito das condições originais da área experimental permitindo conhecer as diferenças hidrogeoquímicas que se estabeleceram após a liberação do contaminante e o início da aplicação da técnica de bioestimulação. Em virtude de os pontos selecionados para a caracterização da área terem sido realizados nos níveis 2 e 6m e, considerando que a concentração dos analitos pode variar significativamente nestes níveis, o resultado da caracterização do aquífero foi expresso utilizando a mediana, a qual é uma medida mais representativa da tendência central dos dados, especialmente quando o conjunto de dados não possui uma distribuição normal (GILBERT, 1987; REIMANN, 2008). Adicionalmente, pelo fato de algumas variáveis terem permanecido abaixo do limite de detecção da análise, a utilização da mediana se torna ainda mais apropriada. Para os analitos detectados abaixo do limite de detecção, o valor considerado foi correspondente à metade do limite de detecção do método (GILBERT, 1987). Para a caracterização físico-química da água subterrânea foram analisadas as variáveis: temperatura, potencial de oxidação e redução, condutividade, oxigênio dissolvido, alcalinidade, acidez, pH, cloreto, brometo, fosfato, nitrato, nitrito, ferro (Fe^{2+}), sulfato, sulfeto e acetato (TABELA 7.5).

Com os resultados obtidos é possível observar que, o aquífero possui baixa disponibilidade dos analitos oxigênio dissolvido, brometo, fosfato, nitrito, sulfeto e acetato. Em virtude de este período do experimento anteceder a liberação dos contaminantes, é coerente que tenham sido observados valores predominantemente positivos de potencial de oxidação-redução e baixas concentrações das espécies reduzidas de receptores de elétrons anaeróbios como nitrito e sulfeto e, também de acetato que é produzido em reações de biotransformação anaeróbia dos contaminantes estudados neste trabalho. Os íons Fe^{2+} e sulfato foram observados em concentrações moderadas (até 7 mg.L^{-1} para ambos os compostos), enquanto que o nitrato foi detectado em altas concentrações em determinados poços, fato este que pode ser atribuído à prévia ocupação da área para atividades pecuárias. As medições de pH revelaram valores entre 4,0 e 5,0 e, de maneira complementar, foram observados valores elevados de acidez (de 68,35 a 128,85 $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$) e, conseqüentemente, baixos de alcalinidade (de 0,0 a 3,85 $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$). Sabe-se que apesar de ambientes com faixas de pH

entre 6 e 8 serem mais favoráveis ao crescimento de micro-organismos, algumas comunidades microbianas, como as do grupo ferro-redutoras, sulfato-redutoras e arqueas são capazes de crescer em faixas de pH mais ácidas, como as detectadas na área experimental (CHAPELLE, 2001; SHELOBOLINA et al., 2003; KOTSYURBENKO et al., 2004). A temperatura da água subterrânea variou entre 21 e 23°C. Tanto os valores de temperatura, como os de pH, são característicos das áreas experimentais da Fazenda Experimental da Ressacada (COSTA, 2008; CHIARANDA, 2011).

TABELA 7.5. Resultado de Análise de Variáveis Físico-Químicas e Geoquímicas do Aquífero.

VARIÁVEIS	POÇOS DE MONITORAMENTO ANALISADOS										
	FONT E	PM3	PM10	PM11	PM17	PM19	PM25	PM28	PM30	PM33	PM35
Temperatura (°C)	21,9	21,8	22,4	22,15	22,15	22,1	22,05	23,35	22,4	22,15	21,8
POR (mV)	115,5	148,5	128	180	107	96,5	184,5	258,5	288,5	255	206,5
OD (mg.L ⁻¹)	0,45	0,2	0,25	0,3	0,2	0,45	0,8	2,5	0,45	1,2	2,05
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	0,0	0,0	2,1	1,6	2,8	2,15	0,0	3,85	2,8	0,0	1,5
Acidez (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	109,6	116,1	65,5	128,85	109,05	85,35	75,35	55,9	98,55	71,25	68,35
pH	4,05	3,95	4,9	4,25	4,55	4,5	4,05	4,9	4,3	4,05	4,1
Cloreto (mg.L ⁻¹)	9,06	11,40	4,50	3,94	3,80	4,37	2,19	3,33	2,99	3,43	2,98
Brometo (mg.L ⁻¹)	0,06	0,004*	0,004*	0,10	0,48	0,20	0,04	0,004*	0,06	0,06	0,004*
Fosfato (mg.L ⁻¹)	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,15	0,0005*	0,0005*	0,07
Nitrato (mg.L ⁻¹)	8,48	19,77	5,26	79,70	0,12	1,25	44,00	3,68	18,32	15,07	3,58
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0,0005*	0,039	0,022	0,018	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*
Fe ²⁺ (mg.L ⁻¹)	3,05	0,32	5,81	0,88	7,02	3,28	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*
Sulfato (mg.L ⁻¹)	3,37	2,96	3,49	6,91	4,56	4,53	4,09	3,93	6,46	5,40	3,74
Sulfeto (mg.L ⁻¹)	0,006	0,009	0,0025	0,0005*	0,009	0,0065	0,004	0,0125	0,025	0,0025	0,004
Acetato (mg.L ⁻¹)	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,0005*	0,39	0,0005*	3,77	0,22	0,0005*	0,0005*

Nota: *Valores referentes à metade do limite de detecção de cada variável.

7.1.3 Caracterização Microbiológica da Água Subterrânea

As análises de caracterização microbiológica foram realizadas com os mesmos poços e no mesmo período que a caracterização físico-química, divergindo somente na quantidade de níveis amostrados (somente nível 2,0, conforme explicação prévia no item 6.5.3), e por isto não houve a necessidade de transformações matemáticas (mediana) para expressar os resultados, uma vez que não existem variações. Os resultados obtidos para o grupo bactérias totais demonstraram uma concentração variando de 10^5 a 10^7 cópias de gene.g^{-1} , tendo sido observadas concentrações semelhantes em outras áreas experimentais (livres de contaminação) na Fazenda Experimental da Ressacada (GUIMARÃES, 2011). Em contrapartida, na maior parte dos resultados, as comunidades microbianas ferro-redutoras, sulfato-redutoras e arqueas encontraram-se abaixo do limite de detecção (TABELA 7.6). Considerando que estas comunidades possuem atividades metabólicas fortemente associadas aos processos de degradação anaeróbia de compostos orgânicos (i.e. BTEX) e, que a concentração das espécies reduzidas de receptores de elétrons e metabólitos de degradação foi predominantemente baixa, é coerente que estas comunidades microbianas estivessem abaixo do limite de detecção nesta etapa do experimento quando os processos de degradação eram ainda inexistentes.

TABELA 7.6. Resultado da caracterização microbiológica da água subterrânea.

VARIÁVEIS (Cópias de gene.g ⁻¹)	POÇOS DE MONITORAMENTO ANALISADOS										
	FONTE	PM3	PM10	PM11	PM17	PM19	PM25	PM28	PM30	PM33	PM35
Bactérias totais	9,32×10 ⁵	1,17×10 ⁶	6,27×10 ⁵	5,72×10 ⁷	9,87×10 ⁵	3,21×10 ⁵	1,51×10 ⁷	9,12×10 ⁷	2,03×10 ⁷	1,86×10 ⁷	3,04×10 ⁶
Bactérias ferro-redutoras	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,00×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}
Bactérias sulfato- redutoras	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}
Arqueas	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}	5,0×10 ^{1*}

Nota: * Valores referentes à metade do limite de detecção.

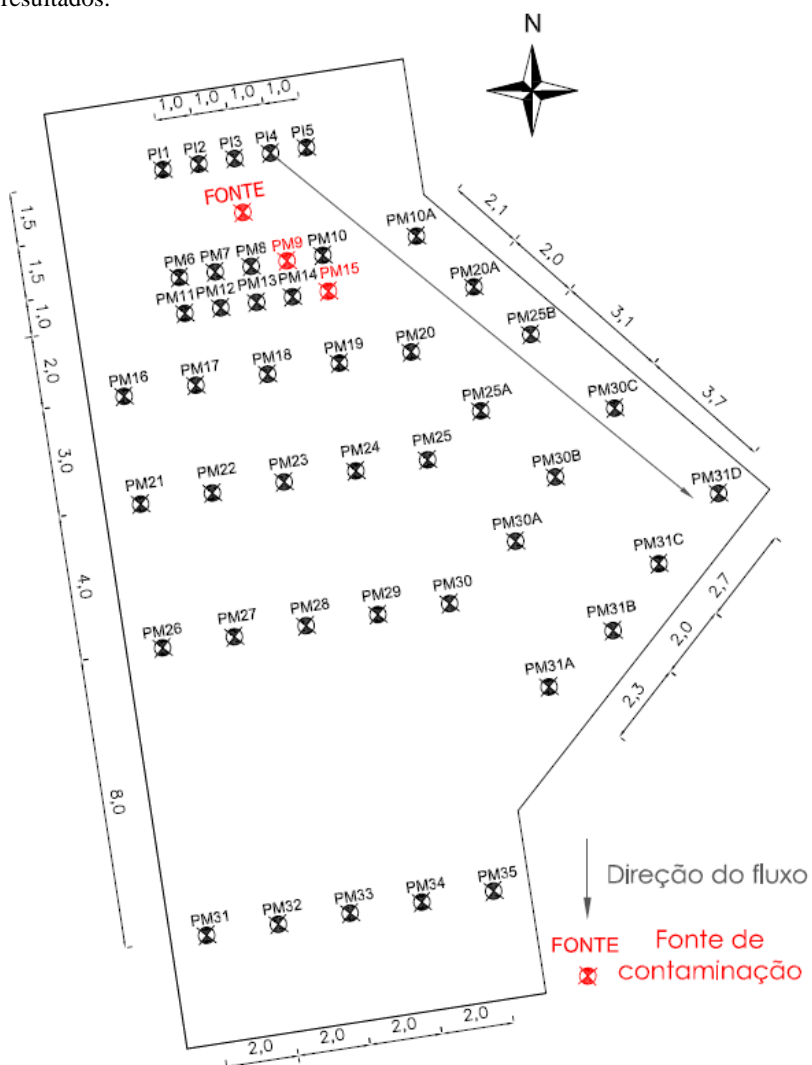
7.2 ALTERAÇÕES GEOQUÍMICAS NA ÁGUA SUBTERRÂNEA APÓS A LIBERAÇÃO DO B20 E INJEÇÕES DE ACETATO DE AMÔNIO

A seguir, serão apresentados dados do experimento após a liberação controlada do B20 e as injeções de acetato de amônio. Ao total, foram realizadas 7 campanhas de monitoramento, 1 antes (*background*) e 6 após a liberação do B20 (TABELA 7.7), sendo que a seleção dos poços analisados foi baseada na direção da migração dos contaminantes. As injeções de acetato de amônio iniciaram 1 mês após a liberação do B20 na área experimental e foram interrompidas após 1,4 anos (conforme mencionado no item 6.3). Para a discussão dos resultados deste trabalho foram selecionados os poços Fonte, PM9 e PM15, baseando-se no fato de que misturas de diesel e biodiesel se comportam como uma fonte fixa e persistente de contaminação, possuindo limitada capacidade de migração na água subterrânea, justificando a escolha pelos poços localizados na região da fonte. Foram selecionados os níveis 2 e 6m para a demonstração das variáveis físico-químicas e microbiológicas, porque estes níveis correspondem às maiores concentrações dos analitos de interesse.

TABELA 7.7. Períodos das campanhas de monitoramento realizadas neste experimento.

Campanhas de Monitoramento	Período da Campanha (mês e ano)	Tempo após a Liberação (ano/s)
0	10/2009	0
Liberação do B20	07/2010	0
Início das injeções	08/2010	0,1
1	10/2010	0,3
2	03/2011	0,7
3	07/2011	1,0
5	11/2011	1,4
Interrupção das injeções	12/2011	1,4
6	Junho/2012	2,0

FIGURA 7.4. Representação da área experimental com destaque (em vermelho) para os poços de monitoramento selecionados para demonstração dos resultados.



A liberação controlada de 100L do biocombustível diesel B20 juntamente com as injeções semanais de acetato de amônio (300 mg.L^{-1}) acarretaram no aumento da demanda bioquímica de oxigênio na área experimental, conforme esperado. Em virtude disso, alterações geoquímicas passaram a ocorrer e, por serem fundamentais para a compreensão dos processos decorrentes no ambiente subsuperficial, foram discutidas nesta seção.

De acordo com o modelo energético de McCarty (1969), o consumo de oxigênio pelos ésteres do biodiesel é relativamente elevado, principalmente quando comparado ao consumo de oxigênio pelos BTEX e acetato. Para exemplificar as demandas de oxigênio exercidas pelos diferentes compostos orgânicos, estão apresentadas na TABELA 7.8 as reações aeróbias de oxidação e redução dos compostos doadores de elétrons; palmitato (representando o grupo de ésteres presentes no biodiesel), BTEX (presentes na formulação do B20) e acetato (injetado semanalmente e subproduto metabólico das reações de degradação do biodiesel e dos BTEX), levando em consideração a produção de biomassa representada genericamente por $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$.

TABELA 7.8. Reações de oxidação-redução via respiração aeróbia do íon palmitato, compostos BTEX e acetato.

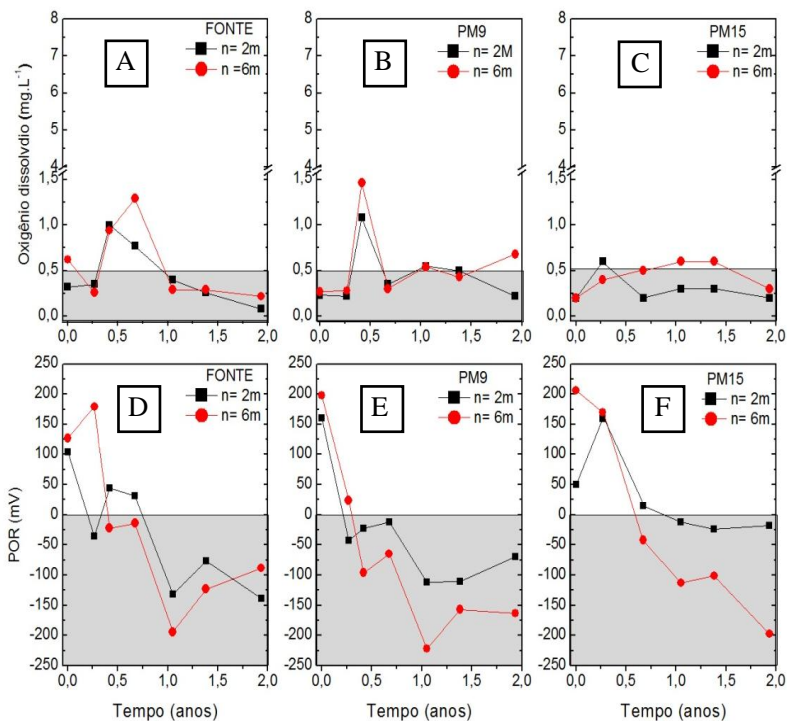
Compostos	Reações aeróbias de oxidação e redução
Palmitato	$C_{16}H_{31}O_2^- + 10 O_2 + 2 HCO_3^- + 3 NH_4^+ \rightarrow C_5H_7O_2N + 4 CO_2 + 12 H_2O$
Benzeno	$C_6H_6 + 3,3 O_2 + HCO_3^- + NH_4^+ \rightarrow C_5H_7O_2N + 2,7 CO_2 + 2,3 H_2O$
Tolueno	$C_7H_8 + 3,3 O_2 + HCO_3^- + NH_4^+ \rightarrow C_5H_7O_2N + 2,3 CO_2 + 2,7 H_2O$
Etilbenzeno	$C_8H_{10} + 5 O_2 + 1,5 HCO_3^- + 1,5 NH_4^+ \rightarrow 1,5 C_5H_7O_2N + 3,5 CO_2 + 4,5 H_2O$
Xileno	$C_8H_{10} + 5,5 O_2 + 1,5 HCO_3^- + 1,5 NH_4^+ \rightarrow 1,5 C_5H_7O_2N + 4 CO_2 + 5 H_2O$
Acetato	$CH_3COO^- + 0,82 O_2 + 0,24 NH_4^+ \rightarrow 0,24C_5H_7O_2N + 0,76 HCO_3^- + 0,06CO_2 + 0,76 H_2O$

FONTE: Adaptado de Gomes (2008) e Chiaranda (2011).

O oxigênio dissolvido foi detectado em baixas concentrações, mesmo na etapa de caracterização da água subterrânea e a maioria dos valores permaneceu igual ou inferior a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (FIGURA 7.5), indicando que condições anaeróbias foram constantemente observadas no experimento, uma vez que ambientes anaeróbios são caracterizados pela existência de concentrações de oxigênio dissolvido inferiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (WIEDEMEIER, 1999a; SCHREIBER e BAR, 2002). A introdução de matéria orgânica em excesso (biodiesel, diesel e acetato de amônio) contribuiu para intensificação de condições anaeróbias no sistema. Isto pôde ser evidenciado pela redução dos valores de potencial de oxidação-redução (POR), ao longo do tempo nos poços de monitoramento utilizados para demonstração (FIGURA 7.5). No poço Fonte, a variação dos valores durante o período experimental foi de 180 a -139 mV, tendo atingido valores ainda mais baixos como -184 mV, no período de 1 ano após a liberação. Comportamento semelhante foi observado nos outros poços de monitoramento estudados, já que os valores de POR variaram de 197 a -222 e 206 a -197 mV nos poços PM9 e PM15 respectivamente, durante todo o período do experimento.

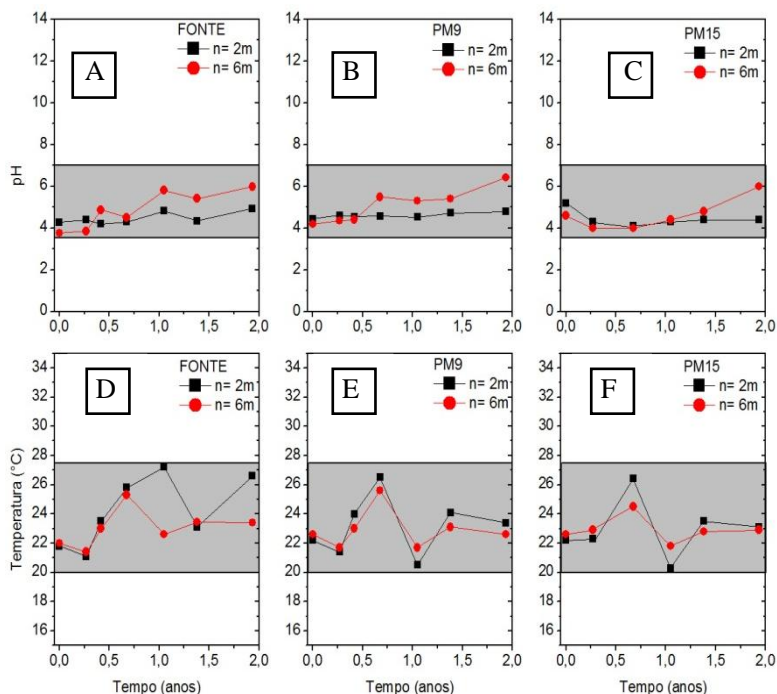
Sabe-se que o POR é uma medida que se refere à atividade de elétrons no meio, indicando uma tendência em aceitar ou transferir elétrons. Desta forma, o POR pode auxiliar na delimitação de zonas em diferentes processos de oxidação-redução na água subterrânea. Os valores de POR comumente observados no ambiente subsuperficial encontram-se na faixa de +800 a -400 mV (WEIDEMEIER, 1999a). Segundo Edmunds et al. (1984) e Champ et al. (1979), valores entre +250 e +100 mV caracterizam zonas de processos aeróbios e de nitrato-redução, faixas entre +100 e 0 mV seriam adequadas para ferro-redução, de 0 a -200 mV para sulfato-redução e, por fim, faixas inferiores a -200 mV seriam características de condições metanogênicas. No entanto, é importante mencionar que estas são faixas de POR estimadas para ambientes com pH = 7 e temperatura de 25°C, sendo diferentes das condições geoquímicas deste experimento (FIGURA 7.6). Portanto, os valores de POR devem ser utilizados como ferramentas de auxílio em conjunção com outras variáveis para uma avaliação mais adequada dos processos de oxidação-redução decorrentes da água subterrânea.

FIGURA 7.5. Concentrações de oxigênio (A, B e C) e potencial de oxidação-redução (D, E e F) ao longo do tempo nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 (níveis 2 e 6m).



Nota: Áreas destacadas em cinza representam as regiões correspondentes à anaerobiose (gráficos A, B e C) e valores negativos de potencial redução-oxidação (D, E e F).

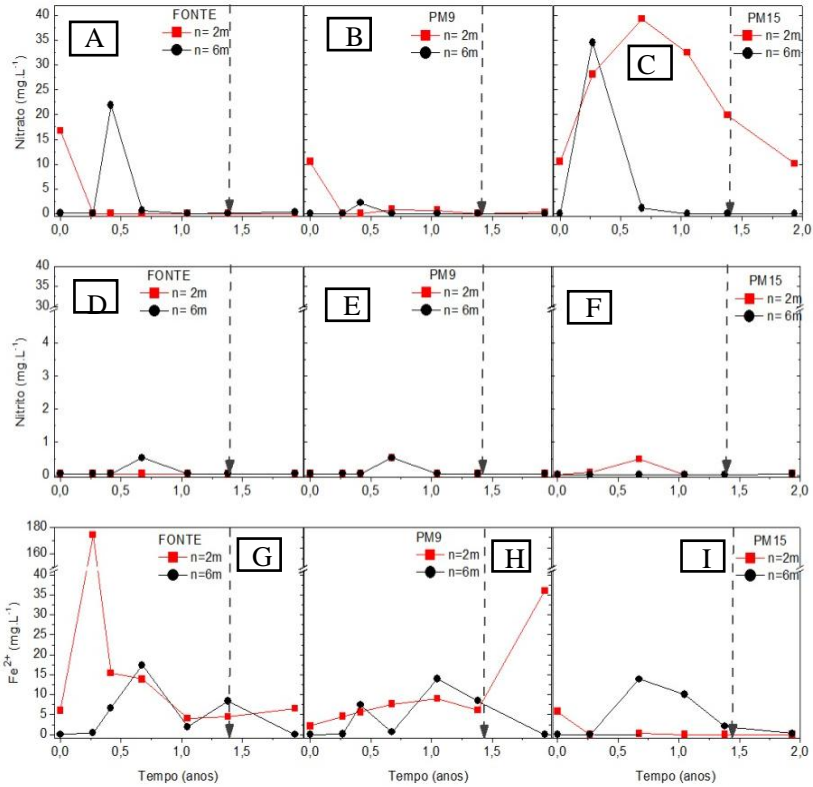
FIGURA 7.6. Faixas de valores de pH (A, B e C) e temperatura (°C) (D, E e F) ao longo do tempo nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 (níveis 2 e 6m).



Para avaliar a evolução geoquímica no experimento foi feita a análise da abundância dos receptores de elétrons e suas espécies reduzidas ao longo do tempo. Conforme discutido anteriormente, o oxigênio é o receptor de elétrons mais favorável termodinamicamente e capaz de gerar mais energia aos micro-organismos que o consomem. Associando esta informação aos resultados de concentração de oxigênio ao longo do experimento e à alta demanda bioquímica de oxigênio exercida pelos contaminantes e pelo acetato de amônio (injetado), observa-se que o sistema foi direcionado para condições anaeróbias e, considerando a hierarquia termodinâmica dos receptores, o processo via nitrato-redução, teoricamente, seria o próximo a ocorrer, seguido de ferro e sulfato-redução até atingir condições metanogênicas. Sendo assim, foram primeiramente apresentados os resultados de todos os receptores de elétrons e suas espécies reduzidas (FIGURAS 7.7 e 7.8)

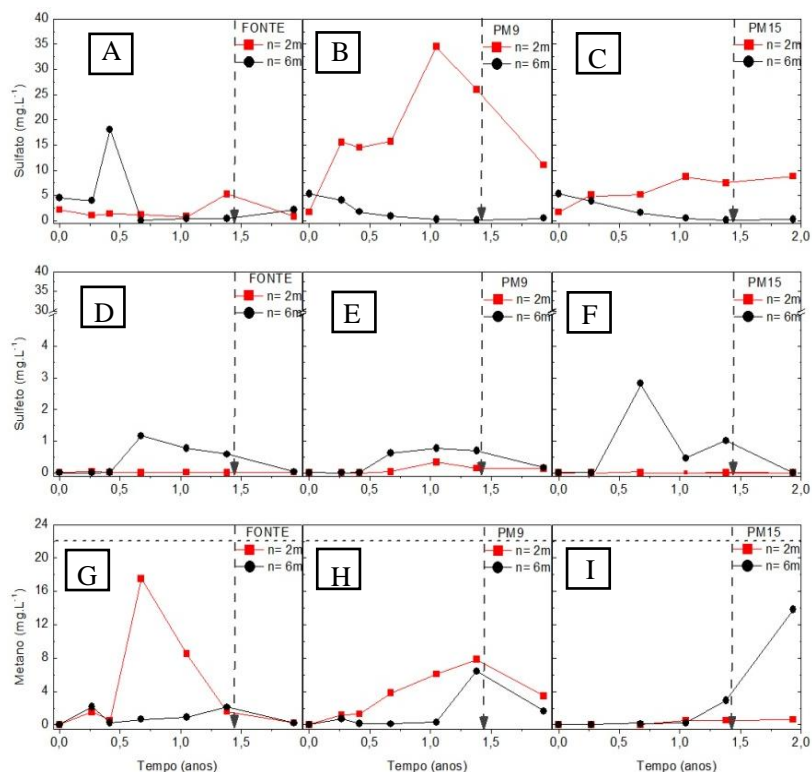
para permitir uma análise integrada da evolução geoquímica na área experimental. Considerando que não é possível realizar esta análise sem informações a respeito do comportamento dos substratos orgânicos disponíveis na área (BTEX, HPAs e acetato), estes resultados foram também disponibilizados (FIGURA 7.9).

FIGURA 7.7. Concentrações de nitrato (A, B, C), nitrito (D, E, F) e Fe^{2+} (G, H, I) nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 ao longo do tempo.



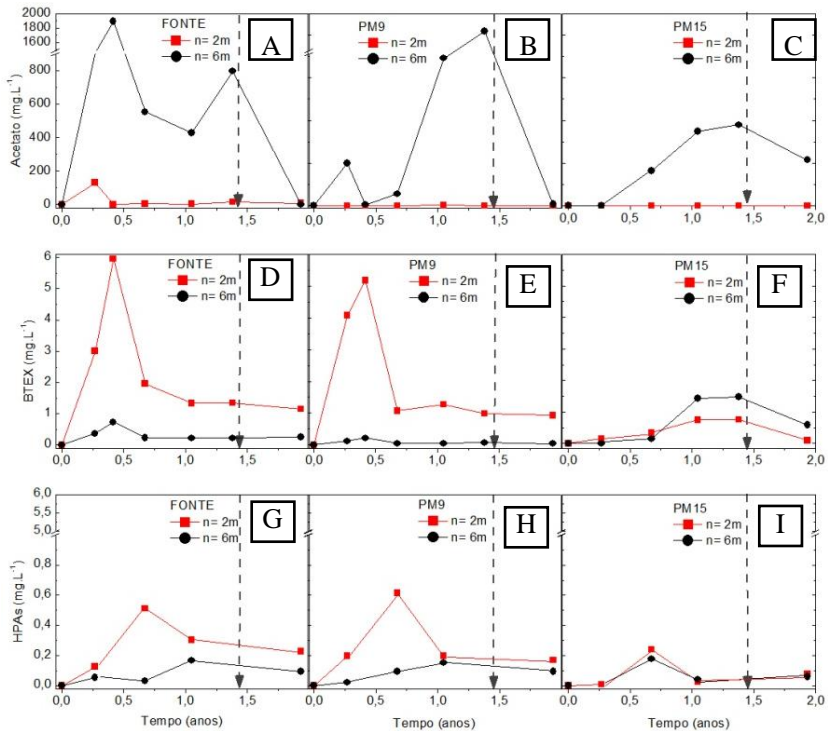
Nota: O período em que ocorreu a interrupção das injeções de acetato de amônio está representado pelas flechas tracejadas.

FIGURA 7.8. Concentrações de sulfato (A, B, C), sulfeto (D, E, F) e metano (G, H, I) nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 ao longo do tempo.



Nota: A linha tracejada horizontal existente nos gráficos G, H e I representa a concentração de saturação do metano em água ($\approx 22 \text{ mg.L}^{-1}$), a uma temperatura de 24°C . O período em que ocorreu a interrupção das injeções de acetato de amônio está representado pelas flechas tracejadas verticais.

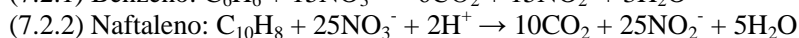
FIGURA 7.9. Concentrações de acetato (A, B, C), BTEX (D, E, F) e HPAs (G, H, I) nos poços de monitoramento Fonte, PM9 e PM15 ao longo do tempo.



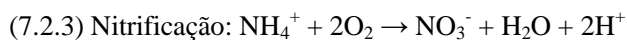
Nota: O período em que ocorreu a interrupção das injeções de acetato de amônio está representado pelas flechas tracejadas.

Para avaliar a ocorrência de processos via nitrato-redução, observou-se o comportamento do nitrato e de sua espécie reduzida (nitrito) ao longo do experimento. Foram detectados picos isolados de nitrato, o que poderia possibilitar a ocorrência de nitrato-redução. No entanto, ao avaliar as concentrações de nitrito, sugere-se que tal processo de oxidação-redução não foi predominante no experimento, uma vez que foram detectadas concentrações significativamente inferiores ao nitrato. Considerando a estequiometria da reação de degradação de benzeno e tolueno via nitrato-redução (reações 7.2.1 e

7.2.2), observa-se que a relação molar teórica entre nitrato consumido e nitrito produzido é de 1:1. Ou seja, para degradação de 1 mol de benzeno são necessários 15 moles de nitrato, produzindo 6 moles de dióxido de carbono e 15 moles de nitrito (DOU et al., 2008). Da mesma forma, para degradação de 1 mol de naftaleno são necessários 25 moles de nitrato, produzindo 10 moles de dióxido de carbono e 25 moles de nitrito:



É possível observar que as concentrações de nitrato detectadas nos poços de monitoramento, principalmente no PM15, não são equivalentes às concentrações de nitrito correspondentes (FIGURA 7.7). Diante disso, não foi observada a ocorrência de nitrato-redução por meio das análises que foram realizadas. No entanto, é importante mencionar que a possibilidade de nitrato-redução não pode ser completamente descartada, uma vez que o nitrito é um metabolito da desnitrificação muito instável e de difícil detecção em amostras ambientais, principalmente quando as concentrações de nitrato são relativamente baixas. Além disso, o nitrato existente na área experimental pode ser convertido em nitrogênio (N₂), o qual não foi analisado neste experimento, não permitindo a verificação da nitrato-redução pela produção de nitrogênio. A possibilidade de as concentrações de nitrato detectadas no PM15 terem sido provenientes da nitrificação do amônio (introduzido por meio das injeções de acetato de amônio) foi descartada, baseando-se na estequiometria da reação de oxidação completa do íon amônio (7.2.3), em que 2 moles de oxigênio são necessários para produção de 1 mol de nitrato (METCALF e EDDY, 2003):



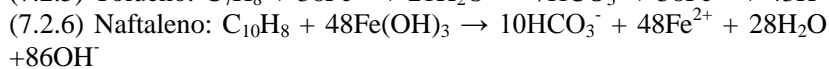
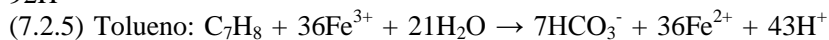
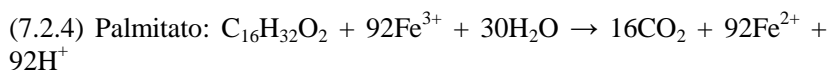
Utilizando a relação estequiométrica acima, para produzir concentrações de nitrato equivalentes às observadas no PM15 nível 2m (entre 28 e 39,3 mg.L⁻¹), seriam necessárias concentrações de oxigênio acima do seu limite de saturação na água (> 8mg.L⁻¹). No entanto, esta concentração é consideravelmente superior à disponibilidade de oxigênio observada neste poço de monitoramento durante todos os períodos amostrais (de 0,2 a 0,6 mg.L⁻¹), descartando-se, portanto, a

possibilidade de nitrificação do amônio introduzido por meio das injeções. Os cálculos para verificação da nitrificação estão disponíveis no apêndice B. Considerando que o período em que foi detectada a máxima concentração de nitrato (0,7 ano) coincide também com o maior índice pluviométrico (133,2 mm) observado nos eventos amostrais (FIGURA 6.4), acredita-se que o nitrato proveniente da prévia utilização da área para atividades pecuárias possa ter percolado do solo para a zona saturada, justificando sua presença no PM15.

De acordo com a hierarquia termodinâmica, o processo de ferro-redução é a etapa posterior à nitrato-redução e a ocorrência deste processo foi avaliada por meio da concentração de sua espécie reduzida Fe^{2+} , em decorrência da dificuldade em amostrar e analisar Fe^{3+} por este possuir tendência em formar óxidos ou hidróxidos que o torna insolúvel em água (LOVLEY, 1991; CHAPELLE, 2001). Foi possível observar que, dentre as espécies reduzidas (NO_2^- , Fe^{2+} e S^{2-}) que foram produzidas ao longo do tempo, Fe^{2+} foi mais abundante no experimento, sugerindo que processos de ferro-redução ocorreram no sistema. As concentrações de Fe^{2+} permaneceram na faixa entre 5 e 20 mg.L^{-1} , enquanto que as máximas concentrações de nitrito e sulfeto detectadas foram de 0,53 e 1,16 mg.L^{-1} , respectivamente. Na fonte de contaminação, foram encontradas concentrações ainda maiores (173,3 mg.L^{-1}) aos 0,3 ano, demonstrando que o processo de ferro-redução foi predominante, especialmente neste poço de monitoramento, no início do experimento. Em condições anaeróbias, grande parte do Fe^{2+} produzido durante o processo de ferro-redução pode se complexar com minerais presentes nos sedimentos, como por exemplo, ilita e magnetita, enquanto que uma menor parte permanece livre na água subterrânea. Em ambientes aeróbios, as espécies reduzidas podem ser reoxidadas produzindo Fe^{3+} nas formas de óxido ou hidróxido. Considerando que no presente estudo as condições do sistema foram predominantemente anaeróbias, a redução na concentração de Fe^{2+} , além de representar a interrupção de processos de ferro-redução, indica também que este metabólito depois de produzido pode ter se complexado com os minerais existentes no sedimento, justificando as quedas em sua concentração observadas nos poços de monitoramento analisados aproximadamente a partir de 0,5 ano (LOVLEY, 1991; CHAPELLE, 2001; ZACHARA et al., 2004).

Relacionando o comportamento dos substratos orgânicos com os processos de oxidação-redução (FIGURA 7.9), nota-se que, no caso

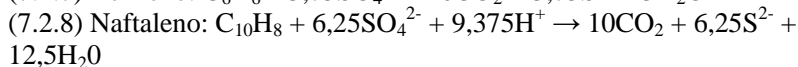
dos BTEX, houve um decréscimo de sua concentração a partir de 0,5 ano após a liberação na fonte de contaminação. Desta forma, observando o comportamento das espécies reduzidas, é plausível que a degradação dos substratos orgânicos tenha ocorrido, inicialmente, via processos de ferro-redução. Sabe-se que a ferro-redução é um importante mecanismo de oxidação de compostos orgânicos alifáticos (por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa) e aromáticos (compostos BTEX e HPAs) em ambientes anaeróbios (LOVLEY, 1991; LOVLEY, 1997; ANDERSON et al., 1998; ANDERSON e LOVLEY, 1999; ROONEY-VARGA et al., 1999; JAHN et al., 2005). As reações de ferro-redução utilizando exemplos de ésteres do biodiesel (palmitato), compostos BTEX (tolueno) e HPAs (naftaleno) presentes no experimento estão representadas abaixo (COATES et al., 1995; LOVLEY, 1991; KLEEMANN e MECKENSTOCK, 2011):



A análise das espécies reduzidas e do comportamento dos substratos orgânicos indica que a degradação via ferro-redução ocorreu no experimento, especialmente na fonte de contaminação, onde há maior concentração de contaminantes. Além disso, a oxidação de substratos orgânicos utilizando Fe^{3+} como receptor de elétrons é mediada por micro-organismos específicos, membros da classe delta *Proteobacteria*, principalmente da família *Geobacteraceae*, a qual inclui os gêneros *Pelobacter*, *Geobacter*, *Desulfuromonas* e *Desulfuromusa* (LOVLEY, 2000), sendo *Geobacter* considerado o grupo mais importante para a condução dos processos de ferro-redução (SNOEYENBOS-WEST et al., 2000). Assim, a presença desta comunidade específica pode auxiliar na verificação da ocorrência destes processos na área experimental. O mesmo vale para as comunidades de bactérias sulfato-redutoras e arqueas metanogênicas, as quais também atuam como indicativos dos processos redox decorrentes no experimento. Com relação aos micro-organismos ferro-redutores, conforme discutido anteriormente na caracterização microbiológica, ficaram abaixo do limite de detecção ($5,6 \times 10^2$ cópias de $gene.g^{-1}$) em todos os pontos de monitoramento avaliados

antes da liberação do B20. Porém, três meses após a liberação e início das injeções de acetato de amônio estes micro-organismos passaram a ser detectados na área experimental, atingindo concentrações de até $3,1 \times 10^6$ cópias de gene.g⁻¹; 1,0 ano após a liberação. Estes resultados estão detalhadamente apresentados na próxima seção - item 7.3.

Na avaliação do processo de sulfato-redução por meio da análise da disponibilidade de sulfato seguida da produção de sulfeto, apesar de ter sido observada a disponibilidade significativa de sulfato (possivelmente resultante da introdução do enxofre presente em até 0,35% no diesel), as concentrações de sulfeto correspondentes foram muito inferiores, sendo 3 mg.L⁻¹ a máxima concentração detectada (FIGURA 7.8). Sabendo que houve degradação dos compostos BTEX e HPAs no presente experimento, a estequiometria das reações de degradação de benzeno e naftaleno via sulfato-redução foi utilizada para avaliar a demanda de sulfato necessária para oxidar 1 mol de cada substrato (benzeno e naftaleno), bem como a quantidade de mols de sulfeto produzidos na reação (DOU et al., 2008; McFARLAND e SIMS, 1991). Observa-se que as concentrações de sulfeto não correspondem à relação molar teórica da reação, em que há uma mesma proporção de sulfato consumido e sulfeto produzido (reações 7.2.7e 7.2.8) e estes resultados sugerem que processos de degradação via sulfato-redução não foram predominantes neste experimento.



De maneira complementar, concentrações consideráveis de Fe²⁺ (conforme previamente apresentado) somente poderão existir se processos de sulfato-redução não forem significativos no aquífero. Esta afirmação se justifica pelo fato de que a presença de sulfetos, provenientes do processo de sulfato-redução, possui a tendência de fazer com que Fe²⁺ precipite na forma de sulfeto de ferro (FeS), tornando-o insolúvel na água subterrânea (BERNER, 1969). Adicionalmente, se concentrações suficientes de Fe³⁺ estiverem disponíveis no aquífero, micro-organismos ferro-redutores podem competir com o grupo de sulfato-redutores fazendo com que estes sejam metabolicamente inibidos e não participem de forma predominante dos processos de degradação da matéria orgânica. Neste contexto, a análise dos micro-organismos sulfato-redutores revela que sua abundância foi inferior aos ferro-

redutores (diferenças aproximadamente na ordem de grandeza 10^2) durante o período do experimento, fornecendo indícios de que o processo de ferro-redução predominou sobre a sulfato-redução. No entanto, mesmo da limitada disponibilidade de sulfato, os micro-organismos sulfato-redutores foram estimulados. Isto se deve pelo fato de estes também possuírem afinidade pelos substratos disponíveis no sistema e porque são capazes de crescer e se desenvolver mesmo na ausência de sulfato (BRYANT et al., 1977; LENGELER et al., 1999). Estas informações estão discutidas detalhadamente no item 7.3.

Após a avaliação da ocorrência de sulfato-redução no aquífero, foi conduzida a análise da última etapa dos processos de oxidação-redução, que se refere ao estabelecimento da metanogênese na água subterrânea. Considerando os resultados obtidos na fonte de contaminação, nota-se que condições metanogênicas passaram a predominar após a ocorrência de ferro-redução, sendo a metanogênese o processo de oxidação-redução de maior contribuição para a degradação dos compostos BTEX no experimento, conforme esperado. Foram detectadas baixas concentrações de metano na fonte de contaminação a partir de 0,3 ano, porém, o pico de concentração deste ocorreu em 0,7 ano (período que coincide com o decaimento das concentrações de BTEX) tendo sido observado valores próximos ao limite de saturação na água ($17,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Da mesma forma, no PM9 concentrações de metano também foram observadas a partir de 0,3 ano e foram aumentando gradativamente ao longo do tempo, tendo atingido a máxima concentração de $7,8 \text{ mg.L}^{-1}$ aos 1,4 anos. No PM15 o estabelecimento destas condições no meio foi reflexo do período em que os contaminantes migraram para este poço de monitoramento e, portanto, concentrações de metano passaram a ser observadas somente a partir de 1,4 anos e atingido seu pico de concentração (14 mg.L^{-1}) após 2,0 anos, podendo ser considerado como um indicativo da existência de biodegradação.

A degradação de compostos aromáticos via metanogênese foi subestimada durante um determinado período de tempo. No entanto, após os estudos de Gbric-Galic e Vogel, (1987), quando o primeiro consórcio de micro-organismos capaz de degradar benzeno e tolueno em condições metanogênicas foi observado, esta possibilidade passou a ser considerada e vários trabalhos passaram a demonstrar a ocorrência da

degradação de contaminantes orgânicos sob estas condições (KAZUMI et al. 1997; WEINER e LOVLEY, 1998; ULRICH e EDWARDS 2003; REINHARD et al. 2005). Considerando que condições metanogênicas passaram a ocorrer e prevalecer na água subterrânea é fundamental que, para a confirmação dos resultados obtidos, tenha sido também observado o desenvolvimento de arqueas na área experimental, uma vez que estas são capazes de atuar nestas condições e degradar os subprodutos metabólicos gerados nas etapas de degradação anteriores. Desta forma, com a análise de arqueas foi possível comprovar a ocorrência da metanogênese, já que estes micro-organismos não foram detectados na etapa de caracterização da área, porém após a liberação do B20 e das injeções de acetato, suas concentrações passaram a aumentar significativamente (até $1,7 \times 10^9$ cópias de gene.g⁻¹; 1,4 anos após a liberação no PM9), tendo sido detectados em concentrações superiores às bactérias ferro e sulfato-redutoras e ao longo do experimento sua predominância na área experimental foi semelhante às bactérias totais (informações detalhadas no item 7.3).

Para concluir a análise da evolução geoquímica na área experimental, foi feita a verificação da contribuição dos diferentes processos redox na degradação dos substratos orgânicos. Considerando que tanto os processos de degradação dos AGCL provenientes do biodiesel (LALMAN, 2000; LALMAN e BAGLEY, 2002; SOUSA et al., 2009; SOUSA et al., 2007), como dos BTEX (CHAKRABORTY e COATES, 2004; HEIDER e FUCHS, 1997) e HPAs (TSAI et al., 2009; HARITASH e KAUSHIK, 2009) provenientes do diesel, produzem acetato como subproduto metabólico, a verificação dos diferentes processos redox foi baseada no consumo de acetato, seguindo a metodologia de Chiaranda (2011). Para determinação do balanço estequiométrico do consumo de acetato por meio de diferentes processos de oxidação e redução (TABELA 7.9), foi utilizado o modelo energético de McCarty, o qual considera a produção celular nas reações (McCARTY,1969).

TABELA 7.9. Reações de oxidação de acetato com os balanços estequiométricos do processo via respiração aeróbia, nitrato-redução, ferro-redução, sulfato-redução e metanogênese.

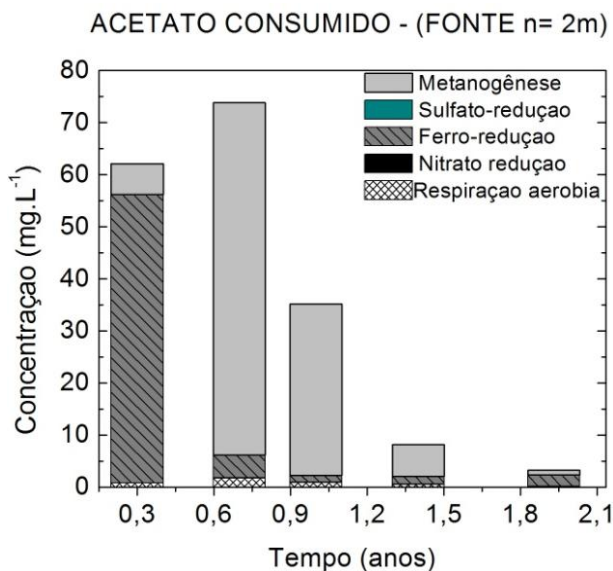
Reações de oxidação de acetato via diferentes processos redox
Respiração aeróbia: $\text{CH}_3\text{COO}^- + 0,82 \text{O}_2 + 0,24\text{NH}_4^+ \rightarrow 0,24 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 0,76 \text{HCO}^- + 0,06 \text{CO}_2 + 0,76\text{H}_2\text{O}$
Nitrato-redução: $\text{CH}_3\text{COO}^- + 0,68 \text{NO}_3^- + 0,23\text{NH}_4^+ + 0,68\text{H}^+ \rightarrow 0,23 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 0,34\text{N}_2 + 0,77 \text{HCO}_3^- + 0,08 \text{CO}_2 + 1,11\text{H}_2\text{O}$
Ferro-redução: $\text{CH}_3\text{COO}^- + 3,36 \text{Fe}^{3+} + 0,23\text{NH}_4^+ + 0,91\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,23 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 3,36\text{Fe}^{2+} + 0,77 \text{HCO}_3^- + 0,07 \text{CO}_2 + 3,36 \text{H}^+$
Sulfato-redução: $\text{CH}_3\text{COO}^- + 0,92 \text{SO}_4^{2-} + 0,03\text{NH}_4^+ + 1,38\text{H}^+ \rightarrow 0,03 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 0,46 \text{H}_2\text{S} + 0,46\text{HS}^- + 0,97 \text{HCO}_3^- + 0,87 \text{CO}_2 + 0,97 \text{H}_2\text{O}$
Metanogênese: $\text{CH}_3\text{COO}^- + 0,03 \text{CO}_2 + 0,02\text{NH}_4^+ + 0,92 \text{H}^+ \rightarrow 0,02 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 0,95 \text{CH}_4 + 0,98 \text{HCO}_3^-$

Fonte: Chiaranda (2011).

De acordo com a TABELA 7.9, foi possível determinar a relação molar entre o consumo de acetato e a demanda de receptores de elétrons e suas espécies reduzidas. Na respiração aeróbia, para oxidação de 1 mol de acetato são necessários 0,82 moles de oxigênio, enquanto que na nitrato-redução são utilizados 0,68 moles de nitrato. Com relação às espécies reduzidas, no processo de ferro-redução a produção de 3,36 moles de Fe^{2+} está associada ao consumo de 1 mol de acetato, no processo de sulfato-redução, a produção de 0,92 moles de sulfeto está relacionada ao consumo de 1 mol de acetato e, por fim, na etapa metanogênica 1 mol de acetato está associado à produção de 0,95 moles de metano.

Baseando-se nas relações molares de cada processo, foi realizado o cálculo da contribuição de cada processo redox no consumo de acetato em diferentes períodos do experimento. Desta forma, as concentrações de oxigênio, nitrato, Fe^{2+} , sulfeto e metano detectadas experimentalmente foram incluídas no cálculo do consumo de acetato. Inicialmente, as concentrações dos receptores (O_2 e NO_3^-) e das espécies reduzidas (Fe^{2+} , S^{2-} e CH_4) foram primeiramente convertidas em mol.L^{-1} e o valor equivalente foi multiplicado pela relação molar correspondente, determinando assim o consumo total de acetato em cada um dos processos de oxidação-redução. O cálculo de consumo de acetato foi realizado para os períodos amostrais em que foi observado o consumo dos receptores de elétrons e produção das espécies reduzidas, uma vez que indicam a ocorrência de processos de degradação. Portanto, na fonte de contaminação (FIGURA 7.10) e no PM9 (FIGURA 7.11A) os períodos avaliados foram 0,3; 0,7; 1,0; 1,4 e 2,0 anos após a liberação do B20, enquanto que para o PM15 (FIGURA 7.11B) foram incluídos somente os períodos de 1,0; 1,4 e 2,0 anos, pelo fato de que nos períodos antecedentes não foi observado o decaimento da concentração dos contaminantes, nem tampouco o consumo ou produção das espécies reduzidas. Esta avaliação foi realizada somente no nível 2m porque os processos de degradação decorrentes na água subterrânea ocorreram de maneira predominante neste nível de profundidade. Detalhes da elaboração dos cálculos foram fornecidos no apêndice A.

FIGURA 7.10. Acetato consumido na fonte de contaminação por diferentes processos de oxidação e redução, ao longo do tempo.

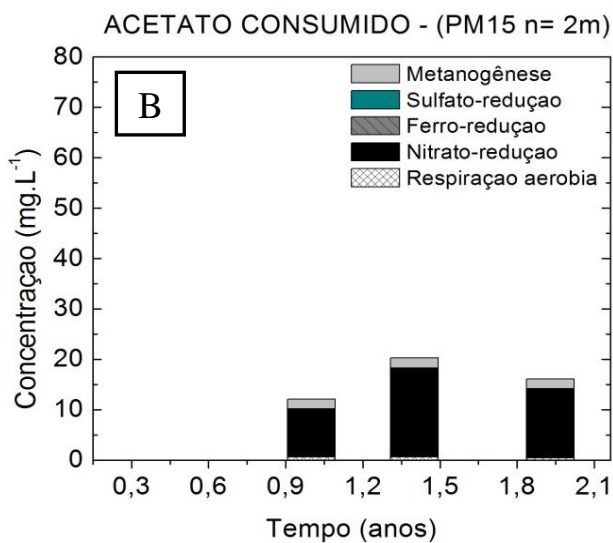
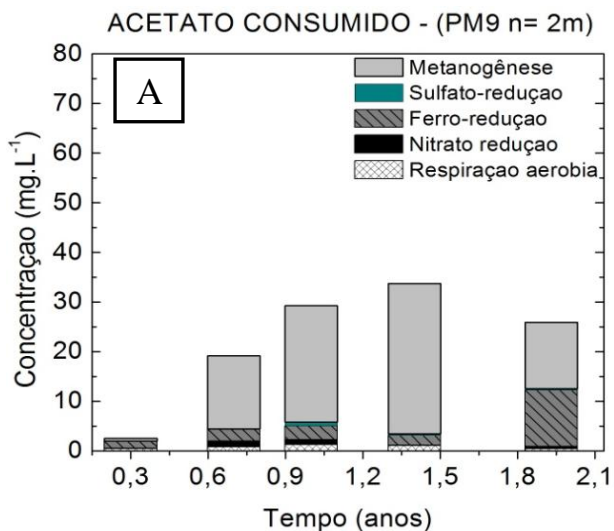


Com relação à fonte de contaminação, foi comprovada a predominância de processos metanogênicos ao longo do experimento, conforme esperado (FIGURA 7.10). Observa-se, no entanto, que no período correspondente a 0,3 ano, houve o predomínio do processo de ferro-redução no experimento. O estabelecimento deste processo antecedeu o período em que foi observada a atenuação dos compostos BTEX e HPAs. Desta forma, apesar de não se dispor de evidências diretas para afirmar, sugere-se que a ferro-redução ocorreu durante o processo de degradação dos AGCL, já que estes compostos são mais suscetíveis à degradação microbiana quando comparados aos compostos mono e poliaromáticos. Adicionalmente, em virtude do decaimento da concentração dos compostos BTEX ter sido evidenciado somente após 0,7 ano, é coerente atribuir a ocorrência de ferro-redução durante o período de 0,3 ano, à degradação preferencial dos ésteres do biodiesel. De maneira complementar, bactérias ferro-redutoras foram primeiramente detectadas na área experimental neste mesmo período de 0,3 ano. Ao final do experimento ($\approx 2,0$ anos), observou-se uma queda

na concentração de acetato em decorrência da interrupção das injeções de acetato de amônio e da redução da concentração dos contaminantes na fase dissolvida. Esta redução na disponibilidade de acetato resultou na diminuição de processos metanogênicos na área experimental. No poço de monitoramento PM9 foi também comprovada a predominância de condições metanogênicas durante a maior parte do experimento, ainda que as concentrações de acetato consumido tenham sido inferiores (FIGURA 7.11A). Estes resultados refletem a produção de acetato oriunda dos processos de degradação que ocorreram neste poço a partir de 0,7 ano após a liberação. Dentre os processos redox que foram analisados no PM15, a nitrato-redução aparentemente predominou sobre todos os outros, inclusive sobre a metanogênese (FIGURA 7.11B). Este resultado é condizente com a migração dos contaminantes neste poço e com a degradação destes que somente foi observada a partir de 1,0 ano após a liberação. Vale a pena ressaltar que a avaliação do processo de nitrato-redução foi feita utilizando nitrato ao invés de sua espécie reduzida (NO_2^-), em virtude de terem sido detectadas concentrações muito baixas de nitrito, o que poderia subestimar a contribuição da nitrato-redução no consumo de acetato.

Conceitualmente, em uma pluma de contaminantes existem diferentes zonas de processos de oxidação-redução (WIEDEMEIER, 1999; LOVLEY, 2000; CHAPELLE, 2001). A distribuição da zona metanogênica predomina na região da fonte de contaminação em consequência do rápido e intenso esgotamento dos receptores de elétrons inorgânicos, já os processos de nitrato-redução são geralmente observados nos poços mais afastados da fonte de contaminação, como é o caso do PM15, onde a concentração de matéria orgânica é inferior e, conseqüentemente zonas de processos anaeróbios estão ainda se estabelecendo em decorrência da demanda bioquímica de oxigênio que passou a ser exercida pela pluma de contaminantes. Portanto, a análise da evolução geoquímica na água subterrânea revelou a predominância da metanogênese nos poços de monitoramento Fonte e PM9, fornecendo evidências do esgotamento dos receptores de elétrons, conforme esperado. A ocorrência de nitrato-redução aparentemente ocorreu no PM15, em virtude de estar mais distanciado da região da fonte e exposto a uma concentração inferior de substrato orgânico, corroborando com os modelos conceituais a respeito da distribuição das diferentes zonas de processos redox na pluma de contaminantes.

FIGURA 7.11. Acetato consumido no PM9 (A) e PM15 (B) por diferentes processos de oxidação e redução, ao longo do tempo.

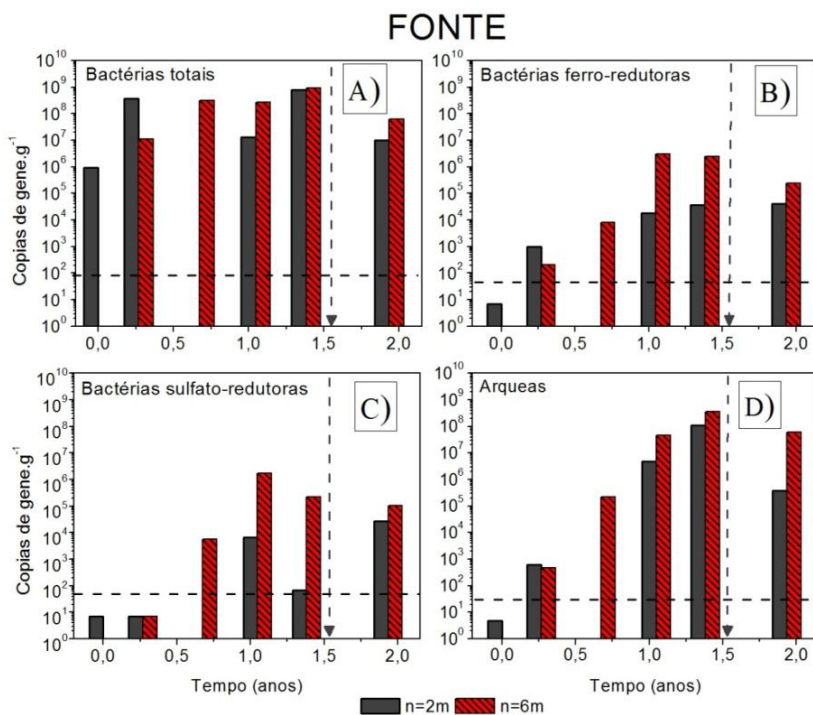


7.3 INVESTIGAÇÃO DA ESTIMULAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL E MICRO-ORGANISMOS ESPECÍFICOS ASSOCIADOS À DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO E PROCESSOS SINTRÓFICOS

7.3.1 Monitoramento das Variáveis Microbiológicas

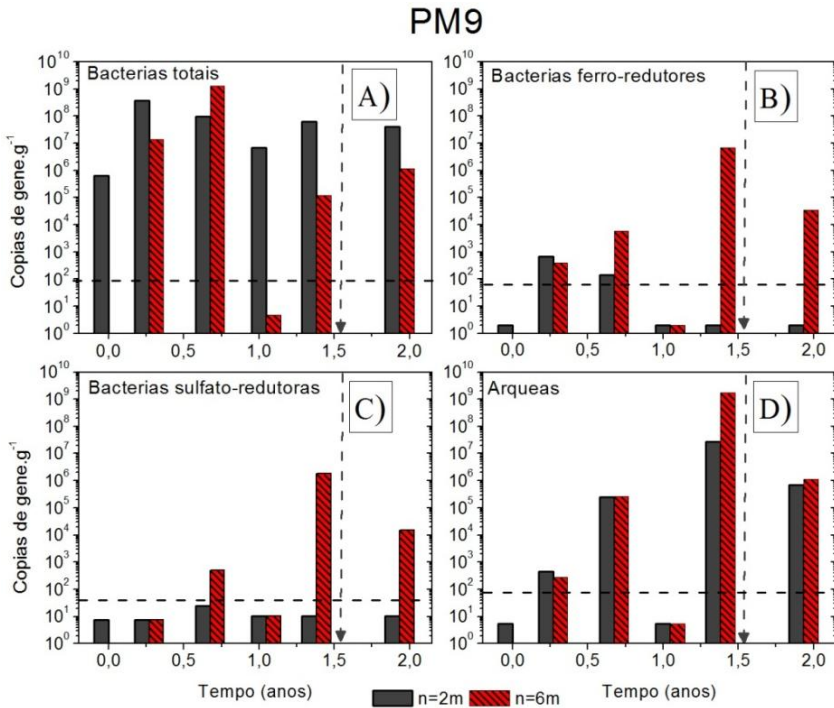
Após discussões a respeito das alterações geoquímicas que sucederam no sistema, decorrentes da introdução dos contaminantes na água subterrânea e do início das injeções de acetato de amônio, é essencial que seja realizada a investigação dos micro-organismos atuantes no ambiente subsuperficial para possibilitar uma avaliação aprofundada dos fatores relevantes ao processo de remediação. Assim, foram primeiramente apresentados os resultados dos micro-organismos que se desenvolveram nos poços Fonte, PM9 e PM15, ao longo do tempo (FIGURAS 7.12, 7.13 e 7.14). Em virtude de os poços PM9 e PM15 não terem sido analisados na etapa de caracterização, os dados provenientes do poço de monitoramento mais próximo (PM10) foram utilizados para os valores referentes ao tempo zero (*background*). Além disso, considerando que os micro-organismos são influenciados pelo comportamento dos substratos orgânicos, a relação entre as comunidades microbianas e os principais substratos (acetato e BTEX) foi disponibilizada na Figura 7.15.

FIGURA 7.12. Concentração de bactérias totais (A), ferro-redutoras (B), sulfato-redutoras (C) e arqueas (D) na fonte de contaminação, níveis 2 e 6m.



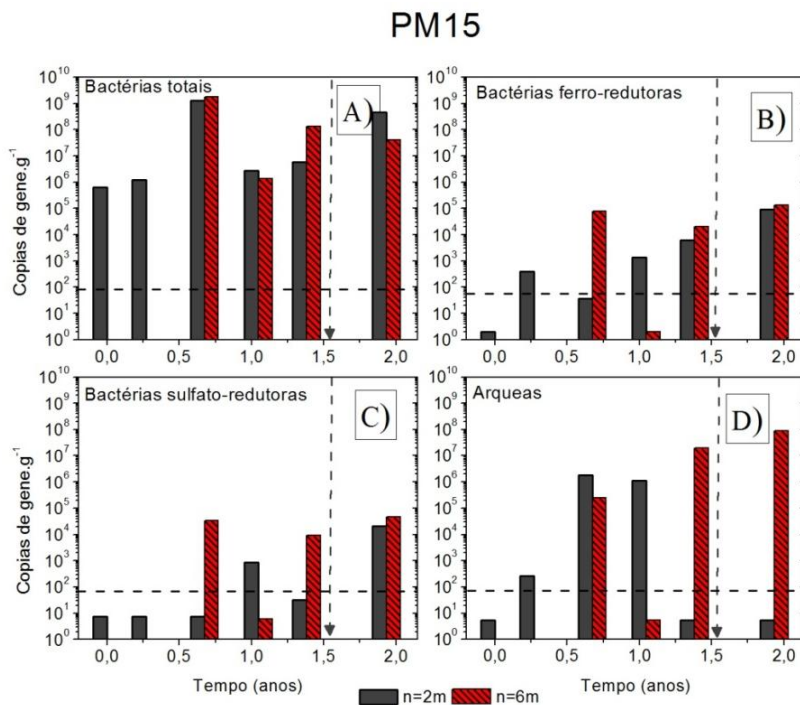
Nota: A linha tracejada horizontal representa o limite de detecção obtido nas respectivas análises. No período 0,7 ano a coleta no nível 2m foi inviabilizada pela escassez de água neste nível da fonte de contaminação. O período em que ocorreu a interrupção das injeções de acetato de amônio está representado pela flecha tracejada vertical.

FIGURA 7.13. Concentração de bactérias totais (A), ferro-redutoras (B), sulfato-redutoras (C) e arqueas (D) no PM9, níveis 2 e 6m.



Nota: A linha tracejada horizontal representa o limite de detecção obtido nas respectivas análises. O período em que ocorreu a interrupção das injeções de acetato de amônio está representado pela flecha tracejada vertical.

FIGURA 7.14. Concentração de bactérias totais (A), ferro-redutoras (B), sulfato-redutoras (C) e arqueas (D) no PM15, níveis 2 e 6m.



Nota: A linha tracejada horizontal representa o limite de detecção obtido nas respectivas análises. O período em que ocorreu a interrupção das injeções de acetato de amônio está representado pela flecha tracejada vertical.

Os resultados apresentados nas FIGURAS 7.12, 7.13 e 7.14, demonstram que após a liberação dos contaminantes e injeções de acetato de amônio, a biomassa passou a ser estimulada na área experimental. Considerando que a concentração dos BTEX e HPAs permaneceu aumentando, possivelmente em virtude de fenômenos de dissolução na água subterrânea, até 0,4 ano e 0,7 ano, respectivamente pôde-se atribuir o aumento inicial (após 0,3 ano) da biomassa do aquífero - representado pelas bactérias totais - principalmente ao consumo de acetato de amônio introduzido semanalmente na área e à presença dos ésteres do biodiesel. Na fonte de contaminação, no período de 0,3 ano, o aumento da biomassa total foi de $9,35 \times 10^5$ para $3,69 \times 10^8$

cópias de gene.g^{-1} , demonstrando que a biomassa foi estimulada no primeiro período amostral após a liberação do B20 e injeções de acetato de amônio. Este aumento da biomassa total foi também observado no PM9, tendo ocorrido na mesma ordem de grandeza (de $6,27 \times 10^5$ para $3,75 \times 10^8$ cópias de gene.g^{-1}) observada na fonte de contaminação, durante este mesmo período. Embora a concentração de acetato detectada em 0,3 ano tenha sido significativamente inferior neste poço (200 mg.L^{-1}), quando comparado à fonte de contaminação ($>1.200 \text{ mg.L}^{-1}$), ainda assim foi suficiente para promover a estimulação da biomassa. Já no PM15 neste mesmo período, não foi observado um aumento significativo da biomassa total, o que é coerente com a ausência de acetato neste período. No momento em que a pluma de acetato e de contaminantes atingiu o PM15 ($\approx 0,7$ ano) um aumento significativo da biomassa passou a ser observado (de $\approx 10^6$ para 10^9 cópias de gene.g^{-1}).

Na fonte de contaminação, durante os períodos 0,3; 0,7 e 1 ano após a liberação foram observadas poucas variações na densidade de bactérias totais, tendo permanecido na concentração de aproximadamente 10^8 cópias de gene.g^{-1} e, após a interrupção das injeções de acetato de amônio (a partir de 1,4 anos), a biomassa total passou a decair. Além disso, neste mesmo período, foram detectadas as menores concentrações dos compostos BTEX e HPAs, o que pode também ter contribuído para a redução da biomassa. No PM9 a biomassa atingiu seu pico ($1,26 \times 10^9$ cópias de gene.g^{-1}) em 0,7 ano, coincidindo com o período em que foi registrado o início da degradação dos BTEX. A estimulação de bactérias totais, pelas injeções de acetato de amônio e também pela presença dos ésteres do biodiesel e compostos BTEX, possivelmente exerceu influência positiva na degradação dos HPAs, a qual foi observada a partir de 1,0 ano após a liberação, o que é consideravelmente rápido, devido às propriedades recalcitrantes destes compostos. Adicionalmente, Chiaranda (2011) desenvolveu um experimento de campo com diesel B20 e a degradação dos HPAs não foi observada antes de 2,5 anos após a liberação. No PM15 a biomassa total não sofreu variações significativas ao longo do tempo, à exceção do período amostral referente a 0,7 ano após a liberação, quando foi detectado o pico de concentração de bactérias totais ($1,81 \times 10^9$ cópias de gene.g^{-1}), que pode ser consequência do momento em que a pluma de acetato alcançou este poço de monitoramento. Apesar de a discussão sobre a biomassa total do aquífero fornecer informações importantes sobre os processos que ocorreram, é fundamental que a análise de

micro-organismos específicos associados à degradação dos compostos presentes no B20, como bactérias ferro-redutoras, sulfato-redutoras e arqueas, seja conduzida para justificar a ocorrência de processos de degradação na área experimental.

Na fonte de contaminação o crescimento das bactérias ferro-redutoras (BFR) foi observado depois de transcorridos 0,3 ano, o que condiz com a existência de ferro-redução na área experimental. A concentração destas bactérias aumentou gradativamente até atingir seu pico ($3,08 \times 10^6$ cópias gene.g^{-1}) em 1,0 ano, porém neste mesmo período houve o estabelecimento de condições metanogênicas na fonte de contaminação que foi acompanhada do desenvolvimento e predomínio de arqueas ($4,68 \times 10^7$ cópias de gene.g^{-1}) neste mesmo período amostral. As bactérias sulfato-redutoras (BSR) passaram a ser observadas somente a partir de 0,7 ano, coincidindo com a discreta produção de sulfeto ($1,2 \text{ mg.L}^{-1}$) observada no mesmo período.

Relações de dominância entre determinadas comunidades microbianas são comumente observadas em processos de biodegradação (CHAPELLE e LOVLEY, 1992; ACHTNICH et al., 1995) e, tal dominância é ocasionada pela competição por compostos doadores de elétrons, onde o micro-organismo que predomina trata-se daquele capaz de utilizar o processo redox com maior potencial energético. Portanto, de acordo com as observações destes autores, no início do experimento ($\approx 0,3$ ano após a liberação) as BFR predominaram sobre as BSR e, conseqüentemente, os processos de sulfato-redução não foram significativos em nenhum dos poços de monitoramento observados. Após um período de adaptação as BSR passaram a se desenvolver, possivelmente utilizando outros receptores de elétrons, visto que a concentração de sulfeto produzida foi muito inferior à concentração dos metabólitos Fe^{2+} e metano. Desta forma, acredita-se que as BSR tenham utilizado Fe^{3+} como receptor de elétrons para garantir sua sobrevivência no ambiente, uma vez que estas podem se desenvolver na ausência de sulfato (BRYANT et al., 1977; LENGELER, 1999; SOUSA et al., 2009) e, nestas condições, são capazes de utilizar Fe^{3+} como receptor de elétrons (LOVLEY, 1991; COLEMAN et al., 1993). O desenvolvimento de arqueas na fonte de contaminação ocorreu no mesmo período em que metano passou a ser produzido no sistema (0,3 ano) e, ao longo do tempo seu crescimento foi estimulado, obtendo o pico de concentração

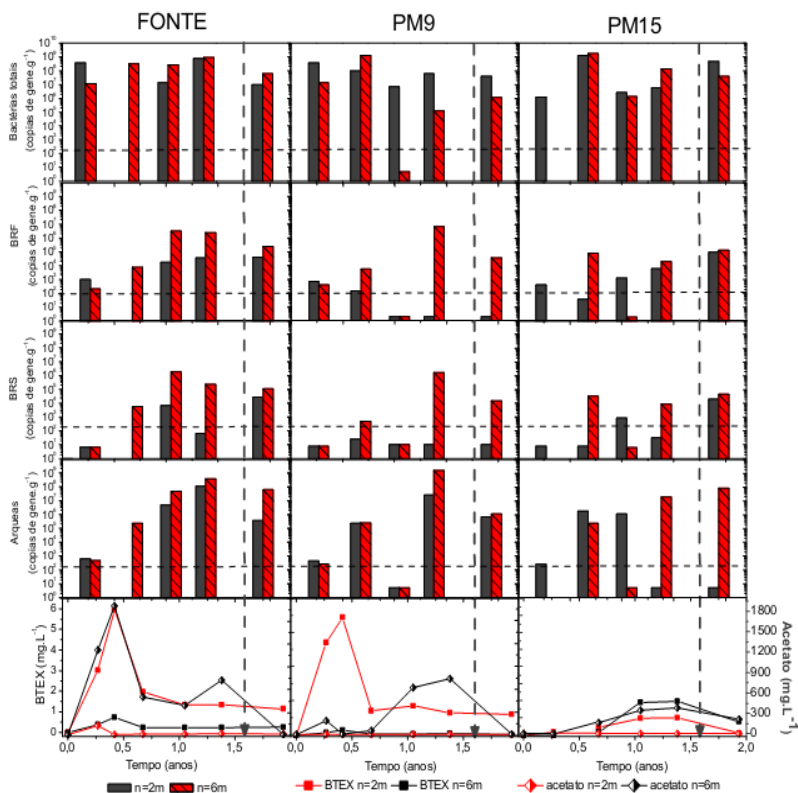
após transcorridos 1,4 anos ($3,67 \times 10^8$ cópias de gene.g^{-1}) e reduzindo em 2,0 anos, em virtude da interrupção das injeções de acetato de amônio e da diminuição da disponibilidade de substratos (contaminantes) orgânicos.

No PM9 foi observado um comportamento semelhante à fonte de contaminação em que o desenvolvimento de BFR ocorreu em 0,3 ano, antecedendo as BSR. O pico de concentração de ambas ($6,95 \times 10^6$ e $1,79 \times 10^6$ cópias de gene.g^{-1} para BFR e BSR, respectivamente) foi observado em 1,4 anos, o que é coerente com a máxima concentração de acetato (800 mg.L^{-1}) detectada neste poço. O mesmo foi observado para as arqueas, as quais também obtiveram a máxima concentração em 1,4 anos ($1,68 \times 10^9$ cópias de gene.g^{-1}), coincidindo com o pico de concentração de metano ($7,8 \text{ mg.L}^{-1}$). Estes resultados corroboram com estudos que observaram a afinidade destas comunidades microbianas por acetato (ACHTNICH et al., 1995; KLEIKEMPER et al., 2005; CALDWELL et al., 2008; GOEVERT e CONRAD, 2008; ZHUANG et al., 2012). Esta estimulação dos micro-organismos específicos aparentemente foi responsável pela observada degradação dos compostos BTEX e HPAs em 0,7 e 1,0 ano, respectivamente. No período correspondente a 1,0 ano foi observada a ausência de BFR, BSR e arqueas no PM9, porém em virtude de não haver condições geoquímicas que pudessem justificar uma possível inibição, acredita-se que no momento da coleta, neste poço de monitoramento especificamente, a porção de água subterrânea amostrada pode não ter contemplado os sólidos suspensos totais, onde a maioria dos micro-organismos permanece aderida.

No PM15, semelhante aos resultados observados na Fonte e no PM9, BFR foram detectadas após 0,3 ano enquanto que BSR passaram a ser detectadas somente em 0,7 ano. A presença de BSR em 0,7 ano condiz com a discreta produção de sulfeto ($\approx 3 \text{ mg.L}^{-1}$) observada neste período. As BFR foram observadas a partir de 0,3 ano, tendo aumentado consideravelmente sua concentração aos 0,7 ano (de $3,99 \times 10^2$ para $7,89 \times 10^4$ cópias de gene.g^{-1}), período que coincidiu com o início da produção de Fe^{2+} ($13,9 \text{ mg.L}^{-1}$) neste poço de monitoramento. As arqueas foram primeiramente detectadas neste poço de monitoramento depois de transcorridos 0,3 ano, tendo seu pico de concentração ($8,64 \times 10^7$ cópias de gene.g^{-1}) em 2,0 anos, o que condiz com a máxima concentração de metano ($13,8 \text{ mg.L}^{-1}$) observada neste mesmo período no PM15. Adicionalmente, os compostos BTEX e HPAs estavam ainda

sendo biodegradados e concentrações significativas de acetato (215 mg.L^{-1}) foram detectadas neste período, o que justifica o pico de concentração de metano em 2,0 anos. De maneira complementar, no PM15 os micro-organismos específicos estavam ainda presentes no período de 2,0 anos após a liberação, o que contribuiu para a continuidade da degradação dos contaminantes presentes neste poço de monitoramento.

FIGURA 7.15. Relação entre a concentração microbiana na Fonte, PM9 e PM15 (níveis 2 e 6m) e concentração dos BTEX e acetato, ao longo do tempo.



Nota. A linha tracejada horizontal representa o limite de detecção obtido nas respectivas análises microbiológicas. O período em que ocorreu a interrupção das injeções de acetato de amônio está representado pela flecha tracejada vertical.

Foi possível concluir que micro-organismos específicos capazes de atuar nas reações de degradação anaeróbia dos AGCL, BTEX e HPAs foram estimulados, tendo sido demonstrada a relação entre a presença destes e os processos de degradação dos contaminantes em todos os poços de monitoramento apresentados. Levando em consideração as características dos compostos do B20, sabe-se que o processo de atenuação irá ocorrer de maneira sequencial, i.e., degradação preferencial do biodiesel, seguida dos compostos BTEX e, por fim, degradação dos HPAs. O biodiesel comporta-se como uma fonte fixa e duradoura de contaminação (CORSEUIL et al., 2011b; CHIARANDA, 2011), possuindo baixa capacidade de migração na água subterrânea em consequência de sua limitada solubilidade aquosa. Assim, há necessidade de intensificar os processos de degradação do biodiesel na fonte de contaminação para que este não retarde a degradação dos compostos aromáticos. Portanto, a bioestimulação com foco na fonte de contaminação deve ser priorizada para que haja uma aceleração na degradação do biodiesel que permita a posterior degradação dos compostos mono e poliaromáticos. No presente trabalho, comunidades microbianas específicas foram estimuladas (principalmente na região da fonte de contaminação) e, conseqüentemente, o decaimento das concentrações dos BTEX e HPAs foi observado aos 0,7 e 1,0 ano, respectivamente.

A fim de realizar uma análise aprofundada das comunidades microbianas que foram estimuladas e, para permitir uma melhor compreensão dos processos de degradação que ocorreram, análises de sequenciamento de DNA (pirosequenciamento) foram conduzidas na fonte de contaminação, a qual corresponde à região de maior atividade microbiológica.

7.3.2 Análise de Sequenciamento de DNA (Pirosequenciamento)

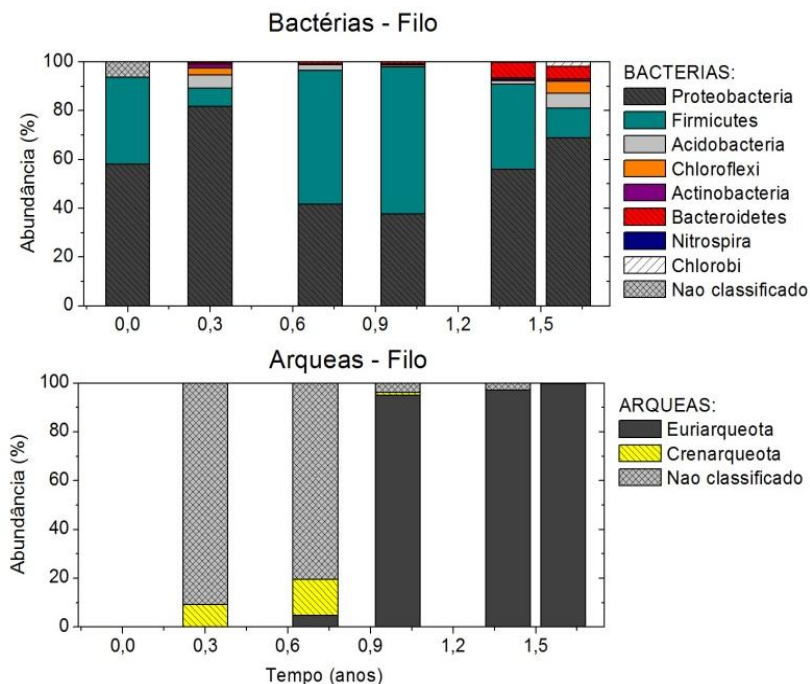
A fim de complementar as análises de biologia molecular (qPCR) e proporcionar uma análise aprofundada das comunidades microbianas e da sucessão ecológica que ocorreu na fonte de contaminação ao longo do tempo (antes e após a exposição aos contaminantes), análises de sequenciamento de DNA microbiano (pirosequenciamento) foram realizadas. Apesar de a maioria dos estudos focar na investigação de genes filogenéticos associados à processos específicos de degradação de contaminantes (DA SILVA e ALVAREZ, 2004; BELLER et al., 2008; CÁPIRO et al., 2008), sabe-se que a atenuação dos contaminantes é conduzida pela ação conjunta de diversos micro-organismos (KLEINSTEUBER et al., 2012). Portanto, é importante realizar uma abordagem ampla, que englobe não somente a análise de genes filogenéticos e catabólicos específicos, mas também a presença de diversos micro-organismos nativos que possam estar metabolicamente associados aos processos de degradação decorrentes no sistema.

A realização das análises de pirosequenciamento possui como pré-requisito a utilização de amostras que contenham concentrações significativas de DNA. Assim, observando os resultados obtidos na análise de biologia molecular foi constatado que, de uma maneira geral, a concentração de DNA microbiano no nível 6m foi superior ao nível 2m (possivelmente em virtude da presença de maiores concentrações de acetato detectadas no nível 6m). Portanto, embora os BTEX se concentrem nos níveis de profundidade mais superficiais, optou-se por utilizar amostras provenientes da fonte de contaminação, no nível 6m para garantir o fornecimento de concentrações suficientes de DNA que pudessem viabilizar a execução desta análise. A justificativa pelo foco na fonte de contaminação foi mencionada no item acima e, as análises foram realizadas até 1,6 anos (diferente das outras análises apresentadas nesta tese, as quais contemplam o período de até 2 anos após a liberação) porque no período em que a análise de pirosequenciamento foi realizada, a última campanha de monitoramento ainda não havia sido realizada.

A análise de pirosequenciamento detectou um total de 49.216 sequências de DNA microbiano, sendo 42.026 (85%) representadas pelo domínio bactéria e 7.190 (15%) classificadas como arqueas. Estas diferenças podem ser justificadas pelo fato de não ter sido detectadas sequências de arqueas antes da exposição ao B20, tendo ocorrido somente depois de transcorridos 0,3 ano, período que coincide com o estabelecimento de condições anaeróbias no sistema. Além disso, as arqueas metanogênicas se tornaram predominantes após 0,7 ano, período em que os compostos BTEX passaram a ser degradados e em que concentrações de metano próximas do limite de saturação foram observadas (17,5 mg.L⁻¹). De acordo com a classificação taxonômica, foi observada a presença de 8 filos para o domínio bactérias e somente 2 filos para arqueas (FIGURA 7.16). Foram detectados os seguintes filos no domínio bactéria: Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Bacteroidetes, Nitrospira e Chlorobi, tendo havido variações ao longo do tempo, porém claramente observada a predominância dos filos Proteobacteria (constituído pelas classes α , β , γ , δ e ϵ Proteobacteria) e Firmicutes (classes Bacilli e Clostridia), sendo os membros α , β , δ -Proteobacteria e Clostridia relacionados aos processos de degradação anaeróbia de compostos aromáticos (KLEINSTEUBER et al., 2012).

Com relação às arqueas, foi observada a presença dos filos Crenarqueota (constituído principalmente por micro-organismos termófilos) e Euriarqueota (que inclui micro-organismos predominantemente metanogênicos e também halófilos e termoacidófilos), com predomínio deste último a partir de 1 ano após a liberação do B20. A predominância do filo Euriarqueota sobre Crenarqueota também já foi observada em ambientes contaminados com HPAs e outros hidrocarbonetos de petróleo (ZHANG et al., 2012), fornecendo indícios de que este filo está associado aos processos de biodegradação destes compostos orgânicos.

FIGURA 7.16. Variações das comunidades de bactérias e arqueas (em nível de filo) na fonte de contaminação, ao longo do tempo.



A avaliação da diversidade microbiana revelou a existência de 26 gêneros bacterianos, diferentemente dos resultados observados para arqueas, onde somente 7 gêneros foram encontrados. Em virtude desta quantidade de gêneros microbianos detectados (principalmente bacterianos), testes estatísticos foram realizados a fim de demonstrar uma relação consistente a respeito da abundância e diversidade dos gêneros encontrados. O conceito de abundância refere-se à concentração de determinadas espécies pelo número total de indivíduos (micro-organismos) na amostra e, a diversidade relaciona-se com o número total de espécies observadas em uma determinada amostra. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa *EstimateS*[®] (*Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples*) e os dados de entrada foram elaborados em forma de matrizes,

correlacionando o número de gêneros microbianos com a incidência em que foram observados em cada uma das amostras analisadas (COLWELL, 2009).

Para a estimativa da abundância foram conduzidos testes pelo método Chao 1 e ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*) e, para avaliar o índice de diversidade microbiana, o índice de Shannon foi utilizado. Os estimadores de abundância Chao 1 e ACE são apropriados para um conjunto de dados onde a maioria das sequências correspondentes a um gênero específico possui baixa incidência. O estimador Chao 1 baseia-se no número absoluto de espécies presentes em uma comunidade e leva em consideração a incidência de espécies raras (entre 1 à 10 sequências por gênero microbiano) nas amostras. O estimador ACE possui o diferencial de permitir que o pesquisador determine os limites para os quais uma espécie é considerada rara (ex: de 1 a 3 sequências por gênero microbiano). O índice de diversidade Shannon considera igual o peso entre espécies raras e abundantes e quanto maior for o valor de Shannon, maior será o índice de diversidade. A maioria dos valores de Shannon concentra-se normalmente entre 1 e zero, portanto valores mais próximos à 1 representam uma maior diversidade das comunidades nas amostras analisadas (COLWELL e CODDINGTON, 1994).

TABELA 7.10. Testes estatísticos com estimadores de abundância e índices de diversidade encontrados nas amostras de bactérias e arqueas, em diferentes períodos amostrais.

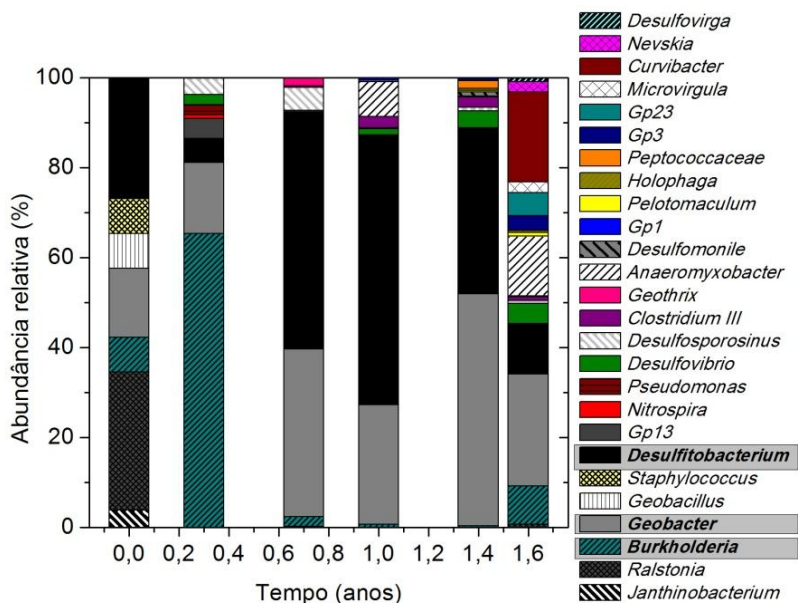
AMOSTRAS (B = bactérias A = arqueas)	SEQUÊNCIAS	ESTIMADORES DE ABUNDÂNCIA		ÍNDICE DE DIVERSIDADE
		CHAO 1	ACE	SHANNON
B t= 0 ano	839	11,74	12,02	0,40
B t= 0,3 ano	1678	17,27	17,71	0,32
B t= 0,7 ano	2517	20,47	21,11	0,27
B t= 1,0 ano	3356	22,55	23,11	0,18
B t= 1,4 anos	4195	24,21	24,63	0,13
B t= 1,6 anos	5034	26	26,35	0,00
A t= 0 ano	346	3,02	3,36	0,21
A t= 0,3 ano	69	4,68	5,24	0,26
A t= 0,7 ano	1038	5,93	6,42	0,34
A t= 1,0 ano	1385	6,59	6,85	0,32
A t= 1,4 anos	1731	6,98	7,11	0,29
A t= 1,6 anos	207	7	7	0,26

Com relação à abundância dos gêneros bacterianos encontrados percebe-se que, pelo aumento dos valores dos estimadores ChaO 1 e ACE, as sequências de DNA correspondentes passaram a ser encontradas em maior abundância nos períodos amostrais que sucederam a liberação dos contaminantes. Já os índices de diversidade passaram a reduzir após a exposição dos micro-organismos nativos aos contaminantes. A análise dos gêneros de arqueas revelou um comportamento semelhante, uma vez que os estimadores de abundância também passaram a aumentar após a liberação. O índice de diversidade de arqueas sugere que, até 0,7 ano houve um aumento na diversidade de arqueas na área experimental, porém, a partir de 1,0 ano a diversidade passou a reduzir, possivelmente pela predominância de determinados gêneros mais adaptados às condições que se estabeleceram no ambiente. Assim, o aumento nos estimadores de abundância e diminuição da

diversidade ao longo do tempo sugerem que a exposição aos contaminantes e ao acetato de amônio exerceu uma pressão seletiva sobre as comunidades microbianas, alterando sua composição e fazendo com que determinados gêneros se tornassem predominantes em relação a outros. Tais observações são condizentes com outros estudos em que a presença de contaminantes orgânicos resultou na diminuição da diversidade microbiana e predominância de espécies com capacidade de adaptação e de utilizar estes compostos como substratos (FAHY et al., 2005; RÖLING et al., 2002; JUCK et al., 2000; ROONEY-VARGA et al., 1999).

Para a compreensão da evolução filogenética, influenciada pela presença dos substratos orgânicos e processos geoquímicos decorrentes no sistema, a análise da abundância relativa (%) dos gêneros microbianos foi apresentada (FIGURAS 7.17 e 7.18) e foi relacionada aos processos metabólicos aos quais os micro-organismos estão associados.

FIGURA 7.17. Variações das comunidades de bactérias (em nível de gênero) na fonte de contaminação, ao longo do tempo, com destaque (em cinza) para os gêneros mais abundantes.



Os resultados de pirosequenciamento demonstraram variações dos gêneros bacterianos ao longo do tempo. Logo após a liberação do B20 (0,3 ano), foi observada a predominância dos gêneros *Burkholderia* spp. e *Geobacter* spp. (pertencentes às classes β e δ -Proteobacteria, respectivamente), sendo que este último permaneceu dominante durante todo o período do experimento, juntamente com *Desulfitobacterium* spp. (pertencente à classe Clostridia). Com relação à atividade metabólica destes micro-organismos, a presença de *Burkholderia* spp. já foi observada em consórcios microbianos capazes de degradar compostos mono e poliaromáticos, assim como metil-ésteres (MORLETT-CHÁVEZ et al., 2009; O'SULLIVAN et al., 2005; PHILIPPE et al., 2001), o que pode justificar sua abundância neste período. Apesar de este gênero bacteriano ter sido significativamente reduzido nos períodos subsequentes, possivelmente em função da dominância de outros gêneros, permaneceu sendo detectado até o último período de monitoramento (1,6 anos), o que sugere sua participação nos processos de degradação.

Sequências de DNA correspondentes ao gênero *Geobacter* spp. foram encontradas de maneira abundante em todos os eventos amostrais, demonstrando a dominância deste gênero. Sua incidência durante o experimento demonstra que pode ter sido um dos principais gêneros responsáveis pela observada degradação dos compostos do B20, uma vez que é notória a capacidade que *Geobacter* spp. possui em conduzir a degradação anaeróbia de diversos compostos orgânicos e aromáticos (KLEINSTEUBER et al., 2012). Adicionalmente, outros estudos já observaram a predominância de *Geobacter* spp., especialmente em ambientes com disponibilidade de acetato (KIELY et al., 2011; PILLONI et al., 2011; CALLISTER et al., 2010), como é o caso do presente experimento. Apesar de *Geobacter* spp. ter sido predominante, não foi o único micro-organismo frequentemente encontrado, tendo sido acompanhado pela presença de *Desulfitobacterium* spp.. Este gênero bacteriano, pertencente à família *Peptococcaceae* (filo Clostridia), trata-se de um micro-organismo estritamente anaeróbio, comumente observado em ambientes contaminados com BTEX e compostos halogenados, capazes de conduzir as reações de degradação utilizando uma variedade de receptores de elétrons anaeróbios (VILLEMUR et al., 2006; KUNAPULI et al., 2010). Membros da família *Peptococcaceae* já foram reportados como micro-organismos naturalmente presentes no

ambiente subsuperficial e, capazes de atuar em cooperações sintróficas com outros membros nas reações de degradação de compostos aromáticos (KUNAPULI et al., 2007). Além disso, consórcios microbianos compostos por membros das famílias *Peptococcaceae* e δ -*Proteobacteria* já foram observados em ambientes com contaminantes orgânicos (IMACHI et al., 2006).

Os gêneros *Janthinobacterium* spp., *Ralstonia* spp., *Pseudomonas* spp. e *Geobacillus* spp. apesar de possuírem capacidade metabólica para degradar contaminantes orgânicos, costumam se desenvolver em ambientes microaeróbios (NAZINA et al., 2001; BODOUR et al., 2003; HABE e OMORI, 2003; SHIM et al., 2005; LIMA et al., 2012), o que justifica a presença destes micro-organismos somente no início do experimento e fornece evidências de que não participaram ativamente dos processos de degradação. O filo *Acidobacterium* (gêneros *Gp 1*, *3*, *13* e *23* spp.) foi observado ao longo do experimento e é composto por micro-organismos adaptados a condições anaeróbias e capazes de crescer em ambientes com baixos valores de pH (entre 4,5 e 6) (GEISLER et al., 2009; WARD et al., 2009; BRUCE et al., 2010), sendo estas as faixas de pH observadas durante o período de monitoramento deste experimento (FIGURA 7.6). Apesar de alguns estudos terem observado a possibilidade de estes gêneros utilizarem intermediários metabólicos (benzoato e acetato) como substrato (WARD et al., 2009; LI et al., 2011), sua participação nos ciclos biogeoquímicos ainda não foi elucidada (NAETHER et al., 2012). Os gêneros *Geothrix* spp. e *Holophaga* spp. (ambos pertencentes à classe *Holophagae*) são organismos estritamente anaeróbios, filogeneticamente semelhantes e suas atividades metabólicas estão relacionadas com a fermentação de diversos compostos orgânicos, principalmente acetato. *Geothrix* spp. é comumente observado em processos de ferro-redução (COATES et al., 1999; NEVIN e LOVLEY, 2002) e, *Holophaga* spp. é classificado como uma bactéria homoacetogênica, capaz de degradar ácidos graxos de cadeia curta e compostos aromáticos (CHAUHAN e OGRAM, 2006; LIESACK et al., 1994). Conforme observado (FIGURA 7.17), a presença de *Geothrix* spp. passou a ser detectada a partir de 0,7 ano após a liberação, coincidindo com o período em que ocorreu a degradação dos BTEX, já o gênero *Holophaga* spp. foi observado somente nos últimos eventos amostrais e em baixa abundância relativa (0,5%). Em virtude de já ter sido observado que arqueas metanogênicas podem competir com bactérias homoacetogênicas por substratos como H₂

(KOTSYURBENKO et al., 2001) e, a julgar pela predominância de arqueas metanogênicas nos 3 últimos períodos amostrais, tal inibição poderia justificar a baixa incidência deste gênero microbiano no experimento.

A presença dos gêneros *Microvirgula* spp., *Nevskia* spp. e *Curvibacter* spp., constituídos por micro-organismos microaeróbios (PATUREAU et al., 1998; DING e YOKOTA, 2010; LEANDRO et al., 2012) e, observada somente ao final do experimento, sugere que em virtude de a concentração dos contaminantes (substratos) na água subterrânea já ter sido significativamente reduzida no período 1,6 anos (na fonte de contaminação) e, pelo fato de que neste período as injeções de acetato de amônio já haviam sido interrompidas, zonas microaeróbias podem ter se estabelecido pela diminuição da demanda bioquímica de oxigênio, propiciando o crescimento destes micro-organismos microaeróbios no experimento. O gênero *Nitrospira* spp., é também constituído por micro-organismos microaeróbios associados à processos de nitrificação (BLACKBURNE et al., 2007), porém sua baixa incidência e presença intermitente na área experimental inviabilizou a compreensão da contribuição deste gênero bacteriano nos processos subsuperficiais.

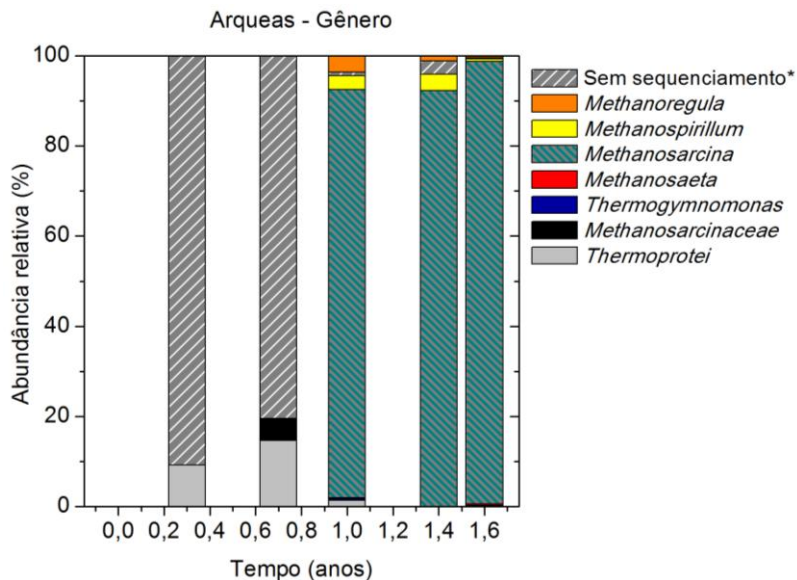
Outros gêneros microbianos foram observados como *Clostridium III* spp. (família *Ruminococcaceae*, classe Clostridia) e *Anaeromyxobacter* spp. (família *Cystobacteraceae*, classe δ -*Proteobacteria*). *Clostridium III* spp. é definido como um grupo de micro-organismos estritamente anaeróbios e capazes de degradar substratos orgânicos (COLLINS et al., 1994; SUN et al., 2012). Os micro-organismos pertencentes a este gênero já foram observados em ambientes com alta carga orgânica e costumam participar das reações de hidrólise dos compostos orgânicos complexos, como AGCL (DYKE e McCARTHY, 2002; HATAMONO et al., 2007; PEREYRA et al., 2010). A presença deste gênero foi observada a partir de 0,7 ano, coincidindo com o início da degradação dos BTEX, e, considerando que este gênero está associado à degradação dos ésteres do biodiesel e que estes são degradados preferencialmente em relação aos compostos aromáticos, a presença de *Clostridium III* em 0,7 ano e a evidência de degradação dos BTEX neste mesmo período são fatos inter-relacionados que sugerem que em 0,7 ano os ésteres do biodiesel já haviam sido

consideravelmente degradados, conseqüentemente permitindo a ocorrência de degradação dos BTEX. Com relação ao gênero *Anaeromyxobacter* spp., apesar de atuar em condições anaeróbias, ser capaz de utilizar compostos como acetato (TREUDE et al., 2003; HE e SANFORD, 2004) e ter sido encontrado no experimento, seu crescimento está mais fortemente associado à utilização de compostos orgânicos halogenados (SANFORD et al., 2002), por este motivo, acredita-se que sua relevância aos processos de degradação decorrentes no presente estudo tenha sido limitada.

Os gêneros *Desulfovirga* spp., *Desulfovibrio* spp. e *Desulfomonile* spp., pertencentes à classe δ -Proteobacteria (famílias *Syntrophobacteraceae*, *Desulfovibrionales* e *Syntrophaceae*, respectivamente.) compreendem grupos de micro-organismos anaeróbios capazes de participar de reações de degradação de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (SOUSA et al., 2009; SOUSA et al., 2007) e compostos aromáticos, como benzeno e tolueno (ALLEN et al., 2008; WINDERL et al., 2010; SUN e CUPPLES, 2011), em relações sintróficas com outros micro-organismos, como por exemplo, arqueas metanogênicas (SCHOLTEN et al., 2007; SOUSA et al., 2007) e *Geobacter* spp. (CORD-RUWISCH et al., 1998). Dentre estes gêneros, o mais abundante foi *Desulfovibrio* spp., tendo sido encontrado em todos os períodos que sucederam a liberação do B20. Diante destas observações e do que já foi reportado na literatura, acredita-se que os micro-organismos deste gênero tenham desempenhado um papel importante na degradação dos AGCL e compostos aromáticos do B20. Adicionalmente, a capacidade deste micro-organismo em utilizar H₂ como substrato já foi anteriormente observada (LEE e ZINDER, 1988; BARIK et al., 1985), o que torna este gênero ainda mais relevante para os processos, uma vez que o acúmulo de hidrogênio no meio pode inibir a degradação dos compostos aromáticos. Dentro do contexto de sintrofia, diversos estudos observaram que os gêneros *Desulfosporosinus* spp. e *Pelotomaculum* spp., ambos pertencentes à família *Peptococcaceae* (classe Clostridia), atuam em processos sintróficos de degradação de compostos orgânicos como ácidos orgânicos, AGCL e BTEX (JONES et al., 2010; McINERNEY et al., 2009; WALKER et al., 2009; WORM et al., 2011; SIEBER et al., 2012). A detecção de seqüências de DNA correspondentes à *Desulfosporosinus* spp. e *Pelotomaculum* spp. no experimento a partir da liberação do B20, forneceu evidências de que tais processos podem ter ocorrido na área

experimental e favorecido a rápida degradação dos BTEX observada em 0,7 ano após a liberação do B20.

FIGURA 7.18. Variações das comunidades de arqueas (em nível de gênero) na fonte de contaminação, ao longo do tempo.



Nota: *Sem sequenciamento: seqüências de arqueas cujo genoma ainda não foi elucidado e não possuem classificações taxonômicas.

Após avaliar os gêneros bacterianos encontrados neste experimento e suas atividades metabólicas, os resultados da análise de gêneros de arqueas foram discutidos, a fim de complementar a análise das comunidades microbianas e demonstrar as alterações que ocorreram em sua composição após a exposição aos contaminantes e às injeções de acetato de amônio. Apesar de a variação das comunidades de arqueas ter sido consideravelmente inferior (somente 7 gêneros), é fundamental para a compreensão do processo que estes gêneros sejam discutidos, visto que possuem divergências com relação a sua atividade metabólica. Foram encontrados os gêneros *Thermoprotei* spp., *Methanosaeta* spp., *Methanosarcina* spp., *Methanospirillum* spp., *Methanoregula* spp. e gêneros não identificados pertencentes à família *Methanosarcinaceae*. É

importante comentar que o genoma de alguns gêneros de arqueas ainda não foi completamente sequenciado e por isso, apesar de serem caracterizados como arqueas, sua taxonomia não foi definida.

Analisando as alterações nas comunidades de arqueas, observa-se a ausência destas nas amostras que antecederam a liberação do B20 e as injeções acetato de amônio, o que é coerente com as condições geoquímicas do meio durante este período e, com a ausência de contaminantes orgânicos na água subterrânea. Já no primeiro evento amostral após a liberação do B20, foi demonstrada a presença do gênero *Thermoprotei* spp. (filo Crenarqueota), o qual é composto por micro-organismos anaeróbios e termófilos, com temperaturas ótimas de crescimento variando de 50°C até 100°C (WAGNER et al., 2008). No entanto, a máxima temperatura detectada na água subterrânea foi de 27°C e, o desenvolvimento deste gênero em ambientes cujas condições não são favoráveis ao seu crescimento pode ser justificado pelos seguintes motivos: i) podem ter sofrido dispersão e estar somente presentes, não necessariamente se desenvolvendo na área ou; ii) podem ter detectado zonas com temperaturas mais elevadas que se estabelecem em locais onde há processos de biodegradação, as quais podem permitir seu crescimento temporário no local (ENGLE et al., 1996).

No segundo período amostral, a presença de *Thermoprotei* spp. foi observada juntamente com micro-organismos membros da família *Methanosarcinaceae* e nos períodos subsequentes o gênero *Methanosarcina* spp. se tornou predominante na área, conforme observado também em outros estudos (ZHANG et al., 2012). O gênero *Methanosarcina* possui características metabólicas muito versáteis, uma vez que é capaz de consumir diversos substratos utilizando as 3 rotas metabólicas existentes para produção de metano; metanogênese hidrogenotrófica, acetoclática e metilotrófica⁵ (GALAGAN et al., 2002; LIU e WHITMAN, 2008), atuando em sintrofia com micro-organismos acetogênicos e acetotróficos (SCHINK, 1997; McINERNEY et al., 2008; KLEINSTEUBER et al., 2012). Os principais gêneros de arqueas encontrados em ambientes com disponibilidade de acetato são

⁵ A metanogênese metilotrófica se refere à conversão de substratos como metanol e metilaminas em metano e, normalmente, CO₂. O metano é produzido a partir da redução de um dos grupos metílicos utilizando os elétrons obtidos na oxidação dos outros radicais metílicos à CO₂. Esta via não é relevante para os processos de degradação dos compostos estudados neste trabalho.

Methanosaeta spp. e *Methanosarcina* spp. (LIU e WHITMAN, 2008). Em ambientes onde a disponibilidade de acetato é limitada, o gênero *Methanosaeta* spp. normalmente se torna dominante, uma vez que sua demanda necessária de acetato para assimilação e produção de energia é inferior ($5\text{-}20\ \mu\text{M}$ ou $0,3\text{-}1,2\ \text{mg.L}^{-1}$) à demanda requerida por *Methanosarcina* spp. (1mM ou $59\ \text{mg.L}^{-1}$) (SMITH e IGRAM-SMITH, 2007). No entanto, em virtude dos micro-organismos do gênero *Methanosarcina* possuírem uma taxa de crescimento superior (SMITH e IGRAM-SMITH, 2007), capacidade de operar três rotas metabólicas distintas, se desenvolver em ambiente com baixos valores de pH (FLORENCIO et al., 1993; KOTSYURBENKO et al., 2007) e, pelo fato de na área experimental ter havido uma disponibilidade contínua de acetato até 1,4 anos ($> 59\ \text{mg.L}^{-1}$), tais fatos justificam a predominância deste gênero até o final do período de monitoramento e indicam que tenha sido o principal responsável pela condução das reações metanogênicas no experimento. Os resultados da presença de *Methanosaeta* spp. corroboram com esta discussão, uma vez que este gênero parece ter sido inibido pela presença de *Methanosarcina* spp., dada as condições favoráveis para este gênero em detrimento daquele, sendo *Methanosaeta* spp. detectada em baixa abundância (0,34 e 0,44%) nos períodos em que sua presença foi observada. Em outros ambientes metanogênicos, como reatores anaeróbios dentre os gêneros de arqueas, *Methanosaeta* spp. demonstrou ser predominante (LECLERC et al., 2004; DÍAZ et al., 2006; MA et al., 2006; GOBERNA et al., 2009; RIVIÈRE et al., 2009). Nestes reatores, as condições de pH são normalmente mais elevadas (próximas da neutralidade) e a disponibilidade de substratos orgânicos é diferente das condições observadas em aquíferos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, onde a predominância deste gênero não foi observada (KLEIKEMPER et al., 2005). A maior afinidade que *Methanosaeta* spp. possui por acetato, quando comparada ao gênero *Methanosarcina* spp., pode justificar sua predominância nestes reatores, onde a disponibilidade deste composto é limitada (DÍAZ et al., 2006; MA et al., 2006).

Outro gênero de arqueas encontrado na área experimental, ainda que em menor abundância, porém importante para a compreensão dos processos decorrentes no ambiente subsuperficial refere-se à *Methanospirillum* spp., o qual é composto por micro-organismos metanogênicos hidrogenotróficos, capazes de utilizar também formato e

dióxido de carbono como substrato (WORM et al., 2011; CHAUAN e OGRAM, 2004; BARIK et al., 1985; FERRY et al., 1974), porém incapazes de utilizar compostos como acetato, piruvato, metanol, etanol e benzoato em seu metabolismo (FERRY et al., 1974). Da mesma forma, a presença do gênero *Methanoregula* spp., o qual também trata-se de um micro-organismo metanogênico que utiliza somente H₂ e CO₂ como substratos, sendo incapaz de utilizar acetato, etanol, metanol e, inclusive formato (BRÄUER et al., 2011), foi observada nos mesmos períodos amostrais. Diante disso, a presença destes gêneros fornece evidências de que metabólitos como hidrogênio podem ter sido produzidos na área experimental durante a etapa acetogênica, o que por sua vez permitiu e estimulou o desenvolvimento de ambos, conforme observado em outro estudo (SAKAI et al., 2009). A presença destes gêneros representa um potencial bioquímico para impedir o acúmulo de hidrogênio na área experimental, o qual pode ocasionar limitações termodinâmicas no sistema e desfavorecer a degradação dos contaminantes. Por fim, o gênero *Thermogymnomonas* spp., assim como *Thermoprotei* spp., não possui capacidade de produzir metano, tratando-se de um micro-organismo termófilo e acidófilo (ITOH et al., 2007). A julgar por sua baixa incidência na área experimental e por suas propriedades metabólicas, acredita-se que o gênero *Thermogymnomonas* spp. não foi relevante e nem participativo nos processos de degradação dos contaminantes.

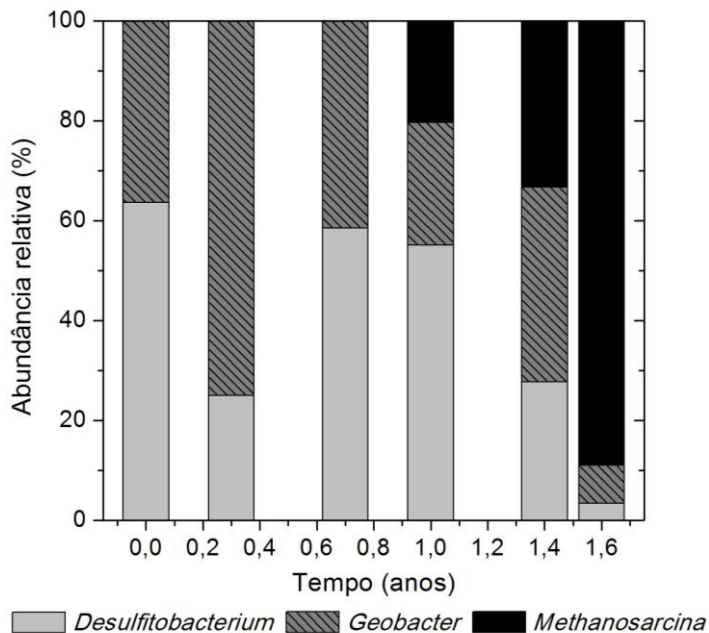
Para finalizar as observações do perfil das comunidades microbianas encontradas nos diferentes períodos do experimento, é possível concluir que apesar de os gêneros bacterianos terem demonstrado uma redução em termos de diversidade ao longo do tempo, os micro-organismos que se desenvolveram no experimento estiveram, de alguma forma, associados aos processos de degradação dos componentes do B20. O mesmo ocorreu com as arqueas, havendo um predomínio dos gêneros com capacidade metanogênica, no mesmo período (a partir de 0,7 ano) em que foi observado o decaimento das concentrações dos substratos orgânicos e a concomitante produção de metano.

Com relação à sucessão ecológica, os gêneros *Desulfitobacterium* spp., *Geobacter* spp. e *Methanosarcina* spp. foram claramente predominantes no experimento, especialmente após a liberação dos contaminantes. Em virtude de estes 3 gêneros serem capazes de atuar em relações sintróficas, é plausível que este tipo de

relação possa ter ocorrido entre eles. Sabe-se que *Methanosarcina* spp. é comumente observada em cooperações sintróficas com outros micro-organismos, uma vez que arqueas metanogênicas não são capazes de conduzir a degradação de compostos orgânicos complexos, sendo necessária a presença de micro-organismos que atuem nas etapas antecedentes até que os contaminantes sejam convertidos em substratos para metanogênese, como acetato e hidrogênio.

O crescimento fortemente associado entre *Geobacter* spp. e *Desulfotobacterium* spp. e o consumo dos mesmos substratos já foi observado por outros autores (SMITH et al., 2012; KUNAPULI et al., 2007). Embora a atuação sintrófica de *Geobacter* spp. não tenha sido completamente elucidada, recentemente, foi observada uma associação sintrófica entre *Geobacter* spp. e *Methanosarcina* spp., onde a transferência de elétrons foi operada por mecanismos alternativos, tendo sido conduzida via minerais de óxido de ferro (KATO et al., 2012). Levando em consideração a dominância destes 3 gêneros no experimento, suas atividades metabólicas e o crescimento fortemente associado entre estes, a hipótese de uma relação sintrófica deve ser considerada (FIGURA 7.19).

FIGURA 7.19. Abundância relativa dos gêneros microbianos predominantes e, possivelmente em relações sintróficas, encontrados na área experimental ao longo do tempo.



Analisando o perfil da abundância relativa destes 3 gêneros, independente dos outros gêneros encontrados, observa-se que *Desulfitobacterium* spp. e *Geobacter* spp. além de serem micro-organismos naturalmente presentes na área experimental, parecem ter participado ativamente dos processos iniciais de degradação dos contaminantes, corroborando com estudos que observaram a capacidade destes micro-organismos em degradar compostos aromáticos em anaerobiose (KUNAPULI et al., 2010). A partir do momento em que a degradação dos contaminantes (compostos orgânicos complexos) iniciou na área (0,7 ano), os metabólitos produzidos nesta reação passaram a atuar como substratos para a metanogênese, estimulando o crescimento de *Methanosarcina* spp. nos períodos subsequentes. Acredita-se

também, que em virtude da alta afinidade de *Geobacter* spp. e *Desulfitobacterium* spp. por acetato, *Methanosarcina* spp. possivelmente conduziu as reações metanogênicas, principalmente pela via hidrogenotrófica. Adicionalmente, em ambientes contaminados com derivados de petróleo, a metanogênese hidrogenotrófica demonstrou predominar sobre a rota acetoclástica (DOLFING et al., 2008). Portanto, sugere-se que a degradação dos contaminantes foi favorecida pelo estabelecimento de relações sintróficas entre *Geobacter* spp. e *Desulfitobacterium* spp. com *Methanosarcina* spp., onde os metabólitos de degradação produzidos nas etapas anteriores são consumidos por este gênero de arquea, evitando que limitações termodinâmicas fossem desencadeadas no sistema.

Os processos de degradação de substratos orgânicos complexos necessitam da participação de diversos micro-organismos com atividades metabólicas distintas, para que os substratos presentes inicialmente e biotransformados possam ser degradados. As reações catalisadas por micro-organismos sintróficos são, em muitos casos, termodinamicamente desfavoráveis (SCHINK, 1997). Estas reações somente se tornam favoráveis na presença de outros micro-organismos que atuam em parceria consumindo metabólitos capazes de desencadear limitações termodinâmicas e, permitindo que as reações de degradação procedam em etapas sequenciais. Diante disso, a avaliação das limitações termodinâmicas na área experimental é fundamental para a compreensão da dinâmica da degradação dos contaminantes no ambiente subsuperficial, uma vez que pode influenciar na continuidade do processo de biodegradação.

7.4 AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES TERMODINÂMICAS IMPOSTAS PELO ACÚMULO DE METABÓLITOS DE DEGRADAÇÃO DO B20

A biodegradação dos contaminantes foi observada em condições predominantemente anaeróbias durante todo o período do experimento e as reações foram mediadas por diversos micro-organismos. Considerando que tais reações são termodinamicamente desfavoráveis e dependem de cooperações sintróficas para proceder, cálculos termodinâmicos foram realizados para as reações relevantes para compreensão dos processos que ocorreram no ambiente subsuperficial. As reações se referem às rotas anaeróbias de biodegradação dos contaminantes presentes no B20. Conforme mencionado anteriormente, estas reações podem ser conduzidas por diversas rotas bioquímicas, dependendo dos micro-organismos atuantes no processo. Os principais micro-organismos encontrados neste experimento foram *Desulfitobacterium* spp., *Geobacter* spp. e *Methanosarcina* spp. e, portanto, as rotas bioquímicas de degradação operadas por estes micro-organismos foram consideradas nos cálculos termodinâmicos (TABELA 7.11).

Os micro-organismos encontrados neste estudo podem degradar os BTEX e HPAs, em anaerobiose, via oxidação sintrófica do acetato, metanogênese acetoclástica e hidrogenotrófica (GALAGAN et al., 2002; HATTORI, 2008; HEIDER e FUCHS, 1997) e, para avaliar a viabilidade termodinâmica destas reações, os valores de energia livre de Gibbs nas condições padrão foram disponibilizados. Os valores de ΔG se referem à quantidade de energia liberada ou necessária para uma reação de conversão química, sendo que quando há liberação de energia a reação é denominada exergônica (valores de ΔG negativos), enquanto que a reação que requer energia é definida como endergônica (valores de ΔG positivos). Para representar as reações dos BTEX, o cálculo foi conduzido com benzeno, visto que dentre os compostos BTEX, este irá determinar a necessidade de ações corretivas em virtude de sua característica mais recalcitrante, quando comparada aos outros BTEX, e de seu potencial carcinogênico (US EPA, 1998). Para representar as reações dos HPAs, o naftaleno foi utilizado por ser o composto mais solúvel dos policíclicos aromáticos (item 5.2, TABELA 5.5).

TABELA 7.11. Reações de degradação anaeróbica de benzeno e naftaleno, via oxidação sintrófica do acetato e rotas metanogênicas com seus respectivos valores ΔG° de reação.

Reações de degradação de benzeno e naftaleno via oxidação sintrófica do acetato e rotas metanogênicas	ΔG° reação (kJ.mol ⁻¹)
(1) Fermentação do benzeno via oxidação sintrófica do acetato (OSA):	
(1.1) $C_6H_6 + 6H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + 3H^+ + 3H_2$ (fermentação)	+70,73
(1.2) $3CH_3COO^- + 3H^+ + 6H_2O \rightarrow 12H_2 + 6CO_2$ (OSA)	+284,754
(1.3) $15H_2 + 3,75CO_2 \rightarrow 3,75CH_4 + 7,5H_2O$ (metanogênese hidrogenotrófica)	-490,30
Soma das reações: $C_6H_6 + 4,5 H_2O \rightarrow 3,75CH_4 + 2,25CO_2$	-134,82
(2) Fermentação do benzeno via rotas metanogênicas:	
(2.1) $C_6H_6 + 6H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + 3H^+ + 3H_2$ (fermentação)	+70,73
(2.2) $3CH_3COO^- + 3H^+ \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2$ (metanogênese acetoclástica)	-107,49
(2.3) $3H_2 + 0,75CO_2 \rightarrow 0,75CH_4 + 1,5H_2O$ (metanogênese hidrogenotrófica)	-98,06
Soma das reações: $C_6H_6 + 4,5H_2O \rightarrow 3,75CH_4 + 2,25CO_2$	-134,82
(3) Fermentação do naftaleno via oxidação sintrófica do acetato (OSA):	
(3.1) $C_{10}H_8 + 10H_2O \rightarrow 5CH_3COO^- + 5H^+ + 4H_2$ (fermentação)	+101,12
(3.2) $5CH_3COO^- + 5H^+ + 10H_2O \rightarrow 10CO_2 + 20H_2$ (OSA)	+474,59
(3.3) $24H_2 + 6CO_2 \rightarrow 6CH_4 + 12H_2O$ (metanogênese hidrogenotrófica)	-784,48
Soma das reações: $C_{10}H_8 + 8 H_2O \rightarrow 6CH_4 + 4CO_2$	-291,75
(4) Fermentação do naftaleno via rotas metanogênicas:	
(4.1) $C_{10}H_8 + 10H_2O \rightarrow 5CH_3COO^- + 5H^+ + 4H_2$ (fermentação)	+101,12
(4.2) $5CH_3COO^- + 5H^+ \rightarrow 5CH_4 + 5CO_2$ (metanogênese acetoclástica)	-179,14
(4.3) $4H_2 + 1CO_2 \rightarrow 1CH_4 + 2H_2O$ (metanogênese hidrogenotrófica)	-130,75
Soma das reações: $C_{10}H_8 + 8H_2O \rightarrow 6CH_4 + 4CO_2$	-291,75

Nota. O valor de $\Delta G^{\circ}f$ referente ao naftaleno foi obtido em Dolfing et al. (2009) e os valores de $\Delta G^{\circ}f$ referentes aos restantes compostos foram obtidos em Thauer et al.(1977). Os cálculos de ΔG° foram realizados considerando as condições padrão (pH = 7, 25°C, 1 M concentração de soluto e pressão parcial = 1 atm).

Conforme as reações de degradação do benzeno e naftaleno disponibilizadas na TABELA 7.11, observa-se que determinadas reações, principalmente as que ocorrem por meio da rota de oxidação sintrófica do acetato (OSA) são endergônicas. Isto se deve pela alta produção de H_2 no meio, o qual é amplamente reconhecido como inibidor termodinâmico de reações de degradação de compostos orgânicos em ambientes anaeróbios (DOLFING et al., 2008; DOLFING et al., 2009; HEIMANN et al., 2010; STAMS e PLUGGE, 2010; KATO e WATANABE, 2010; RAKOCZY et al., 2011). O acúmulo de H_2 no sistema faz com que os valores de ΔG tornem-se positivos, impedindo a continuidade dos processos de degradação. Portanto, tais reações só poderão proceder na presença de micro-organismos capazes de consumir este hidrogênio, como é o caso de arqueas metanogênicas que o consomem e produzem metano e água, utilizando dióxido de carbono como receptor de elétrons (TABELA 7.11; reações 1.3; 2.3; 3.3 e 4.3). É importante mencionar que uma pressão parcial de hidrogênio de 10^{-6} atm é o mínimo necessário para sustentar a atividade das arqueas metanogênicas no sistema. Segundo Zehnder (1978), as relações sintróficas entre micro-organismos fazem com que a pressão parcial do hidrogênio seja mantida entre 10^{-4} e 10^{-6} atm, sendo estas as faixas plausíveis de serem encontradas em aquíferos anaeróbios (KOTELNIKOVA e PEDERSEN, 1997; HEIMANN et al. 2010).

Outro fator igualmente capaz de impor limitações termodinâmicas no aquífero é a produção excessiva de acetato, visto que este é um metabólito de degradação que pode ser produzido por diversas rotas de degradação de contaminantes orgânicos, sendo comumente observado em sistemas metanogênicos. Da mesma forma como ocorre com hidrogênio, o acúmulo de acetato pode reduzir a viabilidade termodinâmica por tornar as reações ainda mais endergônicas, impedindo a continuidade das etapas subsequentes. Em experimentos de laboratório (DOLFING et al., 2009; RAKOCZY et al., 2011) e de campo (CORSEUIL et al., 2011a; CHIARANDA, 2011) a presença de acetato exerceu influência sobre o processo de degradação dos compostos orgânicos, sendo capaz de estabelecer limitações termodinâmicas que, conseqüentemente, retardaram a atenuação dos contaminantes orgânicos.

Diferentes concentrações de acetato foram reportadas como inibidoras dos processos de degradação. Rakoczy et al. (2011), observaram que $17,7 \text{ mg.L}^{-1}$ (0,3 mM) de acetato desencadearam

limitações termodinâmicas e inibiram, de forma reversível, a degradação do benzeno. Já em um experimento de campo com misturas de gasolina e etanol, concentrações $> 64 \text{ mg.L}^{-1}$ de acetato inibiram termodinamicamente a degradação dos BTEX (CORSEUIL et al., 2011a). Em um experimento de campo com biodiesel B100, cálculos termodinâmicos demonstraram que concentrações de 120 mg.L^{-1} de acetato poderiam causar inibições termodinâmicas nas reações de degradação dos ésteres do biodiesel e, para que tais reações se tornassem exergônicas, a concentração de acetato deveria ser reduzida a 40 mg.L^{-1} (CHIARANDA, 2011). Diante destas observações, a faixa de concentração considerada inibitória não pode ser generalizada, visto que as condições específicas da área experimental (pH, temperatura, concentração dos contaminantes, etc.) são relevantes para os cálculos e podem influenciar nos fatores considerados termodinamicamente restritivos.

Apesar de Chiaranda (2011) ter observado que concentrações de 120 mg.L^{-1} de acetato seriam termodinamicamente inibitórias para a degradação dos ésteres do biodiesel e, que em 0,4 ano a concentração de acetato na fonte de contaminação (nível = 2m) no presente experimento foi de 131 mg.L^{-1} , tal concentração poderia também ter desencadeado limitações termodinâmicas à reação de degradação dos ésteres do biodiesel, uma vez que as condições dos sistemas foram semelhantes (pH = 4,5; temperatura de 25°C ; concentração de acetato $\approx 130 \text{ mg.L}^{-1}$ e concentrações dos ésteres de biodiesel equivalentes à solubilidade efetiva correspondente na água subterrânea).

Conforme as observações de Wolin e Miller, (1982), a produção de ácidos orgânicos voláteis, como ácido propiônico e butírico, trata-se de uma rota alternativa de degradação, sendo operada somente quando há acúmulo de hidrogênio no sistema, uma vez que a rota acidogênica produz menos hidrogênio (TABELA 7.12) do que as rotas acetogênicas (TABELA 5.8, item 5.10).

TABELA 7.12. Rotas acidogênicas representadas pelo consumo de propionato e butirato para produção de acetato e hidrogênio.

Rotas acidogênicas para produção de acetato e hidrogênio
Propionato: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$
Butirato: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$

A concentração de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) analisados neste trabalho, com exceção do ácido acético, foi observada em concentrações máximas de 1 mg.L^{-1} em todos os períodos e para todos os ácidos analisados neste trabalho, fornecendo indícios de que as rotas alternativas para produção de menores concentrações de hidrogênio não foram utilizadas. Em sistemas onde os micro-organismos hidrogenotróficos não são capazes de consumir o hidrogênio na mesma taxa em que é produzido, a rota acidogênica representa uma alternativa para produção de menores concentrações de hidrogênio, objetivando contornar as limitações que possam ter se estabelecido como consequência de seu acúmulo (AHRING et al., 1995; LALMAN, 2000). Assim, a presença de compostos como propionato e butirato no sistema representa indícios da existência de limitações termodinâmicas e cinéticas no processo de biodegradação do biodiesel. Conforme discutido anteriormente nos itens 7.3.1 e 7.3.2, no presente estudo foi observada a presença de micro-organismos específicos capazes de conduzir as reações hidrogenotróficas e, a ausência de concentrações significativas de AOVs neste experimento indica que o hidrogênio foi suficientemente consumido por estes micro-organismos hidrogenotróficos, impedindo que o acúmulo deste metabólito causasse perturbações ao sistema e passasse a operar rotas alternativas. Acredita-se, portanto, que a reação de biodegradação dos ésteres do biodiesel não sofreu limitações termodinâmicas e que estes compostos foram degradados (via β -oxidação), produzindo essencialmente acetato e hidrogênio como metabólitos de degradação, por meio da rota acetogênica. Além disso, considerando que o biodiesel é preferencialmente degradado em relação aos aromáticos, a rápida degradação dos compostos BTEX (em 0,7 ano; na fonte de contaminação e PM9) representa outro indicativo de que os ésteres do biodiesel já haviam sido previamente degradados (em $\approx 0,3$ ano), tendo superado quaisquer limitações termodinâmicas que possam ter se

estabelecido durante este período, não havendo necessidade de incluí-los nos cálculos para avaliação de limitações termodinâmicas.

A fim de avaliar a existência de inibições termodinâmicas, ainda que temporárias, durante as etapas de degradação dos compostos aromáticos, cálculos termodinâmicos foram realizados para os compostos BTEX e HPAs. A condição termodinâmica do aquífero foi avaliada no momento em que ocorreu o início da degradação dos BTEX e HPAs e no período antecedente, já que a persistência destes compostos no aquífero pode ser resultante de uma possível inibição termodinâmica que se estabeleceu no aquífero. Portanto, foram analisadas as condições do sistema no período que antecedeu a degradação dos contaminantes (BTEX e HPAs) e no início de sua degradação. Com relação às condições do sistema, foram considerados $\text{pH} = 4,5$; temperatura de 25°C , concentração dos contaminantes nos períodos avaliados e concentrações variáveis dos metabólitos acetato e hidrogênio.

Para os cálculos termodinâmicos, os valores de hidrogênio (H₂) utilizados foram aqueles correspondentes às faixas de concentrações plausíveis de serem encontradas em aquíferos anaeróbios (de 10⁻⁷ a 10⁻⁹ M)⁶ (KOTELNIKOVA e PEDERSEN, 1997; HEIMANN et al. 2010). As concentrações de acetato foram também variáveis, tendo sido considerados os valores detectados no período em que os contaminantes atingiram seu pico de concentração e no período em que passaram a ser degradados. Para realização destes cálculos foi utilizada a seguinte equação:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{Produtos}]^a}{[\text{Reagentes}]^b} \quad (\text{equação 7.4})$$

sendo que:

ΔG = variação da energia livre em condições variáveis (kJ.mol⁻¹)

ΔG° = variação da energia livre de *Gibbs* nas condições padrão (concentração de 1M do soluto, temperatura de 25°C e pressão de 1 atm)

R = constante universal dos gases (0,008314 kJ.K⁻¹.mol⁻¹)

T = temperatura da água subterrânea (K)

[Produtos] = concentração dos produtos (mol.L⁻¹)

[Reagentes] = concentração dos reagentes (mol.L⁻¹)

a e *b* = coeficientes estequiométricos das reações analisadas

⁶ A concentração de saturação do H₂ dissolvido em água ($\approx 10^{-3}$ M) é equivalente à pressão parcial de ≈ 1 atm. Assim, a faixa citada de concentrações molares plausíveis em aquíferos anaeróbios (de 10⁻⁷ a 10⁻⁹ M), corresponde à pressão parcial de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ atm.

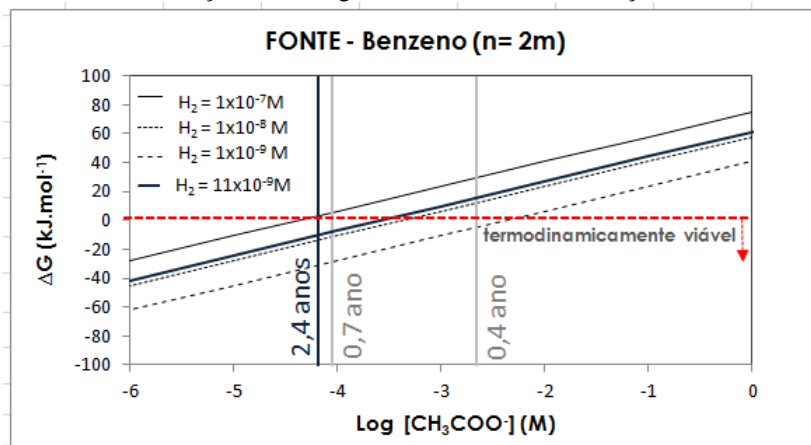
7.4.1 Avaliação das limitações termodinâmicas e cinéticas das reações de degradação do benzeno e naftaleno na fonte de contaminação

A rápida degradação dos BTEX observada na fonte de contaminação em 0,7 ano após a liberação do B20 demonstrou ter ocorrido em virtude da aceleração da degradação dos ésteres do biodiesel nos períodos anteriores. No período de 0,4 ano foi observado o pico de concentração destes compostos na área experimental. Da mesma forma, neste mesmo período concentrações significativas de acetato foram também detectadas na fonte de contaminação (131 e 1894 mg.L⁻¹ nos níveis 2 e 6m, respectivamente), podendo ser provenientes das injeções semanais de acetato de amônio e também da prévia degradação dos ésteres do biodiesel. Diante disso, a reação de fermentação do benzeno produzindo acetato e hidrogênio foi avaliada, utilizando as concentrações de acetato acima mencionadas, para diferentes faixas de concentração de hidrogênio dissolvido (10⁻⁷ a 10⁻⁹ M).

Foi possível observar que na fonte de contaminação (nível 2m) aos 0,4 ano, quando as concentrações de acetato encontravam elevadas (131 mg.L⁻¹), o sistema estava termodinamicamente desfavorável à degradação do benzeno pela rota acetogênica e hidrogenogênica. De acordo com os cálculos, a reação somente poderia proceder se as concentrações de hidrogênio dissolvido fossem $\leq 0,2 \times 10^{-8}$ M. No entanto, em 0,4 ano não foi observada atenuação destes compostos, sugerindo que o hidrogênio estaria sendo produzido numa taxa superior ao seu consumo. As informações microbiológicas são condizentes com esta afirmação, uma vez que micro-organismos hidrogenotróficos passaram a ser predominantes no sistema somente 1 ano após a liberação. A produção de hidrogênio na área pode ter sido oriunda da degradação dos ésteres de biodiesel, ocasionando uma produção excessiva deste metabólito no sistema. Portanto, foi demonstrado que, neste período e nestas concentrações, limitações termodinâmicas e cinéticas se estabeleceram na área (FIGURA 7.20) e, podem justificar a ausência de degradação dos compostos BTEX aos 0,4 ano. Estes mesmos cálculos indicam que aos 0,7 ano, período em que foi observado um aumento do consumo de acetato, reduzindo sua concentração para 5,3 mg.L⁻¹, as reações se tornaram favoráveis à fermentação do benzeno (pela rota bioquímica avaliada nos cálculos), mesmo na concentração de

$0,5 \times 10^{-7}$ M de hidrogênio dissolvido. Considerando que neste período os gêneros microbianos *Geobacter* e *Desulfitobacterium* spp. encontravam-se predominantes e, em virtude de suas características metabólicas, acredita-se que podem ter sido responsáveis pelo aumento do consumo de acetato, fazendo com que as reações se tornassem exergônicas. Portanto, os cálculos indicaram que aos 0,7 ano limitações termodinâmicas foram superadas, o que corrobora com o início do decaimento da concentração dos compostos BTEX neste período e com a predominância de gêneros microbianos específicos associados às reações avaliadas nos cálculos. Além disso, análises de hidrogênio dissolvido foram realizadas aos 2,4 anos e, para as concentrações de acetato ($3,9 \text{ mg.L}^{-1}$) e benzeno ($0,27 \text{ mg.L}^{-1}$) detectadas neste período, a concentração de hidrogênio detectada (11 nM) não foi restritiva.

FIGURA 7.20. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio na fonte de contaminação, nível = 2m.

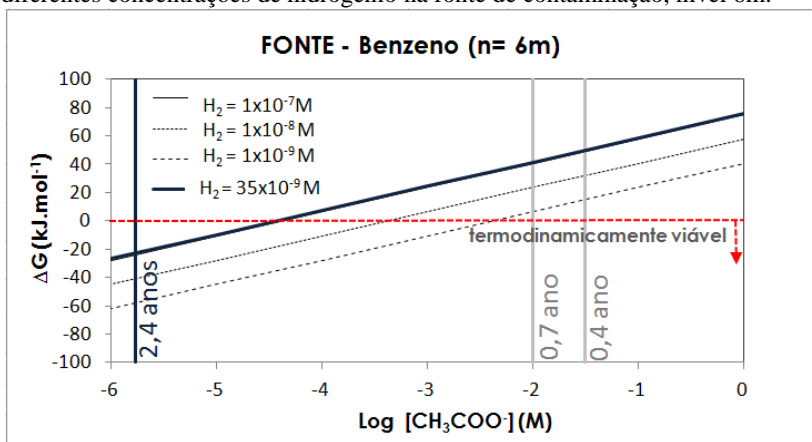


Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,4 ano: $\log -2,7$ M ou 131 mg.L^{-1} ; 0,7 ano: $\log -4,0$ M ou 5 mg.L^{-1} e 2,4 anos: $\log -4,2$ M ou $3,9 \text{ mg.L}^{-1}$). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H_2 dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H_2 detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

No nível 6m foram observadas concentrações significativas de acetato, o que representa um potencial para a ocorrência de restrições termodinâmicas nas reações envolvidas. No período correspondente a 0,4 ano, quando foi registrada a máxima concentração de acetato

(1.894 mg.L⁻¹), os cálculos demonstraram que o sistema encontrava-se termodinamicamente restritivo, podendo inibir a degradação dos compostos BTEX. Porém no período subsequente (0,7 ano), quando a atenuação destes compostos foi observada, apesar de a concentração de acetato ter sido consideravelmente reduzida, ainda permaneceu elevada (553,6 mg.L⁻¹). Diante disso, para que a reação pudesse proceder, as concentrações de hidrogênio deveriam permanecer abaixo de $\approx 10^{-9}$ M e, ainda que esta concentração seja a mínima suficiente para sustentar o crescimento de arqueas hidrogenotróficas, a atenuação dos BTEX foi observada, sugerindo que houve consumo de hidrogênio. *Desulfitobacterium* spp. pode ter sido responsável pela manutenção de baixas concentrações de hidrogênio no meio. Apesar de este gênero bacteriano ser comumente capaz de atuar em reações acetotróficas, é conhecido por sua ampla versatilidade, possuindo também a capacidade de consumir H₂ (VILLEMUR et al., 2006). Neste sentido, a presença abundante de *Desulfitobacterium* spp. pode justificar a ocorrência da reação mesmo em condições termodinamicamente restritivas. Além disso, aos 2,4 anos, a concentração de hidrogênio dissolvido detectada foi de 35nM. Apesar de esta concentração ser capaz de desencadear limitações termodinâmicas nas condições do experimento aos 0,4 e 0,7 ano, o sistema se encontrava consideravelmente diferente aos 2,4 anos, principalmente com relação à concentração de acetato (0,1 mg.L⁻¹) e benzeno (0,0087 mg.L⁻¹) e, de acordo com os cálculos, nestas condições as reações não seriam termodinamicamente restritivas (FIGURA 7.21), podendo ocorrer sem limitações.

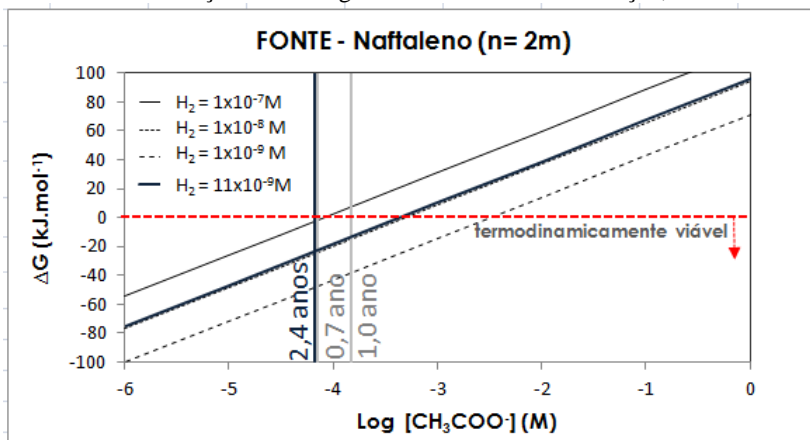
FIGURA 7.21. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio na fonte de contaminação, nível 6m.



Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,4 ano: log -1,5 M ou 1894 mg.L⁻¹; 0,7 ano: log -2,0 M ou 553,6 mg.L⁻¹ e 2,4 anos: log -5,8 M ou 0,1 mg.L⁻¹). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H₂ dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H₂ detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

As reações de degradação dos HPAs, representadas pelo composto naftaleno, também foram avaliadas nos cálculos termodinâmicos. Na fonte de contaminação (nível 2m), foram observadas baixas concentrações de acetato (4,2; 8,9 e 3,9 mg.L⁻¹ em 0,7; 1,0 e 2,4 anos, respectivamente) e, nestas condições o sistema estaria termodinamicamente restritivo somente para a concentração de 10⁻⁷ M de hidrogênio dissolvido em 1,0 ano (FIGURA 7.22). Antes disso, em 0,7 ano a reação era passível de ocorrer em todas as faixas de concentração de hidrogênio dissolvido avaliadas. Todavia, a degradação dos HPAs foi observada somente 1,0 ano após a liberação. Acredita-se que, o retardo na degradação dos HPAs tenha sido atribuído à degradação preferencial dos compostos BTEX, não podendo ser explicado por fatores termodinâmicos, mas por questões cinéticas. A partir do momento em que a atenuação dos BTEX foi iniciada (em 0,7 ano), a degradação dos compostos HPAs passou a ser observada (1,0 ano).

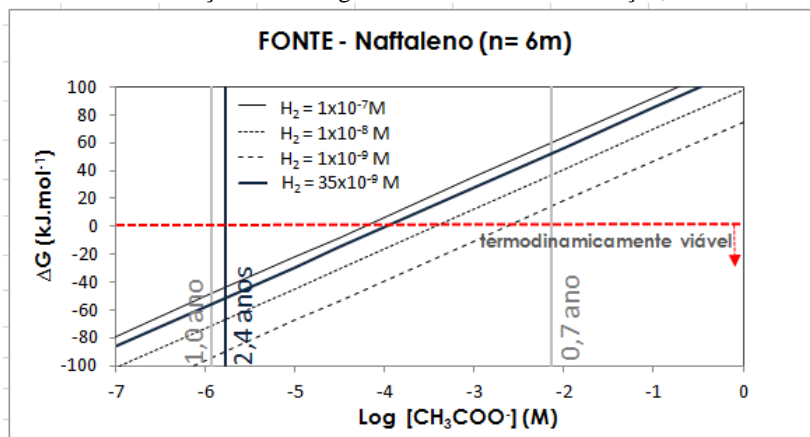
FIGURA 7.22. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio na fonte de contaminação, nível 2m.



Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,7 ano: log -4,1 M ou 4,2 mg.L⁻¹; 1,0 ano: log -3,8 M ou 8,9 mg.L⁻¹ e 2,4 anos: log -4,2 M ou 3,9 mg.L⁻¹). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H₂ dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H₂ detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

O comportamento observado no nível 6m demonstrou que a elevada concentração de acetato detectada aos 0,7 ano (427,9 mg.L⁻¹) desencadeou limitações termodinâmicas, uma vez que, mesmo na concentração mínima suficiente para sustentar o crescimento de arqueas hidrogenotróficas as reações encontravam-se endergônicas (FIGURA 7.23). A partir do momento (1,0 ano) em que o acetato foi consumido e sua concentração foi reduzida (0,1 mg.L⁻¹), o sistema demonstrou estar favorável à ocorrência das reações, mesmo na mais elevada faixa de concentração de hidrogênio dissolvido (10⁻⁷M) avaliada.

FIGURA 7.23. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio na fonte de contaminação, nível = 6m.

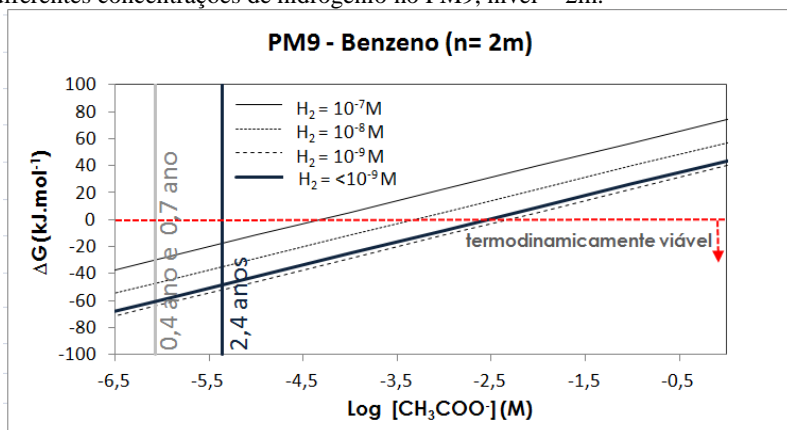


Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,7 ano: $\log -2,1$ M ou $427,9 \text{ mg.L}^{-1}$; 1,0 ano: $\log -5,9$ M ou $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2,4 anos: $\log -5,8$ ou $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H_2 dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H_2 detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

7.4.2 Avaliação das limitações termodinâmicas e cinéticas das reações de degradação do benzeno e naftaleno no PM9

Os cálculos levando em consideração as condições encontradas no PM9 nível 2m, indicaram que não houve o estabelecimento de limitações termodinâmicas no meio. A concentração de acetato se manteve constante ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) durante os períodos de 0,4 e 0,7 ano e a concentração de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ foi detectada aos 2,4 anos. Em virtude de as concentrações detectadas deste metabólito terem sido consideravelmente baixas, os cálculos demonstram que as reações poderiam proceder por serem exergônicas. No entanto, aos 0,4 ano não foi observada atenuação dos compostos BTEX neste poço de monitoramento. Diante destas observações, conclui-se que no PM9 nível 2m, processos termodinâmicos não causaram inibições aos compostos BTEX e a temporária ausência de degradação destes compostos aromáticos foi possivelmente influenciada pela degradação preferencial do biodiesel (FIGURA 7.24).

FIGURA 7.24. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM9, nível = 2m.



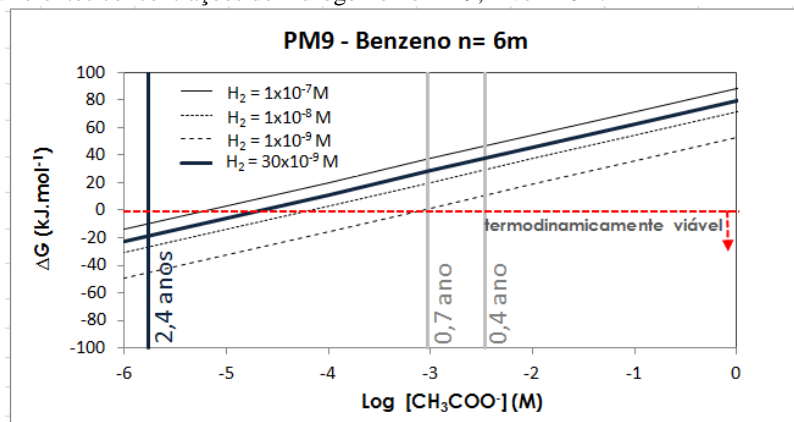
Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas nos diferentes períodos (concentrações constantes em 0,4 e 0,7 ano: $\log -6,1$ M ou $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2,4 anos: $\log -5,4$ M ou $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H_2 dissolvido e a linha diagonal azul se refere à concentração de H_2 detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

De acordo com os cálculos, a existência de limitações termodinâmicas foi observada no PM9 nível 6m (FIGURAS 7.25 e 7.27). Estas limitações podem ter sido desencadeadas pela presença de acetato, o qual foi detectado em concentrações consideráveis (200 mg.L^{-1}) no período em que a concentração dissolvida dos BTEX permaneceu aumentando na água subterrânea (0,4 ano). Segundo os cálculos, neste período as reações seriam termodinamicamente desfavoráveis para todas as concentrações de hidrogênio dissolvido avaliadas, o que pode ter sido um dos fatores responsáveis pela ausência de atenuação dos compostos BTEX aos 0,4 anos. No período subsequente (0,7 ano), houve um aumento no consumo de acetato, evidenciado pela redução em sua concentração (de 200 para 55 mg.L^{-1}), o que fez com que as reações se tornassem mais favoráveis termodinamicamente.

Cálculos teóricos indicam que no período de 0,7 ano, para uma concentração de acetato de 55 mg.L^{-1} , valores de hidrogênio dissolvido \leq a 10^{-9} M tornariam as reações viáveis termodinamicamente, demonstrando que esta concentração de acetato ainda seria suficiente

para causar limitações no sistema, caso as concentrações de H_2 dissolvido se encontrassem acima de 10^{-9} M. Portanto, é possível inferir que a presença de micro-organismos capazes de consumir estes metabólitos de degradação é essencial para a superação das limitações termodinâmicas que possam se estabelecer. No caso do PM9, acredita-se que a estimulação de micro-organismos acetotróficos, como o gênero *Geobacter* spp., colaborou para o aumento do consumo de acetato e, conseqüentemente, tornou as reações de degradação termodinamicamente mais favoráveis. Isto pode ser evidenciado pela condição do sistema em 2,4 anos, em que a redução da concentração de acetato (de 55 para $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) fez com que as reações de degradação do benzeno se tornassem exergônicas em todas as faixas de concentração de H_2 dissolvido avaliadas.

FIGURA 7.25. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM9, nível = 6m.

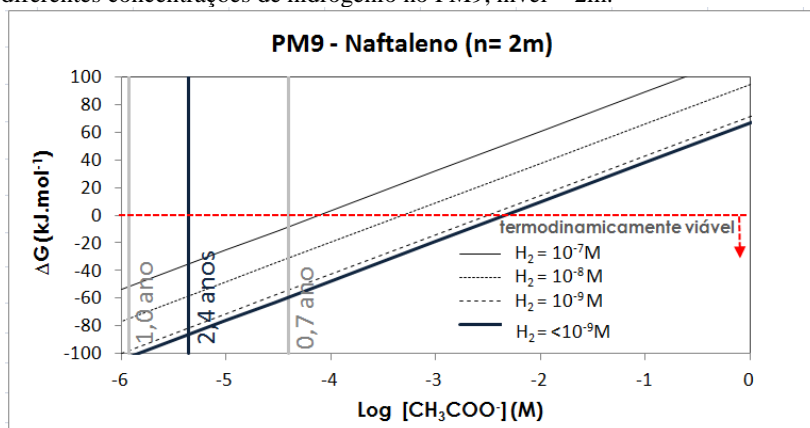


Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,4 ano: $\log -2,5$ M ou 200 mg.L^{-1} ; 0,7 ano: $\log -3,0$ M ou 55 mg.L^{-1} e 2,4 anos: $\log -5,8$ M ou $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H_2 dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H_2 detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

De forma semelhante ao comportamento do benzeno, observado no nível 2m, os cálculos demonstraram a ausência de limitações termodinâmicas nas reações de degradação do naftaleno, nas concentrações de acetato detectadas em todos os períodos avaliados

(2,3; 0,1 e 0,3 mg.L⁻¹ em 0,7; 1,0 e 2,4 anos, respectivamente). Por não ter sido observada a redução das concentrações dissolvidas dos HPAs no período de 0,7 ano, acredita-se que estes compostos podem ter sofrido influência da degradação preferencial dos BTEX, apesar de as reações terem sido viáveis termodinamicamente em todos os períodos avaliados. Esta afirmação pode ser evidenciada pela degradação dos BTEX em 0,7 ano e, pelo início da degradação dos HPAs somente 1,0 ano após a liberação.

FIGURA 7.26. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM9, nível = 2m.

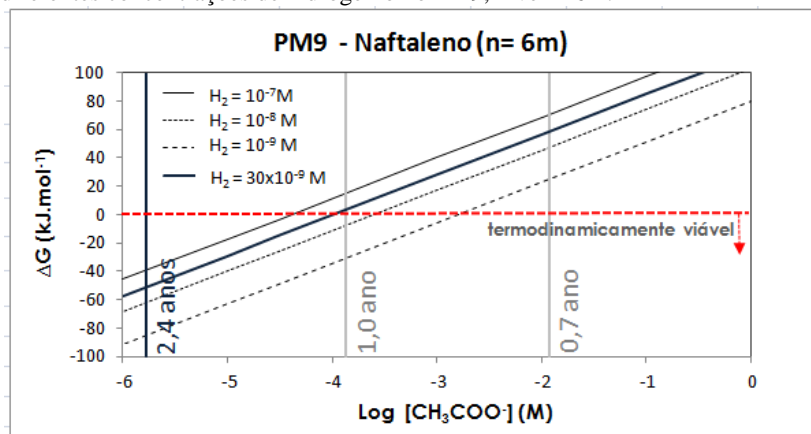


Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,7 ano: log -4,4 M ou 2,3 mg.L⁻¹; 1,0 ano: log -5,9 M ou 0,1 mg.L⁻¹ e 2,4 anos: log -5,4 M ou 0,3 mg.L⁻¹). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H₂ dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H₂ detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

No PM9 nível 6m foi possível observar a existência de limitações termodinâmicas no período em que os compostos HPAs ainda não haviam sido degradados (0,7 ano). Tal limitação pode ser atribuída à elevada concentração de acetato detectada neste mesmo período (691 mg.L⁻¹). Os cálculos demonstram que mesmo na faixa mínima de concentração de hidrogênio dissolvido (10⁻⁹ M) as reações de degradação seriam termodinamicamente desfavoráveis. Porém, a partir do momento em que o acetato passou a ser consumido (1,0 ano) e sua

concentração foi consideravelmente reduzida ($8,3 \text{ mg.L}^{-1}$), as reações tornaram-se favoráveis em concentrações de hidrogênio dissolvido $\leq 2,5 \times 10^{-8} \text{ M}$. Portanto, acredita-se que fatores termodinâmicos podem ter contribuído para o retardo na degradação do naftaleno. Este temporário retardo foi aparentemente superado pela presença de micro-organismos capazes de consumir acetato (e hidrogênio) até reduzi-lo à concentrações não restritivas ao sistema ($2,6 \text{ mg.L}^{-1}$). Isto pode ser evidenciado pelas condições do sistema aos 2,4 anos onde as reações de degradação do naftaleno se encontravam termodinamicamente favoráveis em todas as faixas de concentração de H_2 dissolvido avaliadas, inclusive na concentração de H_2 dissolvido detectada neste período (30 nM).

FIGURA 7.27. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM9, nível = 6m.



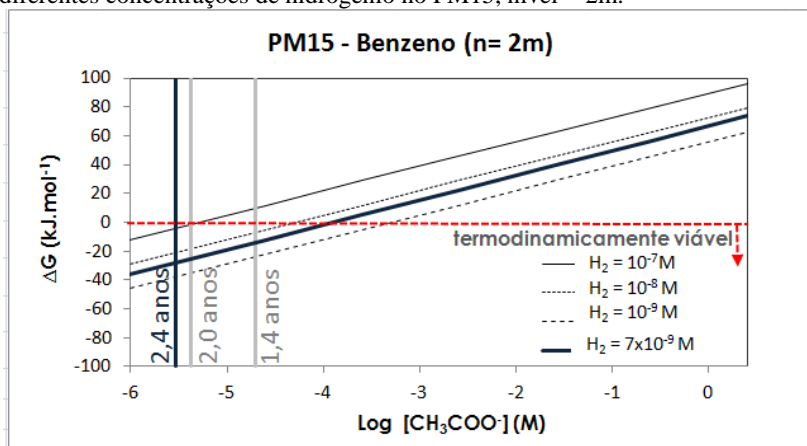
Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,7 ano: $\log -1,9 \text{ M}$ ou 691 mg.L^{-1} ; 1,0 ano: $\log -3,9 \text{ M}$ ou 8 mg.L^{-1} e 2,4 anos: $\log -5,8 \text{ M}$ ou $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H_2 dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H_2 detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

7.4.3 Avaliação das limitações termodinâmicas e cinéticas das reações de degradação do benzeno e naftaleno no PM15

Os cálculos termodinâmicos para o PM15 levaram em consideração os monitoramentos realizados em 1,4 e 2,0 anos, por representarem os períodos em que as concentrações dissolvidas do benzeno aumentaram e reduziram, respectivamente. Para os cálculos avaliando as reações de degradação do naftaleno, foram considerados os períodos de 0,7 e 1,0 ano, pelas mesmas razões que motivaram os períodos escolhidos para a avaliação do benzeno.

Para o nível 2m os cálculos demonstraram que limitações termodinâmicas foram observadas em concentrações de H_2 acima de $0,5 \times 10^{-7}$ M em 1,4 anos e, neste período não houve o decaimento das concentrações dissolvidas dos BTEX. Já em 2,0 anos, de acordo com os cálculos termodinâmicos, na concentração de acetato observada neste período ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), as reações se encontraram favoráveis em todas as faixas de H_2 dissolvido avaliadas. Levando em consideração o decaimento da concentração dos BTEX neste período (de $0,0037$ para $0,0004 \text{ mg.L}^{-1}$), acredita-se que tanto acetato como hidrogênio estariam sendo suficientemente consumidos por micro-organismos específicos, de maneira a impedir o estabelecimento de limitações termodinâmicas e permitir a continuidade das reações de degradação dos BTEX. Diante destas observações, acredita-se que em 1,4 anos pode ter havido um acúmulo de H_2 , produzido nas reações de degradação dos outros contaminantes orgânicos existentes na água subterrânea, que pode ter desfavorecido termodinamicamente a degradação dos BTEX. Adicionalmente, em 2,4 anos o sistema se encontrava em condição semelhante ao período de 2,0 anos, quando as reações foram consideradas termodinamicamente favoráveis para todas as concentrações de H_2 dissolvido avaliadas.

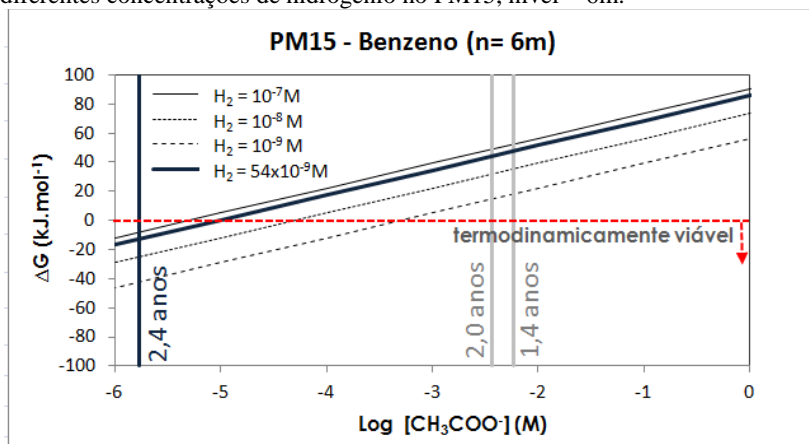
FIGURA 7.28 Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM15, nível = 2m.



Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (1,4 anos: log -5,1 M ou 0,5 mg.L⁻¹; 2,0 anos: log -5,8 M ou 0,1 mg.L⁻¹ e 2,4 anos: log -5,9 M ou 0,07 mg.L⁻¹). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H₂ dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H₂ detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

No nível 6m as concentrações de acetato permaneceram elevadas (379,5 e 215 mg.L⁻¹) nos períodos de 1,4 e 2,0 anos e, portanto, o sistema demonstrou ser termodinamicamente restritivo à todas as faixas de concentração de hidrogênio dissolvido consideradas em ambos os períodos. No entanto, em 2,0 anos, os cálculos demonstraram que em uma concentração de H₂ dissolvido equivalente a $0,25 \times 10^{-9} M$, a reação seria termodinamicamente favorável e, o decaimento da concentração dos BTEX foi observado neste mesmo período (de 1,48 para 0,59 mg.L⁻¹). Acredita-se que micro-organismos hidrogenotróficos tenham contribuído para o consumo de H₂ em quantidades suficientes para impedir o estabelecimento de limitações termodinâmicas. Aos 2,4 anos o consumo de acetato (de 215 para 0,1 mg.L⁻¹) fez com que as reações de degradação do benzeno se tornassem viáveis termodinamicamente em todas as faixas de H₂ dissolvido avaliadas, favorecendo a continuidade dos processos de degradação dos BTEX.

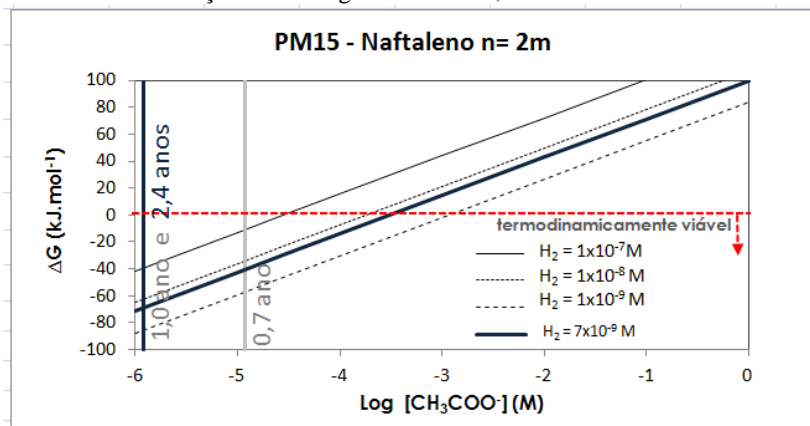
FIGURA 7.29. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do benzeno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 1.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM15, nível = 6m.



Nota: As linhas cinza verticais referem-se às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (1,4 anos: $\log -2,2$ M ou $379,5 \text{ mg.L}^{-1}$; 2,0 anos: $\log -2,4$ M ou 215 mg.L^{-1} e 2,4 anos: $\log -5,8$ M ou $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H_2 dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H_2 detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

Os resultados obtidos para a reação de degradação do naftaleno demonstraram que não houve inibição termodinâmica nos períodos avaliados (0,7; 1,0 ano e 2,4 anos), visto que a reação foi exergônica para todas as faixas de hidrogênio dissolvido consideradas e as baixas concentrações de acetato detectadas nestes períodos (0,7; 0,1 e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente) contribuiriam para que tais inibições não fossem estabelecidas. Semelhante ao ocorrido no PM9 nível 2m, acredita-se que a degradação preferencial dos ésteres do biodiesel tenha retardado temporariamente o processo de degradação dos HPAs. Além disso, conforme mencionado anteriormente, pode ter havido uma produção excessiva de hidrogênio ($>10^{-7} \text{ M}$) aos 0,7 ano que, possivelmente contribuiu para a persistência destes compostos na água subterrânea neste período e, a partir de 1,0 ano a redução da concentração dissolvida de HPAs foi observada. As condições do sistema observadas aos 2,4 anos indicam que as reações de degradação permanecem termodinamicamente viáveis, mesmo na concentração de H_2 dissolvido detectada (7 nM), favorecendo a continuidade das reações.

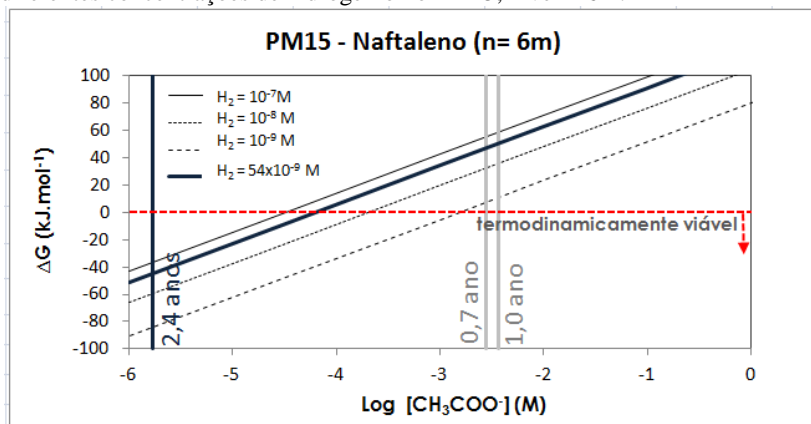
FIGURA 7.30. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM15, nível = 2m.



Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,7 ano: log -4.9 M ou 0,7 mg.L⁻¹; 1,0 e 2,4 anos: log -5.9 M ou 0,1 mg.L⁻¹). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H₂ dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H₂ detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

No PM15 nível 6m, similarmente às observações com relação à degradação do benzeno, concentrações de acetato de 163,7 e 347,7 mg.L⁻¹ foram detectadas em 0,7 e 1,0 ano, respectivamente e causaram limitações termodinâmicas às reações de degradação do naftaleno, podendo proceder aos 0,7 e 1,0 ano somente se a concentração de hidrogênio dissolvido permanecesse inferior a 10⁻⁹ M. Acredita-se que a termodinâmica não tenha sido um fator de influência já que, apesar de as reações terem sido consideradas desfavoráveis termodinamicamente para todas as faixas de H₂ dissolvido avaliadas, o decaimento das concentrações de HPAs foi observado em 1,0 ano. Assim, a degradação preferencial de outros substratos orgânicos (i.e. biodiesel) pode ter contribuído para a persistência dos HPAs até 0,7 ano no sistema. As condições do sistema aos 2,4 anos demonstram que as reações se encontravam termodinamicamente favoráveis para todas as faixas de concentração de H₂ dissolvido avaliadas, principalmente em virtude da redução da concentração de acetato (de 347,7 para 0,1 mg.L⁻¹), podendo favorecer a continuidade das reações de degradação do naftaleno.

FIGURA 7.31. Viabilidade termodinâmica da reação de fermentação do naftaleno, produzindo acetato e hidrogênio (TABELA 7.11, reação 3.1), para diferentes concentrações de hidrogênio no PM15, nível = 6m.



Nota: As linhas verticais se referem às concentrações de acetato detectadas em diferentes períodos (0,7 ano: log -2,6 M ou 163,3 mg.L⁻¹; 1,0 ano: log -2,2 M ou 347,7mg.L⁻¹ e 2,4 anos: -5,8 M ou 0,1 mg.L⁻¹). As linhas diagonais cinzas se referem às concentrações teóricas de H₂ dissolvido e a linha diagonal azul à concentração de H₂ detectada na água subterrânea aos 2,4 anos.

As avaliações termodinâmicas discutidas nos itens acima utilizaram faixas de concentração de H₂ dissolvido plausíveis de serem encontradas em aquíferos anaeróbios e aos 2,4 anos foram realizadas medições de H₂ dissolvido na água subterrânea, que permitiram avaliar termodinamicamente o sistema utilizando concentrações reais (medidas) de H₂ dissolvido. As concentrações de H₂ detectadas permaneceram dentro das faixas plausíveis de serem encontradas em aquíferos anaeróbios (de 1 a 54 nM), sendo a maioria condizente com as concentrações encontradas em ambientes metanogênicos (> 5nM) (CHAPELLE, 2001).

Os resultados observados na fonte de contaminação, PM9 e PM15, demonstraram o estabelecimento de inibições temporárias nas reações de degradação dos BTEX (benzeno) e dos HPAs (naftaleno). Estas inibições foram resultantes da degradação preferencial de determinados substratos e, também, do estabelecimento de limitações termodinâmicas. A presença de acetato, apesar de ter sido responsável por causar restrições termodinâmicas, também demonstrou ter estimulado micro-organismos específicos que participaram das reações

de degradação, tendo sido fundamentais para a superação das limitações termodinâmicas. Os cálculos levando em consideração as condições do experimento aos 2,4 anos demonstraram a ausência de limitações termodinâmicas nos três poços de monitoramento analisados (Fonte, PM9 e PM15; níveis 2 e 6m). Estas observações demonstram que as reações de degradação dos BTEX e HPAs, representadas pelo benzeno e naftaleno, encontraram-se termodinamicamente viáveis aos 2,4 anos, indicando que a termodinâmica não irá exercer influência negativa sobre as reações de degradação avaliadas.

7.5 AVALIAÇÃO DA BIOESTIMULAÇÃO COM ACETATO DE AMÔNIO NA DEGRADAÇÃO ACELERADA DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS COMPARADO À ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA

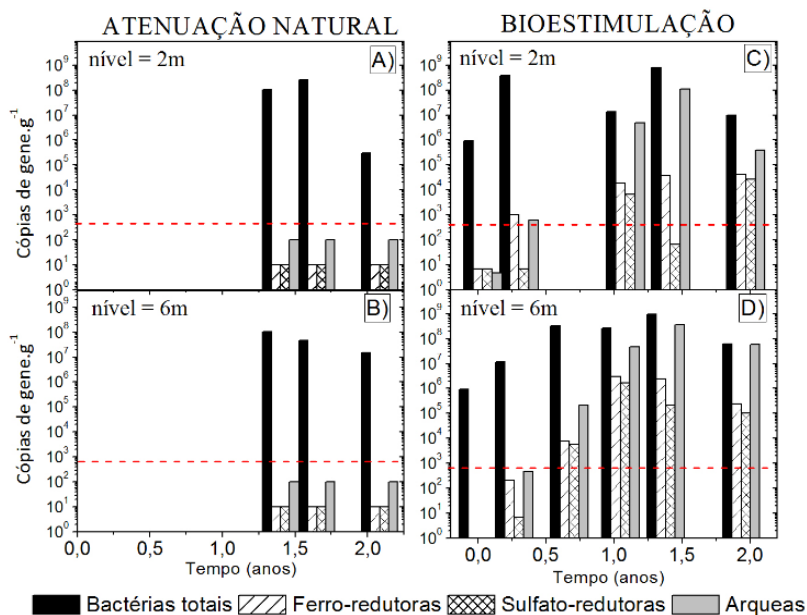
A bioestimulação com substrato orgânico objetivou acelerar a degradação dos compostos presentes na mistura B20 por meio da estimulação de micro-organismos específicos capazes de conduzir as reações de degradação anaeróbia dos ésteres do biodiesel e, principalmente, dos compostos aromáticos, visto que estes são mais preocupantes em virtude de sua recalcitrância e propriedades carcinogênicas. Para avaliar a contribuição da bioestimulação com acetato de amônio na aceleração da degradação dos compostos aromáticos, foi realizada uma comparação com dados provenientes de um experimento de campo com diesel B20, iniciado em junho de 2008 e monitorado durante 29 meses para avaliar processos de atenuação natural (apresentados por Chiaranda (2011)), possibilitando discernir os efeitos da bioestimulação e da atenuação natural sobre o crescimento microbiano e a degradação dos compostos aromáticos. Para as análises comparativas somente a fonte de contaminação foi selecionada para discussão, visto que se trata do local de maior atividade biológica e onde os processos de degradação são observados com maior evidência.

Apesar de o acetato ser um composto capaz de desencadear limitações termodinâmicas capazes de impedir a continuidade dos processos de degradação, este efeito negativo pode ser superado na medida em que o acetato for consumido pelos micro-organismos e reduzido até concentrações consideradas não inibitórias. O consumo de acetato pode promover o crescimento de micro-organismos específicos que, além de impedirem o acúmulo deste composto no meio, podem atuar nas reações de degradação dos compostos aromáticos, como é o caso das bactérias ferro-redutoras, sulfato-redutoras e arqueas metanogênicas. Diante da importância destes micro-organismos para os processos de degradação, os resultados das análises microbiológicas em ambos os experimentos foram disponibilizados, juntamente com os dados de BTEX e HPAs, para a compreensão dos processos decorrentes no experimento de atenuação natural e bioestimulação.

Os resultados da análise microbiológica (FIGURA 7.32) indicam que, no experimento de atenuação natural, a biomassa (bactérias totais) foi estimulada, demonstrando que a presença dos compostos do B20 foi capaz de promover o crescimento microbiano pelo fornecimento de fontes de carbono. No entanto, observa-se que neste mesmo experimento, micro-organismos específicos (ferro-redutores, sulfato-redutores e arqueas) não foram significativamente estimulados, tendo permanecido abaixo do limite de detecção ($\approx 10^2$ cópias de gene.g⁻¹). Já no experimento de bioestimulação, além da biomassa total, micro-organismos específicos passaram a ser estimulados no primeiro evento amostral após a liberação do B20 e início das injeções de acetato de amônio (0,3 ano), fornecendo indícios de que a bioestimulação exerceu uma pressão seletiva nas comunidades microbianas, estimulando sua proliferação no experimento. Diante destas observações, é possível concluir que a bioestimulação com acetato de amônio promoveu a estimulação de micro-organismos específicos associados à degradação anaeróbia de compostos aromáticos e a presença destes é cronologicamente coerente com a observada atenuação dos compostos BTEX e HPAs no experimento de bioestimulação. Da mesma forma, a baixa concentração destes micro-organismos específicos no experimento de atenuação natural condiz com a prolongada persistência destes compostos quando comparado ao experimento de bioestimulação (FIGURA 7.33).

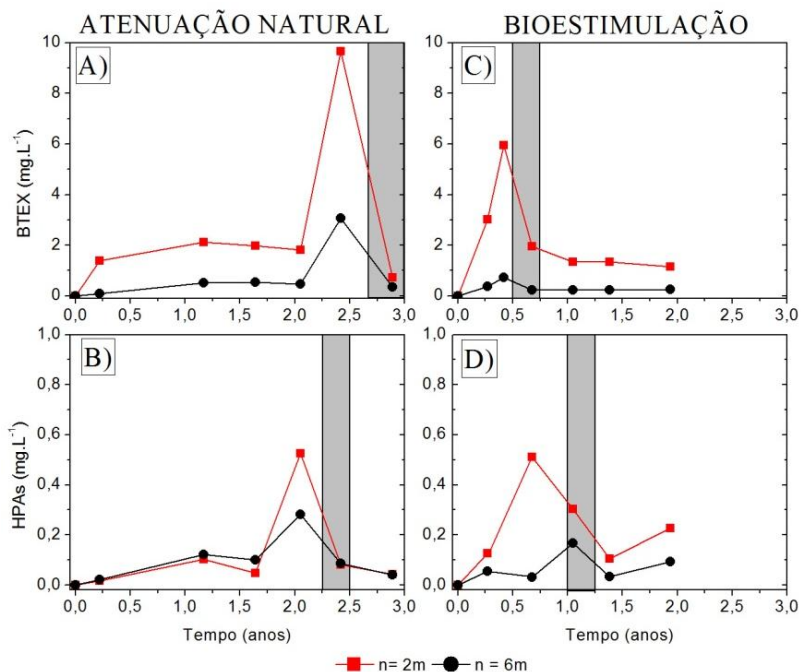
Ao comparar os resultados dos compostos aromáticos, foi possível notar no experimento de bioestimulação o início da atenuação dos BTEX e HPAs em 0,7 e 1,0 ano, respectivamente. Já na atenuação natural, a degradação dos aromáticos foi notada somente a partir de 2,4 anos. Acredita-se que esta temporária persistência dos aromáticos seja reflexo da lenta degradação dos ésteres do biodiesel no experimento de atenuação natural. Sabe-se que estes compostos são degradados preferencialmente e, portanto, enquanto estiverem presentes, os compostos aromáticos permanecerão na água subterrânea. Apesar de as análises microbiológicas neste experimento não terem sido monitoradas de maneira constante desde o início do experimento, sugere-se que a lenta degradação do biodiesel pode ser resultante da menor concentração microbiana neste experimento quando comparado à bioestimulação, uma vez que ambos os experimentos possuem a mesma configuração experimental e foram expostos aos mesmos contaminantes, divergindo somente nas injeções de acetato de amônio.

FIGURA 7.32. Concentração de bactérias totais, ferro-redutoras, sulfato-redutores e arqueas, na fonte de contaminação (níveis 2 e 6m) do experimento de atenuação natural (A e B) e bioestimulação (C e D).



Nota. Linha vermelha tracejada representa o limite de detecção da análise ($\approx 10^2$ cópias de gene.g⁻¹).

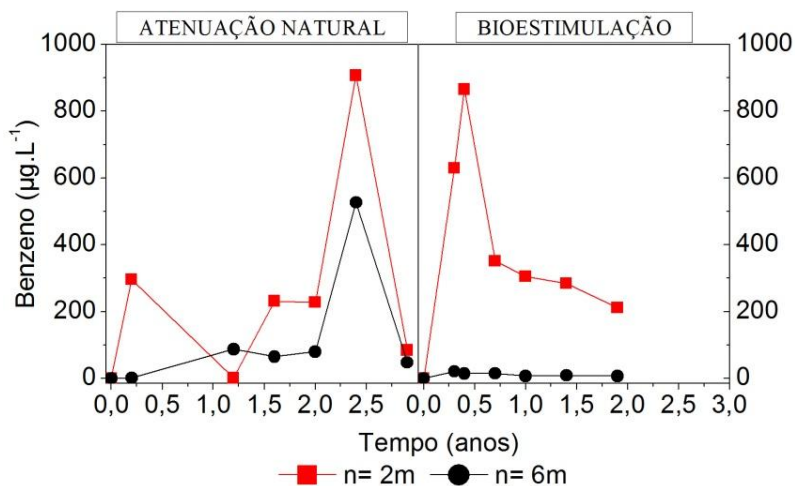
FIGURA 7.33. Concentração de BTEX e HPAs (mg.L^{-1}) na fonte de contaminação, níveis 2 e 6m, no experimento de atenuação natural (A e B) e bioestimulação (C e D), ao longo do tempo.



Nota: Destaque em cinza para os períodos correspondentes ao início da degradação dos contaminantes.

Os compostos BTEX são conhecidos por sua relativa recalcitrância em condições anaeróbias, sendo o benzeno particularmente preocupante devido ao seu potencial carcinogênico. Diante disso, o comportamento deste composto especificamente foi avaliado para verificar sua degradação ao longo do tempo (FIGURA 7.34). Em ambos os experimentos a atenuação do benzeno na fonte de contaminação foi observada, porém, na bioestimulação aos 0,7 ano o decaimento nas concentrações de benzeno já havia sido observado (de 900 para 210 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 20,8 para 6,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$, nos níveis 2 e 6m, respectivamente), enquanto que na atenuação natural, o decaimento das concentrações de benzeno (de 906 para 84 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 527 para 47 $\mu\text{g.L}^{-1}$, nos níveis 2 e 6m, respectivamente) foi observado somente aos 3,0 anos.

FIGURA 7.34. Concentração de benzeno ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na fonte de contaminação, níveis 2 e 6m, nos experimentos de atenuação natural e bioestimulação, ao longo do tempo.



Fatores abióticos como efeitos hidráulicos capazes de influenciar na diluição ou dispersão da pluma de contaminantes, poderiam desvincular ou reduzir a contribuição da biorremediação sobre a atenuação dos contaminantes. Neste sentido, foi avaliada a representatividade da injeção semanal de 25L de solução de acetato de amônio na água subterrânea e observou-se que este volume é negligenciável ($< 1\%$), quando comparado à contribuição (em volume) da recarga por fenômenos de precipitação que ocorrem nas áreas não impermeabilizadas com lona e brita. Portanto, as injeções não contribuíram para o aumento da influência de fatores abióticos na área experimental. Sendo assim, a rápida remoção do benzeno observada no experimento de bioestimulação pôde ser atribuída à biodegradação e reforçou a hipótese de que a introdução de acetato de amônio exerceu efeitos potencialmente favoráveis à degradação dos BTEX (inclusive benzeno), visto que no experimento de atenuação natural a degradação ocorreu somente após 3,0 anos.

O favorecimento da rápida degradação dos compostos BTEX e HPAs no presente experimento foi atribuído ao crescimento de microorganismos capazes de consumir acetato e outros metabólitos de

degradação, assim como aqueles associados à degradação anaeróbia dos ésteres do biodiesel e compostos mono e poliaromáticos, de maneira que as temporárias limitações termodinâmicas estabelecidas pelo acúmulo destes compostos pudessem ser superadas. A julgar pelas observações realizadas neste item, a estimulação utilizando acetato de amônio demonstrou ser eficiente para acelerar a degradação dos compostos presentes em misturas B20 na água subterrânea, em condições metanogênicas e se sugere que esta abordagem possa ser aplicada em ambientes onde a utilização de técnicas aeróbias de remediação não seja viável, como por exemplo, nas regiões de fonte de contaminação, pelo fato de serem ambientes com maior propensão à anaerobiose.

8 CONCLUSÕES

O potencial da bioestimulação anaeróbia, por meio de injeções contínuas de acetato de amônio, foi avaliado para a aceleração da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (BTEX e HPAs) em águas subterrâneas contaminadas com misturas de diesel e biodiesel de soja (B20) e as seguintes conclusões foram formuladas:

- A presença dos ésteres do biodiesel e compostos aromáticos do diesel, juntamente com as injeções de acetato de amônio, promoveu o estabelecimento de condições anaeróbias, como ferro-redução e metanogênese. Dentre estas, a metanogênese foi o processo predominante na fonte de contaminação e PM9 durante a maior parte do período monitorado neste estudo (de 0,7 a 1,4 anos). Considerando que a degradação dos aromáticos neste período foi mais acentuada nesses dois poços de monitoramento, conclui-se que a metanogênese foi o processo de maior contribuição para a degradação dos compostos do B20, especialmente dos aromáticos.
- A biomassa total do aquífero foi estimulada pela presença dos contaminantes e pelas injeções de acetato de amônio. Além disso, foi observada a presença de gêneros microbianos associados a processos sintróficos e degradação anaeróbia de ésteres do biodiesel e compostos aromáticos do diesel. Dentre os gêneros bacterianos, foi evidenciada a predominância de *Geobacter* e *Desulfitobacterium* spp. e, com relação às arqueas, *Methanosarcina* spp. foi o gênero predominante. Em virtude da predominância desses gêneros, de suas atividades metabólicas associadas à degradação dos aromáticos e de seus crescimentos fortemente relacionados, foi sugerida a existência de uma relação sintrófica entre estes três gêneros microbianos.
- O acúmulo de acetato observado nos três poços de monitoramento estudados (Fonte, PM9 e PM15) influenciou negativamente as reações de degradação dos aromáticos, tornando-as termodinamicamente desfavoráveis para as faixas de concentração de hidrogênio dissolvido plausíveis de serem encontradas em aquíferos anaeróbios (10^{-7} a 10^{-9} M).

- O decaimento da concentração dissolvida dos aromáticos coincidiu com o período em que os micro-organismos acetotróficos e hidrogenotróficos se tornaram predominantes (0,7 e 1,0 ano), demonstrando que estes desempenharam um papel fundamental na superação das limitações termodinâmicas, ao impedir o acúmulo dos metabólitos de degradação (acetato e hidrogênio), além de terem participado ativamente das reações de degradação dos ésteres do biodiesel, BTEX e HPAs.
- A estimulação de micro-organismos específicos como ferro-redutores, sulfato-redutores e arqueas metanogênicas, foi um fator determinante para os processos de degradação. No experimento de atenuação natural, onde a presença destes micro-organismos específicos não foi observada em concentrações significativas, a degradação dos BTEX e HPAs ocorreu somente após 3,0 anos, enquanto que no experimento de bioestimulação este processo foi observado a partir de 0,7 ano.
- A contribuição da bioestimulação com adição de acetato de amônio para acelerar a degradação dos compostos do B20, foi evidenciada pela diminuição do tempo necessário para o decaimento da concentração dissolvida dos compostos aromáticos, quando comparado ao experimento de atenuação natural monitorada. Esta redução do tempo foi resultante da estimulação da biomassa total e micro-organismos específicos no experimento de bioestimulação. Considerando que em ambos os experimentos o decaimento das concentrações dos contaminantes foi observado, conclui-se que a contribuição da bioestimulação está relacionada ao menor tempo necessário para a ocorrência da degradação. A lenta degradação dos contaminantes observada no experimento de atenuação natural (quando comparado à bioestimulação) foi atribuída à baixa concentração destes micro-organismos específicos.

A hipótese formulada nesta tese foi confirmada, visto que o processo ocorreu em condições predominantemente metanogênicas e o estabelecimento de limitações termodinâmicas pelo acúmulo de metabólitos de degradação, que causou um retardo na degradação dos compostos aromáticos, foi superado pela presença de micro-organismos capazes de consumi-los sintroficamente. Tais micro-organismos foram

estimulados pela presença de acetato de amônio, culminando na aceleração da degradação dos compostos presentes na mistura B20. No entanto, as injeções de acetato de amônio devem ser constantemente monitoradas a fim de evitar que concentrações elevadas de acetato se estabeleçam e possam impedir a continuidade das reações de degradação dos compostos aromáticos. Esta técnica de bioestimulação demonstrou acelerar a degradação dos compostos presentes na mistura B20, podendo ser considerada para remediação de aquíferos contaminados com este biocombustível, especialmente em regiões próximas à fonte de contaminação, as quais possuem maior propensão à anaerobiose e inviabilizam a aplicação de técnicas aeróbias de remediação.

9 RECOMENDAÇÕES

- Avaliar a continuidade dos processos metanogênicos na degradação dos compostos aromáticos, após a interrupção das injeções de acetato de amônio.
- Realizar análises de sequenciamento de DNA microbiano em experimentos de campo com outros biocombustíveis, como por exemplo, etanol ou biodiesel B100, a fim de verificar as alterações nas comunidades microbianas e determinar quais os principais microorganismos envolvidos nos processos de degradação de diferentes biocombustíveis.
- Avaliar temporalmente a influência do hidrogênio sobre as limitações termodinâmicas causadas às reações de degradação dos compostos aromáticos presentes no B20.
- Realizar estudos para determinar a procedência do acetato, como por exemplo, por meio da utilização de isótopos de carbono, a fim de fornecer uma melhor compreensão dos processos de degradação, uma vez que o acetato pode ser proveniente de diversas rotas de biodegradação e, até mesmo introduzido por meio de injeções.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTNICH, C.; FRIEDHELM, B.; CONRAD, R. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers and methanogens in anoxic paddy soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 19, n. 1, p. 65-72, 1995.

AHMADIAN, A.; EHN, M.; HOBER, S. Pyrosequencing: History, Biochemistry and Future. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, n. 1-2, p. 83-94, 2006.

AHRING, B.K.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 43, p. 559-565, 1995.

ALBUQUERQUE, M. C. G.; MACHADO, Y. L.; AZEVEDO, D.C.S.; CAVALCANTE, C. L. JR.; FIRMIANO, L. R.; PARENTE E. J. S. JR. Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. **Renewable Energy**. v. 34, p. 857-859, Mar, 2009.

ALLEN, T.D.; KRAUS, P.F.; LAWSON, P.A.; DRAKE, G.R.; BALKWILL, D.L.; TANNER, R.S. *Desulfovibrio carbinoliphilus* sp. nov., a benzyl alcohol-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from a gas condensate-contaminated aquifer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, n. 6, p. 1313-1317, Jun, 2008.

ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M. Determination of the density and the viscosities of biodiesel–diesel fuel blends. **Renewable Energy**. v. 33, n. 12, p. 2623-2630, Dec, 2008.

ALVAREZ, P.J.J.; HUNT, C.S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 44, n. 2, p. 83-104, Jun, 2002.

ALVAREZ, P.J.J.; PÉREZ, E.G. **Biorremediación y atenuación natural de acuíferos contaminados por sustancias químicas peligrosas**. Valencia: Consejo del Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad de Carabobo, 2003.

AMBROSOLI, R.; PETRUZZELLI, L.; MINATI, J.L.; MARSAN, F.A. Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. **Chemosphere**. v. 60, n. 9, p. 1232-1236, 2005.

ANDERSON, R.T.; ROONEY-VARGA, J.N.; GAW, C.V.; LOVLEY, D.R. Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. **Environmental Science and Technology**. v. 32, n. 9, p. 1222-1229, 1998.

ANDERSON, R.T.; LOVLEY, D.R. Naphthalene and benzene degradation under Fe(III)-reducing conditions in petroleum-contaminated aquifers. **Bioremediation Journal**. v. 3, n. 2, p. 121-135, 1999.

ANDERSON, R.T.; VRIONIS, H.A.; ORTIZ-BERNAD, I.; RESCH, C.T.; LONG, P.E.; DAYVAULT, R.; KARP, K.; MARUTZKY, S.; METZLER, D.R.; PEACOCK, A.; WHITE, D.C.; LOWE, M.; LOVLEY, D.R. Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 10, p. 5884-5891, 2003.

ANGELIDAKI, I.; ELLEGAARD, L.; AHRING, B.K. A Comprehensive Model of Anaerobic Bioconversion of Complex Substrates to Biogas. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 63, n. 3, p. 363-372, May, 1999.

ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; MECKENSTOCK, R.U. Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-mehtylnaphthalene, and tetraline indicate a new metabolic pathway. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 2, p. 852-858, Feb, 2002.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Biocombustíveis**. Disponível em:< <http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. E2081-00. **Standard Guide for Risk-Based Corrective Action**. Apr, 2000.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profiles, 1995. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=122&tid=25>. Acesso em: agosto, 2010.

BAKER, G.C.; SMITH, J.J.; COWAN, D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**. v. 55, n. 3, p. 541-555, Dec, 2003.

BARIK, S.; BRULLA, W.J.; BRYANT, M.P. PA-1, a Versatile Anaerobe Obtained in Pure Culture, Catabolizes Benzenoids and Other Compounds in Syntrophy with Hydrogenotrophs, and P-2 plus *Wolinella* sp. Degrades Benzenoids. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 50, n. 2, p. 304-310, Aug, 1985.

BECKER, J.G.; BERARDESCO, G.; RITTMAN, B.E.; STAHL, D.A. The Role of Syntrophic Associations in Sustaining Anaerobic Mineralization of Chlorinated Organic Compounds. **Environmental Health Perspectives**. v. 113, n. 3, p. 310-316, Dec, 2004.

BEDESSEM, M.E.; SWOBODA-COLBERG, N.; COLBERG, P.J.S. Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments. **FEMS Microbiology Letters**. v. 152, n. 2, p. 213-218, 1997.

BEDIENT, P.B.; RIFAI, H.S.; NEWELL, C.J. **Groundwater contamination: transport and remediation**. New York: Prentice Hall, 1994. 480 p.

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

BELLER, H.R., KANE, S.R., LEGLER, T.C., MCKELVIE, J.R., LOLLAR, B.S., PEARSON, F., BALSER, L. and MACKAY, D.M. Comparative Assessments of Benzene, Toluene, and Xylene Natural Attenuation by Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis of a Catabolic Gene, Signature Metabolites, and Compound-Specific Isotope Analysis. **Environmental Science and Technology**. v. 42, n. 16, p. 6065-6072, 2008.

BERNER, R.A. Migration of iron and sulfur within anaerobic sediments during early diagenesis. **American Journal of Science**. v. 267, n. 1, p. 19-42, 1969.

BLACKBURNE, R.; VADIVELU, V.M.; YUAN, Z.; KELLER, J. Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. **Water Research**. v. 41, n. 14, p. 3033-3042, 2007.

BODOUR, A. A.; WANG, J.M.; BRUSSEAU, M.L.; MAIER, R.M. Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. **Environmental Microbiology**. v. 5, n. 10, p. 888-895, 2003.

BOHN, H.L., McNEAL, B.L., O'CONNOR, G.A. **Soil Chemistry**, John Wiley and Sons, New York, 329 p., 1979.

BRADLEY, P.M. e CHAPELLE, F.H. Rapid Toluene Mineralization by Aquifer Microorganisms at Adak, Alaska: Implications of Intrinsic Bioremediation in Cold Environments. **Environmental Science and Technology**. v. 29, n.11, p. 2778-2781. 1995.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n°. 396, de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 abr. 2008. Seção 1, p. 64-68.

BRASIL. Lei n°. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, altera as Leis n°. 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636 de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n°. 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.

BRÄUER, S.L.; CADILLO-QUIROZ, H.; WARD, R.J.; YAVITT, J.B.; ZINDER, S.H. Methanoregula boonei gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat Bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, p. 45-52, 2011.

BREGNARD, T.P-A.; HÖHENER, P.; HÄNER, A.; ZEYER, J.; Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, n. 3, p. 299-307, Mar, 1996.

BROADBENT, F.E.. The soil organic fraction. **Advances in Agronomy**. v. 5, p. 153-183,1953.

BRUCE, T.; MARTINEZ, I.B.; NETO, O.M.; VICENTE, A.C.P.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F.L. Bacterial Community Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. **Soil Microbiology**. v. 60, n. 4, p. 840-849, 2010.

BRYANT, M.P.; WOLIN, E.A.; WOLIN, M.J. WOLFE, R.S. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 59, n. 1-3, p. 20–31, 1967.

BRYANT, M.P.; CAMPBELL, L.; REDDY C.; CRABILL, M. Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 33, n. 5, p.1162–1169, 1977.

CALDWELL, M.E.; SUFLITA, J.M. Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions. **Environmental Science and Technology**. v. 34, n. 7, p. 1216–1220, 2000.

CALDWELL, S.L.; LAIDLER, J.R.; BREWER, E.A.; EBERLY, J.O.; SANDBORGH, S.C.; COLWELL, F.S. Anaerobic Oxidation of Methane: Mechanisms, Bioenergetics, and the Ecology of Associated Microorganisms. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 18, p. 6791-6799, Jul, 2008.

CALLISTER, S.J.; WILKINS, M.J.; NICORA, C.D.; WILLIAMS, K.H.; BANFIELD, J.F.; VERBERKMOES, N.C.; HETTICH, R.L.; N'GUESSAN, L.; MOUSER, P.J.; ELIFANTZ, H.; SMITH, R.D.; LOVLEY, D.R.; LIPTON, M.S.; LONG, P.E. Analysis of Biostimulated Microbial Communities from Two Field Experiments Reveals Temporal and Spatial Differences in Proteome Profiles. **Environmental Science and Technology**. v. 44, n. 23, p. 8897-8903, 2010.

CÁPIRO, N.L.; DA SILVA, M.L.B.; STAFFORD, B.P.; RIXEY, W.G.; ALVAREZ, P.J.J. Microbial community response to a release of neat ethanol onto residual hydrocarbons in a pilot-scale aquifer tank. **Environmental Microbiology**. v. 10, n. 9, p. 2236-2244, 2008.

CAVALETT, O.; ORTEGA, E. Integrated environmental assessment of biodiesel production from soybean in Brazil. **Journal of Cleaner Production**. v.18, n.1, p. 55-70, 2010.

CHAKRABORTY, R.; COATES, J.D. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 64, p. 437-446, Jan, 2004.

CHAMP, D.R.; GULENS, J.; JACKSON, R.E. Oxidation–reduction sequences in ground water flow systems. **Canadian Journal of Earth Sciences**. v. 16, n. 1, p. 12-23, 1979.

CHANG, W.; UM, Y.; HOLOMAN, T.R.P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation Coupled to Methanogenesis. **Biotechnology Letters**. v. 28, n. 6, p. 425-430, 2006.

CHAPELLE, F.H; LOVLEY, D.R. Competitive Exclusion of Sulfate Reduction by Fe(III)-Reducing Bacteria: A Mechanism for Producing Discrete Zones of High-Iron Ground Water. **Ground Water**, v. 30, n. 1, p. 29-36, 1992.

CHAPELLE, F.H.; VROBLESKY, D.A.; WOODWARD, J.C.; LOVLEY, D.R. Practical Considerations for Measuring Hydrogen Concentrations in Groundwater. **Environmental Science and Technology**. v. 31, n. 10, p. 2873-2877, 1997.

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

CHAPELLE, F.H.; BRADLEY, P.M.; LOVLEY, D.R.; O'NEILL, K.; LANDMEYER, J.E. Rapid Evolution of Redox Processes in a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer. **Ground Water**. v. 40, n. 4, p. 353-360, 2002.

CHAUHAN, A.; OGRAM, A.; REDDY, K.R. Everglades along a Nutrient Gradient in the Florida Syntrophic-Methanogenic Associations. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 6, p. 3475-3484, Jun, 2004.

CHAUHAN, A.; OGRAM, A. Fatty Acid-Oxidizing Consortia along a Nutrient Gradient in the Florida Everglades. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 4, p. 2400-2406, 2006.

CHIARANDA, H.S. **Alterações Biogeoquímicas em Águas Subterrâneas Impactadas por Biodiesel de Soja e Misturas de Diesel/Biodiesel (B20)**. 2011. 221p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COATES, J.D.; LONERGAN, D.J.; PHILIPS, E.J.P.; JENTER, A.; LOVLEY, D.R. *Desulfuromonas palmitatis* sp., nov. a marine dissimilatory Fe (III) reducer that can oxidize long chain fatty acids. **Archives of Microbiology**. v. 164, n. 6, p. 406-413, 1995.

COATES, J.D.; ELLIS, D.J.; GAW, C.V.; LOVLEY, D.L. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 49, n. 4, p. 1615-1622, 1999.

COATES, J.D.; BHUPATHIRAJU, V.K.; McINERNEY, M.J.; LOVLEY, D.R. *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, n. 2, p. 581-588, Mar, 2001.

COLEMAN, M.L.; HEDRICK, D.B.; LOVLEY, D.R.; WHITE, D.C.; PYE, K. Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. **Nature**. v. 361, n. 6411, p. 436-438, 1993.

COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. **Antoine Van Leeuwenhoek**. v. 67, p. 29-46, 1995.

COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J.J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J.A.E. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology** v. 44, n. 4, p. 812-826, Oct, 1994.

COLWELL, R.K.; CODDINGTON, J.A. Estimating Terrestrial Biodiversity through Extrapolation. **Philosophical Transactions of The Royal Society**. v. 345, n. 1311, p. 101-118, Jul, 1994.

COLWELL, R.K. EstimateS: **Statistical estimation of species richness and shared species from samples**. Versão 8.2. Manual de Operação e Aplicação, 2009. Disponível em: <http://purl.oclc.org/estimates>. Acesso em: 18/10/2012.

CONRAD, R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 28, n. 3, p. 193-202, Mar, 1999.

CORD-RUWISCH, R.; LOVLEY, D.R.; SCHINK, B. Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 6, p. 2232-2236, Jun, 1998.

CORSEUIL, H.X., ALVAREZ, P.J.J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Water Science and Technology**. v. 34, n. 7-8, p. 311-318, 1996.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. Contaminação de águas subterrâneas por derramamento de gasolina: O problema é grave?. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, n. 2, p. 50-54, 1997.

CORSEUIL, H.X.; KAIPPER, B.I.A.; FERNANDES, M. Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol . **Water Research**. v. 38, n. 6, p. 1449-1456, Mar, 2004.

CORSEUIL, H.X.; MONIER, A.L.; FERNANDES, M.; SCHNEIDER, M.R.; NUNES, C.C.; ROSÁRIO, M.; ALVAREZ, P.J.J. BTEX plume dynamics following an ethanol blend release: geochemical footprint and thermodynamic constraints on natural attenuation. **Environmental Science and Technology**. v. 45, n. 8, p. 3422-3429, 2011a.

CORSEUIL, H.X.; MONIER, A.L.; GOMES, A.P.N.; CHIARANDA, H.S.; ROSÁRIO, M.; ALVAREZ, P.J.J. Biodegradation of soybean and castor oil biodiesel: implications on the natural attenuation of monoaromatic hydrocarbons in groundwater. **Groundwater Monitoring & Remediation**. v. 31, n. 3, p. 111-118, 2011b.

COSTA, A.H.R. **Bioestimulação com Injeção de Nitrato em Águas Subterrâneas Impactadas por Derramamento de Gasolina com Etanol**. 2008. 248 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DA SILVA, M.L.B.; ALVAREZ, P.J.J. Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4720-4726, Aug. 2004.

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

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 31, n. 5-6, p. 466-487, 2005.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**. v. 50, n. 1, p. 14-34, Jan, 2009.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Environmental Science Biotechnology**. v. 7, n. 2, p. 173-190, Jan, 2008.

DÍAZ, E.E.; STAMS, A.J.M.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Phenotypic Properties and Microbial Diversity of Methanogenic Granules from a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor Treating Brewery Wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 7, p. 4942-4949, Jul, 2006.

DING, L.; YOKOTA, A. *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 56, n. 3, p. 267-271, 2010.

DOLFING, J. The Microbial Logic behind the Prevalence of Incomplete Oxidation of Organic Compounds by Acetogenic Bacteria in Methanogenic Environments. **Microbial Ecology**. v. 41, n. 2, p. 83-89, 2001.

DOLFING, J.; LARTER, S. R.; HEAD, I.M. Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation. **International Society for Microbial Ecology**. v. 2, n. 4, p. 442-452, 2008.

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

DOU, J.; LIU, X.; HU, Z.; DENG, D. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. **Journal of Hazardous Materials**. v. 151, n. 2-3, p. 720-729, 2008.

DYKE, M.I.V.; McCARTHY, A.J. Molecular Biological Detection and Characterization of *Clostridium* Populations in Municipal Landfill Sites. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 4, p. 2049-2053, Apr, 2002.

EDMUNDS, W.M.; MILES, D.L.; COOK, J.M. A comparative study of sequential redox processes in three British Aquifers, in: Eriksson, E. (ed.). Hydrochemical Balance of Freshwater Systems. Washington, D.C: IAHS-AIHS International Association of Hydrogeological Sciences, 1984. Publ.150, 55-70.

EDWARDS, E.A.; GRBIC-GALIC, D. Anaerobic Degradation of Toluene and o-Xylene by a Methanogenic Consortium. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, n. 1, p. 313-322, Jan, 1994.

ENGLE, M.; LI, Y.; RAINEY, F.; DeBLOIS, S.; MAI, V.; REICHERT, A.; MAYER, F.; MESSNER, F.; WIEGEL, J. *Thermobrachium celere* gen. nov., sp. nov., a Rapidly Growing Thermophilic, Alkalitolerant, and Proteolytic Obligate Anaerobe. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, n. 4, p. 1025-1033, Oct, 1996.

ERIKSSON, M.; SODERSTEN, E.; YU, Z.; DALHAMMAR, G.; MOHN, W.W. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 1, p. 275-284, Jan, 2003.

EVANS, F.F.; ROSADO, A.S.; SEBASTIAN, G.V.; CASELLA, R.; MACHADO, P.L.O.A.; HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J.D. e SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **Fems Microbiology Ecology** v. 49, n. 2, p. 295-305, 2004.

FAHY, A.; LETHBRIDGE, G.; EARLE, R.; BALL, A.S.; TIMMIS, K.N.; McGENITY, T.J. Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. **Environmental Microbiology**. v. 7, n. 8, p. 1192-1199, Jan, 2005.

FERIS, K.; MACKAY, D.; SIEYES, N.; CHAKRABORTY, I.; EINARSON, M.; HRISTOVA, K.; SCOW, K. Effect of ethanol on microbial community structure and function during natural attenuation of benzene, toluene and o-xylene in a sulfate-reducing aquifer. **Environmental Science and Technology**. v. 42, n. 7, p. 2289-2294, 2008.

FERRY, J.G.; SMITH, P.H.; WOLFE, R.S. *Methanospirillum*, a New Genus of Methanogenic Bacteria and Characterization of *Methanospirillum hungatii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 24, n. 4, p. 465-469, Oct, 1974.

FERRY, J.G. Methane from Acetate. **Journal of Bacteriology**. v. 174, n. 17, p. 5489-5495, Sep, 1992.

FETTER, C.W. **Applied hydrogeology**. 3rd ed. New York: Macmillan, 1994. 691 p.

FICKER, M.; KRASTEL, K.; ORLICKY, S.; EDWARDS, E. Molecular Characterization of a Toluene-Degrading Methanogenic Consortium. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 12, p. 5576-5585, Dec, 1999.

FLORENCIO, L.; NOZHEVNIKOVA, A.; LANGERAK, A.V.; STAMS, A.J.M.; FIELD, J.A.; LETTINGA, G. Acidophilic degradation of methanol by a methanogenic enrichment culture. **FEMS Microbiology Letters**. v. 109, n. 1, p. 1-6, May, 1993.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R.O.; PRYDE, E.H. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 63, n. 10, p. 1375-1380, Oct, 1986.

FREITAS, J.G.; FLETCHER, B.; ARAVENA, R.; BARKER, J.F. Methane Production and Isotopic Fingerprinting in Ethanol Fuel Contaminated Sites. **Ground Water**. v. 48, n. 6, p. 844-857, 2010.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, n. p. 803-816, Nov, 2011.

GALAGAN, J.E.; NUSBAUM, C.; ROY, A.; ENDRIZZI, M.G.; MACDONALD, P.; FITZHUGH, W.; CALVO, S.; ENGELS, R.; SMIRNOV, S.; ATNOOR, D.; BROWN, A.; ALLEN, N.; NAYLOR, J.; STANGE-THOMANN, N.; DEARELLANO, K.; JOHNSON, R.; LINTON, L.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; TALAMAS, J.; TIRRELL, A.; YE, W.J.; ZIMMER, A.; BARBER, R.D.; CANN, I.; GRAHAM, D.E.; GRAHAME, D.A. GUSS, A.M.; HEDDERICH, R.; INGRAM-SMITH, C.; KUETTNER, H.C.; KRZYCKI, J.A.; LEIGH, J.A.; LI, W.X., LIU, J.F.; MUKHOPADHYAY, B.; REEVE, J.N., SMITH, K.; SPRINGER, T.A.; UMayAM, L.A.; WHITE, O.; WHITE, R.H.; DE MACARIO, E.C.; FERRY, J.G.; JARRELL, K.F.; JING, H.; MACARIO, A.J.L.; PAULSEN, I.; PRITCHETT, M.; SOWERS, K.R.; SWANSON, R.V.; ZINDER, S.H.; LANDER, E.; METCALF, W.W.; BIRREN, B. The genome of m-activorans reveals extensive metabolic and physiological diversity. **Genome Research**. v. 12, n. 4, p. 532-542, 2002.

GEISSLER, A.; MERROUN, M.; GEIPEL, G.; REUTHER, H.; SELENSKA-POBELL, S. Biogeochemical changes induced in uranium mining waste pile samples by uranyl nitrate treatments under anaerobic conditions. **Geobiology**. v. 7, n. 3, p. 282-294, 2009.

GERPEN, J.; SHANKS, B; PRUSZKO, R; CLEMENTS, D; KNOTHE, G. **Biodiesel analytical methods**: August 2002-January 2004. Preparado para U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy por Midwest Research Institute. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2004. 95 p.

GILBERT, R.O. **Statistical Methods for Environmental Pollution Monitoring**. Jonh Wiley & Sons, Inc: NY, 336p, 1987.

GILOTEAUX, L.; GONI-URRIZA, M. e DURAN, R. Nested PCR and New Primers for Analysis of Sulfate-Reducing Bacteria in Low-Cell-Biomass Environments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 9, p. 2856-2865, May, 2010.

GOBERNA, M.; INSAM, H.; FRANKE-WHITTLE, I.H. Effect of Biowaste Sludge Maturation on the Diversity of Thermophilic Bacteria and Archaea in an Anaerobic Reactor. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 8, p. 2566-2572, Apr, 2009.

GOEVERT, D.; CONRAD, R. Carbon Isotope Fractionation by Sulfate-Reducing Bacteria Using Different Pathways for the Oxidation of Acetate. **Environmental Science and Technology**. v. 42, n. 21, p. 7813-7817, Jun, 2008.

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

GRABOWSKI, A.; BLANCHET, D.; JEANTHON, C. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. **Research in Microbiology**. v. 156, n. 7, p. 814-821, Aug, 2005.

GRBIC-GALIC, D.; VOGEL, T.M. Transformation of Toluene and Benzene by Mixed Methanogenic Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, n. 2, p. 254-260, Feb, 1987.

GREGG, S.J. e SING, K.S.W. **Adsorption, surface area, and porosity**. London, Academic Press, 1982. 303p.

GRIM, R.E. **Clay Mineralogy**, 2nd Edition, McGraw-Hall, New York., 1968.

GU, Y.; HU, S.; CHEN, J.; SHAO, L.; HE, H.; YANG, Y.; YANG, S.; JIANG, W. Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 36, n. 9, p. 1225–1232, 2009.

GUIMARÃES, L.B. **Identificação da presença de combustíveis em subsuperfície através de técnicas de biologia molecular**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

HABE, H.; OMORI, T. Genetics of Polycyclic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 67, n. 2, p. 225-243, 2003.

HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 169, n. 1-3, p. 1-15, Sept. 2009.

HARVEY, R.W.; SMITH, R.L.; GEORGE, L. Effect of Organic Contamination upon Microbial Distributions and Heterotrophic Uptake in a Cape Cod, Mass; Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1197-1202, 1984.

HARVEY, R.W.; BARBER, L.B. Associations of free-living bacteria and dissolved organic compounds in a plume of contaminated groundwater. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 9, n. 1-2, p. 91-103, 1992.

HATAMONO, M.; IMACHI, H.; YASHIRO, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. Diversity of Anaerobic Microorganisms Involved in Long-Chain Fatty Acid Degradation in Methanogenic Sludges as Revealed by RNA-Based Stable Isotope Probing. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 13, p. 4119-4127, Jul, 2007.

HATTORI, S. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. **Microbes and Environments**, Tokyo, v. 23, n. 2, p. 118-127, Jun. 2008.

HE, Q.; SANFORD, R.A. Acetate Threshold Concentrations Suggest Varying Energy Requirements during Anaerobic Respiration by *Anaeromyxobacter dehalogenans*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 11, p. 6940-6943, 2004.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Microbial Anaerobic Aromatic Metabolism. **Anaerobe**. v. 3, n. 1, p. 1-22, Feb, 1997.

HEIMANN A.; JAKOBSEN R.; BLODAU, C. Energetic constraints on H₂-dependent terminal electron accepting processes in anoxic environments: a review of observations and model approaches. **Environmental Science and Technology** v. 44, n. 1, p. 24–33, 2010.

HENDRICKX, B.; DEJONGHE, W.; BOËNNE, W.; BRENNEROVA, M.; CERNIK, M.; LEDERER, T.; BUCHELI-WITSCHER, M.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D. Dynamics of an Oligotrophic Bacterial Aquifer Community during Contact with a Groundwater Plume Contaminated with Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes: an In Situ Mesocosm Study. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 7, p. 3815-3825, Jul, 2005.

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

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

IMACHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; LOY, A.; QIU, Y.L.; HUGENHOLTZ, P.; KIMURA, N.; WAGNER, M.; OHASHI, A.; HARADA, H. Non-Sulfate-Reducing, Syntrophic Bacteria Affiliated with *Desulfotomaculum* Cluster I Are Widely Distributed in Methanogenic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 3, p. 2080-2091, Mar, 2006.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. v. 32, p. 211-224, 1983.

ITOH, T.; YOSHIKAWA, N.; TAKASHINA, T. *Thermogymnomonas acidicolagen. nov., sp. nov.*, a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 57, p. 2557-2561, 2007.

JAHN, M. K.; HADERLEIN, S. B.; MECKENSTOCK, R. U. 2005. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-xylene in sediment-free iron-reducing enrichment cultures. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 71, n. 6, p. 3355–3358, Jun, 2005.

JOHNSEN, A.R.; WICK, L.Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH degradation in soil. **Environmental Pollution.** v. 133, n. 1, p. 71-84, Jan, 2005.

JONES, E.J.P.; VOYTEK, M.A.; CORUM, M.D.; OREM, W.H. Stimulation of Methane Generation from Nonproductive Coal by Addition of Nutrients or a Microbial Consortium. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 76, n. 21, p. 7013-7022, Sep, 2010.

JUCK, D.; CHARLES, T.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS Microbiology Ecology.** v. 33, n. 3, p. 241-249, Sep, 2000.

KAIPPER, B.I.A. **Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel.** 2003. 179 f. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KATO, S.; WATANABE, K. Ecological and Evolutionary Interactions in Syntrophic Methanogenic Consortia. **Microbes and Environment.** v. 25, n. 3, p. 145-151, Jul, 2010.

KATO, S.; HASHIMOTO, K.; WATANABE, K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals. **Environmental Microbiology**. v. 14, n. 7, p. 1646-1654, 2012.

KAZUMI, J.; CALDWELL, M.E.; SUFLITA, J.M.; LOVLEY, D.R.; YOUNG, L.Y. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. **Environmental Science and Technology**. v. 31, n. 3, p.813–818, 1997.

KIELY, P.D.; REGAN, J.M.; LOGAN, B.E. The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 22, n. 3, p. 378-385, Mar, 2011.

KLEEMANN, R.; MECKENSTOCK, R.U. Anaerobic naphthalene degradation by gram-positive, iron-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 78, n. 3, p.488-496, 2011.

KLEIKEMPER, J.; POMBO, S. A.; SCHROTH, M.H.; SIGLER, W.V. PESARO, M.; ZEYER, J. Activity and Diversity of Methanogens in a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 1, p. 149-158, Jan, 2005.

KLEINSTEUBER, S.; SCHLEINITZ, K.M.; VOGT, C. Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 94, n. 4, p. 851-873, May, 2012.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**. n. 86, p. 1059-1070, 2005.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K.R. Kinematic viscosity of biodiesel components (fatty acid alkyl esters) and related compounds at low temperatures. **Fuel**. v. 84, n. 16, p. 2560-2567, Nov, 2007.

KOTELNIKOVA, S.; PEDERSEN, K. Evidence for methanogenic Archaea and Homoacetogenic bacteria in deep granitic rock aquifers. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 20, n. 3–4, p. 339–349, 1997.

KOTSYURBENKO, O.R.; GLAGOLEV, M.V.; NOZHEVNIKOVA, A.N.; CONRAD, R. Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 38, n. 2-3, p. 153-159, 2001.

KOTSYURBENKO, O.R.; CHIN, K-J.; GLAGOLEV, M.V.; STUBNER, S.; SIMANKOVA, M.V.; NOZHEVNIKOVA, A.N.; CONRAD, R. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. **Environmental Microbiology**. v. 6, n. 11, p. 1159-1173, Nov, 2004.

KOTSYURBENKO, O.R.; FRIEDRICH, M.W.; SIMANKOVA, M.V.; NOZHEVNIKOVA, A.N.; GOLYSHIN, P.N.; TIMMIS, K.N.; CONRAD, R. Shift from Acetoclastic to H₂-Dependent Methanogenesis in a West Siberian Peat Bog at Low pH Values and Isolation of an Acidophilic Methanobacterium Strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 7, p. 2344-2348, 2007.

KRASIKOVA, R.N.; FEDOROVA, O.S.; KORSAKOV, M.V.; BENNINGTON, B.L.; BERRIDGE, M.S. Improved [13N] ammonia yield from the proton irradiation of water using methane gas. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 55, n. 4, p. 395-401, Oct, 1999.

KUNAPULI, U.; LUEDERS, T.; MECKENSTOCK, R.U. The use of stable isotope probing to identify key iron -reducing microorganisms involved in anaerobic benzene degradation. **International Society for Microbial Ecology**. v. 1, p. 643-653, 2007.

KUNAPULI, U.; JAHN, M.K.; LUEDERS, T.; GEYER, R.; HERMANN, J.H.; MECKENSTOCK, R.U. *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxydans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, p. 686-695, 2010.

LADISCH, M.R. Fermentation-derived butanol and scenarios for its uses in energy-related applications. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 13, n. 3, p. 280-283, 1991.

LAGE, I.C. Avaliação de metodologias para determinação da permeabilidade em meios porosos: a área experimental da Fazenda Ressacada, SC. Rio de Janeiro, 2005. 119 p. Dissertação (Mestrado em Geociências). Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LALMAN, J.D. **Anaerobic Degradation of Linoleic (C18:2), Oleic (C18:1) and Stearic (C18:0) Acids and their Inhibitory Effects on Acidogens, Acetogens and Methanogens.** 2000. 202p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade de Toronto, Canadá, 2000.

LALMAN, J.D.; BAGLEY, D.M. Effects of C18 long chain fatty acids on glucose, butyrate and hydrogen degradation. **Water Research.** v. 36, n. 13, p. 3307-3313, Jul, 2002.

LEANDRO, T.; FRANÇA, L.; NOBRE, M.F.; SCHUMANN, P.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; COSTA, M.S. *Nevskia aquatilis* sp. nov. and *Nevskia persephonica* sp. nov., isolated from a mineral water aquifer and the emended description of the genus *Nevskia*. **Systematic and Applied Microbiology.** v. 35, n. 5, p. 297-301, 2012.

LECLERC, M.; DELGENES, J-P; GODON, J-J. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. **Environmental Microbiology.** v. 6, n. 8, p. 809-819, Aug, 2004.

LEE, L.S.; HAGWALL, M.; DELFINO, J.J.; RAO, P.S.C. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel fuel into water. **Environmental Science & Technology,** Easton, Pa, v. 26, n. 11, p. 2104-2109, Nov. 1992.

LEE, M.; ZINDER, S.H. Hydrogen Partial Pressures in a Thermophilic Acetate-Oxidizing Methanogenic Coculture. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 54, n. 6, p. 1457-1461, Jun, 1988.

LEHMAN, R.M.; COLWELL, F.S.; BALA, G.A. Attached and Unattached Microbial Communities in a Simulated Basalt Aquifer under Fracture- and Porous-Flow Conditions. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 67, n. 6, p. 2799-2809, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 2nd ed. New York: Worth Publishers, 1993. 1013 p.

LENGELER, J.W.; DREWS, G.; SCHLEGEL, H.G. **Biology of the prokaryotes**. Blackwell Science, Inc., Malden, 1999.

LEUNG, D.Y.C.; KOO, B.C.P.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 250-256, 2006.

LI, H.; PENG, J.; WEBER, K.A.; ZHU, Y. Phylogenetic diversity of Fe(III)-reducing microorganisms in rice paddy soil: enrichment cultures with different short-chain fatty acids as electron donors. **Journal of Soils and Sediments**. v. 11, n. 7, p. 1234-1242, 2011.

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

LIESACK, W.; BAK, F.; KREFT, J-U; STACKEBRANDT, E. *Holophaga foetida* gen. nov. sp. nov., a new homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds **Archives of Microbiology**. v. 162, n. 1-2, p. 85-90, 1994.

LIMA, G.; PARKER, B.; MEYER, J. Dechlorinating Microorganisms in a Sedimentary Rock Matrix Contaminated with a Mixture of VOCs. **Environmental Science and Technology**. v. 46, n. 11, p. 5756-5763, 2012.

LI-PING, H.; FAN, L.; PIN-JING, H.; LEI, L.; LI-MING, S. Predominant Contribution of Syntrophic Acetate Oxidation to Thermophilic Methane Formation at High Acetate Concentrations. **Environmental Science and Technology**. v. 45, n. 2, p. 508-513, 2011.

LIU, Y.; WHITMAN, W.B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of The New York Academy of Sciences**. v. 1125, p. 171-189, Mar, 2008.

LOVLEY, D.; LONERGAN, D. Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol and p-Cresol by the Dissimilatory Iron-Reducing Organism, GS-15. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, n. 6, p.1858-1864, Jun, 1990.

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

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

LOVLEY, D.R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 18, n. 2-3, p. 75-81, 1997.

LOVLEY, D.R. Anaerobic benzene oxidation. **Biodegradation**. v. 11, n. 2-3, p. 107-116, 2000.

LOVLEY, D.R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to biorremediation. **Nature Reviews**. Massachusetts, v. 1, p. 35-44, Oct. 2003.

LUEDERS, T.; POMMERENKE, B.; FRIEDRICH, M.W. Stable-Isotope Probing of Microorganisms Thriving at Thermodynamic Limits: Syntrophic Propionate Oxidation in Flooded Soil. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 10, p. 5778-5786, Oct, 2004.

MA, K.; LIU, X.; DONG, X. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, n. 1, p. 127-131, Jan, 2006.

MACKAY, D.M.; SHIU, W.Y. Aqueous Solubility of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. **Journal of Chemical and Engineering Data**. v. 22, n. 4, p. 399-402, Oct, 1977.

MACKAY, D. M.; DE SIEYES, N. R.; EINARSON, M. D.; FERIS, K. P.; PAPPAS, A. A.; WOOD, I. A.; JACOBSON, L.; JUSTICE, L. G.; NOSKE, M. N.; SCOW, K. M.; WILSON, J. T. Impact of ethanol on the natural attenuation of benzene, toluene, and o-xylene in a normally sulfate-reducing aquifer. **Environmental Science and Technology**. v. 40, n. 19, p. 6123–6130, 2006.

MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 18, n. 6, p. 417-428. 1999.

MARGESIN, R. e SCHINNER, F. Biodegradation and Bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56, n. 5-6, p. 650-663, 2001.

McCARTY, P.L. **Energetics and bacterial growth**. Presented at the 5th Rudolf Research Conference, Rutgers, the State University, New Brunswick, NJ. 1969.

McFARLAND, M.J. e SIMS, R.C. Thermodynamic Framework for Evaluating PAH Degradation in the Subsurface. **Ground Water**. v. 29, n. 6, p. 885-895, 1991.

McINERNEY, M.; STRUCHTEMEYER, C.G.; SIEBER, J.; MOUTTAKI, H.; STAMS, A.J.M.; SCHINK, B.; ROHLEN, L.; GUNSALUS, R.P. Physiology, Ecology, Phylogeny and Genomics of Microorganisms Capable of Syntrophic Metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1125, p. 58-72, Mar, 2008.

McINERNEY, M.; SIEBER, J.R.; GUNSALUS, R.P. Syntrophy in anaerobic global cycles. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, n. 6, p. 623-632, 2009.

McLEISH, K.; RYAN, M. C.; CHU, A. Integrated sampling and analytical approach for common groundwater dissolved gases. **Environmental Science and Technology**. v. 41, n. 24, p. 8388–8393, 2007.

MECKENSTOCK, R.U.; ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; RICHNOW, H.H.; SCHINK, B. Anaerobic Naphthalene Degradation by a Sulfate Reducing Enrichment Culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 7, p. 2743-2747, Jul, 2000.

MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 10, n. 3, p.248-268, Jun, 2006.

MELLO, J.A.; CARMICHAEL, C.A.; PEACOCK, E.E.; NELSON, R.K.; AREY, J.S.; REDDY, C.M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. **Marine Pollution Bulletin** London, v. 54, n. 7, p. 894-904, Jul. 2007.

METCALF & EDDY. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4.ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 1819 p.

MONOT, F.; MARTIN, J.R.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. **Applied and Environmental Technology**. v. 44, n. 6, p. 1318-1324, 1982.

MORLETT-CHÁVEZ, J.A.; ASCACIO-MARTÍNEZ, J.A.; RIVAS-ESTILLA, A.M.; VELÁZQUEZ-VADILLO, J.F.; HASKINS, W.E.; BARRERA-SALDAÑA, H.A.; ACUÑA-ASKAR, K. Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 64, n. 7, p. 581-587, Oct, 2010.

MURUGESAN, A.; UMARAMI, C.; SUBRAMANIAN, R.; NEDUNCHEZHIAN, N. Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 13, n. 3, p. 653-662, Apr, 2009.

MUYZER, G.; STAMS, A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**. v. 6, p. 441–454, Jun, 2008.

NAETHER, A.; FOESEL, B.U.; NAEGELE, V.; WÜST, P.K.; WEINERT, J.; BONKOWSKI, M.; ALT, F.; OELMANN, Y.; POLLE, A.; LOHAUS, G.; GOCKEL, S.; HEMP, A.; KALKO, E.K.V.; LINSSEN, K.E.; PFEIFFER, S.; RENNER, S.; SCHÖNING, I.; WEISSER, W.W.; WELLS, K.; FISCHER, M.; OVERMANN, J.; FRIEDRICH, M.W. Environmental Factors Affect Acidobacterial Communities below the Subgroup Level in Grassland and Forest Soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 20, p. 7398-7406, 2012.

NAIDU, R.; NANDY, S.; MEGHARAJ, M.; KUMAR, R.P.; CHADALAVADA, S.; CHEN, Z. BOWMAN, M. Monitored natural attenuation of a long-term petroleum hydrocarbon contaminated sites: a case study. **Biodegradation**. v. 23, n. 6, p. 881-895, Nov, 2012.

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

NATIONAL STANDARD FOR BIODIESEL. **Setting National Fuel Quality Standards**. Preparado por Environment Australia, Canberra, Mar, 2003, 119 p.

NAZINA, T.N.; TOUROVA, T.P.; POLTARAUS, A.B.; NOVIKOVA, E.V.; GRIGORYAN, A.A.; IVANOVA, A.E.; LYSENKO, A.M.; PETRUNYAKA, V.V.; OSIPOV, G.A.; BELYAEV, S.S.; IVANOV, M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzonensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, n. 2., p. 433-446, 2001.

NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Mechanisms for Accessing Insoluble Fe(III) Oxide during Dissimilatory Fe(III) Reduction by *Geothrix fermentans*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 5, p. 2294-2299, May, 2002.

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

NOSSA, C.W.; OBEDORF, W.E.; YANG, L.; AAS, J.A.; PASTER, B.J.; DESANTIS, T.Z.; BRODIE, E.L.; MALAMUD, D.; POLES, M.A.; PEI, Z. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 33, p. 4135-4144, 2010.

NUNES, C.C. **Dinâmica da variação dos receptores de elétrons e subprodutos metabólicos em águas subterrâneas impactadas por derramamento de gasolina com etanol**. 2006. 244p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Curso de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, J.C.S. **Contaminação de sedimentos argilosos por combustíveis automotivos**: problema de avaliação da permeabilidade. 2001. 102 f. Tese (Doutorado em Geologia) - Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

O’SULLIVAN, L.A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 8-11, 2005.

OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.K.; HEIPIEPER, H.J. Biodegradation of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 3, p.1497-1500, 2009.

PASQUALINO, J.C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 874-879, Oct. 2006.

PATUREAU, D.; GODON, J.J.; BOUCHEZ, T.; BERNET, N.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R. *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new Gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Biology**. v. 48, n. 3, p. 775-782, 1998.

PEREYRA, L.P.; HIIBEL, S.R.; RIQUELME, P.M.V.; REARDON, K.F.; PRUDEN, A. Detection and Quantification of Functional Genes of Cellulose- Degrading, Fermentative, and Sulfate-Reducing Bacteria and Methanogenic Archaea. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 7, p. 2192-2202, Apr, 2010.

PHILIPPE, G.; VEGA, D.; BASTIDE, J. Microbial hydrolysis of methyl aromatic esters by *Burkholderia cepacia* isolated from soil. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 37, n. 3, p. 251-258, Nov, 2001.

PILLONI, G.; VON NETZER, F.; ENGEL, M.; LUEDERS, T.; Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 1, p. 165 –175, Mar, 2011.

POWERS, S.E.; HUNT, C.S.; HEERMANN, S.E.; CORSEUIL, H.X.; RICE, D.; ALVAREZ, P.J.J. The Transport and Fate of Ethanol and BTEX in Groundwater Contaminated by Gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v. 31, n. 1, p. 79-123, 2001.

RAKOCZY, J.; SCHLEINITZ, K.M.; MÜLLER, N.; RICHNOW, H.H.; VOGT, C. Effects of hydrogen and acetate on benzene mineralisation under sulphate-reducing conditions. **Microbiology Ecology**. v. 77, n. 2, p. 238-247, Aug, 2011.

RAMOS, J.L.; DUQUE, E.; HUERTAS, M.J.; HAÏDOUR, A. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. **Journal of Bacteriology**. v. 177, n. 14, p. 3911-3916, Jul, 1995.

RAMOS, D.T.; DA SILVA, M.L.B.; CHIARANDA, H.S.; ALVAREZ, P.J.J.; CORSEUIL, H.X. Biostimulation of anaerobic BTEX biodegradation under fermentative methanogenic conditions at source-zone groundwater contaminated with a biodiesel blend (B20). **Biodegradation**. v. 24, n. 3, p. 333-341, Jun, 2013.

RAMSAY, J.A.; LI, H.; BROWN, R.S.; RAMSAY, B.A. Naphthalene and anthracene mineralization linked to oxygen, nitrate, Fe(III) and sulphate reduction in a mixed microbial population. **Biodegradation**. v. 14, n. 5, p. 321-329, 2003.

REEVE, J.N.; NÖLLING, J.; MORGAN, R.M.; SMITH, D.R. Methanogenesis: Genes, Genomes, and Who's on First? **Journal of Bacteriology**. v. 179, n. 19, p. 5975-5986, Oct, 1997.

REIMANN, C.; DUTTER, R.; GARRETT, R. and FILZMOSE, P. **Statistical Data Analysis Explained. Applied Environmental Statistics with R**. John Wiley & Sons, Inc. 362p., 2008.

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

REINHARD, M. HOPKINS, G.D.; STEINLE-DARLING, E.; LEBRON, C.A. In Situ Biotransformation of BTEX Compounds Under Methanogenic Conditions. **Ground Water Monitoring & Remediation**. v. 25, n. 4, p. 50-59, 2005.

REIS, S.C.M; LACHTER, E.R.; NASCIMENTO, R.S.V.; RODRIGUES JUNIOR, J.A.; REID, M.G. Transesterification of brazilian vegetable oils with methanol over ion-exchange resins. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 82, n. 9. p. 661-665, 2005.

REYES-JARAMILLO, Irma. **Fundamentos teórico-prácticos de temas selectos de la ciencia del suelo**. Parte I. Universidad Autónoma Metropolitana, México, DF, 1996. 276 p.

RISER-ROBERTS, E. **Bioremediation of petroleum contaminated sites**. Boca Ratón, FL: CRC Press, 1992. 496 p.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical & chemical processes**. Boca Ratón, FL: CRC Press, 1998. 542 p.

RITTMANN, B.E. e McCARTY, P.L. Stoichiometry and bacterial energetic. In *Environmental Biotechnology*. New York: McGraw-Hill, 2001. 126-161p.

RIVIÈRE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBACH, J.; LI, T.; CAMACHO, P.; SGHIR, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. **International Society for Microbial Ecology**. v. 3, n. 6, p. 700-714, Feb, 2009.

RODEN, E.E.; LOVLEY, D.R. Dissimilatory Fe (III) Reduction by the Marine Microorganisms *Desulforomonas acetoxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, n. 3, p. 734-742, Mar, 1993.

RÖLING, W.F.M.; MILNER, M.G.; JONES, D.M.; LEE, K.; DANIEL, F.; SWANNELL, R.J.P.; HEAD, I.M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 11, p. 5537-5548, Nov, 2002.

ROONEY-VARGA, J.N.; ANDERSON, R.T.; FRAGA, J.L.; RINGELBERG, D.; LOVLEY, D.R. Microbial Communities Associated with Anaerobic Benzene Degradation in a Petroleum-Contaminated Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 7, p. 3056-3063, 1999.

RÜEGG, I.; HAFNER, T.; BUCHELI- WITSCHER, M.; EGLI, T. Dynamics of Benzene and Toluene Degradation in *Pseudomonas putida* F1 in the Presence of the Alternative Substrate Succinate. **Engineering in Life Sciences**. v. 7, n. 4, p. 331-342, Jul, 2007.

RUIZ-AGUILAR, G.M.L.; O'REILLY, K.; ALVAREZ, P.J.J. A Comparison of Benzene and Toluene Plume Lengths for Sites Contaminated with Regular vs. Ethanol-Amended Gasoline. **Groundwater Monitoring & Remediation**. v. 23, n. 1, p. 48-53, Feb, 2003.

RUSSELL, E.W. **Soil Conditions and Plant Growth**, 10th Edition, Longman, 849 p., 1973.

SANFORD, R.A.; COLE, J.R.; TIEDJE, J.M. Characterization and Description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an Aryl-Halo-respiring Facultative Anaerobic Myxobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 2, p. 893-900, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec, 1977.

SAKAI, S.; IMACHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; TSENG, I-C.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. Cultivation of Methanogens under Low-Hydrogen Conditions by Using the Coculture Method. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 14, p. 4892-4896, Jul, 2009.

SBCS – CQFS. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Comissão Química de Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10ª ed. Porto Alegre, 400 p, 2004.

SCHERER, M.M.; RICHTER, S.; VALENTINE, R.L. e ALVAREZ, P.J.J. Chemistry and Microbiology of Permeable Reactive Barriers for In Situ Groundwater Clean up. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v. 30, n. 3, p. 363-411, 2000.

SCHINK, B. **Conservation of small amounts of energy in fermenting bacteria**, In: Biotechnology, Focus 2 (Finn, R.K. e Präve, P.), p. 63–89, Munich, Germany, 1990.

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

SCHINK, B.; STAMS, A.J.M. Syntrophism Among Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; SCHLEIFER, K.H. **The Prokaryotes**. Capítulo 1.11; 3ª ed.; v. 2, 2006, 1107 p.

SCHNOOR, J.L. **Environmental modeling: fate and transport of pollutants in water, air and soil**. New York: Wiley, 2nd ed. New York: Wiley, 1996. 682 p.

SCHOLTEN, J.C.; CULLEY, D.E.; BROCKMAN, F.J.; WU, G.; ZHANG, W. Evolution of the syntrophic interaction between *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Involvement of an ancient horizontal gene transfer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 352, n. 1, p. 48-54, Jan, 2007.

SCHREIBER, M.E.; BAHR, J.M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 55, p. 29-56, 2002.

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

SHELOBOLINA, E.S., O'NEILL, K.; FINNERAN, K.T.; HAYES, L.A.; LOVLEY, D.R. Potential for in situ bioremediation of a low-pH, high-nitrate uranium-contaminated groundwater. **Soil & Sediment Contamination**. v. 12, n.6, p. 865-884, 2003.

SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S.; KONG, S. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**. v. 16, n. 4, p. 319-327, 2005.

SIEBER, J.R.; McINERNEY, M.J.; GUNSALUS, R.P. Genomic Insights into Syntrophy: The Paradigm for Anaerobic Metabolic Cooperation. **Annual Review of Microbiology**. v. 66, 429-452, 2012.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. Acesso em Janeiro, 2012.

SMITH, K.S.; INGRAM-SMITH, C. *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? **Trends in Microbiology**. v. 15, n. 4, p.150-155, Apr, 2007.

SMITH, R.J.; JEFFRIES, T.C.; ROUDNEW, B.; FITCH, A.J.; SEYMOUR, J.R.; DELPIN, M.W.; NEWTON, K.; BROWN, M.H.; MITCHELL, J.G. Metagenomic Comparison of Microbial Communities Inhabiting Confined and Unconfined Aquifer Ecosystems. **Environmental Microbiology**. v. 14, n. 1, p. 240-253, Jan, 2012.

SNOEYENBOS-WEST, O.L.; NEVIN, K.P.; ANDERSON, R.T.; LOVLEY, D.R. Enrichment of *Geobacter* Species in Response to Stimulation of Fe(III) Reduction in Sandy Aquifer Sediments. **Microbial Ecology**. v. 39, n. 2, p. 153-167, Fev, 2000.

SOUSA, D.Z.M. **Ecology and Physiology of Anaerobic Microbial Communities that Degrade Long Chain Fatty Acids**. 2006, 233p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Portugal.

SOUSA, D.Z.M.; PEREIRA, A.M.; STAMS, A.J.M.; ALVES, M.M.; SMIDT, H. Microbial Communities Involved in Anaerobic Degradation of Unsaturated or Saturated Long-Chain Fatty Acids. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 4, p. 1054-1064, Feb, 2007.

SOUSA, D.Z.M.; ALVES, J.I.; ALVES, M.M.; SMIDT, H.; STAMS, A.J.M. Effect of sulfate on methanogenic communities that degrade unsaturated and saturated long chain fatty acids (LCFA). **Environmental Microbiology**. v. 11, n. 1, p. 68-80, 2009.

SPALDING, B. P.; WATSON, D. B. Measurement of dissolved H₂, O₂, and CO₂ in groundwater using passive samplers for gas chromatographic analyses. **Environmental Science and Technology**. v. 40, n. 24, p. 7861–7867, 2006.

SPALDING, B. P.; WATSON, D. B. Passive Sampling and Analyses of Common Dissolved Fixed Gases in Groundwater. **Environmental Science and Technology**. v. 42, n. 10, p. 3766–3772, 2008.

SPARKS, D.L. **Environmental Soil Chemistry**, 2nd Edition, Academic Press, London, 352 p., 2003.

SPRINGAEL, D. e TOP, E.M. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 53-58, 2004.

STAMS, A.J.M.; DE BOK, F.A.M.; PLUGGE, C.M.; EEKERT, M.H.A.V.; DOLFING, J.; SCHRAA, G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. **Environmental Microbiology**. v. 8, n. 3., p. 371-382, Mar, 2006.

STAMS, A.J.M.; PLUGGE, C.M. **The Microbiology of Methanogenesis In: Methane and Climate Change**, p. 14-26, 2010..

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1998. 1325 p.

STULTS, J.R.; SNOEYENBOS-WEST, O.; METHE,B.; LOVLEY, D.R.; CHANDLER, D.P. Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2781-2789, Jun. 2001.

SUN, W.; CUPPLES, A.M. Diversity of Five Anaerobic Toluene-Degrading Microbial Communities Investigated Using Stable Isotope Probing. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 4, p. 972-980, Dec, 2011.

SUN, W.; SUN, X.; CUPPLES, A.M. Anaerobic Methyl tert-Butyl Ether-Degrading Microorganisms Identified in Wastewater Treatment Plant Samples by Stable Isotope Probing. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 8, p. 2973-2980, Apr, 2012.

TAYLOR, L.T.; JONES, D.M. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, n. 5, p.1131-1136, Aug. 2001.

TGSC – The Good Scent Company. Disponível em: <http://www.thegoodscentcompany.com/search2.html>Acesso em Janeiro, 2012.

THAUER, R.K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. Energy Conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. **Bacteriology Reviews**. v. 41, n. 1, p. 100-180, Mar, 1977.

THAUER, R.K.; MÖLLER-ZINKHAN, D.; SPORMANN, A.M. Biochemistry of Acetate Catabolism in Anaerobic Chemotrophic Bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**. v. 43, p. 43-67, 1989.

TOXNET – Toxicology Data Network. **Hazardous Substances Data Bank (HSDB)**. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>. Acesso em Janeiro, 2012.

TREUDE, N.; ROSENCRANTZ, D.; LIESACK, W.; SCHNELL, S. Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of Myxococcales. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 44, n. 2, p. 261-269, May, 2003.

TSAI, J.-C.; KUMAR, M.; LIN, J.-G. Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. **Journal of Hazardous Materials**. v. 164, n. 2-3, p. 847-588, Sep, 2009.

ULRICH, A.C.; EDWARDS, E.A. Physiological and molecular characterization of anaerobic benzene-degrading mixed cultures. **Environmental Microbiology**. v. 5, n. 2, p. 92-102, 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Carcinogenic effects of benzene: an update**, vol 63. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, p 30495, 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - UFMT. Núcleo de Pesquisa em Agricultura de Precisão. Determinar a macro e a microporosidade do solo. Disponível em: <http://solos.ufmt.br/docs/solos1/macro.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2010.

VILLEMUR, R.; LANTHIER, M.; BEAUDET, R.; LÉPINE, F. The *Desulfitobacterium* genus. **Microbiology Reviews**. v. 30, n. 5, p. 706-733, Sep, 2006.

VROBLESKY, D. A.; CHAPELLE, F. H.; BRADLEY, P. M. A simple pore water hydrogen diffusion syringe sampler. **Ground Water**, v. 45, n. 6, p. 798–802, Dec, 2007.

WAGNER, I.D.; WIEGEL, J. Diversity of Thermophilic Anaerobes. **Annals of The New York Academy of Sciences**. v. 1125, n. 1, p. 1-43, Mar, 2008.

WALKER, C.B.; HE, Z.; YANG, Z.K.; RINGBAUER, J.A.; HE, Q.; ZHOU, J.; VOORDOUW, G.; WALL, J.D.; ARKIN, A.P.; HAZEN, T.C.; STOLYAR, S.; STAHL, D.A. The Electron Transfer System of Syntrophically Grown *Desulfobivrio vulgaris*. **Journal of Bacteriology**. v. 191, n. 18, p. 5793-5801, Sep, 2009.

WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.X.; COUTINHO, P.M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D.H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R. D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T.S.; BRINKAC, L.M.; BRUCE, D. CREASY, T.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.M.; DeBOY, R.T.; DETTER, J.C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C.S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S.P.; MADUPU, R.; NELSON, K.E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M.J.; SELENGUT, J.D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L.S.; WATKINS, K.L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three Genomes from the Phylum *Acidobacteria* Provide Insight into Lifestyles of These Microorganisms in Soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 237-241, 2001.

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

WIEDEMEIER, T.H., WILSON, J.T., KAMPBELL D.H., MILLER, R.N., HANSEN, J.E. Approximation of biodegradation rate constants for monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in ground water. **Groundwater Monitoring and Remediation**. v. 16, n. 3, p. 186-194. 1996.

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

WIEDEMEIER, T.H.; WILSON, J.T.; KAMPBELL, D.H.; MILLER, R.N.; HANSEN, J.E. **Technical protocol for implementing intrinsic remediation with long-term monitoring for natural attenuation of fuel contamination dissolved in groundwater**. San Antonio, Texas: Air Force Center for Environmental Excellence, Brooks AFB, 1999b. v. 1.

WINDERL, C.; PENNING, H.; VON NETZER, F.; MECKENSTOCK, R.U.; LUEDERS, T. DNA-SIP identifies sulfate-reducing Clostridia as important toluene degraders in tar-oil-contaminated aquifer sediment. **International Society for Microbial Ecology**. v. 4, n. 10, p. 1314-1325, Apr, 2010.

WOLIN, M.J.; MILLER, T.L. Interspecies hydrogen transfer: 15 years later. **ASM News**. v. 48, p. 561-565, 1982.

WORLDWATCH INSTITUTE. **Biofuels for Transport – Global Potential and Implications for Sustainable Energy and Agriculture**. Earthscan, USA, Mar, 2007. 452p.

WORM, P.; MÜLLER, N.; PLUGGE, C.M.; STAMS, A.J.M.; SCHINK, B. Syntrophy in Methanogenic Degradation. **Microbiology Monographs**. v. 19, p. 143-173, 2011.

YU, D. C.; BARKER, J. F.; LAI, G. A Strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: a microcosm study. **Journal of Contaminant Hydrology**, Amsterdam, v. 96, n. 1-4, p. 17-31, Feb., 2008.

ZACHARA, J.M.; KUKKADAPU, R.K.; GASSMAN, P.L.; DOHNALKOVA, A.; FEDRICKSON, J.K.; ANDERSON, T. Biogeochemical transformation of the Fe minerals in a petroleum-contaminated aquifer. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 68, n. 8, p. 1791-1805, 2004.

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

ZHANG, X.; PETERSON, C.; REECE, D.; MOLLER, G.; HAWS, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the ASABE**, St. Joseph, Mi, v. 41, n. 5, p. 1423-1430, 1998.

ZHANG, X.; SULLIVAN, E.R.; YOUNG, L.Y. Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulfate reducing consortium. **Biodegradation**. v. 11, n. 2-3, p. 117-124, 2000.

ZHANG, S.Y.; WANG, Q.F.; XIE, S.G.; Molecular characterization of phenanthrene-degrading methanogenic communities in leachate-contaminated aquifer sediment. **International Journal of Environmental Science and Technology**. v. 9, n. 4, p. 705-712, 2012.

ZHUANG, K.; MA, E.; LOVLEY, D.R.; MAHADEVAN, R. The design of long-term effective uranium bioremediation strategy using a community metabolic model. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 109, n. 10, p. 2475-2483, Oct, 2012.

ZUCCHI, M.; ANGIOLINI, L.; BORIN, S.; BRUSETTI, L.; DIETRICH, N.; GIGLIOTTI, C. ; BARBIERI, P.; SORLINI, C. e DAFFONCHIO, D. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, n. 2, p. 248-257, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Cálculos Elaborados para Determinação do Consumo de Acetato Via Diferentes Processos Redox	207
APÊNDICE B – Cálculos Elaborados para Determinação do Consumo de Oxigênio e Produção de Nitrato Via Oxidação Completa do Íon Amônio (NH_4^+)	211
APÊNDICE C – Cálculos Termodinâmicos Elaborados para as Diferentes Reações de Degradação nas Condições Padrão	212
APÊNDICE D – Cálculos Elaborados nas Condições Ambiente para Verificação da Viabilidade Termodinâmica das Reações de Degradação do Benzeno e Naftaleno	214
APÊNDICE E – Cálculos Elaborados para Quantificação de Micro-Organismos na Curva de Calibração e nas Amostras de Água Subterrânea	216

APÊNDICE A – Cálculos Elaborados para Determinação do Consumo de Acetato Via Diferentes Processos Redox

Primeiramente, as concentrações medidas dos receptores de elétrons (O_2 e NO_3^-) e das espécies reduzidas (Fe^{2+} , S^{2-} e CH_4) nos diferentes períodos amostrais foram transformadas de $mg.L^{-1}$ para $mol.L^{-1}$ utilizando a equação abaixo:

$$Molaridade = \frac{m}{PM \times V} \quad \text{em que,}$$

$m =$ massa do composto (g)

$PM =$ peso molecular do composto ($g.mol^{-1}$)

$V =$ volume (L)

TABELA A.1. Relações Molares para o Consumo de Acetato via Diferentes Processos Redox.

Processos redox	Relação molar
Respiração aeróbia	1:1,22 ($O_2 : CH_3COO^-$)
Nitrato-redução	1:1,47 ($NO_3^- : CH_3COO^-$)
Ferro-redução	1:0,3 ($Fe^{2+} : CH_3COO^-$)
Sulfato-redução	1: 1,09 ($S^{2-} : CH_3COO^-$)
Metanogênese	1:1,05 ($CH_4 : CH_3COO^-$)

Considerando as relações molares contidas na tabela abaixo, observa-se que para o consumo de 1 mol dos receptores oxigênio e nitrato, são utilizados 1,22 e 1,47 moles de acetato, respectivamente. Ao mesmo tempo, para a produção de 1 mol das espécies reduzidas ferro ferroso, sulfeto e metano, 0,3; 1,09 e 1,05 moles de acetato são consumidos, respectivamente. Assim, as concentrações molares dos receptores de elétrons e das espécies reduzidas foram multiplicadas por sua relação molar correspondente para determinar os moles de acetato consumidos em cada processo redox, nos diferentes períodos avaliados. O total de acetato consumido (M) é calculado pela soma do consumo via respiração aeróbia, nitrato-redução, ferro-redução, sulfato-redução e metanogênese.

TABELA A.2. Consumo de Acetato (M) em Diferentes Períodos na Fonte de Contaminação, PM9 e PM15.

Poço	Tempo (anos)	Consumo de acetato (mol.L ⁻¹) em diferentes processos redox					
		O ₂	NO ₃ ⁻	Fe ²⁺	S ²⁻	CH ₄	Total
FONTE	0,3	0,000013	0,000001	0,000936	0,000001	0,000100	0,001052
	0,7	0,000029	0,000001	0,000075	0,000000	0,001146	0,001251
	1,0	0,000015	0,000001	0,000022	0,000001	0,000557	0,000596
	1,4	0,000010	0,000001	0,000024	0,000000	0,000103	0,000139
	2,0	0,000003	0,000001	0,000035	0,000001	0,000016	0,000055
PM9	0,3	0,000008	0,000001	0,000024	0,000000	0,000010	0,000044
	0,7	0,000013	0,000020	0,000041	0,000001	0,000249	0,000325
	1,0	0,000021	0,000017	0,000049	0,000012	0,000398	0,000496
	1,4	0,000019	0,000001	0,000033	0,000005	0,000512	0,000571
	2,0	0,000008	0,000006	0,000193	0,000005	0,000226	0,000439
PM15	1,0	0,000011	0,000161	0,000000	0,000000	0,000033	0,000205
	1,4	0,000011	0,000299	0,000000	0,000000	0,000033	0,000343
	2,0	0,000008	0,000232	0,000000	0,000000	0,000033	0,000273

Com os resultados do acetato total consumido nos diferentes períodos amostrais, foi determinada a contribuição de cada processo redox pela determinação da concentração (mg.L^{-1}) de acetato consumido. A conversão foi realizada utilizando a relação abaixo:

- Tomando como exemplo o poço: Fonte; tempo = 0,3 ano:

Acetato total consumido: $0,0010522 \text{ mol.L}^{-1}$

Acetato consumido na respiração aeróbia: $0,000013 \text{ mol.L}^{-1}$

1 mol de acetato = 59,0440 g (peso molecular)

Acetato total consumido = $62,13 \text{ mg.L}^{-1}$

Acetato consumido na respiração aeróbia = $0,79 \text{ mg.L}^{-1}$

TABELA A.3. Consumo de Acetato (mg.L^{-1}) em Diferentes Períodos na Fonte de Contaminação, PM9 e PM15.

Poço	Tempo (anos)	Consumo de acetato (mg.L^{-1}) em diferentes processos redox					
		O ₂	NO ₃ ⁻	Fe ²⁺	S ²⁻	CH ₄	Total
FONTE	0,3	0,7879	0,0700	55,2847	0,0883	5,8980	62,13
	0,7	1,7334	0,0700	4,4088	0,0120	67,6517	73,88
	1,0	0,9005	0,0700	1,3036	0,0321	32,8723	35,18
	1,4	0,5853	0,0700	1,4273	0,0000	6,0901	8,17
	2,0	0,1801	0,0350	2,0680	0,0562	0,9225	3,26
PM9	0,3	0,4953	0,0672	1,4463	0,0050	0,5665	2,58
	0,7	0,7879	1,2080	2,4296	0,0622	14,7265	19,21
	1,0	1,2381	0,9955	2,8673	0,6864	23,4835	29,27
	1,4	1,1256	0,0700	1,9570	0,2850	30,2591	33,70
	2,0	0,4953	0,3831	11,4185	0,2689	13,3356	25,90
PM15	1,0	0,6753	9,5187	0,0025	0,0020	1,9323	12,13
	1,4	0,6753	17,6375	0,0025	0,0040	1,9323	20,25
	2,0	0,4502	13,7181	0,0025	0,0050	1,9323	16,11

APÊNDICE B – Cálculos Elaborados para Determinação do Consumo de Oxigênio e Produção de Nitrato Via Oxidação Completa do Íon Amônio (NH_4^+) no PM15.

TABELA B1. Concentrações (mg.L^{-1} e mol.L^{-1}) de nitrato e oxigênio detectadas no PM15 nível 2m, ao longo do tempo.

Tempo (anos)	NO_3^- (mg.L^{-1})	NO_3^- (mol.L^{-1})	O_2 (mg.L^{-1})	O_2 (mol.L^{-1})
0,3	28,1	$4,5 \times 10^{-4}$	0,6	$1,9 \times 10^{-5}$
0,7	39,3	$6,3 \times 10^{-4}$	0,2	$6,2 \times 10^{-6}$
1,0	32,5	$5,2 \times 10^{-4}$	0,3	$9,4 \times 10^{-6}$
1,4	19,9	$3,2 \times 10^{-4}$	0,3	$9,4 \times 10^{-6}$
2,0	10,1	$1,6 \times 10^{-4}$	0,2	$6,2 \times 10^{-6}$

$$\text{Molaridade} = \frac{m}{PM \times V}$$

Peso molecular do $\text{NO}_3^- = 62 \text{ g.mol}^{-1}$

Peso molecular do $\text{O}_2 = 32 \text{ g.mol}^{-1}$

- Tempo = 0,3 ano:

Considerando a reação de oxidação completa do íon amônio (nitrificação), 2 moles de oxigênio seriam necessários para produção de 1 mol de nitrato:



Assim, para produção de $4,5 \times 10^{-4}$ moles de nitrato (ou $28,1 \text{ mg.L}^{-1}$), seriam necessários 9×10^{-4} moles de oxigênio ou $28,9 \text{ mg.L}^{-1}$. Porém, a concentração de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ foi detectada, sendo esta muito inferior à concentração necessária calculada de acordo com as relações estequiométricas, não havendo possibilidade de nitrificação com esta disponibilidade de oxigênio. A mesma conclusão foi observada para os outros períodos considerados.

APÊNDICE C – Cálculos Termodinâmicos Elaborados para as Diferentes Reações de Degradação nas Condições Padrão

Os cálculos termodinâmicos elaborados para as reações nas condições padrão (ΔG°) foram conduzidos por meio da seguinte equação:

$$\Delta G^\circ = \sum(\Delta G_f \text{ Produtos} \times a) - \sum(\Delta G_f \text{ Reagentes} \times b)$$

em que:

ΔG° = variação da energia livre de *Gibbs* nas condições padrão (concentração de 1M do soluto, temperatura de 25°C e pressão de 1 atm)

$\sum[\Delta G_f \text{ Produtos}]$ = soma do $\Delta G_{\text{formação a } 25^\circ\text{C}}$ dos produtos ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

$\sum[\Delta G_f \text{ Reagentes}]$ = soma do $\Delta G_{\text{formação a } 25^\circ\text{C}}$ dos reagentes ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

a e b = coeficientes estequiométricos das reações analisadas

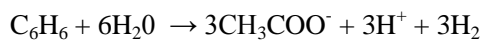
Os valores de $\Delta G_{\text{formação}}$ dos compostos avaliados nas reações obtidos em Thauer et al. (1977), Lalman et al. (2000) e Dolfing et al. (2009) foram disponibilizados na tabela abaixo.

TABELA C.1. Valores de $\Delta G_{\text{formação}}$ dos compostos avaliados nas reações de degradação.

Composto	$\Delta G_{\text{formação a } 25^\circ\text{C}}$
⁽¹⁾ C ₆ H ₆	124,8
⁽¹⁾ H ₂ O	-237,178
⁽¹⁾ CH ₃ COO ⁻	-369,41
^{(1)*} H ⁺	-39,87
^{(1)**} H ₂	0
⁽¹⁾ CO ₂	-394,359
⁽¹⁾ CH ₄	-50,75
⁽²⁾ C ₁₈ H ₃₃ O ₂	-239,6
⁽¹⁾ C ₇ H ₈	114,22
⁽¹⁾ HCO ₃ ⁻	-586,85
⁽³⁾ C ₁₀ H ₈	307,24

Nota: *Valor de ΔG_f para pH = 7. **Valor de ΔG_f considerando H₂ na fase gasosa (atm). ⁽¹⁾ Thauer et al. (1977); ⁽²⁾ Lalman et al. (2000); ⁽³⁾ Dolfing et al. (2009).

- Tomando como exemplo a reação de fermentação do benzeno descrita abaixo, o seguinte cálculo foi realizado para determinação do ΔG° :



$$\Delta G^\circ = ((-369,41 \times 3) + (-39,87 \times 3) + (0 \times 3)) \\ - ((124,5 \times 1) + (-237,18 \times 6))$$

$$\Delta G^\circ = ((-1108,23) + (-119,61) + (0)) - ((124,5) + (-1423,07))$$

$$\Delta G^\circ = +70,728 \text{ kj. mol}^{-1}$$

APÊNDICE D – Cálculos Elaborados nas Condições Ambiente para Verificação da Viabilidade Termodinâmica das Reações de Degradação do Benzeno e Naftaleno

Os cálculos termodinâmicos nas condições ambiente (ΔG) foram previamente descritos no item 7.4. Assim, neste apêndice serão detalhados os valores considerados nos cálculos.

TABELA D.1. Valores de $\Delta G_{\text{formação}}$ dos compostos avaliados nas reações de degradação do benzeno e naftaleno.

Composto	$\Delta G_{\text{formação}}$ a 25°C
⁽¹⁾ C ₆ H ₆	124,8
⁽¹⁾ H ₂ O	-237,178
⁽¹⁾ CH ₃ COO ⁻	-369,41
^{(1)*} H ⁺	0
^{(2)**} H ₂	+17,72
⁽³⁾ C ₁₀ H ₈	307,24

Nota: *Valor de ΔG_f para pH \neq 7. **Valor de ΔG_f considerando H₂ dissolvido na fase aquosa (M). ⁽¹⁾ Thauer et al. (1977); ⁽²⁾ Amend e Shock (2001)⁷; ⁽³⁾ Dolfing et al. (2009).

- Tomando como exemplo a mesma reação de fermentação do benzeno descrita anteriormente neste apêndice e, as condições do experimento aos 0,4 ano após a liberação, na fonte de contaminação, nível = 2m; para uma concentração de H₂ dissolvido = 10⁻⁷M.

$$\Delta G^\circ = ((-369,41 \times 3) + (0 \times 3) + (+17,72 \times 3)) - ((124,5 \times 1) + (-237,18 \times 6))$$

$$\Delta G^\circ = +243,498 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

⁷ AMEND, J.P.; SHOCK, E.L. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 25, n. 2, p. 175-243, Apr, 2001.

Dados do sistema:

$$\Delta G^\circ = +243,498 \text{ kJ. mol}^{-1}$$

$$R = 0,008314$$

$$T = 298,15 \text{ (25}^\circ\text{C)}$$

$$[\text{C}_6\text{H}_6] = 1,1075 \times 10^{-6} \text{ M (0,9 mg.L}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 2,2 \times 10^{-3} \text{ M (131 mg.L}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{H}^+] = 3,2 \times 10^{-5} \text{ (10}^{-4,5} \text{ ou pH} = 4,5\text{)}$$

$$[\text{H}_2] = 10^{-7} \text{ M}$$

Considerando a equação 7.4:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{Produtos}]^a}{[\text{Reagentes}]^b}$$

$$\Delta G$$

$$= +243,498$$

$$+ (0,008314 \times 298,15) \times \ln \frac{[(2,2 \times 10^{-3})^3 \times (3,2 \times 10^{-5})^3 \times (10^{-7})^3]}{[(1,1075 \times 10^{-6})^1]}$$

$$\Delta G = + 29,36 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

APÊNDICE E – Cálculos Elaborados para Quantificação de Micro-Organismos na Curva de Calibração e nas Amostras de Água Subterrânea.

A equação proposta por Beller et al. (2002), readequada por Da Silva e Alvarez (2004), foi utilizada no presente trabalho. Esta equação é baseada nas seguintes considerações; i) o conjunto de iniciadores e sondas é compatível com a sequência de genes alvo existente em qualquer micro-organismo que contenha esta informação genética (não somente nas cepas padrão utilizadas); ii) o tamanho aproximado do genoma, em milhões de pares de base (Mpb), da cepa padrão utilizada deve ser consultado; iii) em virtude da diversidade genética microbiana encontrada em amostras ambientais, foi necessário padronizar que $9,1257 \times 10^{14}$ pares de bases (pb) estão presentes em cada μg de DNA (conforme observado no genoma de *Escherichia coli*); iv) e que há um determinado número de cópias de gene por genoma de cada cepa padrão. Assim, a seguinte equação foi utilizada:

$$\frac{\text{Cópia de gene}}{\mu\text{L}} = \left(\frac{[\text{DNA padrão}] (\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}})}{\text{Tamanho da cepa} (\frac{\text{Mpb}}{\text{Genoma}})} \right) \times \left(\frac{9,1257 \times 10^{14} \text{pb}}{\mu\text{g de DNA}} \right) \times \left(\frac{\text{Cópia de gene}}{\text{Genoma}} \right)$$

Para dar seguimento aos cálculos, algumas informações com relação à característica genômica dos micro-organismos utilizados para construir a curva de calibração são necessárias. Tais informações estão disponibilizadas na tabela abaixo.

TABELA E.1. Características Genômicas dos Micro-organismos Utilizados para Construção da Curva de Calibração.

Micro-organismo	[DNA padrão] ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	(*)Tamanho da cepa (Mpb)	(**)Cópias de gene.genoma ⁻¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1095	6,6	4
<i>Geobacter metallireducens</i>	0,1095	4,01	2
<i>Methanococcus maripaludis</i>	0,1095	1,8	3

Nota: *NCBI⁸. **Michigan State University – Microbiology and Molecular Genetics⁹.

Para construir a curva de calibração, alíquotas de DNA microbiano padrão foram diluídas em série (de 10^{-1} até 10^{-5}) e, foram plotados em um gráfico a concentração (cópias de gene. μL^{-1}) e os valores de CT (*cycle threshold*) correspondentes até a obtenção da equação da reta, a qual foi posteriormente utilizada para quantificação dos micro-organismos presentes nas amostras de água subterrânea. Para quantificar os micro-organismos na água subterrânea e expressar o resultado em cópias de gene por sólidos suspensos totais, a equação abaixo foi utilizada, considerando a massa de sólidos suspensos retida nos filtros:

$$\frac{\text{Cópias de gene}}{g \text{ de SS}} = \left(\frac{\text{Cópias de gene}}{\text{Reação}} \right) \times \left(\frac{\text{Reação}}{2\mu\text{L de DNA}} \right) \times \left(\frac{100\mu\text{L de DNA}}{g \text{ DNA}} \right)$$

O número de cópias de gene é obtido por meio da equação da reta, da curva de calibração correspondente. O termo “reação” se refere ao volume de DNA utilizado na reação em cadeia da polimerase (2 μL). Em seguida, multiplica-se pelo volume de DNA obtido em cada amostra (100 μL). Por fim, para possibilitar a expressão dos resultados em cópias de gene.g⁻¹, divide-se pelo valor da massa seca (sólidos suspensos totais, em grama) retida nos filtros.

⁸ NCBI - National Center for Biotechnology Information. US National Library of Medicine. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>.

⁹ Michigan State University – Microbiology and Molecular Genetics. Disponível em: <http://rrndb.mmg.msu.edu/search.php>.

ANEXOS

ANEXO A – LAUDO ANALÍTICO DO BIODIESEL DE SOJA.....	219
ANEXO B – FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO (FISPQ) - DIESEL.....	220

Produto: Biodiesel (rota metilica)	Data de carregamento:	Placa do caminhão:
Data de Validade do Laudo Analítico: 01.04.2010	Laudo Emitido em: 01.03.2010	Volume total do lote: 2.475.400 litros
Data de Fabricação: 17.02.2010 a 23.02.2010	Número do Lote: 008/2010	Número Laudo Analítico: 008/2010

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação (1)	Métodos
Aspecto a 20°C	-	Límpido e isento de impurezas	Límpido e isento de impurezas	Visual
Massa Específica a 20°C	kg/m3	881,48	850 - 900	ASTM D 4052
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm2/s	4,567	3,0 - 6,0	ASTM D 445
Teor de água	mg/kg	232	máximo 500	ASTM D 6304
Contaminação Total	mg/kg	11,47	máximo 24	EN 12662
Ponto de Fulgor	°C	122	mínimo 100,0	ASTM D 93
Teor de Éster (2)	% massa	97,0	mínimo 96,5	EN 14103
Resíduo de Carbono (100% da amostra)	% massa	0,0165	máximo 0,050	ASTM D 4530
Cinzas Sulfatadas	% massa	0,0039	máximo 0,020	ASTM D 874
Enxofre Total (3)	mg/kg	0,5	máximo 50	ASTM D 5453
Sódio + Potássio	mg/Kg	1,11	máximo 5	EN 14538
Cálcio + Magnésio	mg/kg	1,092	máximo 5	EN 14538
Fósforo	mg/kg	< 0,0129	máximo 10	ASTM D 4951
Corrosividade ao Cobre	-	1b	máximo 1	ASTM D 130
Ponto de Entupimento de Filtro a Frio	°C	-4	máximo 19	ASTM D 6371
Índice de Acidez	mg KOH/g	0,406	máximo 0,50	ASTM D 664
Glicerina Livre	% massa	0,004	máximo 0,02	ASTM D 6584
Glicerina Total	% massa	0,245	máximo 0,25	ASTM D 6584
Monoglicerídeos	% massa	0,757	Anotar	ASTM D 6584
Diglicerídeos	% massa	0,205	Anotar	ASTM D 6584
Triglicerídeos	% massa	0,139	Anotar	ASTM D 6584
Metanol (4)	% massa	< 0,05	máximo 0,20	EN 14110
Índice de Iodo	g/100g	123,21	Anotar	EN 14111
Estabilidade à Oxidação a 110°C	horas	11,54	mínimo 6	EN 14112

(1) Conforme Resolução ANP Nº 7, de 19.03.2008 - DOU 20.03.2008.

(2) Análise realizada no Laboratório - Bioagri Piracicaba/SP.

(3) Análise realizada no Laboratório de Combustíveis da UFRGS - Porto Alegre/RS.

(4) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol. Analisado no Laboratório Bioagri - Piracicaba/SP.

Matérias-primas: Metanol + Óleo Degomado de Soja (100%)

Aditivo: Antioxidante

VERIFICADO
Controle de Qualidade
BSBIOS

Larisse Garibotti
Eng. Larisse Garibotti

CRQ 05302605 - 5ª Região / CREA 10.471D

Controle de Qualidade - BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A

BR 285, km 174, s/nº - Distrito Industrial - Passo Fundo - Rio Grande do Sul - (0xx54)2103-7100 - www.bsbios.com



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: ÓLEO DIESEL

Página 1 de 6

Data: 18/02/2009

Nº FISPQ: Pb0091_P

Versão: 0.4P

Anula e substitui versão: todas anteriores

1 - IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

Nome do produto: ÓLEO DIESEL INTERIOR.
 Código interno de identificação: Pb0091.
 Nome da empresa: Petróleo Brasileiro S. A.
 Endereço: Avenida Chile, 65.
 20035-900 Rio de Janeiro (RJ) Brasil
 Telefone: 0800-78-9001

2 - COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÃO SOBRE OS INGREDIENTES

>>>PREPARADO

Natureza química: Hidrocarbonetos.
 Sinônimos: Óleo diesel tipo B.
 Registro CAS: Óleo diesel (CAS 68476-30-2).
 Ingredientes ou impurezas que contribuem para o perigo: Hidrocarbonetos parafínicos;
 Hidrocarbonetos naftênicos;
 Hidrocarbonetos aromáticos: 10 - 40 % (v/v);
 Enxofre (CAS 7704-34-9, orgânico): máx. 0,35 % (p/p);
 Compostos nitrogenados: impureza;
 Compostos oxigenados: impureza;
 Aditivos.

3 - IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

PERIGOS MAIS IMPORTANTES

- Perigos físicos e químicos: Líquido inflamável.
 - Perigos específicos: Produto inflamável.

EFEITOS DO PRODUTO

- Principais sintomas: Por inalação pode causar irritação das vias aéreas superiores, dor de cabeça, náuseas e tonteiras.

4 - MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

Inalação: Remover a vítima para local arejado. Se a vítima não estiver respirando, aplicar respiração artificial. Se a vítima estiver respirando, mas com dificuldade, administrar oxigênio a uma vazão de 10 a 15 litros / minuto. Procurar assistência médica imediatamente, levando o rótulo do produto, sempre que possível.

Contato com a pele: Retirar imediatamente roupas e sapatos contaminados. Lavar a pele com água em abundância, por pelo menos 20 minutos, preferencialmente sob chuveiro de emergência. Procurar assistência médica imediatamente, levando o rótulo do produto, sempre que possível.

Contato com os olhos: Lavar os olhos com água em abundância, por pelo menos 20 minutos, mantendo as pálpebras separadas. Usar de preferência um lavador de olhos. Procurar assistência médica imediatamente, levando o rótulo do produto, sempre que possível.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: ÓLEO DIESEL

Página 2 de 6

Data: 18/02/2009

Nº FISPQ: Pb0091_P

Versão: 0.4P

Anula e substitui versão: todas anteriores

Ingestão: Não provocar vômito. Se a vítima estiver consciente, lavar a sua boca com água limpa em abundância e fazê-la ingerir água. Procurar assistência médica imediatamente, levando o rótulo do produto, sempre que possível.

Notas para o médico: Em caso de contato com a pele e/ou com os olhos não fricção as partes atingidas.

5 - MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO

Meios de extinção apropriados: Espuma para hidrocarbonetos, pó químico e dióxido de carbono (CO₂).

Métodos especiais: Resfriar tanques e containers expostos ao fogo com água, assegurando que a água não espalhe o diesel para áreas maiores. Remover os recipientes da área de fogo, se isto puder ser feito sem risco. Assegurar que há sempre um caminho para escape do fogo.

Proteção dos bombeiros: Em ambientes fechados, usar equipamento de resgate com suprimento de ar.

6 - MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO

Precauções pessoais

- Remoção de fontes de ignição: Eliminar todas as fontes de ignição, impedir centelhas, fagulhas, chamas e não fumar na área de risco. Isolar o vazamento de todas as fontes de ignição.

- Controle de poeira: Não se aplica (produto líquido).

Precauções ao meio ambiente: Estancar o vazamento se isso puder ser feito sem risco. Não direcionar o material espalhado para quaisquer sistemas de drenagem pública. Evitar a possibilidade de contaminação de águas superficiais ou mananciais. Restringir o vazamento à menor área possível. O arraste com água deve levar em conta o tratamento posterior da água contaminada. Evitar fazer esse arraste.

Métodos para limpeza

- Recuperação: Recolher o produto em recipiente de emergência, devidamente etiquetado e bem fechado. Conservar o produto recuperado para posterior eliminação.

- Neutralização: Absorver com terra ou outro material absorvente.

- Disposição: Não dispor em lixo comum. Não descartar no sistema de esgoto ou em cursos d'água. Confinar, se possível, para posterior recuperação ou descarte. A disposição final desse material deverá ser acompanhada por especialista e de acordo com a legislação ambiental vigente.

Nota: Contactar o órgão ambiental local, no caso de vazamento ou contaminação de águas superficiais, mananciais ou solos.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

222

PRODUTO: ÓLEO DIESEL

Página 3 de 6

Data: 18/02/2009

Nº FISPQ: Pb0091_P

Versão: 0.4P

Anula e substitui versão: todas anteriores

7 - MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

MANUSEIO

Medidas técnicas:

Providenciar ventilação local exaustora onde os processos assim o exigirem. Todos os elementos condutores do sistema em contato com o produto devem ser aterrados eletricamente. Usar ferramentas anti-faíscantes.

- Prevenção da exposição do trabalhador: Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) para evitar o contato direto com o produto.

Orientações para manuseio seguro: Manipular respeitando as regras gerais de segurança e higiene industrial.

ARMAZENAMENTO

Medidas técnicas:

O local de armazenamento deve ter o piso impermeável, isento de materiais combustíveis e com dique de contenção para reter o produto em caso de vazamento.

Condições de armazenamento

- Adequadas: Estocar em local adequado com bacia de contenção para reter o produto, em caso de vazamento, com permeabilidade permitida pela norma ABNT-NBR-7505-1.

Produtos e materiais incompatíveis:

Oxidantes.

8 - CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Medidas de controle de engenharia:

Manipular o produto em local com boa ventilação natural ou mecânica, de forma a manter a concentração de vapores inferior ao Limite de Tolerância.

Parâmetros de controle

- Limites de exposição ocupacional

- Valor limite (EUA, ACGIH):

Névoa de óleo: TLV/TWA: 5 mg/m³.

Equipamento de Proteção Individual

- Proteção respiratória:

Em baixas concentrações, usar respirador com filtro químico para vapores orgânicos. Em altas concentrações, usar equipamento de respiração autônomo ou conjunto de ar mandado.

- Proteção das mãos:

Luvas de PVC em atividades de contato direto com o produto.

- Proteção dos olhos:

Nas operações onde possam ocorrer projeções ou respingos, recomenda-se o uso de óculos de segurança ou protetor facial.

Precauções especiais:

Manter chuveiros de emergência e lavador de olhos disponíveis nos locais onde haja manipulação do produto. Evitar inalação de névoas, fumos, vapores e produtos de combustão. Evitar contato do produto com os olhos e a pele.

Medidas de higiene:

Higienizar roupas e sapatos após o uso. Métodos gerais de controle utilizados em Higiene Industrial devem minimizar a exposição ao produto. Não comer, beber ou fumar ao manusear produtos químicos. Separar as roupas de trabalho das roupas comuns.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: ÓLEO DIESEL

Página 4 de 6

Data: 18/02/2009

Nº FISPQ: Pb0091_P

Versão: 0.4P

Anula e substitui versão: todas anteriores

9 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Aspecto

- Estado físico: Líquido límpido (isento de material em suspensão).
- Cor: Vermelho intenso (adição de corante conforme legislação).
- Odor: Característico.
- Faixa de destilação: 100 a 400 °C @ 101,325 kPa (760 mmHg); Método: NBR-9619.

Temperatura de decomposição: 400 °C.

Ponto de fulgor: 38,0 °C Min; Método NBR-7974.

Densidade: 0,82 - 0,88 @ 20 °C; Método NBR-7148.

Solubilidade

- Na água: Desprezível.
 - Em solventes orgânicos: Solúvel.
- Viscosidade: 2,5 – 5,5 Cst @ 40 °C; Método: D445/NBR-10441.

10 - ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Condições específicas

Instabilidade: Estável sob condições normais de uso.

Materiais / substâncias incompatíveis: Oxidantes.

Produtos perigosos de decomposição: Hidrocarbonetos de menor e maior peso molecular e coque.

11 - INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Toxicidade aguda

- Contato com a pele: Névoa de óleo: DL50 (coelho) > 5 g/kg.
 - Ingestão: Névoa de óleo: DL50 (rato) > 5 g/kg.
- Sintomas: Por inalação pode causar irritação das vias aéreas superiores, dor de cabeça, náuseas e tonteadas.

Efeitos locais

- Inalação: Irritação das vias aéreas superiores. Podem ocorrer dor de cabeça, náuseas e tonteadas.
- Contato com a pele: Contatos ocasionais podem causar lesões irritantes.
- Contato com os olhos: Irritação com vermelhidão das conjuntivas.
- Ingestão: Pode causar pneumonia química por aspiração durante o vômito.

Toxicidade crônica

- Contato com a pele: Contatos repetidos e prolongados podem causar dermatite.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: ÓLEO DIESEL

Página 5 de 6

Data: 18/02/2009

Nº FISPQ: Pb0091_P

Versão: 0.4P

Anula e substitui versão: todas anteriores

12 - INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Mobilidade: Moderadamente volátil.

Ecotoxicidade

- Efeitos sobre organismos aquáticos: Pode formar películas superficiais sobre a água. É moderadamente tóxico à vida aquática. Derramamentos podem causar mortalidade dos organismos aquáticos, prejudicar a vida selvagem, particularmente as aves. Pode transmitir qualidades indesejáveis à água, afetando o seu uso.
- Efeitos sobre organismos do solo: Pode afetar o solo e, por percolação, degradar a qualidade das águas do lençol freático.

13 - CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

Métodos de tratamento e disposição

- Produto: O tratamento e a disposição do produto devem ser avaliados tecnicamente, caso a caso.
- Resíduos: Descartar em instalação autorizada.
- Embalagens usadas: Descartar em instalação autorizada.

14 - INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE

Regulamentações nacionais

Vias terrestres (MT, Resolução 420/2004):

Número ONU: 1202
Nome apropriado para embarque: ÓLEO DIESEL.
Classe de risco: 3
Risco subsidiário: -
Número de risco: 30
Grupo de embalagem: III
Provisões especiais: -
Quantidade isenta: 333 kg.

15 - REGULAMENTAÇÕES

Etiquetagem

Classificação conforme NFPA:

Incêndio: 2
Saúde: 1
Reatividade: 0
Outros: Nada consta.

Regulamentação conforme CEE:

Rotulagem obrigatória (auto classificação) para substâncias perigosas: aplicável.

Classificações / símbolos:

NOCIVO (Xn).



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

225

PRODUTO: ÓLEO DIESEL

Página 6 de 6

Data: 18/02/2009

Nº FISPQ: Pb0091_P

Versão: 0.4P

Anula e substitui versão: todas anteriores

Frasas de risco:	R11	Substância inflamável.
	R40	Pode causar danos irreversíveis à saúde.
	R65	Nocivo. Pode causar danos nos pulmões.
Frasas de segurança:	S02	Manter longe do alcance de crianças.
	S24	Evitar contato com a pele.
	S36/37	Usar roupas protetoras e luvas adequadas ao tipo de atividade.
	S61	Evitar liberação para o meio ambiente - consultar informações específicas antes de manusear.
	S62	Não provocar vômito após ingestão e consultar assistência médica imediatamente.

16 - OUTRAS INFORMAÇÕES

Referências bibliográficas:

Seção 14: Regulamento do Transporte Terrestre de Produtos Perigosos do Ministério de Transporte (Resolução 420 de 12 de fevereiro de 2004).

Nota:

As informações e recomendações constantes desta publicação foram pesquisadas e compiladas de fontes idôneas e capacitadas para emití-las, sendo os limites de sua aplicação os mesmos das respectivas fontes. Os dados dessa ficha de informações referem-se a um produto específico e podem não ser válidos onde este produto estiver sendo usado em combinação com outros. A Petrobras esclarece que os dados por ela coletados são transferidos sem alterar seu conteúdo ou significado.