

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Cássio Moraes Schambeck

**CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DE MÚLTIPLOS
SUBSTRATOS EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS IMPACTADAS
POR DERRAMAMENTOS DE MISTURAS DE GASOLINA COM
ETANOL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S299c Schambeck, Cássio Moraes

Cinética de biodegradação de múltiplos substratos em águas subterrâneas impactadas por derramamentos de misturas de gasolina com etanol [dissertação] / Cássio Moraes Schambeck ; orientador, Henry Xavier Corseuil. - Florianópolis, SC, 2012. 112 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Engenharia ambiental. 2. Álcool. 3. Biodegradação - Taxas. I. Corseuil, Henry Xavier. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. III. Título.

CDU 628.4

“Ó Mestre, fazei que eu procure mais consolar
que ser consolado; compreender que ser
compreendido; amar que ser amado.”

(Trecho da Oração de São Francisco)

RESUMO

A contaminação de ambientes naturais por um único composto ao invés de misturas é exceção em áreas impactadas. Diante deste cenário, uma estratégia desenvolvida pelos micro-organismos para crescer com sucesso na natureza é o crescimento com uso de múltiplos substratos. Um exemplo desta interação no meio ambiente é a presença dos hidrocarbonetos monoaromáticos do grupo BTEX e do etanol em águas subterrâneas impactadas por gasolina comercial. Estudos realizados em escala laboratorial têm apontado que a biodegradação de um composto como constituinte de uma mistura depende da sua proporção, contudo, estas teorias não foram testadas em ambientes naturais. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar *in situ* a interação de múltiplos substratos com foco na sua proporção em águas subterrâneas impactadas por derramamentos da mistura de gasolina com etanol em dois experimentos de biorremediação: um sob atenuação natural monitorada e outro sob bioestimulação com injeção de nitrato. Como resultado, observou-se que a taxa de biodegradação do etanol e dos BTEX dissolvidos em água subterrânea depende da fração de cada substrato. O substrato com maior proporção é biodegradado em uma taxa mais elevada que os demais. Isso explica a biodegradação preferencial do etanol, já que ele está presente em uma fração muito maior que a dos BTEX na água subterrânea contaminada. As constantes de atenuação dos BTEX e do etanol, quando associadas ao modelo de decaimento de primeira ordem, levaram a inferir que a taxa de biodegradação de um substrato em um ambiente sob as mesmas condições depende somente da sua concentração. Assim, substratos com maiores concentrações são mais rapidamente biodegradados. Além disso, os maiores valores das constantes de atenuação dos BTEX na área sob bioestimulação com injeção de nitrato, quando comparada à área sob atenuação natural monitorada, mostraram que as reações de oxi-redução que predominam na biodegradação de compostos orgânicos determinam o quão rápido uma mistura vai degradar, no entanto, a relação de proporcionalidade prevalece. Deste modo, o foco de ações de remediação de locais contaminados por misturas de etanol e gasolina deve ser o estímulo da biodegradação do álcool para assim aumentar a fração e a taxa de biodegradação dos demais compostos mais tóxicos (como os BTEX).

Palavras-chaves: Múltiplos substratos, etanol, BTEX, taxa de biodegradação, proporção.

ABSTRACT

Contamination of natural environments by single compounds instead of mixtures is an exception. In this scenario, a strategy developed by microorganisms to grow successfully in nature is the growth with use of multiple substrates. An example of this interaction in the environment is the presence of monoaromatic hydrocarbons of BTEX group and ethanol in groundwater impacted by commercial gasoline. Studies in laboratory scale have shown that biodegradation of a compound as a constituent of a mixture depends on its proportion, however, this results has not been tested in natural environments. This study aimed to evaluate in situ the interaction of multiple substrates focusing on their proportion in groundwater impacted by spills of gasohol in two bioremediation experiments: one under monitored natural attenuation, and another one under nitrate biostimulation. It was observed that the rate of biodegradation of ethanol (and its by-products) and BTEX dissolved in groundwater depends on the fraction of each substrate. The substrate with the highest proportion is biodegraded at a higher rate than the others. This explains the preferential biodegradation of ethanol since it is present in a much higher fraction than that of BTEX in groundwater contaminated. The attenuation constant of BTEX and ethanol in association with the model of first-order decays led to infer that the rate of biodegradation of a substrate in an environment under the same conditions depends on its concentration. Therefore, substrates with higher concentrations are faster biodegraded. Moreover, the highest values of the attenuation constants of BTEX in the area under nitrate biostimulation than at the area under monitored natural attenuation showed that the oxidation-reduction reactions that dominate the biodegradation of organic compounds determine how fast a mixture will degrade, however, the relationship of proportionality is maintained. Thus, the focus of cleanup action at contaminated sites by gasohol should be the stimulation of biodegradation of ethanol in order to increase the fraction and the rate of biodegradation of other more toxic compounds (like BTEX).

Key-words: Multiple substrates, BTEX, ethanol, biodegradation rate, proportion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Reação que exemplifica o modo de inibição competitiva. E é a enzima, S é o substrato, E-S é o complexo enzima-substrato, I é o inibidor e P é o produto final..... 42
- Figura 2.2 - Reação que exemplifica o modo de inibição não competitiva. E é a enzima, S é o substrato, E-S é o complexo enzima-substrato, I é o inibidor, E-I-S é o complexo enzima-inibidor-substrato e P é o produto final..... 43
- Figura 2.3 - Reação que exemplifica o modo de inibição incompetitiva. E é a enzima, S é o substrato, E-S é o complexo enzima-substrato, I é o inibidor, E-I-S é o complexo enzima-inibidor-substrato e P é o produto final..... 43
- Figura 3.1 – Exemplo de uma área experimental (A) e ampliação de um poço de monitoramento cujas mangueiras identificadas com cores diferenciam cada nível de amostragem (B)..... 54
- Figura 3.2 – Representação em planta da área experimental da atenuação natural monitorada com seus poços de monitoramento, fonte de contaminação e direção preferencial do fluxo da água subterrânea. 55
- Figura 3.3 - Representação em planta da área experimental da bioestimulação com injeção de nitrato com seus poços de monitoramento, injeção, fonte de contaminação e a direção preferencial do fluxo da água subterrânea..... 58
- Figura 4.1 – Concentração de etanol, acetato e BTEX ao longo do tempo nos poços de monitoramento 4 nas áreas experimentais sob atenuação natural monitorada (ANM) a 2,0 metros de profundidade e sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN) a 2,3 metros de profundidade. Destaque para as diferentes escalas do etanol e acetato nos primeiros gráficos. Nos últimos gráficos as concentrações de etanol e acetato foram somadas a fim de compará-las com as dos BTEX..... 65
- Figura 4.2 – Fração dos substratos etanol + acetato (●) e BTEX (○) em relação à mistura dos três (todos como carbono orgânico total (COT)) ao longo do tempo nos poços de monitoramento 4 nas áreas experimentais

sob atenuação natural monitorada (ANM) a 2,0 metros de profundidade e sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN) a 2,3 metros de profundidade. A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX..... 67

Figura 4.3 - Variação temporal de oxigênio dissolvido no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX..... 77

Figura 4.4 - Variação temporal de nitrato no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX. 78

Figura 4.5 - Variação temporal de ferro ferroso no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX..... 78

Figura 4.6 - Variação temporal de sulfato no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX. 79

Figura 4.7- Variação temporal de metano no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX. 79

Figura 4.8 - Variação temporal do potencial de oxi-redução (POR) no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação

com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX. 80

Figura 4.9 - Modelo conceitual para biodegradação da mistura de etanol e BTEX em derramamentos subsuperficiais de gasolina comercial..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos BTEX e do etanol.....	30
Tabela 3.1 - Distribuição das coletas de monitoramento da água subterrânea na área experimental sob atenuação natural monitorada....	55
Tabela 3.2 – Caracterização da água subterrânea antes da contaminação na área experimental sob atenuação natural monitorada.....	56
Tabela 3.3 - Distribuição das coletas de monitoramento de água subterrânea na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato.....	59
Tabela 3.4 – Caracterização da água subterrânea antes da contaminação na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato.....	59
Tabela 4.1 – Constantes de atenuação de primeira ordem (k) dos BTEX individuais para os poços de monitoramento 4 na profundidade 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANM	Atenuação Natural Monitorada
BTEX	grupo de hidrocarbonetos formado pelo benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno
BIN	Bioestimulação com Injeção de Nitrato
COT	Carbono orgânico total
LNAPL	abreviatura do inglês para <i>light nonaqueous phase liquids</i> (líquido de fase não aquosa menos denso que a água)
MTBE	abreviatura do inglês para <i>methyl tert-butyl ether</i>
N.D	não detectado
N.A.	não analisado
OD	oxigênio dissolvido
PEBD	polietileno de baixa densidade
PM	poço de monitoramento
POR	potencial de oxi-redução
Redox	oxi-redução
REMAS	Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas
SCBR[®]	Solução Corretiva Baseada no Risco
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
v/v	relação volume/volume

GLOSSÁRIO

Advecção – Movimento unidirecional que não muda as características do contaminante. A advecção simplesmente move a matéria de um local para outro no espaço.

Aquífero – Estrato ou formação geológica que permite a circulação da água através dos seus poros ou fraturas.

Biorremediação – tecnologia de remediação de áreas impactadas que faz uso de processos biológicos para degradação de substâncias nocivas, transformando-as em compostos menos tóxicos ou inócuos.

BTEX – abreviação usada para o grupo de hidrocarbonetos monoaromáticos composto pelo benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno, comumente encontrados em produtos de petróleo.

Crescimento diáuxico – comportamento apresentado por micro-organismos na presença de uma mistura de dois substratos. Há uma fase *lag* inicial, seguida pelo consumo do alimento mais facilmente assimilável. Em seguida, ocorre uma segunda fase *lag* de adaptação ao segundo substrato acompanhada pelo consumo do mesmo.

Degradação abiótica – mecanismos de transformação de um composto por vias não biológicas, como fotólise e/ou hidrólise. No meio subterrâneo, compostos halogenados estão mais sujeitos a este mecanismo.

Difusão – transporte de um contaminante devido ao movimento aleatório do meio líquido. Este processo faz com que o contaminante se espalhe ao longo do tempo com um movimento desprezível do seu centro de massa.

Estado estacionário – ou também conhecido como equilíbrio dinâmico, representa a situação de um sistema na qual um parâmetro não varia com o tempo.

Fase lag – também conhecida como fase de adaptação ou latência. É o período em que o micro-organismo se adapta ao ambiente em que está com a produção de metabólitos essenciais para o seu desenvolvimento,

como enzimas, por exemplo. Neste período não há multiplicação dos indivíduos.

Fase livre – sinônimo para NAPL.

Fase não dissolvida – sinônimo para NAPL.

Fonte – local onde ocorreu o derramamento. Fornece a contribuição de contaminação ao aquífero.

Heterotróficos – qualidade de seres que utilizam compostos orgânicos para obtenção de energia e síntese celular.

LNAPL – abreviatura do inglês para *light nonaqueous phase liquids* (líquido de fase não aquosa menos denso que a água). Uma vez em contato com a zona saturada, este tipo de NAPL tende a permanecer na superfície do aquífero como uma fase flutuante imiscível à água.

NAPL – abreviatura do inglês para *nonaqueous phase liquids* (líquido de fase não aquosa). É um termo rotineiramente utilizado para fase de hidrocarbonetos que não se dissolvem na água subterrânea.

Pluma – fase dissolvida de hidrocarbonetos.

Porosidade – umas das propriedades físicas de um aquífero que é definida pela relação entre o volume de vazios e o volume total.

Reação de oxidação-redução – reação em que elétrons são transferidos de uma molécula doadora para outra receptora. Também chamada de reação redox.

Receptor de elétrons – são compostos que recebem os elétrons provenientes do substrato doador de elétrons.

Relação sintrófica – relação entre micro-organismos na qual um depende do outro para o seu crescimento.

Sorção – relação entre a matriz do aquífero e o soluto onde compostos orgânicos relativamente mais hidrofóbicos se sorvem ao carbono orgânico ou a minerais de argila.

Taxa de biodegradação – variação da concentração de um composto ao longo do tempo devidos aos processos biológicos de degradação.

Volatilização – transferência de contaminantes dissolvidos da fase aquosa para fase de vapor.

Xenobiótico – substância química que é estranha a um micro-organismo ou a um sistema biológico.

Zona saturada – também conhecida como zona de saturação, corresponde à região do aquífero onde todos os vazios estão totalmente preenchidos por água.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	25
1.2	HIPÓTESE.....	27
1.3	OBJETIVOS.....	28
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BTEX E DO ETANOL.....	29
2.2	ACETATO.....	32
2.3	ASPECTOS BIOLÓGICOS DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	33
2.3.1	<i>Vias de biodegradação</i>	33
2.3.2	<i>Expressão enzimática</i>	35
2.3.3	<i>Biodisponibilidade</i>	36
2.4	BIODEGRADAÇÃO DE MÚLTIPLOS SUBSTRATOS ORGÂNICOS.....	36
2.4.1	<i>Influência da proporção</i>	39
2.5	MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE SUBSTRATOS.....	40
2.5.1	<i>Assimilação</i>	40
2.5.2	<i>Cometabolismo</i>	41
2.5.3	<i>Inibição enzimática</i>	41
2.6	MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	43
2.6.1	<i>Modelo cinético de Monod</i>	44
2.6.2	<i>Modelo de decaimento de ordem zero</i>	44
2.6.3	<i>Modelo de decaimento de primeira ordem</i>	45
2.6.4	<i>Modelo cinético para múltiplos substratos de Lendenmann et al. (1996)</i>	45
2.6.5	<i>Modelo cinético para múltiplos substratos de Lendenmann & Egli (1998)</i>	46
2.6.6	<i>Modelo para inibição competitiva de múltiplos substratos de Bielefeldt & Stensel (1999)</i>	46
2.7	FATORES INTERVENIENTES NA TAXA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	47
2.7.1	<i>Biodegradação dos BTEX e do etanol</i>	49
2.8	TÉCNICAS DE BIORREMEDIÇÃO.....	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	DESCRIÇÃO DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS.....	53
3.1.1	<i>Atenuação natural monitorada</i>	54
3.1.2	<i>Bioestimulação com injeção de nitrato</i>	57
3.2	TRATAMENTO DOS DADOS.....	59

3.2.1	<i>Determinação da constante de atenuação e tempo de meia-vida</i>	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
4.1	INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO NA BIODEGRADAÇÃO DO ETANOL, ACETATO E BTEX	63
4.2	ANÁLISE DE RESULTADOS DA LITERATURA ONDE NÃO SE USOU O FATOR PROPORCIONALIDADE NA EXPLICAÇÃO DAS DIFERENTES TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO DE MÚLTIPLOS SUBSTRATOS.....	69
4.3	CONSTANTES DE ATENUAÇÃO E TEMPOS DE MEIA-VIDA	71
4.4	RELAÇÃO ENTRE PROPORCIONALIDADE E BIODEGRADAÇÃO DOS BTEX.....	75
4.5	MODELO CONCEITUAL DE BIODEGRADAÇÃO DE MÚLTIPLOS SUBSTRATOS.....	82
5	CONCLUSÕES	85
	RECOMENDAÇÕES	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXO A - Valores das concentrações dos BTEX, etanol e acetato em cada área experimental.....	107
	ANEXO B - Valores das concentrações de oxigênio dissolvido, nitrato, ferro ferroso, sulfato, metano e potencial de oxi-redução em cada área experimental	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

A contaminação de águas subterrâneas por compostos isolados ao invés de misturas é exceção em locais impactados, logo, este fato pede maior entendimento da biodegradação de combinações de substratos. Muitas evidências estão disponíveis e sugerem que, em ambientes com baixa concentração de substratos, a estratégia básica para um uso eficiente dos nutrientes, sobrevivência e desenvolvimento de micro-organismos heterotróficos é o crescimento com o uso de múltiplos substratos (EGLI, 2010; IHSEN & EGLI, 2005; LENDEMANN & EGLI, 1998; LENDEMANN et al., 1996). Alguns estudos demonstraram que a máxima taxa de crescimento de micro-organismos ocorre em culturas expostas a misturas de substratos quando comparada a cenários de fontes de carbono isoladas (BUCHELI-WITSCHEL et al., 2009; LENDEMANN et al., 1996). Contudo, também existe a possibilidade de que a degradação de um composto possa ser mais rápida quando ele estiver disponível sozinho do que quando for um componente de uma mistura (PLAZA et al., 2007; BIELEFELDT & STENSEL, 1999). Conforme o exposto, uma generalização do uso de vários substratos é algo que deve ser evitado ou realizado com cautela, já que, conforme as condições do meio, pode haver diferentes padrões de biodegradação, e isto é um fator que estimula maiores estudos a fim de melhor detalhamento do tema.

Um exemplo desta interação de múltiplos substratos é o caso da contaminação de águas subterrâneas por combustíveis. Devido a vazamentos de tanques subterrâneos de armazenamentos de combustíveis, oleodutos, derramamentos acidentais e à disposição imprópria, os compostos orgânicos derivados do petróleo têm se tornado contaminantes subterrâneos que ameaçam fontes de água potável (HOLLIGER et al., 1997). Em locais onde estes produtos foram lançados e contribuem para a contaminação da água subterrânea, muitos hidrocarbonetos se particionam para água, contudo, os monoaromáticos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, e os isômeros *para*, *meta* e *orto*-xilenos) são o foco das ações de limpeza devido a preocupações regulatórias e de risco. A atenção especial dada a este grupo de contaminantes é devido a sua relativa alta solubilidade em água e elevada toxicidade (BEDIENT et al., 1999). Com isto, os hidrocarbonetos podem migrar do solo para a água subterrânea e

alcançar locais de abastecimento de água mesmo longe de sua origem de contaminação.

Além dos hidrocarbonetos presentes naturalmente em combustíveis fósseis, o etanol pode ser utilizado como aditivo oxigenado acrescentado à gasolina a fim de melhorar o desempenho do combustível (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). Desde julho de 2007, a gasolina comercial brasileira deve apresentar obrigatoriamente vinte e cinco por cento de álcool etílico anidro (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007), contudo, em termos práticos, a porcentagem varia de 20 a 25 conforme a disponibilidade do etanol no mercado nacional. Esta mistura de etanol com os compostos monoaromáticos do grupo BTEX cria uma nova relação que deve ser levada em conta em estudos de análise de riscos ambientais, já que o etanol pode alterar as taxas de biodegradação dos BTEX, tanto aumentando a degradação devido ao estímulo da biomassa, quanto diminuindo pelo fato da exaustão dos receptores de elétrons disponíveis (SCHAEFER et al., 2010a; DA SILVA et al., 2005). Com a biodegradação dos BTEX e principalmente do etanol, o subproduto metabólico acetato pode ser formado (CHEN et al., 2008; COSTA, 2008; DA SILVA & ALVAREZ., 2004; FERNANDES, 2002), que também atua como um substrato e interfere na biodegradação dos compostos monoaromáticos (CHEN et al., 2008). Logo, compreender e quantificar a atenuação dos contaminantes BTEX e etanol como constituintes de uma mistura de substratos, levando em conta a presença do subproduto metabólico acetato, é válida para uma melhor descrição de processos de remediação que ocorrem no ambiente subsuperficial.

Enquanto a cinética de utilização de um ou dois substratos é bem conhecida, pouco se sabe sobre como as taxas de biodegradação dependem da concentração de vários substratos disponíveis simultaneamente para a biomassa local, sobretudo com relação à proporção dos substratos. Princípios e conceitos sobre este assunto podem ser desenvolvidos mais facilmente em condições laboratoriais, todavia eles devem ser testados e confirmados nos complexos ambientes naturais que compõem um cenário real onde os micro-organismos são expostos a elevadas quantidades de contaminantes, como no caso de derramamentos subsuperficiais de derivados de petróleo.

Assim, este trabalho se propõe a avaliar *in situ*, sob a óptica da interação de múltiplos substratos, como se dá o comportamento da biodegradação do etanol e dos hidrocarbonetos monoaromáticos do grupo BTEX dissolvidos em água subterrânea devido ao derramamento controlado de gasolina com etanol em dois experimentos: um sob

atenuação natural e outro sob condições de bioestimulação com injeção de nitrato. A variação da concentração do subproduto orgânico e substrato acetato também é considerada na avaliação da biodegradação. O estudo é baseado em duas das áreas experimentais estudadas pelo Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas (REMAS) localizadas na Fazenda Experimental da Ressacada, no sul da cidade de Florianópolis - Santa Catarina. Os dados utilizados para este trabalho foram obtidos previamente por Costa (2008), Nunes (2006), Fernandes (2002) e pela continuidade do monitoramento feita pela equipe do laboratório REMAS, configurando uma continuação na linha de pesquisa do grupo científico que pretende entender melhor as tecnologias de remediação com base nos processos de biodegradação.

A compreensão da influência de um contaminante sobre os demais presentes na biodegradação de uma mistura de compostos em condições de campo é necessária para detalhar de modo mais verossímil os resultados da aplicação de tecnologias de biorremediação e os conceitos de utilização de múltiplos substratos muitas vezes generalizados. Assim, os resultados advindos deste trabalho podem fornecer informações úteis para o detalhamento de tecnologias de descontaminação de áreas impactadas via biodegradação, como longevidade e influência mútua dos poluentes.

1.2 HIPÓTESE

Estudos realizados em escala laboratorial apontam que a degradação de um composto como constituinte de uma mistura depende da sua proporção. Um estudo laboratorial realizado por Lendenmann et al. (1996) em um reator contínuo com uma mistura de açúcares mostrou que a concentração em estado estacionário de um açúcar efluente ao reator foi proporcional a concentração afluyente, ou seja, foi verificada uma relação entre a taxa de biodegradação e a proporção de cada componente na mistura. Resultado semelhante foi obtido por Bielefeldt & Stensel (1999) com uso de culturas mistas bacterianas expostas aos BTEX sozinhos e misturados em reator de batelada. Este padrão de biodegradação foi posteriormente estudado mais profundamente com a mistura de etanol e tolueno, e concluiu-se que maiores frações de um substrato na mistura levaram a maiores taxas de biodegradação do mesmo (LOVANH et al., 2002; LOVANH & ALVAREZ, 2004).

Estes resultados obtidos servem como hipóteses para este trabalho, já que é esperado encontrar o mesmo padrão para a biodegradação dos BTEX e do etanol *in situ* no meio aquático

subsuperficial, ou seja, a taxa de biodegradação depende da proporção destes substratos. No caso de um derramamento subterrâneo de gasolina comercial, o etanol, que possui uma fração na água subterrânea muito superior daquela dos BTEX, teria uma taxa de biodegradação superior a dos hidrocarbonetos.

1.3 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar a cinética de biodegradação de múltiplos substratos em águas subterrâneas impactadas por derramamentos da mistura de gasolina com etanol.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar como a proporção dos substratos influencia nas suas taxas de biodegradação;
- Avaliar a relação entre proporcionalidade e biodegradação em processos de biorremediação sob atenuação natural monitorada e bioestimulação com injeção de nitrato;
- Desenvolver um modelo conceitual da interação de múltiplos substratos em águas subterrâneas impactadas por derramamentos da mistura de gasolina com etanol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BTEX E DO ETANOL

BTEX é uma abreviação utilizada para o grupo de hidrocarbonetos monoaromáticos formados pelo benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros *para*, *meta* e *orto*-xilenos, os quais são compostos apolares e voláteis que possuem sua estrutura baseada no anel benzênico (C_6H_6) (BEDIENT et al., 1999). A fração solúvel da gasolina comum na água do mar é composta predominantemente por hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX, compreendendo de 94 a 97% do total de compostos dissolvidos (SAEED et al., 1999). No caso de sistemas aquáticos subterrâneos, a tendência deste valor é ser ainda maior devido ao fenômeno de aumento da solubilidade de compostos apolares com o decréscimo da concentração de sais inorgânicos dissolvidos (SCHWARZENBACH et al., 2003). Consequentemente, estes compostos são os contaminantes mais comuns de serem encontrados dissolvidos no caso de contaminação de água subterrânea por combustíveis fósseis. A Tabela 2.1 expõe algumas características químicas dos hidrocarbonetos do grupo BTEX.

O etanol é um biocombustível produzido a partir de açúcares ou amidos de vegetais (tais como cana-de-açúcar, beterraba, milho e trigo) que é utilizado como aditivo oxigenado acrescentado à gasolina a fim de melhorar o seu desempenho (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). No Brasil, a Portaria Federal nº143 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007) fixou em vinte e cinco por cento o percentual obrigatório de adição de álcool etílico anidro combustível à gasolina comercial desde julho de 2007. Contudo, conforme a disponibilidade de etanol no mercado, sua adição varia de 20 a 25%. Uma importante característica do etanol que deve ser levada em consideração em análises de riscos ambientais em cenários de derramamentos de gasolina comercial, é o fato de ele aumentar a já relativa alta solubilidade dos hidrocarbonetos BTEX na água subterrânea através do efeito da cossolvência (CORSEUIL & FERNANDES, 1999; CORSEUIL et al., 2004). Algumas características físico-químicas relevantes do etanol estão expostas a seguir (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos BTEX e do etanol.

Composto	Formula Estrutural	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	Solubilidade (mg.L ⁻¹)	Gravidade Específica	Pressão de vapor (atm)	Constante de Henry (atm.m ³ .mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Log K _{oc}
Benzeno	C ₆ H ₆	78,112	1780	0,8765	1,25x10 ⁻¹	2,25x10 ⁻¹	2,13	1,91
Tolueno	C ₇ H ₈	92,139	515	0,8669	3,75x10 ⁻²	2,74x10 ⁻¹	2,69	2,37
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	106,165	152	0,8670	1,25x10 ⁻²	3,58x10 ⁻¹	3,13	2,73
<i>m</i> -xileno	C ₈ H ₁₀	106,165	160	0,8842	1,09x10 ⁻²	2,95x10 ⁻¹	3,20	2,79
<i>p</i> -xileno	C ₈ H ₁₀	106,165	215	0,8611	1,15x10 ⁻²	2,33x10 ⁻¹	3,18	2,77
<i>o</i> -xileno	C ₈ H ₁₀	106,165	220	0,8802	1,15x10 ⁻²	2,28x10 ⁻¹	3,15	2,75
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,068	miscível	0,7893	7,80x10 ⁻²	5,00x10 ⁻⁶	-0,31	0,09

Fonte: Mackay et al. (2006a).

Notas: Valores determinados à 25°C.

A solubilidade, pressão de vapor, constante de Henry, K_{ow} e K_{oc} dos BTEX são valores médios de experimentos realizados sob configurações e condições diversas.

Uma vez liberados no ambiente subsuperficial, os contaminantes podem se volatilizar, dissolver, adsorver em partículas do solo (sorção), degradar biologicamente ou permanecer como fase pura LNAPL¹ (este último somente para os BTEX por serem menos densos que a água e poucos solúveis) (SCHNOOR, 1996). A volatilização ocorre quando os produtos químicos evaporam, permitindo-lhes mover-se do líquido para o ar, e é descrita numericamente pela pressão de vapor, que diz respeito a pressão exercida pelas moléculas de um composto em equilíbrio com sua fase líquida. Já quando há a dissolução, há a formação das chamadas plumas de contaminação que permitem a migração dos contaminantes na zona saturada do aquífero. Esta propriedade é exacerbada pelo efeito da cossolvência. Dos monoaromáticos, o benzeno possui a maior solubilidade, ou seja, a maior concentração do soluto dissolvido quando em equilíbrio com uma solução aquosa, enquanto que o etanol é totalmente solúvel. A Constante de Henry, que indica como se dá o particionamento de um composto entre as fases líquida e gasosa, é um indicativo do potencial de volatilização e solubilidade de compostos, já que apresentará valores maiores para compostos voláteis e pouco solúveis, como os BTEX. Em solos com alto teor de carbono orgânico, os poluentes podem ficar adsorvidos nas partículas e apresentar um retardo na sua migração devido ao movimento mais lento que o da água subterrânea. Este comportamento é influenciado pelos coeficientes de partição carbono orgânico/água K_{oc} , que expressa a relação da concentração de um composto adsorvido na matéria orgânica pela sua concentração dissolvida na água, e de partição octanol/água K_{ow} , que expressa a afinidade de um composto por materiais orgânicos (SCHWARZENBACH et al., 2003). Nota-se com a observação da Tabela 2.1 que os BTEX possuem uma grande tendência de ficarem retidos no solo enquanto que para o etanol é esperado o oposto. Finalmente, se o oxigênio ou outros receptores de elétrons estiverem presentes em quantidades suficientes, os contaminantes podem se degradar biologicamente em diferentes velocidades, e este comportamento é expresso pela taxa de biodegradação (WIEDEMEIER et al., 1999).

Os BTEX estão presentes em diferentes proporções nos combustíveis e alguns trabalhos caracterizaram esta composição. A porcentagem em massa dos compostos BTEX na gasolina comercial brasileira (com 24% de etanol) é: 0,59% de benzeno, 3,28% de tolueno,

¹ Abreviatura do inglês para *light nonaqueous phase liquids* (líquido de fase não aquosa mais leve que a água) (BEDIENT et al., 1999)

1,15% de etilbenzeno, 4,58% de *m,p*-xilenos, e 1,80% de *o*-xileno (FERNANDES, 1997). Já no óleo diesel comercial, os hidrocarbonetos monoaromáticos totalizam 17,7% em massa e possuem uma concentração² de 0,002 g.g⁻¹ para o benzeno, 0,018 g.g⁻¹ para o tolueno, 0,024 g.g⁻¹ para o etilbenzeno e 0,037 g.g⁻¹ para os xilenos totais (KAIPPER, 2003), uma quantidade superior à encontrada na gasolina. Além de combustíveis, estes compostos podem ser encontrados em produtos como borracha sintética, plásticos, nylon, inseticidas, tintas, resinas e lustra-móveis (MITRA & ROY, 2011).

A toxicidade dos BTEX é outro fator de peso que direciona a atenção para este grupo de hidrocarbonetos. A exposição aos BTEX ocorre por injeção de água contaminada, respiração de vapores ou por contato dérmico e pode causar desde uma simples irritação da pele até problemas no sistema nervoso central e respiratório, isto para baixíssimas concentrações quando comparadas àquelas que causam efeitos deletérios pelo etanol (TOXNET, 2010).

Haja vista o risco à saúde humana, a Portaria Federal do Ministério da Saúde nº 2.914 (BRASIL, 2011) incluiu em sua lista de padrões de potabilidade as concentrações máximas aceitáveis em água potável para os compostos BTEX: 5 µg.L⁻¹ para o benzeno, 170 µg.L⁻¹ para o tolueno, 200 µg.L⁻¹ para o etilbenzeno e 300 µg.L⁻¹ para os xilenos. Com um foco específico para as águas subterrâneas, a Resolução nº 396 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2008) também regula os maiores valores presentes toleráveis conforme o uso preponderante do manancial, com valores para consumo humano idênticos à Portaria Federal do Ministério da Saúde nº 2.914 e outros menos restritivos conforme se altera o destino de uso do aquífero.

2.2 ACETATO

O acetato é um subproduto metabólico da biodegradação anaeróbia e fermentativa³ de compostos orgânicos, como os BTEX e etanol (NELSON et al., 2010; CHEN et al., 2008; COSTA, 2008; DA SILVA & ALVAREZ., 2004; FERNANDES, 2002) comumente encontrado em ambientes subsuperficiais impactados. Assim, ele pode se acumular em altas concentrações em aquíferos (ALVAREZ & HUNT, 2002) como resultado de processos de biodegradação.

² Esta concentração é dada em grama do composto por grama de óleo diesel.

³ Os processos de biodegradação anaeróbios e fermentativos são discutidos no item 2.3.

Em casos de derramamentos subsuperficiais por misturas de gasolina e etanol, a quantidade de acetato gerada é proveniente predominantemente da biodegradação do etanol já que ele está presente em uma proporção maior que os compostos BTEX e atua como um substrato preferencial (COSTA, 2008). Deste modo, altas concentrações de acetato são um indicador primeiramente da biodegradação do álcool e posteriormente dos BTEX (NUNES, 2006).

Entretanto, mesmo com a completa remoção do etanol, ainda podem existir doadores de elétrons (como o acetato) que competem pelos receptores de elétrons disponíveis. Assim, o desaparecimento do etanol não acaba com os prováveis impactos na biodegradação dos BTEX provocados pelos subprodutos metabólicos (CHEN et al., 2008), devendo-se levar em consideração que uma efetiva remoção dos monoaromáticos só será observada a partir do momento em que ocorrer o decaimento do acetato no meio.

Logo, o acetato não é um substrato inicialmente presente no caso de contaminação de um aquífero por combustíveis, como o etanol e os BTEX, entretanto, ele é um importante subproduto metabólico intermediário e, assim, é também um substrato que deve ser levado em conta na análise de múltiplos substratos.

2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

Visto que processos que influenciam o destino de contaminantes em aquíferos, como sorção e volatilização, não os removem do meio (WIEDEMEIER et al., 1999), as mudanças nas concentrações dos xenobióticos ligadas à biodegradação possuem um papel de grande importância em quadros de remediação, constituindo um dos processos mais relevantes para remoção dos BTEX da água subterrânea (FISHER et al., 2006; CHAPELLE, 2001). Para que essa biodegradação ocorra, além da presença do substrato, outras condições são previamente necessárias, como: presença de um receptor de elétrons, expressão enzimática e acesso microbiano ao substrato.

2.3.1 Vias de biodegradação

A geração de energia para as células pode ser executada, dependendo do micro-organismo, por fermentação ou respiração (VON SPERLING, 2007). Na fermentação, os compostos orgânicos são transformados em subprodutos na ausência de um receptor final de

elétrons inorgânico. Tanto o doador de elétrons quanto o receptor são compostos orgânicos (BITTON, 2005). Já na respiração, é necessária a presença de compostos inorgânicos que possam receber os elétrons advindos do substrato doador de elétrons, e estes são chamados de receptores de elétrons. Dentre estes, os mais comuns utilizados pelos micro-organismos nos ambientes naturais são: oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-), manganês (Mn^{+4}), ferro férrico (Fe^{+3}), sulfato (SO_4^{-2}) e dióxido de carbono (CO_2) em ordem decrescente de transferências de energia, respectivamente (CHAPELLE, 2001). À medida que o uso dos receptores de elétrons caminha em direção ao uso do CO_2 , o ambiente se torna mais redutor e o valor do potencial de oxi-redução (POR)⁴ tende a diminuir, assumindo valores negativos, enquanto que para receptores mais oxidantes, como O_2 e NO_3^- , são esperados valores positivos (EDMUNDS et al., 1984).

Os processos anaeróbios⁵ de biodegradação são de grande relevância na biorremediação de áreas impactadas, já que a disponibilidade de oxigênio é limitada em aquíferos na maioria das vezes, tornando, assim, o meio anaeróbio, como observado em alguns estudos realizados (GOMES, 2008; FERNANDES, 2002). Nos parágrafos seguintes, são descritas vias anaeróbias de biodegradação que foram relevantes para este trabalho: desnitrificação, ferro-redução, sulfato-redução e metanogênese.

A partir do momento que há depleção de oxigênio, o nitrato disponível no meio será utilizado como receptor de elétron no processo de biodegradação por ser o mais favorável energeticamente. Sob condições aeróbias, a amônia (NH_3) pode ser oxidada a nitrito (NO_2^-), e este posteriormente oxidado a nitrato (NO_3^-), em um processo chamado de nitrificação. Uma vez completa a oxidação do nitrogênio, o nitrato pode ser assimilado pelos micro-organismos ou ser utilizado como receptor de elétrons no metabolismo de várias bactérias anaeróbias facultativas incluindo espécies do gênero *Pseudomonas*. A redução do nitrato para produção de energia através da respiração e liberação de N_2 é conhecida como desnitrificação, e ocorre em várias etapas, cada uma catalizada por diferentes micro-organismos, na seguinte ordem: $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ (CHAPELLE, 2001).

Após o nitrato, o ferro férrico (Fe^{+3}) é utilizado como receptor de elétrons até sua redução a ferro ferroso (Fe^{+2}). A ferro-redução é uma

⁴ Medida que indica a tendência de elétrons serem transferidos do doador para o receptor (LEHNINGER et al., 1993).

⁵ Processos que ocorrem na ausência de oxigênio (O_2) (CHAPELLE, 2001).

importante via de biodegradação em ambientes aquáticos subsuperficiais já que o Fe^{+3} é fácil de ser encontrado nesse meio (CHAPELLE, 2001). Contudo, este processo é difícil de ser quantificado já que o Fe^{+3} é solúvel somente como certas espécies complexadas. Além disso, o Fe^{+2} pode ser removido da água por se precipitar como sulfeto férrico através da reação com o H_2S proveniente da sulfato-redução (SIMON et al., 2002).

Na sulfato-redução, após o esgotamento no nitrato e do ferro, o sulfato atua como receptor de elétrons na oxidação de vários compostos orgânicos, em uma reação onde sulfato (SO_4^{-2}) é reduzido a sulfeto (S^{-2}) (CHAPELLE, 2001). As bactérias redutoras do sulfato (BRS) ou sulforedutoras são os micro-organismos que atuam neste processo e são conhecidas pela sua grande versatilidade (RITTMANN & MCCARTY, 2001).

A formação biológica de metano (CH_4) é o processo terminal da degradação de contaminantes em ambientes aquáticos quando o oxigênio, nitrato, ferro e sulfato forem exauridos como receptores de elétrons (ZENGLER et al., 1999). A metanogênese é uma das vias de respiração mais importantes encontradas em ambientes anaeróbios subsuperficiais (CHAPELLE, 2001) e ocorre em etapas sequenciais, com a presença de, no mínimo, três grupos fisiológicos de micro-organismos: bactérias fermentativas ou acidogênicas; bactérias sintróficas ou acetogênicas; e arqueas metanogênicas (CHERNICHARO, 1997).

2.3.2 Expressão enzimática

Para sobreviver e competir com sucesso na natureza, a maioria dos micro-organismos é capaz de superar muitos dos desafios ambientais aos quais são expostos, como o contato com uma alta carga de compostos orgânicos, ajustando sua composição celular de modo que essa mudança também afeta o crescimento e/ou as propriedades cinéticas exibidas pela célula (SINGH et al., 2009; KALISKY et al., 2007; KOVÁROVÁ-KOVAR & EGLI, 1998). Há diferenças nos processos que ocorrem durante o crescimento microbiano em variadas concentrações de substrato, como nos casos de: baixa disponibilidade; crescimento controlado pelo fornecimento de alimento; e crescimento com excesso de substrato (KOVÁROVÁ-KOVAR & EGLI, 1998). Assim, as propriedades cinéticas exibidas por uma célula microbiana na degradação de substratos são ligadas ao nível de expressão das enzimas

envolvidas na catálise⁶ da via metabólica (LENDENMANN et al., 1996; EGLI, 2010). Três diferentes estratégias de regulação enzimática podem ser postuladas conforme a concentração de substratos (KOVÁROVÁ-KOVAR & EGLI, 1998):

1) Nível fixo de enzimas: a concentração de enzimas na célula não é afetada pela alteração na concentração de substratos na mistura;

2) Nível regulado de enzimas: a concentração de enzimas em uma via catabólica é sujeita a regulação devido a variação de um determinado substrato (REARDON et al., 2002; KIM & JAFFE, 2007);

3) Valor limite para indução enzimática: em baixas concentrações de substrato, as células não expressam as enzimas utilizadas para a degradação pois uma concentração mínima é necessária ser alcançada para que a indução enzimática ocorra (RÜEGG et al., 2007; COZZARELI et al., 2010).

2.3.3 Biodisponibilidade

Em situações onde há substratos e receptores de elétrons em quantidades suficientes e micro-organismos para biodegradação, pode não haver a indução enzimática devido à dificuldade de acesso ao alimento pela biomassa. A atividade biológica em si limita o processo de biorremediação somente em poucos casos. Na maioria das vezes, a transferência de massa impede o completo proveito do potencial de degradação microbiológica devido à baixa biodisponibilidade de um substrato. Uma reduzida biodisponibilidade faz com que bactérias vivam "famintas" mesmo em altas concentrações de poluentes, dificultando, assim, tanto a evolução da degradação quanto a construção e manutenção da biomassa catabolicamente ativa (BOSMA et al., 1997). Baseado nisto, o crescimento dos micro-organismos será favorecido nas zonas perto da contaminação, onde o fluxo de substrato é suficiente para manter os requisitos nutricionais (HARMS & BOSMA, 1997).

2.4 BIODEGRADAÇÃO DE MÚLTIPLOS SUBSTRATOS ORGÂNICOS

O entendimento e aplicação do conceito de crescimento microbiano em substratos múltiplos contribuem para um melhor

⁶ Mecanismo de ação enzimática que fornece um caminho alternativo para que a reação ocorra onde a energia dispensada é menor que para a reação não catalisada (HARVEY & FERRIER, 2011).

controle do desempenho da biomassa local sob condições ambientais (EGLI & ZINN, 2003). Na natureza, os micro-organismos não são somente confrontados com misturas de várias fontes de carbono, mas também, com uma constante mudança no ambiente onde estão, logo, dificilmente eles encontrarão condições de estado estacionário. Sob estas condições, não seria esperado um crescimento significativo se as células utilizassem somente uma fonte de carbono disponível. Na realidade, há muito mais evidências de que as células utilizam vários compostos de carbono simultaneamente e que as misturas controlam o crescimento, e não somente um único substrato (LENDENMANN et al., 1996). O uso simultâneo de diferentes substratos é uma estratégia de sobrevivência em que micro-organismos metabolizam dezenas de compostos orgânicos ao mesmo tempo equipando a célula com uma vantagem cinética e flexibilidade metabólica, além de permitir um rápido crescimento em mínimas concentrações de cada alimento (EGLI, 2010). Esta estratégia de vida também pode ser uma maneira dos micro-organismos lidarem com a baixa disponibilidade de substratos (SEMPLE et al., 2007). A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura cujo foco é o estudo do comportamento da biodegradação de misturas são realizados em concentrações baixas de substratos e em condições laboratoriais (diferentemente do que ocorre em um derramamento subterrâneo), como será abordado a seguir.

A fim de avaliar o uso simultâneo de várias fontes de carbono, Lendenmann et al. (1996) realizaram um experimento em reator contínuo com *Escherichia coli* alimentado com misturas de seis açúcares. Independente da composição da mistura e da taxa de diluição usada, *E. coli* consumiu todos os açúcares simultaneamente e de maneira mais efetiva que quando comparado com o crescimento em um único açúcar. Com os dados deste estudo, Lendenmann & Egli (1998) desenvolveram um modelo que descreveu de modo razoável a taxa de crescimento microbiano como função das concentrações individuais de diversas fontes de carbono (açúcares) utilizadas simultaneamente (detalhado em 2.6.5). O mesmo padrão de biodegradação foi observado com clorofenóis (SALMERÓN-ALCOCER et al. 2007) em que o uso simultâneo de várias fontes de carbono resultou em uma menor concentração de todos substratos. Entretanto, outros estudos que fizeram uso de culturas bacterianas mistas (BIELEFELDT & STENSEL, 1999) e puras (PLAZA et al., 2007) na presença simultânea e separada dos BTEX, mostraram que os micro-organismos degradaram cada composto mais rapidamente quando ele estava disponível sozinho do que quando era um componente de uma mistura. Com base no exposto, deve ser

tomado cuidado quando se generalizar conceitos sobre interações de substratos em misturas de poluentes (DEEB & ALAVERZ-COHEN, 2000), de modo que cada caso apresenta condições específicas que alteram o padrão de biodegradação de uma mistura tanto positiva quanto negativamente.

Em um ambiente onde vários substratos estão disponíveis para uso dos micro-organismos, muitas vezes pode ser observado o crescimento diáuxico, na qual o consumo de um substrato só é observado a partir do momento em que outro mais facilmente biodegradável se esgote (SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2003; RÜEGG et al., 2007; LAWRENCE et al., 2009). Experimentos com uso de reatores batelada com altas concentrações de substrato (como no caso de derramamentos subsuperficiais) reportaram que o excesso de succinato inibiu o consumo de benzeno resultando em crescimento diáuxico, enquanto que em um reator contínuo com concentrações baixas, ambos os substratos foram utilizados ao mesmo tempo (BUCHELI-WITSCHERL et al., 2009; RÜEGG et al., 2007). Em reator contínuo, maiores proporções de succinato, um substrato mais facilmente biodegradado, teve um efeito positivo na biodegradação do benzeno (BUCHELI-WITSCHERL et al., 2009). Logo, a presença de outro substrato mais facilmente assimilável pode ser útil para que haja a biodegradação de um composto considerado recalcitrante, como o benzeno (SCHAEFER et al. 2010a; DOU et al., 2008a; CHAKRABORTY et al., 2005; DEEB & ALAVAREZ-COHEN, 2000).

O entendimento da cinética de crescimento com múltiplos substratos obtido por Lendenmann & Egli (1998) fornece uma explicação sobre o porquê dos micro-organismos utilizarem uma mistura de substratos simultaneamente em baixas concentrações e sequencialmente em altas concentrações. Em baixas concentrações, o uso da mistura permite um crescimento mais rápido enquanto que em altas concentrações, os micro-organismos preferem utilizar o substrato que garanta a maior taxa de crescimento. Isto permite o ser ter sucesso em ambientes naturais onde a composição e a concentração de substratos de carbono disponíveis podem mudar rapidamente, como o ambiente subterrâneo contaminado. Este mesmo padrão de biodegradação foi obtido em experimentos para avaliar a biodegradação simultânea dos BTEX no solo e na água fornecidos em uma ampla faixa de concentrações (DOU et al., 2008a; DOU et al., 2008b).

A conformação da biomassa presente para atuar na degradação de uma miscelânea de compostos também influi na eficiência do processo. Uma mistura de culturas é capaz de degradar uma mistura de substratos

mais rápido que culturas isoladas (MORLETT-CHÁVEZ et al., 2010; DEEB & ALVAREZ-COHEN, 2000; REARDON et al., 2002; SALMERÓN-ALCOCER et al. 2007). Este comportamento é possível pois as populações bacterianas em consórcio que competem pelos mesmos alimentos podem estabelecer relações sintróficas, as quais ajudam a protegê-las contra condições adversas do meio em que se encontram (MORLETT-CHÁVEZ et al., 2010). Outra característica interessante presente em uso de múltiplos substratos é que a degradação de um componente de uma mistura pode ser inibida ou não começar até que a(s) concentração(ões) de outro(s) caia(m) para um nível suficientemente baixo (DEEB & ALAVAREZ-COHEN, 2000; REARDON et al., 2002; DA SILVA & ALVAREZ, 2004; COZZARELI et al., 2010).

2.4.1 Influência da proporção

Alguns estudos disponíveis na literatura realizados em escala laboratorial apontam que a degradação de um composto como constituinte de uma mistura é dependente da sua proporção. Com uso de um reator contínuo alimentado com uma mistura de açúcares em diferentes proporções, Lendenmann et al. (1996) observaram que a concentração de saída em estado estacionário de cada açúcar foi proporcional a sua contribuição para a concentração total de substrato afluente. Em reator em batelada, Bielefeldt e Stensel (1999) fizeram uso dos compostos BTEX misturados e concluíram que maiores taxas de degradação foram observadas para os hidrocarbonetos que tinham maior participação na mistura. Deste modo, a taxa de degradação de um substrato dependeu da sua proporção. Este padrão de biodegradação também foi encontrado para misturas de tolueno e etanol em diferentes frações, que mesmo pertencentes a funções orgânicas diferentes (hidrocarboneto e álcool, respectivamente), maiores proporções do hidrocarboneto monoaromático resultaram em seu maior fluxo metabólico (taxa de degradação por célula) (LOVANH & ALVAREZ, 2002). Para explicar tal comportamento, Lovanh & Alvarez (2004) introduziram o termo *diluição do fluxo metabólico*, que descreve que a taxa de utilização de um substrato diminui devido ao metabolismo de outro que está em maior proporção. Este tipo de interação de substratos tem um grande peso na elongação de plumas de contaminação (GOMEZ et al., 2008). Assim, o aumento da disponibilidade de substratos alternativos diminui a probabilidade de um micro-organismo entrar em contato e assimilar um poluente alvo.

O conhecimento de como é o comportamento da biodegradação de misturas é de grande valia para o estudo da velocidade de degradação e, assim, prever a persistência de contaminantes. Logo, avaliar a taxa de biodegradação de contaminantes subterrâneos, como os BTEX e o etanol, sob a óptica das inter-relações entre substratos focando nas proporções é razoável já que pode fornecer informações úteis para tecnologias de biorremediação, como longevidade e influência mútua dos contaminantes.

2.5 MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE SUBSTRATOS

O desenvolvimento de estratégias de tratamento para descontaminação de solo e/ou água requer a consideração das interações entre substratos para controlar a concentração de poluentes individuais a fim de satisfazer padrões regulatórios (OKPOKWASILI & NWEKE, 2005). A literatura mostra que a biodegradação de um componente pode ser alterada positiva ou negativamente por outros componentes em uma mistura, logo, diferentes condições podem ser necessárias para degradar diferentes compostos. Nos itens subsequentes, são apresentados os principais mecanismos de interação entre substratos geralmente observados em trabalhos cujo foco foi avaliar o comportamento da biodegradação de múltiplas fontes de energia e carbono.

2.5.1 Assimilação

Os processos químicos que acontecem nas células constituem o metabolismo, e esse pode ser dividido em dois outros grandes processos que governam a vida: *dissimilação* ou *catabolismo*, que engloba as reações de produção de energia com degradação do substrato; e *assimilação* ou *anabolismo*, que agrega reações que levam ao crescimento utilizando a energia liberada na dissimilação (VON SPERLING, 2007). Logo, percebe-se que a assimilação constitui a via básica do aproveitamento de um substrato por um micro-organismo para que o mesmo possa crescer. Entretanto, na presença de várias fontes de alimento, algumas dessas opções disponíveis não são diretamente aproveitadas pelos micróbios e atuam como coadjuvantes na biodegradação de outros compostos, como será visto no item seguinte.

2.5.2 Cometabolismo

O cometabolismo ocorre quando um micro-organismo que cresce em determinado substrato transforma uma outra fonte de alimento sem que esta seja assimilada pelo mesmo. Como um exemplo, quando *Mycobacterium vaccae* cresce em propano, ela pode simultaneamente oxidar ciclohexano em ciclohexanal sem que haja assimilação pelo organismo (SRISVATAVA & SRISVATAVA, 2003). No cometabolismo não há benefício para a célula que realiza a reação de biodegradação (SINGH et al., 2009).

Este tipo de interação entre substratos é muito comum de ser observado em trabalhos que avaliaram a influência mútua de diversas fontes de alimentos em processos de biodegradação. Usando misturas de fenóis como fontes de carbono e energia, o consórcio microbiano utilizado por Salmerón-Alcocer et al. (2007) degradou cometabolicamente os mono, di e triclorofenóis fornecidos. A degradação microbiana cometabólica foi atribuída pelos autores de ser a principal via de remoção dos substratos. O mesmo tipo de comportamento cometabólico foi observado em experimentos com misturas dos BTEX em solo (DOU et al., 2008b) e em meio líquido (LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2007). Prenafeta-Boldú et al. (2002) em um estudo que avaliou o crescimento fúngico em uma solução que continha a fração solúvel da gasolina, incluindo todos os compostos BTEX, concluiu que, dentre outros, o cometabolismo foi um importante processo de interação dos substratos, já que somente os alquilbenzenos foram metabolizados. O tolueno e o etilbenzeno serviram como fonte de energia e de carbono para o fungo enquanto que os xilenos foram cometabolizados. O cometabolismo também é uma das hipóteses sugeridas para o aumento da biodegradabilidade das misturas de biodiesel com combustíveis fósseis quando comparadas com o combustível derivado do petróleo isolado (PASQUALINO et al., 2006).

2.5.3 Inibição enzimática

Um inibidor é uma substância que interfere nos mecanismos de ação de enzimas e diminui a velocidade da reação. Há dois tipos de inibidores que podem afetar uma reação enzimática de diferentes maneiras. O *inibidor reversível* pode se ligar à enzima e ser subsequentemente liberado sem alteração na conformação enzimática de modo a mantê-la com a sua condição original. Já um *inibidor irreversível* reage com a enzima dando origem a uma proteína que é

enzimaticamente inativa e não pode ser regenerada (CAMPBELL & FARRELL, 2007).

Três grandes modos gerais de ação de inibidores reversíveis podem ser diferenciados com base na maneira que se associam à enzima e são comuns de serem encontrados em trabalhos que avaliam a degradação de múltiplos substratos (MIKKELNSEN & CORTÓN, 2004). A primeira classe consiste de inibidores cuja composição é muito semelhante com a do substrato de modo que o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo⁷ da enzima, cenário que caracteriza a *inibição competitiva*. Neste caso, o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima e impede o acesso do substrato. Este tipo de inibição foi sugerido como explicação para as diferentes taxas de biodegradação obtidas para os BTEX misturados e isolados em diversos estudos realizados (PLAZA et al., 2007; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002; DEEB & ALVAREZ-COHEN, 2000; BIELEFELDT & STENSEL, 1999), fato que traz a possibilidade de este ser um modo de inibição padrão para compostos monoaromáticos. A reação abaixo exemplifica o modo da inibição competitiva onde a enzima (E) pode interagir com o substrato (S) resultando no complexo enzima-substrato (E-S) e posteriormente gerando o produto final (P), ou então se ligar com o inibidor (I) e dar origem ao complexo enzima-inibidor (E-I):

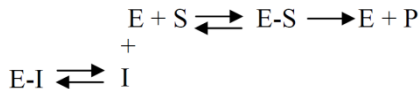


Figura 2.1 - Reação que exemplifica o modo de inibição competitiva. **E** é a enzima, **S** é o substrato, **E-S** é o complexo enzima-substrato, **I** é o inibidor e **P** é o produto final.

A outra classe é formada por inibidores que se ligam em outro local da enzima que não o sítio ativo e causam mudanças na conformação da enzima. O substrato ainda é capaz de se ligar ao sítio ativo (formando o complexo enzima-inibidor-substrato (E-I-S)), contudo a enzima não pode realizar a catálise da reação enquanto o inibidor estiver acoplado. Este modo de ação é chamado de *inibição não competitiva*. Lin et al. (2007) atribuíram à inibição não competitiva a

⁷ Região da superfície enzimática onde o substrato se liga e cataliticamente é transformado. Também é conhecido como sítio catalítico (LEHNINGER et al., 1993).

inibição da degradação do MTBE (abreviatura do inglês para *methyl tert-butyl ether*) na presença dos BTEX. A reação para este modo de atuação enzimática é esquematizada a seguir:

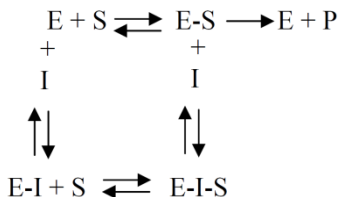


Figura 2.2 - Reação que exemplifica o modo de inibição não competitiva. **E** é a enzima, **S** é o substrato, **E-S** é o complexo enzima-substrato, **I** é o inibidor, **E-I-S** é o complexo enzima-inibidor-substrato e **P** é o produto final.

A terceira classe de inibição enzimática consiste na *inibição incompetitiva* ou *acompetitiva*, na qual o inibidor só consegue se ligar ao complexo enzima-substrato. Logo, é necessário adesão do substrato ao sítio ativo da enzima para que o inibidor possa agir. Este tipo de inibição é mais raro e relacionado a certas enzimas que agem em múltiplos substratos (BUXBAUM, 2007).

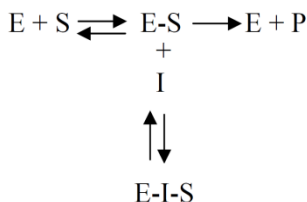


Figura 2.3 - Reação que exemplifica o modo de inibição incompetitiva. **E** é a enzima, **S** é o substrato, **E-S** é o complexo enzima-substrato, **I** é o inibidor, **E-I-S** é o complexo enzima-inibidor-substrato e **P** é o produto final.

2.6 MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADAÇÃO

Um passo necessário na avaliação do potencial de biorremediação em campo é a construção de um modelo matemático que descreva o transporte e a biodegradação dos compostos de uma pluma de contaminantes. Uma estimativa correta do tempo esperado para atenuação natural ou acelerada de compostos de uma pluma depende do conhecimento do comportamento da biodegradação. Diversas

expressões são disponíveis para descrever a taxa de biodegradação e outros parâmetros cinéticos, dentre os quais, os mais relevantes são expostos nos itens subsequentes.

2.6.1 Modelo cinético de Monod

É uma das expressões mais utilizadas para simular o decaimento da concentração de um poluente em água subterrânea apresentada por Monod em 1942 (WIEDEMEIER et al., 1999):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{C}{K_s + C} \quad (2.1)$$

A variável μ representa a taxa de crescimento (T^{-1}); $\mu_{m\acute{a}x}$ é a taxa de crescimento máximo (T^{-1}); C é a concentração do substrato limitante ($mg.L^{-1}$); e K_s é a constante de meia-saturação, que é o valor da concentração do substrato na qual μ é igual a metade de $\mu_{m\acute{a}x}$. No modelo, o aumento da concentração de substrato faz com que a população microbiana cresça até que uma taxa máxima de crescimento seja alcançada (ARONSON & HOWARD, 1997).

2.6.2 Modelo de decaimento de ordem zero

No modelo cinético de decaimento de ordem zero, a degradação do substrato não altera a taxa de biodegradação, ou seja, é independente da concentração. A taxa de degradação é linear e representada matematicamente por (ARONSON & HOWARD, 1997):

$$C = C_o - kt \quad (2.2)$$

Onde C é a concentração do componente após certo tempo de biodegradação ($M.L^{-3}$); C_o é a concentração inicial; k é a taxa de decaimento do composto ($M.L^{-3}.T^{-1}$); e, t é o tempo (T).

O modelo de decaimento de ordem zero é indicado quando a concentração de substrato é maior que o valor da constante de meia-saturação (K_s), pois deste modo o erro devido ao uso da equação é menor (BEKINS et al., 1998).

2.6.3 Modelo de decaimento de primeira ordem

Outra expressão comumente utilizada para representar a biodegradação de hidrocarbonetos dissolvidos em água subterrânea (COZZARELLI et al., 2010) envolve o uso de uma relação de decaimento exponencial (WIEDEMEIER et al., 1999):

$$C = C_o e^{-kt} \quad (2.3)$$

Onde C é a concentração do componente após certo tempo de biodegradação ($M.L^{-3}$); C_o é a concentração inicial; k é a taxa de decaimento do composto (T^{-1}); e, t é o tempo (T). Neste caso, k tem unidades de T^{-1} e é assumido que a taxa de degradação do poluente é proporcional a sua concentração, logo, maiores concentrações resultarão em maiores taxas. Neste caso, não é levado em consideração o crescimento da população microbiana (ARONSON & HOWARD, 1997). Além disso, para assumir um decaimento de primeira ordem em uma modelagem, deve ser realizada uma verificação da validade da equação, a qual é apropriada para valores de concentrações que sejam muito menores que K_s , já que quando $C \ll K_s$ o erro é menor (BEKINS et al, 1998).

As taxas de degradação de primeira ordem são frequentemente expressas com relação ao tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)⁸ do composto:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2.4)$$

A biodegradação de poluentes em solos e água subterrânea é frequentemente modelada utilizando o modelo de decaimento de primeira ordem (SUAREZ & RIFAI, 2002; SUAREZ & RIFAI, 2004; MALETIĆ et al., 2009; BLUM et al., 2009, COZZARELLI et al., 2010).

2.6.4 Modelo cinético para múltiplos substratos de Lendenmann et al. (1996)

Já que frequentemente os substratos orgânicos são utilizados ao mesmo tempo, como descrito no item 2.4, diversos compostos juntos, e

⁸ A meia-vida de uma reação é o tempo necessário para que a concentração caia à metade de seu valor inicial (CHAPRA, 2008).

não somente um único, irão controlar a taxa de biodegradação. Com base nisto, expressões matemáticas que consideram a presença de vários substratos vêm sendo desenvolvidas. A partir de dados obtidos de um experimento em um reator contínuo com crescimento de *E. Coli* em uma mistura de glicose com galactose, Lendenmann et al. (1996) expandiram uma equação matemática desenvolvida para obter concentrações de dois substratos para a situação de crescimento de micro-organismos em várias fontes de carbono:

$$s_i = s_{100\%,i} \cdot \frac{q_i}{\sum q_j} = s_{100\%,i} \cdot \frac{S_{0,i}}{\sum S_{0,j}} \quad (2.5)$$

Onde s_i é a concentração em estado-estacionário do substrato i ; $s_{100\%,i}$ é a concentração em estado-estacionário do substrato i durante seu crescimento como única fonte de alimento; q_i é a taxa de consumo específico; $\sum q_j$ é o somatório da taxa de consumo específico total dos substratos; $S_{0,i}$ é a concentração inicial do composto i ; e, $\sum S_{0,j}$ é o somatório da concentração total inicial de substratos.

2.6.5 Modelo cinético para múltiplos substratos de Lendenmann & Egli (1998)

O desenvolvimento deste modelo teve como ponto de partida a equação 2.5 anteriormente descrita por Lendenmann et al. (1996). Aqui, é descrita a taxa de crescimento dos micro-organismos como função das concentrações individuais de diversos substratos utilizados simultaneamente:

$$\mu = \frac{\mu_{\max \text{ geral}} \sum \left(\frac{\mu_{\max,i}}{K_{si}} \right) s_i}{\mu_{\max \text{ geral}} + \sum \left(\frac{\mu_{\max,i}}{K_{si}} \right) s_i} \quad (2.6)$$

Onde $\mu_{\max \text{ geral}}$ é o maior valor de todos os μ ; e, K_{si} é a constante de meia saturação para o substrato i ; e s_i é a concentração em estado-estacionário do substrato i .

2.6.6 Modelo para inibição competitiva de múltiplos substratos de Bielefeldt & Stensel (1999)

Uma equação que descreve a taxa de biodegradação de misturas é apresentada por Bielefeldt & Stensel (1999) com base na junção da

equação de Monod com o modelo de inibição competitiva para dois substratos desenvolvido por Bailey & Ollis (1986) e se aplica para os hidrocarbonetos do grupo BTEX:

$$\frac{R_{I,m}}{R_{I,s}} \approx \frac{I}{\Sigma BTEX} \quad (2.7)$$

Onde $R_{I,m}$ é a taxa de biodegradação do hidrocarboneto quando presente na mistura ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$); $R_{I,s}$ é a taxa de biodegradação do hidrocarboneto quando presente sozinho ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$); I é a concentração do hidrocarboneto (mg.L^{-1}); e $\Sigma BTEX$ é a soma das concentrações dos compostos monoaromáticos (mg.L^{-1}).

Com base nesta expressão, a taxa de biodegradação de um composto em uma mistura de BTEX pode ser estimada com base na taxa de biodegradação do composto sozinho e na concentração total de substrato. A equação é válida para o caso em que $I \gg K_{si}$, ou seja, quando a concentração do composto for muito maior que sua constante de meia-saturação e quando os valores de K_s dos BTEX forem similares.

2.7 FATORES INTERVENIENTES NA TAXA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

As reações de biodegradação que envolvem compostos orgânicos acontecem em velocidades específicas. Quantificar a taxa de biodegradação, ou seja, a variação da concentração ao longo do tempo é importante para avaliações de processos de biorremediação já que a biodegradação é o mecanismo chave “destrutivo” que controla o destino e o transporte de contaminantes. As taxas de biodegradação podem ser determinadas com o uso de microcosmos, com base em valores da literatura ou com coleta e análise de dados de campo (WIEDEMEIER et al., 1999).

Os padrões e taxas de remediação podem variar de local para local, dependendo da importância relativa dos vários processos de biodegradação possíveis (WIEDEMEIER et al., 1996), das peculiaridades microbiológicas do ambiente (PLAZA et al. 2007), entre outros. A seguir, são apresentados alguns fatores que podem interferir nas taxas de biodegradação:

Presença da biomassa: No início de um processo de biorremediação, a biodegradação pode ser limitada pela atividade microbiológica devido à baixa concentração de biomassa presente no

meio, resultando em uma baixa taxa de remoção dos contaminantes (BORDEL et al., 2007; MUÑOZ et al., 2007).

Subprodutos: O acúmulo de produtos intermediários de biodegradação, como o catecol na biodegradação aeróbia do benzeno, pode inibir o processo de degradação devido aos efeitos tóxicos (MUNOZ et al., 2007) ou pelo fato destes subprodutos serem mais facilmente biodegradáveis que o substrato original (KIM & JAFFE, 2007).

Concentração de substrato: altas concentrações podem prejudicar o crescimento dos micro-organismos de modo a afetar a taxa de biodegradação dos substratos (ALLAGAPAN & COWAN, 2003; BORDEL et al., 2007; NELSON et al., 2010).

Presença de nutrientes: a baixa concentração de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, é um fator que pode limitar a extensão e viabilidade da biodegradação (CORSEUIL et al., 1998; FERNANDES, 2002; SHABIR et al., 2008).

Receptores de elétrons: Os receptores de elétrons disponíveis para a degradação dos substratos também podem interferir na velocidade de degradação de compostos (SCHAEFER et al., 2010a), com taxas mais lentas sob condições anaeróbias (CHAKRABORTY et al., 2005; DA SILVA et al., 2005). Os processos anaeróbios de biodegradação têm um grande peso na remoção de contaminantes em aquíferos. Segundo estudo realizado por Essaid et al. (2003) com uso de modelagem matemática, a extensão da pluma de BTEX é controlada pela taxa de biodegradação anaeróbia ao passo que a biodegradação aeróbia só afeta as bordas. Quando a taxa de biodegradação anaeróbia é diminuída, a extensão da pluma a jusante da fonte é maior. Assim, os processos anaeróbios podem controlar efetivamente a migração de uma pluma de contaminação (ESSAID et al., 2003).

Biodisponibilidade: As lentas taxas de biodegradação *in situ* são frequentemente um resultado do acesso restrito aos poluentes pelos micro-organismos. Deste modo, a degradação de poluentes depende principalmente da transferência do substrato ao invés do movimento do micróbio (HARMS & BOSMA, 1997).

Substratos alternativos: a presença de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, como o etanol na gasolina, pode diminuir a taxa de biodegradação de um composto alvo (DA SILVA & ALVAREZ, 2004; DA SILVA et al., 2005; BUCHELI-WITSCHERL et al., 2009; RÜEGG et al., 2007).

Proporcionalidade: Estudos realizados em escala laboratorial apontam que a degradação de um composto como constituinte de uma

mistura depende da sua proporção (LENDEMANN et al., 1996; BIELEFELDT & STENSEL, 1999; LOVANH et al., 2002; LOVANH & ALVAREZ, 2004).

2.7.1 Biodegradação dos BTEX e do etanol

Vários estudos em microcosmos e em escala real sob diversas configurações avaliaram as taxas de biodegradação dos BTEX e do etanol dada importância ambiental destes poluentes. As taxas de biodegradação dos BTEX são bastante variadas: enquanto que para alguns experimentos a degradação ocorreu de forma rápida, para outros, foram necessários longos períodos de incubação, ou então, simplesmente não houve biodegradação para certos compostos. Isto reafirma que a velocidade com que a concentração de um contaminante varia no tempo se modifica de acordo com o local e as condições de estudo. Já para o etanol, sua rápida biodegradação é quase sempre reportada. Estes padrões de biodegradação são expostos nos parágrafos seguintes.

O fungo comum em solos *Cladophialophora* sp. foi capaz de crescer em uma fração solúvel de gasolina (meio líquido) que continha todos os seis compostos BTEX em um experimento laboratorial realizado por Prenafeta-Boldú et al. (2002). Na mistura dos BTEX, a concentração de benzeno ficou constante durante todo experimento, e tanto o tolueno quanto o etilbenzeno só desapareceram depois de 17 dias. O uso dos xilenos só começou depois que as concentrações de tolueno e etilbenzeno foram parcialmente removidas.

Com o uso de outro tipo de micro-organismo, duas diferentes bactérias isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, Plaza et al. (2007) obtiveram a seguinte ordem decrescente de biodegradação aeróbia em meio líquido dos BTEX: *m+p*-xilenos > tolueno > *o*-xileno > etilbenzeno > benzeno. Sob condições semelhantes, porém com o uso de um consórcio microbiano aclimatado a gasolina, Morlett-Chávez et al. (2010) não observam diferenças significativas na biodegradação dos BTEX juntos e isoladamente, assim como Chakraborty et al. (2005).

Com relação a experimentos de campo, taxas e padrões de biodegradação dos BTEX foram medidas ao longo de 1000 dias por Cozzareli et al. (2010) usando um microcosmo *in situ* em um aquífero contaminado com petróleo cru sob condições de ferro redução. Entre os BTEX, a ordem de persistência foi: etilbenzeno > benzeno > *m,p*-xileno > *o*-xileno > tolueno. Além disso, foi observada uma fase *lag* antes do

início da degradação do benzeno e do etilbenzeno. Embora a população do aquífero já estivesse adaptada aos BTEX, a degradação de substratos mais favoráveis aconteceu primeiramente. Já Wiedemeier et al. (1996) calcularam as taxas de biodegradação dos BTEX *in situ* e observaram que até mesmo o benzeno obteve uma taxa de remoção similar com a dos demais monoaromáticos, e isto não foi ao encontro dos resultados obtido em outros locais com uso de biorremediação. Este fato sugere que as vias e padrões de biodegradação de BTEX são realmente específicos de cada local.

Isoladamente, o etanol é rapidamente biodegradado sob condições aeróbias e anaeróbias (SCHAEFER et al., 2010b; SCHAEFER et al., 2010a). Em misturas com BTEX, o etanol pode alterar as taxas de biodegradação dos compostos. Schaefer et al. (2010a) concluíram que o etanol é passível de incrementar a taxa de degradação dos TEX acelerando o crescimento dos degradadores destes compostos, entretanto a adição de etanol diminui a taxa de biodegradação dos três hidrocarbonetos. Da Silva et al. (2005) observaram em experimentos com colunas de fluxo contínuo que a rápida biodegradação do etanol diminuiu o oxigênio dissolvido, estimulou a metanogênese e diminuiu a eficiência de remoção dos BTEX, que era maior que 99% na ausência de etanol para uma média de 32% para o benzeno, 49% para o tolueno, 77% para o etilbenzeno e 30% para os xilenos após a adição do álcool. Logo, a premissa muito utilizada de que a adição de etanol aumenta a taxa de degradação dos BTEX deve ser interpretada com cuidado já que, em situações reais, os receptores de elétrons podem ser exauridos e o aumento da demanda dos mesmos pode sobrepor os benefícios positivos do incremento da biomassa nas taxas de biodegradação (SCHAEFER et al., 2010a).

2.8 TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO

A aplicação prática dos processos de biodegradação discutidos no item 2.3 para descontaminação de locais impactados por substâncias poluentes é chamada de biorremediação (BEDIENT et al., 1999). Quando os processos que ocorrem naturalmente (como advecção, difusão, sorção, volatilização e degradação biótica e abiótica) são usados para remediar poluentes sem qualquer alteração adicional das características de campo, o processo é descrito como atenuação natural (WIEDEMEIER et al., 1999). Já no caso em que as condições de trabalho em campo sofrem interferências da engenharia, ou seja, há projetos para acelerar a biorremediação dos contaminantes, o processo é

referido como bioestimulação (FAHRADIAN et al., 2008). Na bioestimulação, nutrientes, doadores ou receptores de elétrons têm que ser injetados na subsuperfície, ou consórcios microbianos específicos têm que ser estimulados para criar condições seletivas e/ou estimuladas de crescimento (HOLLIGER et al, 1997; SCOW & HICKS, 2005) para que assim possa se aumentar a taxa de biodegradação de contaminantes (FAHRADIAN et al., 2008; DA SILVA et al., 2005).

Com isto, percebe-se que processos microbiológicos responsáveis pela biodegradação de contaminantes orgânicos na água subterrânea são as forças motrizes por trás da atenuação natural e podem ser aproveitados em tecnologias de aceleração da biorremediação, como a bioestimulação (SCOW & HICKS, 2005). A biorremediação *in situ* sob atenuação natural tem sido utilizada de maneira satisfatória para remoção de poluentes orgânicos, incluindo compostos monoaromáticos (FERNANDES, 2002; SUAREZ & RIFAI, 2002; MACKAY et al., 2006b; FRASER et al., 2008; BATLLE-AGUILAR et al., 2009; NEUHAUSER et al., 2009; KAO et al., 2010), entretanto a biorremediação aplicada em conjunto com técnicas de engenharia é mais rápida e eficiente, conforme resultados de estudos publicados (COSTA et al., 2009; SCHREIBER & BAHR, 2002; CUNNINGHAM et al., 2001).

Um ponto importante a ser avaliado em projetos de biorremediação é que, sob condições naturais, o oxigênio dissolvido pode ser exaurido devido à degradação dos contaminantes e, com isto, causar uma carência de receptores de elétrons. Neste caso, a biodegradação aeróbia provavelmente será mais relevante à montante, à jusante e nas porções diluídas e extremas da pluma onde as condições aeróbias podem ter sido restabelecidas (SCHAEFER et al., 2010b). Já nas demais regiões da pluma de contaminação, os processos anaeróbios de biodegradação seriam mais relevantes, fato que justifica o uso de outros receptores de elétrons, como nitrato, na aplicação da bioestimulação em cenários de remediação. A injeção de nitrato pode aumentar a atividade desnitrificante de modo a alcançar uma degradação satisfatória de compostos de petróleo na água subterrânea que está exaurida de oxigênio e outros receptores de elétrons (JIN et al., 2010), sendo um alternativa viável até mesmo para biorremediação *in situ* (COSTA et al., 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar como a proporção dos substratos influencia na atenuação da mistura do etanol, do acetato e dos BTEX *in situ*, este estudo teve como base os dados temporais de concentração destes compostos em águas subterrâneas em duas áreas experimentais que simulam tecnologias de biorremediação: uma, a atenuação natural monitorada; e outra, a bioestimulação com injeção de nitrato. Além disso, também se fez uso da concentração de receptores de elétrons, de subprodutos metabólicos e do potencial de oxi-redução. Os procedimentos de coleta, armazenagem e análise da água subterrânea contaminada foram realizados por Costa (2008), Nunes (2006), Fernandes (2002) e pela equipe do laboratório REMAS e podem ser conferidos nos trabalhos dos autores citados.

3.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS

Ambas as áreas experimentais de estudo estão localizadas no sul da cidade de Florianópolis (estado de Santa Catarina), no bairro Tapera, na Fazenda Experimental da Ressacada cuja propriedade é da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Em cada área foi realizado um derramamento controlado no ambiente subsuperficial de 100 litros de gasolina com etanol junto com brometo de potássio (KBr) que serviu como traçador (substância que não sofre nem biodegradação nem retardo). Para o monitoramento do movimento dos constituintes poluentes do combustível derramado, poços de monitoramento (PM) multiníveis subterrâneos foram instalados na direção do fluxo preferencial da água subterrânea de onde foi possível a extração da amostra líquida contaminada em variadas profundidades. Cada ponto de amostragem do poço multinível é composto por uma mangueira fina de PEBD (polietileno de baixa densidade) diferenciada por cores relacionadas à determinada profundidade (Figura 3.1-B). As áreas experimentais foram cobertas por lona plástica e brita para simular uma superfície impermeabilizada (como um posto de combustível) e diminuir as perdas por volatilização dos compostos. Já que estruturalmente as áreas experimentais são semelhantes, a Figura 3.1-A exemplifica uma configuração das áreas de estudo.



Figura 3.1 – Exemplo de uma área experimental (A) e ampliação de um poço de monitoramento cujas mangueiras identificadas com cores diferenciam cada nível de amostragem (B).

3.1.1 Atenuação natural monitorada

Esta área de estudo foi implantada por Fernandes (2002) com objetivo de demonstrar que a atenuação natural monitorada é uma solução eficiente para remediar áreas impactadas com gasolina e etanol. Para isto, foi realizado o derramamento controlado de 100 litros de gasolina com 24% de etanol em uma abertura feita no solo chamada de fonte de contaminação⁹ em 1º de dezembro de 1998. A área é composta atualmente por 51 poços multiníveis (Figura 3.2) com as seguintes profundidades em relação à cota do terreno: 1,0; 2,0; 2,5; 3,5 e 4,5 metros. Até o momento, foram realizadas 19 coletas de amostras de água subterrânea contaminada no local, cuja periodicidade variou ao longo dos anos, conforme pode ser conferido na Tabela 3.1.

Parâmetros relacionados à hidrogeologia do local, características do solo e da água subterrânea foram determinados para a área experimental. Com uso de sondagem à percussão e análise granulométrica, o solo foi caracterizado como areia nas camadas superiores e areia fina na subsuperfície com menos de 5% de silte e argila. A condutividade hidráulica média da região é $6,6 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$, valor obtido através de ensaios de carga em níveis variados. A

⁹ Neste experimento a fonte de contaminação não funcionou como um poço de monitoramento.

porosidade efetiva é de 20% e a direção do fluxo da água subterrânea foi determinada através da análise de três piezômetros alocados no entorno da área experimental. O gradiente hidráulico médio do local é de 1,8% e a velocidade intersticial de 2,8 m.ano⁻¹. O solo possui uma baixa concentração de carbono orgânico que varia de 0,06% a 0,12% nas profundidades de 2,0 a 4,0 metros e uma baixa concentração de nutrientes. As características naturais da água subterrânea local foram determinadas antes da contaminação e estão expostas na Tabela 3.2.

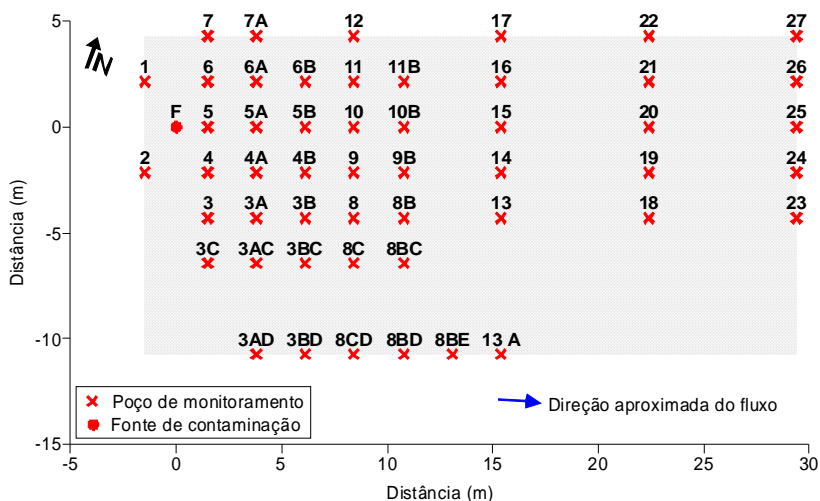


Figura 3.2 – Representação em planta da área experimental da atenuação natural monitorada com seus poços de monitoramento, fonte de contaminação e direção preferencial do fluxo da água subterrânea.

Tabela 3.1 - Distribuição das coletas de monitoramento da água subterrânea na área experimental sob atenuação natural monitorada.

Coleta	Data	Tempo após a liberação do combustível		
		Dias	Meses	Anos
1	Dez/1998	14	0,5	0,0
2	Jan/1999	51	1,7	0,1
3	Mar/1999	113	3,7	0,3
4	Mai/1999	168	5,5	0,5
5	Ago/1999	251	8,3	0,7
6	Out-Nov/1999	328	10,8	0,9
7	Abr/2000	497	16,3	1,4
8	Nov/2000	708	23,3	1,9
9	Ago/2001	974	32	2,7
10	Jan/2002	1127	37,1	3,1
11	Out/2002	1370	45,0	3,8
12	Dez/2003	1821	59,9	5,0
13	Ago/2004	2065	67,9	5,7
14	Jul/2005	2409	79,2	6,6
15	Jul/2006	2774	91,2	7,6
16	Mai-Jun/2007	3109	102,2	8,5
17	Abr-Mai/2008	3467	114,0	9,5
18	Mai/2009	3828	125,9	10,5
19	Jun/2010	4223	138,8	11,6

Tabela 3.2 – Caracterização da água subterrânea antes da contaminação na área experimental sob atenuação natural monitorada.

Variáveis	Valores medidos
Temperatura (°C)	17 – 24
Potencial de oxi-redução (mV)	+32 – +169
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	7 – 8
Nitrato (mg.L ⁻¹)	0,05 – 0,137
Sulfato (mg.L ⁻¹)	0,3 – 4,3
Ferro ferroso (mg.L ⁻¹)	0,0 – 1,64
Fosfato (mg.L ⁻¹)	0,05 – 0,54
Metano (mg.L ⁻¹)	< 0,01

Fonte: Fernandes (2002).

3.1.2 Bioestimulação com injeção de nitrato

Visando avaliar uma tecnologia ativa de remediação com base no preceito de que os processos anaeróbios de biodegradação são de grande relevância, um experimento pioneiro em escala real de bioestimulação com injeção de nitrato para remediação de águas subterrâneas contaminadas com gasolina comercial brasileira com 25% de etanol foi iniciado em 2004 por Costa (2008). Foram liberados, em 22 de dezembro de 2004, 100 litros do combustível a uma profundidade de 1,0 m da cota do terreno. Após 2,5 meses da liberação, iniciou-se a injeção do nitrato a partir de uma solução que continha nitrato de sódio (NaNO_3) e fosfato dihidrógeno de potássio (KH_2PO_4), ou seja, o receptor de elétrons e nutrientes, em seis poços específicos para este fim (Figura 3.3). A injeção foi realizada três vezes por semana durante nove meses e meio à uma taxa de 30 L.dia^{-1} , resultando em uma massa total final de 38.767 gramas de nitrato. A área é composta atualmente por 70 poços multiníveis (Figura 3.3) com as seguintes profundidades em relação à cota do terreno: 2,3; 2,8; 3,8; 4,8 e 5,8 metros, com exceção dos poços de monitoramento 30A, 30B, 31B, 31C e 31D que possuem somente os dois últimos níveis mais profundos¹⁰. Entre estes 70 poços, está inclusa a fonte de contaminação que também foi monitorada. Até o momento, foram realizadas 13 coletas de amostras de água subterrânea contaminada no local, cuja periodicidade pode ser conferida na Tabela 3.3.

Análises para determinação de parâmetros relacionados à hidrogeologia do local, características do solo e da água subterrânea também foram realizadas para esta área experimental. A condutividade hidráulica e a direção do fluxo da água subterrânea foram obtidos através de dados de oito poços piezométricos que rodeiam a área. A condutividade hidráulica foi determinada com uso de ensaios de carga a nível variado e recuperação de poços. O piezômetro mais próximo da área do experimento indicou um valor de condutividade hidráulica de $4,25 \times 10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$. O gradiente hidráulico médio obtido foi de 0,6%. A velocidade da água subterrânea foi estimada por meio do monitoramento do traçador brometo e indicou uma faixa de valores de 5,2 a 6,2 m.ano^{-1} . A direção do fluxo da água subterrânea foi determinada com a construção de mapas potenciométricos gerados pelo modelo matemático SCBR[®] através dos dados de flutuação do nível d'água nos piezômetros.

¹⁰ Os poços de monitoramento 30A, 30B, 31B, 31C e 31D não estão ilustrados na Figura 3.3 por possuírem somente os níveis 4,8 e 5,8.

O solo da área experimental pode ser caracterizado como uma areia fina, pouco argiloso e com baixo teor de matéria orgânica, essa presente na camada superficial do solo. A porcentagem de carbono orgânico presente é menor que 1,2% entre a superfície e 0,5 metros de profundidade e menor que 0,76% entre 0,5 e 1,7 metros de profundidade. A porosidade efetiva média foi determinada através do uso do método da Mesa de Tensão e seu valor foi de 20%. As características naturais da água subterrânea local foram determinadas previamente à contaminação e estão expostas na Tabela 3.4.

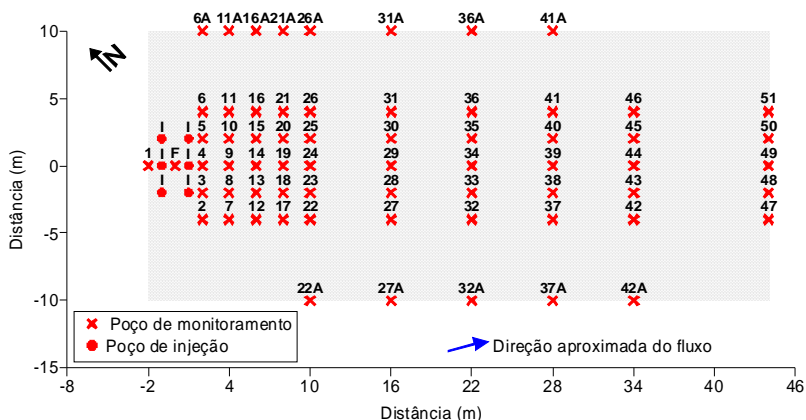


Figura 3.3 - Representação em planta da área experimental da bioestimulação com injeção de nitrato com seus poços de monitoramento, injeção, fonte de contaminação e a direção preferencial do fluxo da água subterrânea.

Tabela 3.3 - Distribuição das coletas de monitoramento de água subterrânea na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato.

Coleta	Data	Tempo após a liberação do combustível		
		Dias	Meses	Anos
1	Jan/2005	34	1,1	0,1
2	Abr/2005	124	4,1	0,3
3	Jun/2005	166	5,5	0,5
4	Out/2005	285	9,4	0,8
5	Jan-Fev/2006	387	13,1	1,1
6	Mai/2006	502	16,5	1,4
7	Set-Out/2006	625	20,5	1,7
8	Jan-Fev/2007	754	24,8	2,1
9	Ago-Set/2007	962	31,6	2,6
10	Fev-Mar/2008	1151	37,8	3,2
11	Set-Nov/2008	1387	45,6	3,8
12	Mar-Abr/2009	1555	51,1	4,3
13	Jun/2010	1969	64,7	5,4

Tabela 3.4 – Caracterização da água subterrânea antes da contaminação na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato.

Variáveis	Valores medidos
Temperatura (°C)	24 – 25
Potencial de oxi-redução (mV)	+517 – +524
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	2,3 – 5,2
Nitrato (mg.L ⁻¹)	0,57 – 1,61
Sulfato (mg.L ⁻¹)	2,87 – 4,44
Ferro ferroso (mg.L ⁻¹)	< 0,1
Fosfato (mg.L ⁻¹)	< 0,01
Metano (mg.L ⁻¹)	< 0,01

Fonte: Costa (2008).

3.2 TRATAMENTO DOS DADOS

Em cada área experimental, a partir dos dados de concentração dos BTEX e do etanol obtidos em laboratório para todas as coletas, foi feito um levantamento de qual poço de monitoramento pertencente à linha de poços imediatamente à jusante da fonte possuía as maiores

concentrações de BTEX e etanol. Para isto, foi realizada uma somatória das concentrações em todos os níveis de cada poço ao longo do tempo e verificado qual obteve a maior concentração final. Para o poço com maior concentração de cada área experimental, foi analisado um nível fixo que possuiu geralmente a maior concentração em todas coletas. Os poços de monitoramento escolhidos para este estudo foram o PM 4 localizado a 2,6 metros da fonte de contaminação na profundidade de 2,0 metros na área sob atenuação natural; e o PM 4 localizado a 2,0 metros da fonte de contaminação na profundidade de 2,3 metros na área sob bioestimulação com injeção de nitrato.

As concentrações de etanol e acetato foram somadas em alguns casos e tratadas como um único substrato, já que o acetato gerado é proveniente predominantemente da biodegradação do etanol (conforme item 2.2). A partir dos dados temporais de concentração nos poços e profundidades acima expostos, foram calculadas as constantes de atenuação e os tempos de meia-vida dos substratos (detalhados no subitem seguinte) e construídos gráficos ao longo do tempo para a concentração e para a proporção de cada substrato na mistura. Para os gráficos de concentração e proporção, os valores de concentração foram transformados para carbono orgânico total (COT) por litro a fim de se obter uma unidade comum a todos os substratos e poder realizar as comparações cabíveis. Dados de oxigênio dissolvido (OD), nitrato (NO_3^-), ferro ferroso (Fe^{+2}), sulfato (SO_4^{-2}), metano (CH_4) e potencial de oxi-redução (POR) foram plotados ao longo do tempo para cada área experimental a fim de verificar quais rotas de biodegradação atuaram na atenuação dos contaminantes.

3.2.1 Determinação da constante de atenuação e tempo de meia-vida

A taxa de uma reação de biodegradação pode ser expressa pela lei de ação das massas que afirma que a taxa é proporcional ao produto da constante de biodegradação k pela concentração do reagente C (Equação 3.1). A velocidade na qual a biodegradação ocorre é determinada pela ordem da reação (n) (CHAPRA, 2008).

$$\frac{dC}{dt} = -kC^n \quad (3.1)$$

Neste trabalho foram utilizadas reações cujo expoente da equação 3.1 é um. Para uma reação de ordem 1, considerando $t_0=0$, a

equação 3.1 integrada resultará na equação 2.3 exposta primeiramente na revisão bibliográfica (seção 2.6.3):

$$C = C_0 e^{-kt}$$

Neste trabalho, o cálculo de k não isola somente os processos de biodegradação ocorridos, mas todos os mecanismos de atenuação dos contaminantes no meio subsuperficial (ou seja, mais advecção, difusão, sorção, volatilização e degradação abiótica). Logo, k é chamado de constante de atenuação. As constantes de atenuação de primeira ordem são frequentemente utilizadas para avaliar processos de atenuação em águas subterrâneas contaminadas (NEWELL et al., 2002; SUAREZ & RIFAI, 2004; NEUHAUSER et al., 2009; KAO et al., 2010). Um dos tipos de constante de atenuação é a pontual, obtida através da linearização da equação 2.3, sendo o k_{ponto} igual à inclinação da reta do logaritmo natural da concentração pelo tempo em um determinado ponto (NEWELL et al., 2002). Neste estudo, o local para medição do k_{ponto} foi o poço e o nível anteriormente expostos. A constante de atenuação do etanol não foi calculada devido ao seu comportamento diferente dos BTEX na água subterrânea. Mesmo sem biodegradação, a concentração do álcool diminuiria com os processos advectivos de transporte já que ele é totalmente solúvel. O foco do cálculo da constante de atenuação foi avaliar, principalmente, processos de biodegradação envolvidos na atenuação dos substratos. A análise de regressão para obtenção do k foi feita considerando um intervalo de 95% de confiança. Para fins de comparação dos BTEX com o etanol, as constantes de atenuação foram transformadas em tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que é um parâmetro que indica o tempo necessário para que a concentração do substrato caia à metade do valor inicial (CHAPRA, 2008):

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3.2)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com bases nos dados de concentração dos substratos etanol, acetato e BTEX medidos em um poço de monitoramento de duas áreas experimentais expostas aos processos de biorremediação atenuação natural monitorada (ANM) e bioestimulação com injeção de nitrato (BIN), foi possível fazer uma análise da interação dos múltiplos substratos focando em como a proporção destes compostos influenciou na sua biodegradação. Como já dito anteriormente (seção 3.2.1), os valores das concentrações medidas dos substratos não isolam somente os processos de biodegradação. Contudo, como os processos biológicos de degradação predominam no ambiente subsuperficial (KAO et al., 2010; BATTLE-AGUILAR et al., 2009; FRASER et al., 2008; FERIS et al., 2008), a biodegradação é considerada o principal mecanismo de atenuação neste estudo. Diferentemente de outros trabalhos feitos em laboratório com o foco na proporção de substratos, este estudo foi realizado *in situ* sob as complexas condições ambientais. Nas seções seguintes, serão apresentados, para os substratos avaliados, gráficos temporais das concentrações e da fração de cada um na mistura seguida por uma análise de resultados da literatura. Em seguida, são expostas as constantes de atenuação e os tempos de meia-vida dos compostos BTEX individuais acompanhada por uma análise de quais vias de biodegradação atuaram na atenuação dos BTEX. Por fim, uma proposição de um modelo conceitual da biodegradação da gasolina comercial é apresentada. Os valores das concentrações dos substratos, receptores de elétrons, subprodutos e demais parâmetros utilizados podem ser conferidos nos Anexos A e B.

4.1 INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO NA BIODEGRADAÇÃO DO ETANOL, ACETATO E BTEX

A presença de etanol na gasolina comercial brasileira levou a realização de estudos que avaliaram o comportamento da biodegradação desta mistura de álcool com hidrocarbonetos. A partir do momento que ocorre o derramamento de gasolina comercial em um aquífero, além da presença do etanol e dos hidrocarbonetos, o subproduto metabólico orgânico acetato é formado (Figura 4.1) via biodegradação dos contaminantes. Em ambas as áreas, houve produção de acetato, contudo, no poço de monitoramento do experimento sob atenuação natural monitorada (ANM), a quantia formada (23 mg COT.L^{-1} ou 102 mg.L^{-1})

foi superior àquela presente no poço do experimento sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN) (2,9 mg COT.L⁻¹ ou 12.6 mg.L⁻¹), principalmente devido aos diferentes processos de biodegradação predominantes em cada experimento. Assim, o acetato, que provem predominantemente da biodegradação do etanol (NUNES, 2006; COSTA, 2008), é outro importante substrato disponível e, como está presente em concentrações similares a dos BTEX, sua presença deve ser levada em consideração. Para fins de comparação com os BTEX, a concentração de acetato é somada com o etanol em alguns casos (Figura 4.1).

Em ambos os processos de biorremediação, a atenuação do etanol ocorreu primeiramente, e, somente após o decaimento significativo da concentração do álcool, iniciou-se a biodegradação dos BTEX. Na área sob ANM, a persistência do etanol é maior ao longo do tempo, ou seja, leva um tempo maior para ocorrer a atenuação, e o mesmo ocorre para os BTEX. Já na área sob BIN, a atenuação do etanol ocorre rapidamente e, após o seu decaimento, a concentração dos BTEX diminui igualmente de modo veloz. Ou seja, há dois cenários em que a biodegradação dos BTEX só se inicia após o decaimento do etanol, contudo, dependendo da técnica de biorremediação usada, a taxa de biodegradação ocorre em velocidades diferentes. A explicação das diferentes taxas de biodegradação em cada área será detalhada na seção 4.4, onde são discutidos os diferentes processos de biodegradação atuantes. Já o padrão de biodegradação em que o etanol é primeiramente atenuado seguido pelos BTEX é ligado ao fato do álcool estar em concentrações muito superiores a dos BTEX. A partir do momento em que ocorrer o contato da gasolina comercial com um aquífero, as concentrações dissolvidas dos compostos BTEX e de etanol tendem a ser muito discrepantes (Figura 4.1). A concentração de etanol pode atingir valores em torno de 2000 mg.L⁻¹ (equivalente a 1100 mg COT.L⁻¹) enquanto que os BTEX atingem um máximo de aproximadamente 40 mg.L⁻¹ (equivalente a 38 mg COT.L⁻¹). O etanol, que esteve presente em concentrações quase 30 vezes maiores que a dos BTEX (Figura 4.1), retardou a biodegradação dos monoaromáticos e só a partir do momento que a diferença entre as concentrações caiu (com o consumo do etanol) observou-se a biodegradação dos hidrocarbonetos. O etanol foi mais rapidamente consumido, ou seja, possuiu uma maior taxa de biodegradação que os BTEX. Logo, o substrato com maior concentração deteve a taxa de biodegradação mais elevada. Analisando a Figura 4.1, nota-se como as concentrações dos BTEX são pequenas em relação as de etanol.

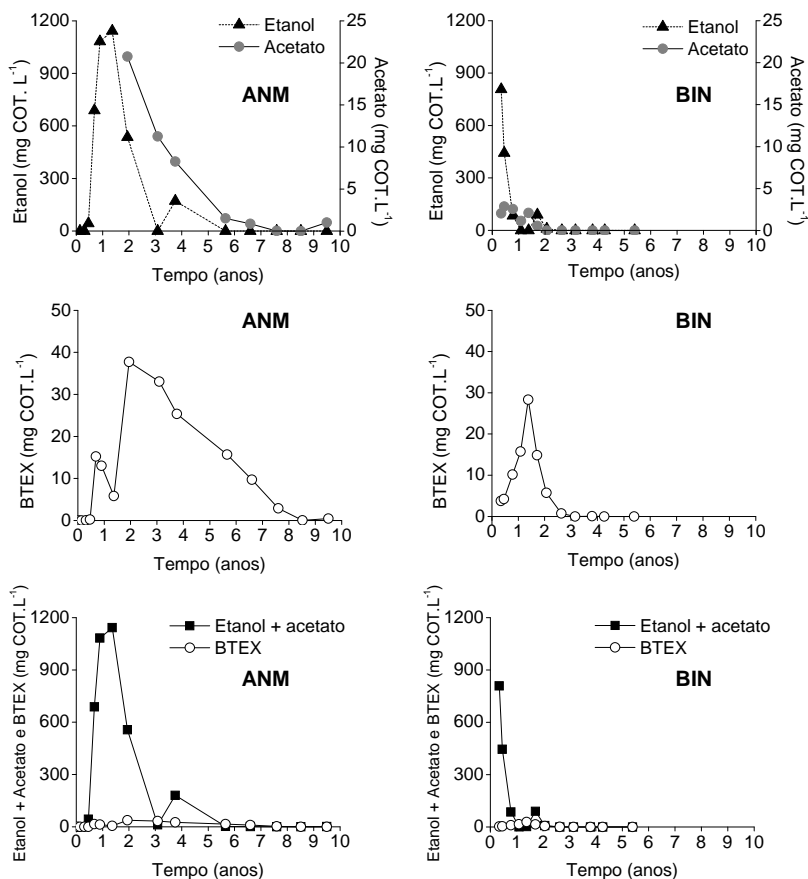


Figura 4.1 – Concentração de etanol, acetato e BTEX ao longo do tempo nos poços de monitoramento 4 nas áreas experimentais sob atenuação natural monitorada (ANM) a 2,0 metros de profundidade e sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN) a 2,3 metros de profundidade. Destaque para as diferentes escalas do etanol e acetato nos primeiros gráficos. Nos últimos gráficos as concentrações de etanol e acetato foram somadas a fim de compará-las com as dos BTEX.

Com posse da Figura 4.2 fica possível visualizar como se dá a distribuição da proporção¹¹ do etanol + acetato e dos BTEX considerando uma mistura destes substratos em cada área experimental.

¹¹ Esta fração foi calculada com os valores de concentração em carbono orgânico total (COT) para cada substrato.

Aqui, etanol e acetato são tratados como um único substrato já que os efeitos do etanol na biodegradação dos BTEX persistem após o seu esgotamento devido ao acúmulo de acetato (CORSEUIL et al., 2011). Observa-se que os hidrocarbonetos tendem a aumentar sua fração na mistura com a atenuação do etanol e acetato. Na área sob ANM, a fase de decaimento das concentrações dos BTEX tende a ocorrer no momento em que a fração de etanol + acetato diminui (3 anos) e o mesmo ocorre na área sob BIN, porém em um tempo menor (1,7 anos) (Figura 4.2). Ou seja, uma atenuação significativa dos BTEX tende a ocorrer quando as concentrações de etanol + acetato caem a níveis onde a proporção dos substratos seja menos discrepante. O consumo do etanol ocorre primeiramente porque o álcool estava presente em uma proporção muito superior a dos BTEX, resultando em uma maior taxa de biodegradação. A partir do momento em que ocorre o consumo e diminuição da fração de etanol (e também de seu produto metabólico acetato, se em concentrações altas comparadas com a dos BTEX), a biodegradação dos monoaromáticos se torna mais evidente devido ao aumento da fração dos BTEX na mistura. Freitas et al. (2011) realizou um experimento *in situ* com gasolina contendo 0%, 10% e 95% de etanol e foi percebido que maiores frações de etanol diminuíram a taxa de biodegradação de BTEX embora não tenha sido observado impacto significativo na mistura com 10% de etanol. Deste modo, o impacto na degradação dos BTEX dependeu, dentre outros fatores, da fração de etanol presente. Contudo, Lawrence et al. (2009) fazendo uso de microcosmos com misturas de BTEX com 10, 50 e 90% de etanol em solos não previamente contaminados, obtiveram a maior taxa de remoção dos BTEX quando o etanol compunha metade da mistura.

Em função da baixa solubilidade em água dos compostos BTEX presentes na gasolina comercial, em torno de 38 mg de COT.L⁻¹ (FERNANDES, 2002), possivelmente, concentrações de etanol e/ou acetato acima destes valores deverão inibir a degradação dos contaminantes aromáticos mais tóxicos por diminuírem a fração de BTEX na mistura. Visto que a partir do momento em que ocorrer um derramamento subsuperficial de gasolina comercial a proporção de etanol na água subterrânea é muito superior a dos BTEX, é esperado que quando a concentração de etanol e/ou seus subprodutos orgânicos atingirem um valor próximo à saturação dos monoaromáticos, a diferença na taxa de biodegradação entre os compostos caia. Logo, concentrações de etanol e/ou acetato superiores a 38 mg de COT.L⁻¹ são passíveis de fazer com que os BTEX sejam removidos em taxas mais lentas do que aconteceria se a concentração dos substratos fossem

parecidas, isso devido ao efeito inibitório causado pelas diferentes proporções.

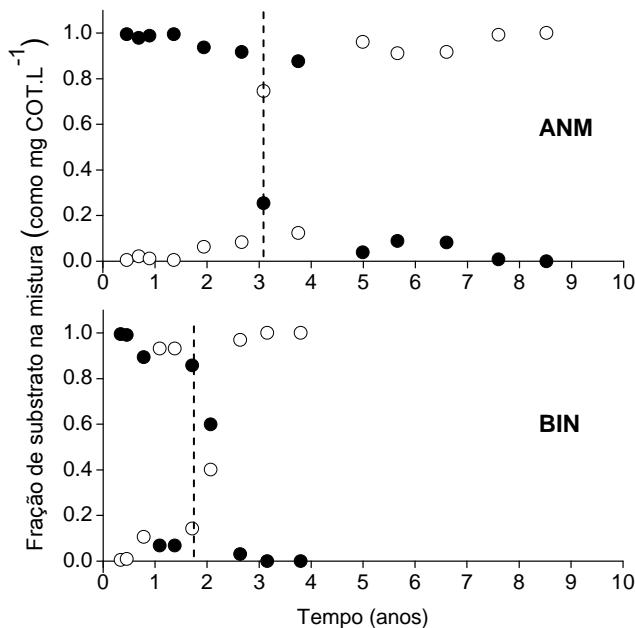


Figura 4.2 – Fração dos substratos etanol + acetato (●) e BTEX (○) em relação à mistura dos três (todos como carbono orgânico total (COT)) ao longo do tempo nos poços de monitoramento 4 nas áreas experimentais sob atenuação natural monitorada (ANM) a 2,0 metros de profundidade e sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN) a 2,3 metros de profundidade. A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX.

A ocorrência da biodegradação do etanol anterior a dos BTEX pode ser explicada pelo fato do álcool ser um composto mais simples de ser degradado pelos micro-organismos que os hidrocarbonetos monoaromáticos, os quais possuem sua estrutura baseada no anel benzênico. Contudo, estudos feitos com a mistura de tolueno e etanol em reatores de fluxo contínuo mostraram que a degradação de cada composto esteve ligada a sua proporção na mistura e independeu da natureza química do substrato. Quando fornecidos separadamente, o etanol foi mais rapidamente biodegradado que o tolueno e, quando postos em mistura, a relação de proporcionalidade prevaleceu (LOVANH et al., 2002). Este padrão de biodegradação proporcional pode ser explicado pelo termo *diluição do fluxo metabólico*, criado por

Lovanh & Alvarez (2004) e é apontado como um dos principais fatores a alongar plumas de benzeno na presença de etanol (GOMEZ et al., 2008). O fluxo metabólico de um composto pode ser definido como a taxa em que ele é metabolizado por unidade de biomassa (gramas de substrato.hora⁻¹.gramas de células⁻¹). O termo descreve uma forma de inibição não competitiva em que a taxa de utilização de um substrato diminui devido o metabolismo de outro. Uma das causas da diminuição do metabolismo de um substrato é a presença de maiores proporções de outros substratos. A maior concentração de etanol em relação aos BTEX faz com que ele esteja mais disponível para atuação da biomassa e, assim, diminui a probabilidade de um micro-organismo entrar em contato e assimilar os BTEX, resultando em uma menor taxa de degradação. A partir do momento em que as concentrações dos substratos se equivalham, os micro-organismos têm as mesmas chances de utilizar todos os substratos. Assim, o uso de um substrato é proporcional a sua relativa disponibilidade. Isso seria uma explicação do porquê da utilização do etanol e do acetato em detrimento dos BTEX em uma área contaminada por gasolina comercial.

Autores que trabalharam com misturas de substratos frequentemente explicam a taxa de remoção mais rápida de um composto em relação aos demais pelo fato de ele ser preferencialmente biodegradado (LEAHY et al., 2003; OWSIANIAK et al., 2009). Essa explicação também se aplica para mistura do etanol com hidrocarbonetos, onde se atribui a rápida degradação do álcool ao fato de ele servir como uma fonte de carbono mais fácil de ser biodegradada pelos micro-organismos (ALVAREZ & HUNT, 2002; DA SILVA et al., 2005; MACKAY et al., 2006b; NUNES & CORSEUIL, 2007; LAWRENCE et al., 2009; CORSEUIL, et al., 2011). Contudo, com os resultados aqui obtidos, percebe-se que o consumo preferencial do etanol nada mais é que uma degradação proporcional, já que ele está presente em uma fração muito maior que a dos BTEX na gasolina comercial brasileira e, assim, será mais rapidamente biodegradado. Os resultados obtidos por Freitas et al. (2011) corroboram para este uso proporcional, já que em um experimento *in situ* com gasolina contendo 0%, 10% e 95% de etanol, foi percebido que maiores frações de etanol diminuíram a taxa de biodegradação de BTEX. Isso introduz uma nova abordagem ao campo de interação de múltiplos substratos, especificamente ao caso da mistura de etanol e gasolina, já que explica por que motivo o etanol é preferencialmente biodegradado.

Alguns trabalhos em laboratório com uso de reatores observaram esta biodegradação proporcional de múltiplos substratos, onde o

composto com maior participação foi mais rapidamente biodegradado. Com uma mistura de galactose e glicose em um reator de fluxo contínuo, maiores proporções de um açúcar resultaram em uma maior concentração do mesmo em estado estacionário efluente do reator. Além disso, mesmo se a cultura de micro-organismos usada estivesse sido exposta primeiro a galactose ou glicose o padrão de biodegradação foi o mesmo (LENDENMANN et al., 1996). Assim, explicar o decaimento dos BTEX em ambas as áreas experimentais devido ao aumento da biomassa pela biodegradação do etanol, como visto em outros trabalhos (DA SILVA & ALVAREZ, 2002; LOVANH et al. 2002; FERIS et al., 2008; GOMEZ et al., 2008), não alteraria o padrão de biodegradação ligado a proporcionalidade de cada substrato. Contudo, não se pode descartar a possibilidade que um aumento na biomassa devido ao consumo do etanol pode levar a maiores taxas de biodegradação dos BTEX. Em um reator em batelada com uma mistura dos BTEX, Bielefeldt & Stensel (1999) observaram que a taxa de biodegradação de cada hidrocarboneto na mistura foi uma fração da sua correspondente taxa de biodegradação quando testado sozinho. Maiores taxas de biodegradação foram observadas quando o composto compunha uma maior fração do total de BTEX degradado. Dou et al. (2008a) concluíram, com uso de BTEX em solos, que mesmas proporções de cada monoaromático na mistura levaram a degradação simultânea para concentrações indetectáveis em 10 dias. Ou seja, frações semelhantes levaram a mesmas taxas de biodegradação para cada substrato.

4.2 ANÁLISE DE RESULTADOS DA LITERATURA ONDE NÃO SE USOU O FATOR PROPORCIONALIDADE NA EXPLICAÇÃO DAS DIFERENTES TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO DE MÚLTIPLOS SUBSTRATOS

Uma comparação com outros padrões de biodegradação de múltiplos substratos provenientes de diversos trabalhos disponíveis na literatura é realizada a fim de ligar os resultados com a relação de proporcionalidade. É possível perceber que em muitos casos, embora não justificados pelos autores, a diferença de proporção dos substratos levou a diferentes taxas de biodegradação.

Vários estudos já foram realizados na avaliação da biodegradação de múltiplos substratos e diversas explicações são dadas para os variados padrões de biodegradação ocorridos, sendo a principal, o efeito inibitório de determinado(s) substrato(s) na biodegradação dos demais. Uma análise dos resultados destes trabalhos leva a acreditar que esta

inibição é devido ao fator proporção. Em microcosmos, Corseuil et al. (1998) observam que maiores concentrações de etanol aumentavam a fase *lag* dos BTEX. Possivelmente, esta fase *lag* poderia ser explicada pela diminuição da fração de BTEX com o aumento da concentração etanol, o que resultaria em menores taxas de biodegradação. Em outro trabalho, a adição de etanol em altas concentrações ($11.000 \text{ mol.L}^{-1}$) em microcosmos com BTEX ($330 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) diminuiu a taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos tanto em condições aeróbias (SCHAEFER et al., 2010b) quanto aneróbias (SCHAEFER et al., 2010a), e isso possivelmente é também ligado a diminuição da proporção dos BTEX. Este mesmo cenário foi observado em colunas de fluxo contínuo após a adição de etanol (DA SILVA et al., 2005). Em experimentos de campo com misturas de hidrocarbonetos na presença e ausência de etanol, a presença do álcool resultou em maiores concentrações de benzeno e provocou um maior alongamento das plumas de contaminação (MACKAY et al. 2006). De modo análogo aos resultados obtidos em laboratório, este comportamento pode ser explicado pelo fator da proporcionalidade. A presença do etanol diminuiu a fração de benzeno levando a uma biodegradação mais lenta, e, assim, permitindo a migração dos contaminantes para locais mais distantes.

Não só na mistura de etanol e BTEX a proporção dos substratos foi importante, embora não citada pelos autores. Com a mistura de naftaleno a outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, à medida que se aumentou o número de hidrocarbonetos na mistura, a biodegradação do naftaleno foi inibida (KNIGHTES & PETERS, 2006), e isto provavelmente foi devido à introdução de outros substratos que diminuíram a fração do naftaleno e, consequentemente, a sua taxa de biodegradação. Lin et al. (2007) obtiveram a diminuição da taxa de biodegradação do MTBE (sigla em inglês para metil 1,1-dimetil-éter) com a adição de BTEX, de modo que a máxima taxa de biodegradação foi obtida com MTBE sozinho. É de se considerar que a máxima taxa de biodegradação de um composto acontece quando ele é fornecido sozinho e tende a diminuir à medida que outros substratos são adicionados. Contudo, há estudos onde não foi possível relacionar as diferentes frações de substratos com a taxa de biodegradação. Em reatores de batelada, a biodegradação do fenol presente em maiores concentrações em misturas binárias com tolueno e benzeno só começou quando os hidrocarbonetos foram consumidos (REARDON et al., 2002). Deste modo, deve-se ter cautela a generalizar um padrão de

biodegradação de múltiplos substratos para qualquer mistura de compostos.

Uma última observação é feita com relação a resultados de estudos com múltiplos substratos que apontam a biodegradação simultânea de substratos em baixas concentrações (todos utilizados concomitantemente) e sequencial em altas concentrações (BUCHELI-WITSCHERL et al., 2009; DOU et al., 2008a; RÜEGG et al., 2007; LENDENMANN & EGLI, 1998). Dou et al. (2008a) em um experimento com uso dos BTEX em solos observaram que quando a concentração inicial dos BTEX no solo foi 30 mg.kg^{-1} (5 mg.kg^{-1} de cada substrato), todos os hidrocarbonetos foram degradados simultaneamente. Maiores concentrações iniciais fizeram com que cada BTEX fosse degradado em taxas diferentes, principalmente o benzeno e os *o*- e *p*-xilenos. Para frações iguais de cada BTEX, menores concentrações iniciais não causaram efeito inibitório aparente, ao passo que maiores concentrações inibiram a degradação destes substratos. Deste modo, a relação de proporcionalidade seria válida para concentrações relativamente baixas dos substratos com frações iguais na mistura, enquanto que em altas concentrações o uso sequencial dos substratos mais favoráveis ao crescimento microbiano ocorreria. Como a biomassa estaria exposta a várias opções de alimentos em grandes quantidades, ela preferiria utilizar aquele que fosse mais favorável para ela. Contudo, neste estudo, a fração de etanol foi bem superior a dos BTEX, de modo que os micro-organismos tinham uma probabilidade muito maior de assimilar o álcool que os hidrocarbonetos, evidenciando a biodegradação proporcional.

4.3 CONSTANTES DE ATENUAÇÃO E TEMPOS DE MEIA-VIDA

O cálculo da constante de atenuação (k) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) dos BTEX permitiu esclarecer a dependência da concentração de um substrato para sua atenuação no meio. Como explicado em 3.2.1, não foi calculado o k do etanol por se tratar de um contaminante de comportamento diferente no meio subsuperficial em relação aos BTEX. O etanol é um combustível totalmente solúvel e, deste modo, os processos de transporte no aquífero (principalmente a advecção) têm um peso grande na sua atenuação. Mesmo sem ocorrência da biodegradação, o etanol passaria pelo poço de estudo devido aos processos advectivos, alcançando um pico de concentração e, em seguida, desaparecendo. Já os BTEX compõem uma fonte de

contaminação contínua, pois são pouco a pouco solubilizados do NAPL. Como o foco é a biodegradação dos contaminantes, a constante de atenuação foi calculada só para os BTEX já que o comportamento do etanol no meio subterrâneo é muito afetado pelo transporte. Admitiu-se que a biodegradação é o principal fator influente no k , já que estudos em campo mostraram que a constante de biodegradação dos BTEX foi em média 80% do valor da constante de atenuação (KAO et al., 2010).

As constantes de atenuação para cada composto BTEX apresentaram-se iguais para cada área exposta às mesmas condições, conforme pode ser conferido na Tabela 4.1. Levando-se em consideração o desvio padrão, as constantes de atenuação para uma mesma área experimental são estatisticamente iguais, ou seja, elas se situam dentro da mesma faixa de valores mínimos e máximos. Além disso, os valores aqui obtidos pontualmente para os BTEX na área sob ANM são similares com os obtidos em estudos anteriores para toda área experimental através do decaimento da massa total (Corseuil et al., 2011). Assim, visto que o cálculo de k para o etanol em um ponto não é representativo, usou-se o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) calculado por Corseuil et al. (2011) na área sob ANM a fim de compará-lo com o tempo de meia-vida dos BTEX. A massa de etanol segue um decaimento de ordem zero com um tempo de meia vida de 1,10 a 2,36 anos, que é uma faixa de valores similares às obtidas para os BTEX (Tabela 4.1). Assim, com base nos tempos de meia-vida, percebe-se que o etanol e os hidrocarbonetos monoaromáticos possuem constantes de atenuação semelhantes. Se o valor de k para substratos em uma área exposta às mesmas condições é um valor constante e a taxa de atenuação de primeira ordem de um substrato pode ser descrita como exposto em 3.2.1 por $\frac{dc}{dt} = -kC$, a taxa de variação da concentração de um substrato ao longo do tempo dependerá somente da sua concentração. Considerando que os processos de biodegradação predominam na atenuação dos contaminantes, a taxa de biodegradação em um mesmo ambiente depende da concentração de um composto. Logo, substratos presentes em maiores concentrações são mais rapidamente biodegradados e os com menores concentrações possuem uma taxa de biodegradação mais lenta. Esse fato que corrobora com o observado nas duas áreas experimentais, onde o etanol, por possuir concentração mais elevada que a dos BTEX, foi mais rapidamente atenuado. Contudo, vale ressaltar que maiores concentrações de substratos podem ser tóxicas à biomassa e, deste modo, não resultar em maiores taxas de biodegradação. Dou et al. (2008a) realizaram um estudo com BTEX em

solo e, para certas faixas de concentrações, a taxa de degradação dos BTEX aumentou com o incremento da concentração inicial. Após 100 mg.kg de solo⁻¹ de BTEX, as taxas de degradação decaíram indicando que maiores concentrações iniciais destes substratos podem ser tóxicas e inibir a capacidade de degradação. Além dos BTEX, toxicidade também foi observada em microcosmos que continham mais que 6% v/v de etanol puro, inibindo a comunidade microbiana (NELSON et al., 2010).

Na área sob atenuação natural monitorada, os valores de k foram menores que os obtidos para a área sob bioestimulação com injeção de nitrato (Tabela 4.1). Deste modo, o etanol e acetato foram mais lentamente atenuados e, assim, mantiveram por mais tempo maior proporção na mistura de substratos, influenciando a remoção dos BTEX que compuseram uma menor fração da mistura por um período igualmente maior. O contrário foi observado na área sob bioestimulação, onde a disparidade entre as concentrações de etanol e acetato e a dos BTEX foram diminuídas mais rapidamente e, assim, houve uma remoção mais veloz dos contaminantes. O fato da velocidade da água subterrânea ser diferente em cada área (aproximadamente 2,8 m.ano⁻¹ na área sob ANM e 5,7 m.ano⁻¹ na área sob BIN) é capaz de ter influenciado no maior valor de k na área sob BIN, onde o transporte pode ter tido um peso maior. Embora a velocidade seja duas vezes maior na área sob BIN, os valores de k foram quase 10 vezes maiores, sendo um indício que os processos de biodegradação tiveram uma grande participação na atenuação. Além disto, haja vista que ambas as áreas possuem valores semelhantes e baixos de carbono orgânico, os processos de sorção não causariam disparidades nos valores das constantes de atenuação em cada área experimental. Deste modo, com base nos valores de k para os BTEX pode-se afirmar que eles foram atenuados mais rapidamente na área sob BIN que na área sob ANM, devido principalmente aos diferentes processos de biodegradação que ocorreram em cada experimento, cujas explicações pertinentes são feitas na seção sobre a biodegradação dos hidrocarbonetos (seção 4.4).

Tabela 4.1 – Constantes de atenuação de primeira ordem (k) dos BTEX individuais para os poços de monitoramento 4 na profundidade 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato.

Experimento	Substrato	Período^(a) (anos)	k (ano⁻¹)	t_{1/2} (ano)	n^(b)	R²	Valor p
Atenuação natural monitorada	Benzeno	1,9 a 7,6	0,36 - 1,08	0,64 - 1,93	6	0,89	0,01
	Tolueno	1,9 a 6,6	0,16 - 0,44	1,58 - 4,33	5	0,94	0,01
	Etilbenzeno	3,1 a 7,6	0,20 - 0,46	1,51 - 3,47	5	0,95	0,00
	Xilenos	3,1 a 7,6	0,14 - 0,42	1,65 - 4,95	5	0,93	0,01
	Benzeno	1,4 a 2,6	0,83 - 4,85	0,14 - 0,84	4	0,95	0,03
	Tolueno	1,4 a 2,6	2,17 - 4,37	0,16 - 0,32	4	0,99	0,01
Bioestimulação com injeção de nitrato	Etilbenzeno	1,4 a 2,6	2,06 - 3,10	0,22 - 0,34	4	1,00	0,00
	Xilenos	1,4 a 2,6	2,04 - 3,00	0,23 - 0,34	4	1,00	0,00

Notas: ^(a)Correspondente ao decaimento das concentrações após a liberação do combustível no meio.

^(b)Quantidade de dados na regressão.

Estudos com experimentos em campo que avaliaram processos de biorremediação frequentemente calculam as constantes de atenuação dos contaminantes. Não foram encontrados na literatura valores de k em experimentos sob bioestimulação *in situ*, assim, a seguir é feita uma comparação com estudos realizados sob atenuação natural. Destaca-se que, no geral, os experimentos, além de não possuírem etanol, foram realizados em locais onde a água subterrânea possuía velocidades superiores e temperaturas menores ao observado nos experimentos da Fazenda da Ressacada. Em um aquífero contaminado com alcatrão de carvão sob condições mais redutoras (ausência de oxigênio e nitrato), as taxas de atenuação *in situ* foram determinadas com os seguintes valores para os compostos BTEX: 0,73 ano⁻¹ para o benzeno; 1,24 ano⁻¹ para o tolueno; 0,77 ano⁻¹ para o etilbenzeno; e 0,91 ano⁻¹ para o *o*-xileno (BLUM et al., 2009), valores superiores aos da área sob ANM. Neuhauser et al. (2009) estudaram a água subterrânea de um aquífero raso e arenoso contaminada por uma indústria de alcatrão e obtiveram para o tolueno um valor médio de k de 0,33 ano⁻¹. Já Kao et al. (2010), em um local sob atenuação natural com predominância da metanogênese onde houve um vazamento de um oleoduto que resultou na contaminação do aquífero por hidrocarbonetos de petróleo, os valores de k para os BTEX foram em torno de 8 ano⁻¹. Percebe-se que a ordem de grandeza nesse trabalho foi diferente dos valores apresentados na Tabela 4.1 (10 vezes maior). Contudo, a velocidade da água subterrânea no local chegou a perto de 1000 m.ano⁻¹, de modo que nesse trabalho os processos de transporte podem ter tido um peso maior no cálculo da constante de atenuação que no experimento sob ANM, cuja velocidade da água subterrânea está perto de 2,8 m.ano⁻¹. Além disso, a temperatura da água subterrânea que chegou a 29 °C pode ter acelerado os processos de biodegradação. Wiedemeier et al. (1996) obtiveram constantes de biodegradação similares para cada BTEX em torno de 4,38 ano⁻¹ no centro da pluma de contaminação (novamente chama-se a atenção para a velocidade da água subterrânea que era de 488 m. ano⁻¹). Este resultado corrobora com o obtido nas áreas sob ANM e BIN, onde os valores das constantes de atenuação foram estatisticamente iguais por estarem dentro da mesma margem de erro.

4.4 RELAÇÃO ENTRE PROPORCIONALIDADE E BIODEGRADAÇÃO DOS BTEX

Conforme os resultados expostos até o momento, tanto na área sob atenuação natural monitorada (ANM) quanto sob bioestimulação

com injeção de nitrato (BIN), a biodegradação dos BTEX só foi observada após o decaimento do etanol. Contudo, dependendo da técnica de biorremediação usada, a taxa de atenuação ocorreu em velocidades diferentes, principalmente devido aos diferentes processos de biodegradação atuantes em cada área experimental. Assim, esta seção visa elucidar quais processos de biodegradação predominaram em cada área e, deste modo, influenciaram as respectivas constantes de atenuação (k) e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$). Como na seção onde as constantes foram calculadas e discutidas (seção 4.3), a análise da biodegradação não inclui o etanol pelo fato dos processos de transporte terem uma grande participação na atenuação do álcool.

No poço de monitoramento estudado da área sob ANM, os BTEX foram mais letamente atenuados e, conseqüentemente, obtiveram-se menores valores de k e maiores de $t_{1/2}$ (Tabela 4.1) devido, principalmente, aos processos de biodegradação mais lentos que podem ser comprovados com a análise da variação dos receptores de elétrons, subprodutos metabólicos e potencial de oxi-redução. A fase de significativa biodegradação dos BTEX se inicia em um cenário onde a maior parte dos receptores de elétrons foram utilizados para a biodegradação do etanol e, assim, as condições do meio são mais redutoras (FERNANDES, 2002). O oxigênio dissolvido, que já estava presente em baixas concentrações devido a biodegradação do etanol, decaiu ainda mais ao longo da fase de biodegradação dos monoaromáticos, ficando na maior parte do tempo em valores inferiores a 1 mg.L^{-1} (Figura 4.3). Não houve uso significativo de nitrato na biodegradação, até mesmo por que esse ânion esteve presente em concentrações naturalmente baixas no aquífero ($0,05 - 0,37 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figura 4.4). A produção de ferro ferroso (Fe^{+2}), um subproduto da redução do ferro férrico (Fe^{+3}) via biodegradação, que era alta na fase de biodegradação do etanol, diminuiu no período da atenuação dos BTEX, indicando que este processo não foi importante na biodegradação dos hidrocarbonetos (Figura 4.5). Percebe-se um aumento da concentração de sulfato até o restabelecimento das quantias naturalmente encontradas no aquífero (4.3 mg.L^{-1}) no fim do período de biodegradação dos BTEX, indicando o consumo deste receptor de elétrons (Figura 4.6). Contudo, dadas às baixas concentrações do ânion que não atingem as necessárias para biodegradar a quantidade disponível de BTEX estequiometricamente (WIEDEMEIER et al., 1998), a sulfato-redução também não teve grande participação na biodegradação dos monoaromáticos. As elevadas concentrações de metano (até 73 mg.L^{-1}) indicam a predominância de processos metanogênicos na biodegradação

dos BTEX (Figura 4.7), já que os receptores e subprodutos das demais vias de biodegradação foram detectados em concentrações baixas. Contudo, parte deste metano gerado provém também do uso das altas concentrações de acetato resultantes da biodegradação de etanol, como observado por Fernandes (2002). O estabelecimento de condições fortemente redutoras é corroborado pelo potencial de oxi-redução que atingiu valores negativos durante o decaimento dos BTEX e, posteriormente, voltou para valores observados no início do experimento (Figura 4.8). Assim, a metanogênese foi a principal via de biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos, embora não se possa descartar que vários processos de biodegradação atuaram. A predominância da metanogênese em outros experimentos sob ANM é reportada com frequência na literatura (CHEN et al., 2010; KAO et al., 2010; BATLLE-AGUILAR et al., 2009; MACKAY et al., 2006a).

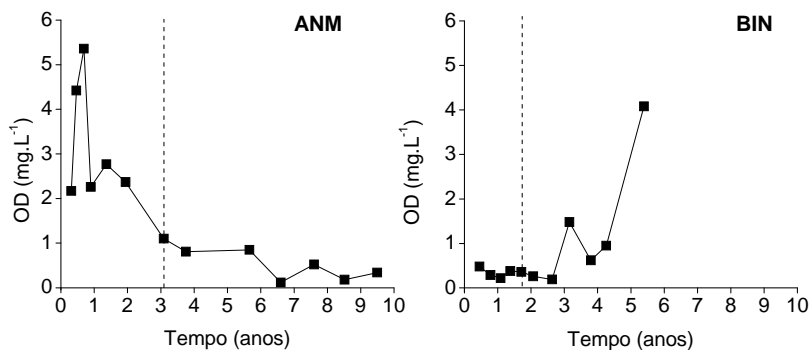


Figura 4.3 - Variação temporal de oxigênio dissolvido no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX.

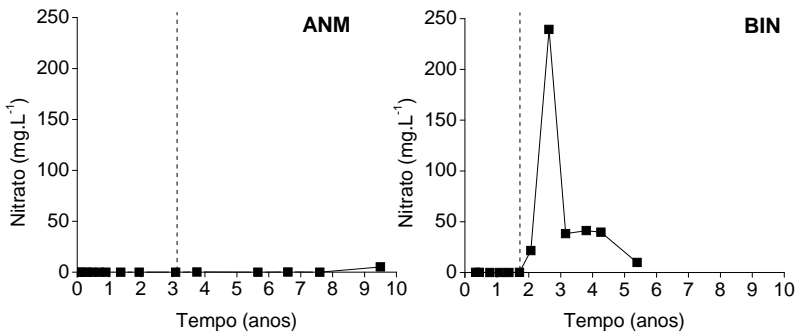


Figura 4.4 - Variação temporal de nitrato no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX.

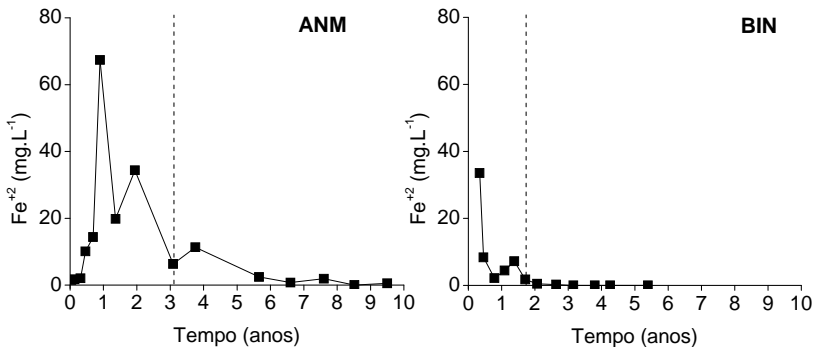


Figura 4.5 - Variação temporal de ferro ferroso no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX.

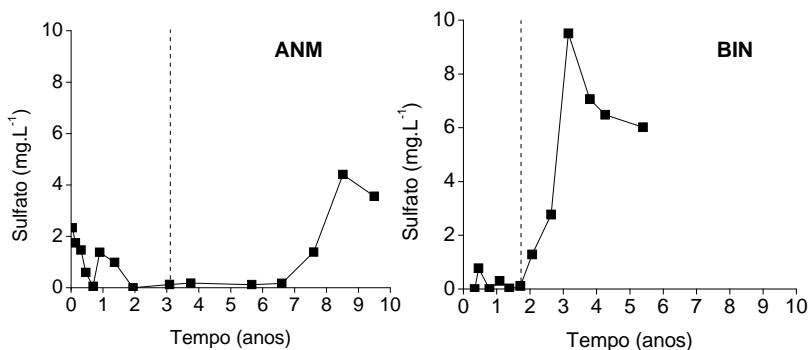


Figura 4.6 - Variação temporal de sulfato no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX.

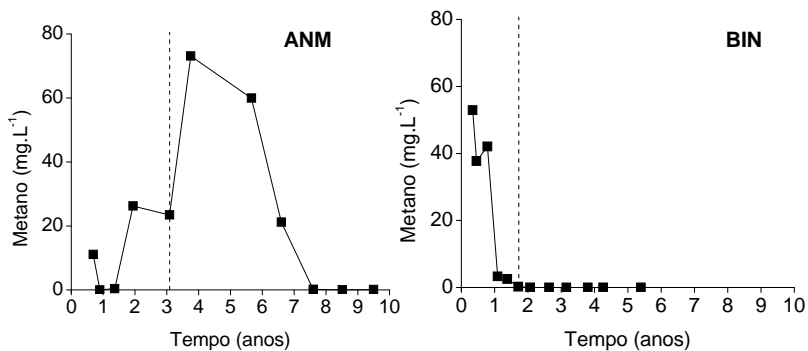


Figura 4.7- Variação temporal de metano no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX.

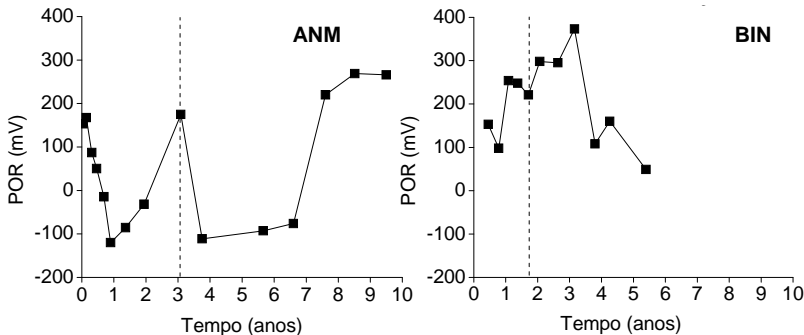


Figura 4.8 - Variação temporal do potencial de oxi-redução (POR) no poço de monitoramento 4 na profundidade de 2,0 metros na área experimental sob atenuação natural monitorada (ANM) e na profundidade de 2,3 metros na área experimental sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN). A linha tracejada indica o início da fase de decaimento dos BTEX.

Já no poço de monitoramento da área sob BIN, um cenário diferente foi observado, onde um decaimento rápido dos BTEX resultou em maiores valores de k e menores de $t_{1/2}$ quando comparados com o poço da área sob ANM. Isto ocorreu devido à injeção do nitrato que tornou as condições do meio menos redutoras, já que um receptor de elétrons mais favorável energeticamente estava disponível em altas concentrações. A análise das Figuras 4.3 a 4.8, que expõem a variação temporal dos receptores de elétrons, subprodutos e potencial de oxi-redução na área sob BIN, permite explicar a predominância de condições mais oxidantes que na área sob ANM. O meio estava anaeróbico, com concentrações de oxigênio dissolvido abaixo de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ na maior parte do período de biodegradação dos BTEX (Figura 4.3). As concentrações baixas de nitrato indicaram que o ânion foi usado na biodegradação, já que ele foi injetado em quantias elevadas (Figura 4.4). Um pico de 240 mg.L^{-1} de nitrato mostra que ele estava presente em altas concentrações na área e disponível para ser utilizado. Após a biodegradação dos BTEX, as concentrações de nitrato voltaram a se elevar com valores superiores ($\approx 40 \text{ mg.L}^{-1}$) ao naturalmente presente no aquífero ($0,6\text{-}1,6 \text{ mg.L}^{-1}$), configurando a quantia remanescente injetada que não foi utilizada na biodegradação. Logo, as concentrações de nitrato inseridas no aquífero foram suficientes para suprir a biodegradação tanto do etanol quanto dos BTEX. A baixa produção obtida de ferro ferroso (Fe^{+2}) mostra que a ferro-redução não atuou significativamente na biodegradação dos BTEX (Figura 4.5). Assim

como na área sob ANM, o sulfato foi utilizado, mas como estava presente em baixas concentrações, sua redução não teve grande contribuição na biodegradação dos monoaromáticos (Figura 4.6). A formação de metano foi praticamente nula no período, contrastando fortemente com as concentrações do gás obtidas na área sob ANM (Figura 4.7). Comparando os resultados de potencial de oxi-redução obtidos na área sob BIN com a área sob ANM (Figura 4.8), observa-se que os valores foram superiores e sempre positivos ao longo de toda fase de biodegradação. Isso indica que o meio estava menos redutor devido a injeção de nitrato, fato que possibilitou a predominância da nitrato-redução na biodegradação dos compostos BTEX.

O aumento das taxas de biodegradação dos BTEX devido a mudanças nas condições do meio já foi reportado, com a alteração de um ambiente metanogênico para aeróbio devido a bioestimulação com oxigênio (CHEN et al., 2010). Isto foi comprovado neste estudo, onde houve uma maior taxa de biodegradação dos BTEX sob condições nitrato-redutoras quando comparada com um meio predominantemente metanogênico. Maiores taxas de remoção de hidrocarbonetos monoaromáticos sob nitrato-redução em relação à via metanogênica já haviam sido obtidas em experimentos laboratoriais (CORSEUIL et al., 1998; DA SILVA et al., 2005), contudo não se pode excluir a ocorrência de uma miscelânea de vias de biodegradação, assim como observado em outros estudos *in situ* (BAKERMANS et al., 2002; MACKAY et al., 2006a; KAO et al., 2010).

Considerando a biodegradação o principal mecanismo de atenuação, as reações de oxi-redução que ocorrem na biodegradação de substratos determinam o quão rápido uma mistura vai degradar, no entanto, a relação de proporcionalidade predomina. O padrão de biodegradação observado para os BTEX em ambas as áreas experimentais permite inferir que duas misturas análogas expostas a diferentes receptores de elétrons irão biodegradar em velocidades diferentes, todavia o substrato com maior participação será biodegradado a uma taxa maior que os demais presentes. Os BTEX, presentes em pequenas frações, foram mais lentamente biodegradados em ambas as áreas experimentais quando comparados com o etanol. Entretanto, na área sob ANM, pelo fato da metanogênese ter sido a principal via de biodegradação, a atenuação dos hidrocarbonetos foi ainda mais lenta quando comparada com a área sob BIN, onde uma via catabólica energeticamente mais favorável, a nitrato-redução, predominou.

4.5 MODELO CONCEITUAL DE BIODEGRADAÇÃO DE MÚLTIPLOS SUBSTRATOS

A criação de um modelo conceitual que explica a biodegradação de múltiplos substratos com base na proporção em um cenário de contaminação de um aquífero com gasolina comercial é proposta nesta seção, baseando-se nos resultados obtidos neste estudo. Também é intencionada uma avaliação do fator proporção em relação a outros fatores importantes que influenciam na taxa de biodegradação de múltiplos substratos, como disponibilidade de receptores de elétrons e biomassa.

A partir do momento que ocorrer a contaminação da água subterrânea por gasolina comercial, a biodegradação do etanol, seus subprodutos orgânicos (quando em concentrações altas) e dos hidrocarbonetos do grupo BTEX esta ligada à fração de cada composto na mistura. Para representar este padrão de biodegradação proporcional de modo genérico, o modelo conceitual apresentado baseou-se principalmente na Figura 4.2 (seção 4.1), obtida experimentalmente para ambas as áreas estudadas. O gráfico que traduz o modelo conceitual (Figura 4.9) mostra que o etanol possui uma maior taxa de biodegradação por estar presente em uma fração muito maior quando comparada com aquela dos BTEX. Nos primeiros momentos, nota-se que a fração do álcool é constante ao longo do tempo porque sua concentração é muito elevada quando comparada com a dos BTEX. Somente após certo tempo, com uma grande queda na concentração do álcool, a proporção dos contaminantes é alterada de modo significativo. Com a biodegradação do etanol, a participação dos BTEX na mistura aumenta, assim como a sua taxa de biodegradação. Destaca-se que este modelo foi aplicado para a mistura de etanol com os hidrocarbonetos BTEX, contudo é possível que este padrão de interação de múltiplos substratos englobe outras misturas. O modelo apresentado serve para uma área exposta às mesmas condições de biodegradação. Em locais onde as vias de biodegradação são mais oxidantes, como ambientes aeróbios ou desnitrificantes, a atenuação de todos os contaminantes será mais rápida. O contrário será observado em áreas energeticamente menos favoráveis, como meios metanogênicos. Contudo, a relação de proporção predomina, com o substrato em maior proporção detendo uma maior taxa de biodegradação em relação aos demais.

Com isso, destaca-se que o foco de ações de remediação de áreas impactadas por gasolina comercial deve ser o estímulo da biodegradação do etanol a fim de diminuir a sua proporção em relação aos demais

contaminantes mais tóxicos (BTEX), e, deste modo, aumentar a taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos. Esta estratégia de ação focando na exaustão do etanol já foi proposta por outros autores (COSTA, 2009), contudo não foi utilizada a justificativa das diferentes proporções. Além disso, com a biodegradação do etanol, ocorre a formação de acetato, principalmente sob processos fermentativos metanogênicos como na área sob ANM, de modo que este subproduto estende o impacto do etanol na biodegradação dos BTEX (CORSEUIL et al., 2011). Logo, acelerar a biodegradação do etanol e de seu subproduto acetato se faz necessária para aumentar a proporção dos BTEX e, conseqüentemente, a sua taxa de biodegradação.

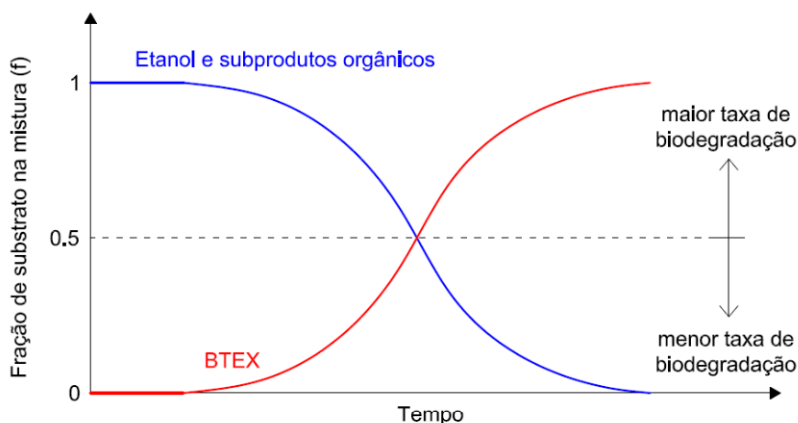


Figura 4.9 - Modelo conceitual para biodegradação da mistura de etanol e BTEX em derramamentos subsuperficiais de gasolina comercial.

O modelo conceitual é idealizado com base nos resultados obtidos, porém alguns pontos que podem levar a diferentes taxas de biodegradação do etanol e dos BTEX devem ser destacados. A biodegradação preferencial do etanol pela sua maior fração no meio pode esgotar os receptores de elétrons e conduzir a uma biodegradação mais lenta dos BTEX, conforme outros estudos apontaram (SCHAEFER et al., 2010a; CHEN et al., 2008; DA SILVA & ALVAREZ, 2004). Isto pode ter ocorrido na área sob ANM, onde não foi injetado nenhum receptor de elétrons. Deste modo, a taxa de biodegradação do etanol seria maior que a dos BTEX devido às condições mais favoráveis de biodegradação junto com o fato de o álcool estar em maiores proporções. Ressalta-se também que a biodegradação dos BTEX pode

ser acelerada pelo crescimento da biomassa com a biodegradação do etanol. Em reatores de fluxo contínuo, a adição de etanol à solução de benzeno afluente ao reator fez com que a concentração do monoaromático diminuísse, e isso foi devido ao crescimento microbiano que superou os efeitos da proporcionalidade (LOVANH et al., 2002). Contudo, os próprios autores afirmaram que este resultado não é provável de se repetir em um ambiente natural devido ao consumo dos receptores de elétrons pelo álcool.

5 CONCLUSÕES

Com bases nos dados temporais de concentração de etanol, acetato e BTEX medidos *in situ* em dois poços de monitoramento de água subterrânea de dois locais impactados por gasolina comercial, foi possível avaliar como a proporção desses substratos interferiu em suas taxas de biodegradação. Cada local consistiu em uma área exposta a diferentes processos de biorremediação: uma sob atenuação natural monitorada (ANM) e outra sob bioestimulação com injeção de nitrato (BIN).

A partir do momento que ocorrer a contaminação de um aquífero por gasolina misturada com etanol em padrões comerciais ($\approx 25\%$ de álcool), a taxa de biodegradação do etanol e dos BTEX dissolvidos em água subterrânea dependerá da fração de cada substrato. O etanol, presente em concentrações muito superiores a dos BTEX, é primeiramente biodegradado a uma taxa mais elevada devido a sua maior proporção. A presença de acetato em concentrações semelhantes ou superiores a dos BTEX estende efeitos inibitórios causados pelo etanol. Assim, concentrações totais de etanol e/ou acetato superiores a $38 \text{ mg de COT.L}^{-1}$ tenderão a inibir a biodegradação dos BTEX por diminuir a fração dos hidrocarbonetos no aquífero. Quando a concentração do etanol e seus subprodutos orgânicos decaírem e o peso da proporção dos BTEX aumentar, os hidrocarbonetos monoaromáticos começam a ser biodegradados em taxas mais significativas. Isso explica a biodegradação preferencial do etanol, que nada mais é que uma biodegradação proporcional, já que ele está presente em uma fração muito maior que a dos BTEX na água subterrânea contaminada por gasolina comercial brasileira e, assim, é mais rapidamente biodegradado. Este padrão de biodegradação ligando a taxa de biodegradação à proporção de etanol e dos BTEX corroborou com outros resultados disponíveis na literatura.

As constantes de atenuação para cada composto BTEX foram iguais em cada área experimental, assim como o tempo de meia-vida do etanol que se assemelhou ao dos BTEX na área sob atenuação natural monitorada. Esta constatação aliada ao modelo de decaimento de primeira ordem levou a inferir que a taxa de biodegradação de um substrato em um ambiente sob as mesmas condições depende da sua concentração. Substratos com maiores concentrações serão mais rapidamente biodegradados e vice-versa, como o observado experimentalmente para o etanol e os BTEX. Na área sob ANM, os valores de k foram menores que os obtidos para a área sob BIN,

principalmente devido aos diferentes processos de biodegradação predominantes.

As reações de oxi-redução que ocorrem na biodegradação de compostos orgânicos determinam o quão rápido uma mistura vai degradar, no entanto, a relação de proporcionalidade predomina. Em condições mais redutoras, como as metanogênicas observadas na área sob ANM, os substratos são mais lentamente biodegradados, enquanto que em meios mais oxidantes, como observado na área sob BIN onde a nitrato-redução predominou, o consumo dos substratos ocorre em uma velocidade maior. Entretanto, tanto em condições redutoras ou oxidantes, os substratos com maiores proporções (etanol), são primeiramente biodegradados e em taxas mais elevadas quando comparados com outros compostos em menores frações (BTEX).

A criação de um modelo conceitual que explicou a biodegradação do etanol (e seus subprodutos orgânicos) e dos BTEX em um cenário de contaminação de um aquífero com gasolina comercial foi feita com base no observado nas áreas experimentais. No modelo, em uma área expostas as mesmas condições, a taxa de biodegradação está relacionada à fração do substrato na mistura. O etanol, por estar presente em maior fração, possui maior taxa de biodegradação. À medida que os BTEX aumentam de fração na mistura, a sua velocidade de biodegradação também aumenta. Logo, estimular a biodegradação do etanol deve ser o foco de estratégias de remediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina comercial.

Portanto, os conhecimentos adquiridos com este trabalho fazem a diferença, pois testam teorias desenvolvidas em laboratório na complexidade de ambientes naturais. É introduzida uma nova abordagem de atenuação de poluentes nos processos de tratamentos biológicos, como técnicas de biorremediação, já que a remoção de um poluente alvo, como os tóxicos BTEX, dependerá da presença dos demais substratos disponíveis. Assim, a consideração da interação de múltiplos substratos se faz necessária para que se possa controlar a concentração de um contaminante isolado e, deste modo, sejam alcançados padrões regulatórios, como níveis de potabilidade.

RECOMENDAÇÕES

A fim de se estender o padrão de biodegradação proporcional a outros cenários, recomenda-se a realização de estudos:

- 1) Com micro-organismos adaptados e não adaptados à mistura dos contaminantes etanol e BTEX;
- 2) Em altas concentrações de etanol e BTEX com frações iguais na mistura;
- 3) Em misturas de outros combustíveis (como biodiesel/diesel e iso-butanol/gasolina);
- 4) Com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes em misturas de diesel e etanol;
- 5) Com misturas de outros substratos de interesse ambiental;
- 6) Que realizem outros cálculos cinéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGAPPAN, G.; COWAN, R. Substrate Inhibition Kinetics for Toluene and Benzene Degrading Pure Cultures and a Method for Collection and Analysis of Respirometric Data for Strongly Inhibited Cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.83, n.7, p.798-809, 2003.

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

ARONSON, D.; HOWARD, H. P. **Anaerobic Biodegradation of Organic Chemicals in Groundwater**: A Summary of Field and Laboratory Studies. Relatório. Environmental Science Center, Syracuse Research Corporation. North Syracuse, NY, 1997. 263p.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. R. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2^a ed. Nova York: McGraw-Hill, 1986. 928p.

BAKERMANS, C.; HOHNSTOCK-ASHE, A. M.; PADMANABHAN, S.; PADMANABHAN, P.; MADSEN, E. L. Geochemical and physiological evidence for mixed aerobic and anaerobic field biodegradation of coal tar waste by subsurface microbial communities. **Microbial Ecology**, v.44, n.2, p.107-117, 2002.

BATLLE-AGUILAR, J.; BROUYÈRE, S.; DASSARGUES, A.; MORASCH, B.; HUNKLER, D.; HÖHENER, P.; DIELS, L.; VANBROEKHOVEN, K.; SEUNTJENS, P.; HALEN, H. Benzene dispersion and natural attenuation in an alluvial aquifer with strong interactions with surface water. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.329, n.3-4, p.305-317, 2009.

BEDIENT, P. B.; RIFAI, H. S.; NEWLL, C. J. **Ground water contamination**: transport and remediation. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1999. 604p.

BEKINS, B. A.; WARREN, E.; GODSY, E. M. A comparison of zero-order, first-order, and Monod biotransformation models. **Ground Water**, v.36, n.2, p.261-228, 1998.

BIELEFELDT, A. R.; STENSEL, H. D. Modeling competitive inhibition effects during biodegradation of BTEX mixtures. **Water Research**, v.33, n.3, p.707-714, 1999.

BITTON, G. **Wastewater microbiology**. 3^a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. 746p.

BLUM, P.; HUNKELER, D.; WEEDE, M.; BEYER, C.; GRATHWOHL, P.; MORASH, B. Q. Quantification of biodegradation for *o*-xylene and naphthalene using first order decay models, Michaelis-Menten kinetics and stable carbon isotopes. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.105, n.3-4, p.118-130, 2009.

BORDEL, S.; MUÑOZ, R.; DÍAZ, L. F.; VILLAVERDE, S. New insights on toluene biodegradation by *Pseudomonas putida* FI: influence of pollutant concentration and excreted metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, n.4, p.857-866, 2007.

BOSMA, T. P.; MIDDELDORP, P. J. M.; SCHARAA, G.; ZEHNDER, A. J. B. Mass Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability. **Environmental Science Technology**, v.31, n.1, p.248-252, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para

consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria MS n.º 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2011.

BUCHELI-WITSCHER, M.; HAFNER, T.; RÜEGG, I.; EGLI, T. Benzene degradation by *Ralstonia pickettii* PKO1 in the presence of the alternative substrate succinate. **Biodegradation**, v.20, n.3, p.419–431, 2009.

BUXBAUM, E. **Fundamentals of protein structure and function**. 1 ed. Nova York: Springer, 2007. 367p.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Biochemistry**. 6^a ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007. 832p.

CHAKRABORTY, R.; O'CONNOR, S. M.; CHAN, E.; COATES, J. D. Anaerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Compounds by *Dechloromonas* Strain RCB. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8649–8655, 2005.

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

CHAPRA, S. C. **Surface Water-Quality Modeling**. New York: Waveland Press, 2008. 844p.

CHEN, Y. D.; BARKER, J. F.; GUI, L. A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: A microcosm study. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.96, n.1-4, p.17-31, 2008.

CHEN, K.; KAO, C.; CHEN, C.; SURAMPALLI, R. Y.; LEE, M. Control of petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater by

intrinsic and enhanced bioremediation. **Journal of Environmental Sciences**, v.22, n.6, p.864-871, 2010.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. 2 ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 1997. 379p. (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias).

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA.
Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Resolução n° 396 de 3 de abril de 2008.

CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.4, n.1-2, p.71-75, 1999.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S.; DOS SANTOS, R. C. F.; ALVAREZ, P. J. J. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Research**, v.32, n.7, p.2065-2072, 1998.

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, 2004.

CORSEUIL, H. X.; MONIER, A. L.; GOMES, A. P. N.; CHIARANDA, H. S.; DO ROSÁRIO, M.; ALVAREZ, P. J. J. Biodegradation of Soybean and Castor Oil Biodiesel: Implications on the Natural Attenuation of Monoaromatic Hydrocarbons in Groundwater. **Ground Water Monitoring and Remediation**, v.31, n.3, p.11-118, 2011.

COSTA, A. H. R.; NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n.2, 2009.

COSTA, A. H. **Bioestimulação com injeção de nitrato em águas subterrâneas impactadas por derramamento de gasolina com etanol**. Florianópolis. 2008. 229p. Tese de doutorado em Engenharia Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina.

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

CUNNINGHAM, J. A.; RAHME, H.; HOPKINS, G. D.; LEBRON, C.; REINHARD, M. Enhanced In Situ Bioremediation of BTEX-Contaminated Groundwater by Combined Injection of Nitrate and Sulfate. **Environmental Science and Technology**, v.35, n.8, p.1663-1670, 2001.

DA SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Effects of Ethanol versus MTBE on Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Natural Attenuation in Aquifer Columns. **Journal of Environmental Engineering**, v.128., n.9, p.862-867, 2002.

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

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, n.2, p.105-114, 2005.

DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic Biotransformation of Gasoline Aromatics in MultiComponent Mixtures. **Bioremediation Journal**, v.4, n.2, p.171-179, 2000.

DOU, J.; LIU, X.; HU, Z. Anaerobic BTEX degradation in soil bioaugmented with mixed consortia under nitrate reducing conditions. **Journal of Environmental Sciences**, v.20, n.5, p.585-592, 2008a.

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, 2008b.

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

EGLI, T. How to live at very low substrate concentration. **Water Research**, v.44, n.17, p.4826-4837, 2010.

EGLI, T. ZINN, M. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. **Biotechnology Advances**, v.22, n.1-2, p.35-43, 2003.

ESSAID, H. I.; COZZARELLI, I. M.; EGANHOUSE, R. P.; HERKELRATH, W. N.; BEKINS, B. A.; DELIN, G. N. Inverse modeling of BTEX dissolution and biodegradation at the Bemidji, MN crude-oil spill site. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.67, n.1-4, p.269– 299, 2003.

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

FERIS, K.; MACKAY, G.; 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, 2289-2294, 2008.

FERNANDES, M. **Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos monoaromáticos em aquíferos contaminados por gasolina**. Florianópolis. 1997. 115p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina.

FERNANDES, M. **Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina**. Florianópolis. 2002. 213p. Tese de doutorado em Química – Universidade Federal de Santa Catarina.

FISHER, A.; BAUER, J.; MECKENSTOCK, R. U.; STICHLER, W.; GRIEBLER, C.; MALOSZEWSKI, P.; KÄSTNER, M.; RICHNOW, H. H. A Multitracer Test Proving the Reliability of Rayleigh Equation-Based Approach for Assessing Biodegradation in a BTEX Contaminated Aquifer. **Environmental Science Technology**, v.40, n.13, p.4245-4252, 2006.

FREITAS, J. G.; MOCANU, M. T.; ZOBY, J. L. G.; MOLSON, J. W.; BARKER, J. F. Migration and fate of ethanol-enhanced gasoline in groundwater: A modelling analysis of a field experiment. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.199, n.1-4, p.25-43, 2011.

FRASER, M.; BARKER, J. F.; BUTLER, B.; BLAINE, F.; JOSEPH, S.; COOK, C. Natural attenuation of a plume from an emplaced coal tar

creosote source over 14 years. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.100, n.3-4, p.101-115, 2008.

GOMES, A. P. N. **Biodegradação de biodiesel de soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos.**

Florianópolis. 2008. 102p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina.

GOMEZ, D. E.; DE BLANC, P. C.; RIXEY, W. G.; BEDIENT, P. B.; ALZAVREZ, P. J. J. Modeling benzene plume elongation mechanisms exerted by ethanol using RT3D with a general substrate interaction module. **Water Resources Research**, v.44, n.5, 2008.

HARMS, H.; BOSMA, T. N. P. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, n.2-3, p.97-105, 1997.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Biochemistry**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. 544p.

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

IHSSEN, J.; EGLI, T. Global physiological analysis of carbon- and energy limited growing *Escherichia coli* confirms a high degree of catabolic flexibility and preparedness for mixed substrate utilization. **Environmental Microbiology**, v.7, n.10, p.1568-1581, 2005.

JIN, S.; FALLGREN, P.; LUO, H. Feasibility of Enhanced Biodegradation of Petroleum Compounds in Groundwater Under

Denitrifying Conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.84, n.3, p.357-361, 2010.

KAIPPER, B. I. A. **Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos monoaromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel**. Florianópolis. 2003. 179p. Tese de doutorado em Química – Universidade Federal de Santa Catarina.

KAO, C. M.; CHIEN, H. Y.; SURAMPALLI, R. Y.; CHIEN, C. C.; CHEN, C. Y. Assessing of Natural Attenuation and Intrinsic Bioremediation Rates at a Petroleum-Hydrocarbon Spill Site: Laboratory and Field Studies. **Journal of Environmental Engineering**, v.136, n.1, p.54-67, 2010.

KALISKY, T.; DEKEL, E.; ALON, U. Cost–benefit theory and optimal design of gene regulation functions. **Physical Biology**, v.4, n.4 ,2007.

KIM, H.; JAFFE, P. R. Spatial distribution and physiological state of bacteria in a sand column experiment during the biodegradation of toluene. **Water Research**, v.41, n.10, p.2089-2100, 2007.

KNIGHTES, C. D.; PETERS, C. A. Multisubstrate biodegradation kinetics for binary and complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25, n.7, p.1746–1756, 2006.

KOVÁROVÁ-KOVAR, K.; EGLI, T. Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.646-666, 1998.

LAWRENCE, A.; JONSSON, S.; BÖRJESSON, G. Ethanol, BTEX and microbial community interactions in E-blend contaminated soil slurry.

International Biodeterioration & Biodegradation, v.63, n.6, p.654-666, 2009.

LEAHY, J. G.; TRACY, K. D.; ELEY, M. H. Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.43, n.2, p.271-276, 2003.

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

LENDENMANN, U.; EGLI, T. Kinetic Models for the Growth of *Escherichia coli* with Mixtures of Sugars under Carbon-Limited Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.59, n.1, p.99-107, 1998.

LENDENMANN, U.; SNOZZI, M.; EGLI, T. Kinetics of the Simultaneous Utilization of Sugar Mixtures by *Escherichia coli* in Continuous Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.5, p.1493-1499, 1996.

LIN, C.; LIN, H.; LAI, C. MTBE biodegradation and degrader microbial community dynamics in MTBE, BTEX, and heavy metal-contaminated water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.59, n.2, p.97-102, 2007.

LITTLEJOHNS, J. V.; DAUGULIS, A. J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. **Process Biochemistry**, v.43, n.10, p.1068-1076, 2007.

LOVANH, N.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of Ethanol, Acetate, and Phenol on Toluene Degradation Activity and *tod-lux* Expression in *Pseudomonas putida* TOD102: Evaluation of the Metabolic Flux

Dilution Model. **Biotechnology and Bioengineering**, v.86, n.7, p.801-808, 2004.

LOVANH, N.; HUNT, C. S.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. **Water Research**, v.36, n.15, p.3739-3746, 2002.

MACKAY, D.; SHIU, W. Y.; MA, K. LEE, S. C. **Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals**. 2^a ed. Danvers: Taylor & Francis Group, 2006a. Volume I e III.

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, 2006b.

MALETIĆ, S.; DALMACIJA, B.; RONČEVIĆ, S.; AGBABA, J.; PETROVIĆ, O. Degradation Kinetics of an Aged Hydrocarbon-Contaminated Soil. **Water, Air & Soil Pollution**, v.202, n.1-4, p.149-159, 2009.

MIKKELNSEN, S. R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical Chemistry**. 1^a ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2004. 384p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria, nº 143, de 27 de junho de 2007. Diário Oficial da União.

MITRA, S.; ROY, P. BTEX: A Serious Ground-water Contaminant. **Research Journal of Environmental Sciences**, v.5, 2011.

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, 2010.

MUÑOZ, R.; DÍAZ, L. F.; BORDEL, S.; VILLAVERDE, S. Inhibitory effects of catechol accumulation on benzene biodegradation in *Pseudomonas putida* F1 cultures. **Chemosphere**, v.68, n.2, p.244-252, 2007.

NELSON, D.; LAPARA, T.; NOVAK, P. Effects of Ethanol-Based Fuel Contamination: Microbial Community Changes, Production of Regulated Compounds, and Methane Generation. **Environmental Science and Technology**, v.44, n.12, 4525-4530, 2010.

NEUHAUSER, E. F.; RIPP, J. A.; AZZOLINA, N. A.; MADSEN, E. L.; MAURO, D. M.; TAYLOR, T. Monitored Natural Attenuation of Manufactured Gas Plant Tar Mono- and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ground Water: A 14-Year Field Study. **Ground Water Monitoring & Remediation**, v.29, n.3, p.66-76, 2009.

NEWELL, C. J.; RIFAI, H. S.; WILSON, J. T.; CONNOR, J. A.; AZIZ, J. A.; SUAREZ, M. P. EPA Ground Water Issue: **Calculation and use of first-order rate constants for monitored natural attenuation studies**. Washington D.C., 2002, 28p.

NUNES, C. C. **Dinâmica da variação dos receptores de elétrons e subprodutos metabólicos em águas subterrâneas impactadas por derramamentos de gasolina com etanol**. Florianópolis. 2006. 244p. Tese de doutorado em Engenharia Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina.

NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Importância do etanol na atenuação natural de águas subterrâneas impactadas por gasolina. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.12, n.3, p.259-265, 2007.

OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER, H. J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, v.100, p.1497-1500, 2009.

OKPOKWASILI, G. C.; NWEKE, C. O. Microbial growth and substrate utilization kinetics. **African Journal of Microbiology**, v.5, n.4, p.305-317, 2005.

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

PLAZA, G. A.; WYPYCH, J.; BERRY, C.; BRIGMON, R. L. Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum contaminated soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n.4, p.533-542, 2007.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J. T. C.; VAN GROENESTIJN, J. W. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.

REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. B.; DUTEAU, N. M.; KIM, K. Biodegradation Kinetics of Aromatic Hydrocarbon Mixtures by Pure and Mixed Bacterial Cultures. **Environmental Health Perspectives**, v.110, n.6, p.1005-1011, 2002.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental Biotechnology: Principles and Applications**. 1^a ed. Nova York: McGraw-Hill, 2001. 754p.

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, 2007.

SAEED, T.; AL-MUTAIRI, M. Chemical composition of the water-soluble fraction of the leaded gasolines in seawater. **Environment International**, v.25, n.1, p.117-129, 1999.

SALMERÓN-ALCOCER, A.; RUIZ-ORDAZ, N.; JUÁREZ-RAMÍREZ, C.; GALÍNDEZ-MAYER, J. Continuous biodegradation of single and mixed chlorophenols by a mixed microbial culture constituted by *Burkholderia* sp., *Microbacterium phyllosphaerae*, and *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, n.2, p.201-211, 2007.

SCHAEFER, C. E.; YANG, X.; PELZ, O.; TSAO, D. T.; STREGER, S. H.; STEFFAN, R. J. Anaerobic biodegradation of iso-butanol and ethanol and their relative effects on BTEX biodegradation in aquifer materials. **Chemosphere**, v.81, n.9, p.1111-1117, 2010a.

SCHAEFER, C. E.; YANG, X.; PELZ, O.; TSAO, D. T.; STREGER, S. H.; STEFFAN, R. J. Aerobic biodegradation of iso-butanol and ethanol and their relative effects on BTEX biodegradation in aquifer materials. **Chemosphere**, v.81, n.9, p.1104-1110, 2010b.

SCHNOOR, J. L. **Environmental Modeling: Fate and transport of Pollutants in water, air and soil**. 1^a ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1996. 682p.

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, n.1-2, p.29-56, 2002.

SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND, P. M.; IMBODEN, D. M. **Environmental organic chemistry**, 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 1313 p.

SEMPLE, K. T.; DOICK, K. J.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. **Environmental Pollution**, v.150, n.1, p.166-176, 2007.

SCOW, K. M.; HICKS, K. A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n.3, p.246–253, 2005.

SHABIR, G.; AFZAL, M.; ANWAR, F.; TAHSEEN, R.; KHALID, Z. M. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.61, n.2, p.161-166, 2008.

SIMON, F.G.; MEGGYES, T.; MCDONALD, C. **Advanced groundwater remediation: active and passive technologies**. 1^a ed. London: Thomas Telford Publishing, 2002. 360p.

SINGH, A.; KUHAD, R. C.; WARD, O. P. **Advances in Applied Bioremediation**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. 365p. Soil Biology.

SRIVASTAVA, S; SRIVASTAVA, P. S. **Understanding Bacteria**. 1^a ed. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 2003. 469p.

SUAREZ, M. P.; RIFAI, H. S. Evaluation of BTEX Remediation by Natural Attenuation at Coastal Facility. **Ground Water Monitoring & Remediation**, v.22, n.1, p.62-77, 2002.

SUAREZ, M. P.; RIFAI, H. S. Modeling Natural Attenuation of Total BTEX and Benzene Plumes with Different Kinetics. **Ground Water Monitoring & Remediation**, v.24, n.3, p.53-68, 2004.

TOXNET – Toxicology Data Network. **Harzadous Substances Data Bank (HSDB)**, 2010. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>>. Acesso em 6 de dez. 2010.

VON SPERLING, M. **Basic principles of wastewater treatment**. 1 ed. Londres: IWA Publishing, 2007. 212p.

WIEDEMEIER, T. H.; SWANSON, M. A.; WILSON, J. T.; KAMPBELL, D. H.; MILLER, R. N.; HANSEN, J. E. Approximation of Biodegradation Rate Constants for Monoaromatic Hydrocarbons (BTEX) in Ground Water. **Ground Water Monitoring & Remediation**, v.16, n.3, p.186-194, 1996.

WIEDEMEIER, T.H.; SWANSON, M.A.; MOUTOUX, D.E.; GORDON, E.K. **Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water**. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development, EPA/600/R-98/128, 244 p., 1998.

WIEDEMEIER, T. H.; RIFAI, H. S.; NEWELL, C. J.; WILSON, J. T. **Natural Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface**. 1ª ed. Nova York: John Wily & Sons, 1999. 617p.

WORLDWATCH INSTITUTE. **Biofuels for transport**: global potential and implications for sustainable energy and agriculture. 1 ed. Londres: Earthscan, 2007. 452p.

ZENGLER, K.; RICHNOW, H. H.; ROSSELÓ-MORA, R.; MICHAELIS, W.; WIDDEL, F. Methane formation by long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. **Nature**, v.401, p.266-269, 1999.

ANEXO A - Valores das concentrações dos BTEX, etanol e acetato em cada área experimental

Atenuação natural monitorada – concentrações em $\mu\text{g.L}^{-1}$ e mg.L^{-1}

PM4 – Nível 2.0							
Tempo (anos)	BTEX ^(a) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Benzeno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Tolueno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Etilbenzeno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Xilenos ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Etanol (mg.L^{-1})	Acetato (mg.L^{-1})
0.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.	N.A.
0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.
0.3	27	5	10	3	10	N.D.	N.A.
0.5	234	105	118	N.D.	10	83	N.A.
0.7	16663	8443	3925	2700	1595	1321	N.A.
0.9	14228	5185	5976	538	2529	2078	N.A.
1.4	6377	2293	2839	374	871	2193	N.A.
1.9	41325	11411	21706	1579	6629	1028	102
3.1	36306	5644	18558	2366	9738	N.D.	55
3.8	27852	4722	14307	1743	7080	330	41
5.7	17249	568	9459	1284	5938	N.A.	7
6.6	10666	1226	5040	786	3614	N.D.	4
7.6	3195	126	206	481	2382	N.D.	0
8.5	27	N.D.	N.D.	N.D.	27	N.D.	N.D.
9.5	517	35	90	22	370	N.D.	5

Nota: N.D. = não detectado (abaixo do limite de detecção do cromatógrafo); N.A. = não analisado; ^(a)somatório das concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros dos xilenos.

Atenuação natural monitorada – concentrações em mg de COT.L⁻¹ para todos os substratos

PM4 – Nível 2,0									
Tempo (anos)	BTEX ^(a)	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	Xilenos	Etanol	Acetato		
0.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.	N.A.		
0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.		
0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	N.D.	N.A.		
0.5	0.2	0.1	0.1	N.D.	0.0	43.3	N.A.		
0.7	15.2	7.8	3.6	2.4	1.4	688.2	N.A.		
0.9	13.0	4.8	5.4	0.5	2.3	1082.5	N.A.		
1.4	5.8	2.1	2.6	0.3	0.8	1142.5	N.A.		
1.9	37.7	10.5	19.8	1.4	6.0	535.5	20.8		
3.1	33.1	5.2	16.9	2.1	8.8	N.D.	11.3		
3.8	25.4	4.4	13.0	1.6	6.4	171.7	8.3		
5.7	15.7	0.5	8.6	1.2	5.4	N.A.	1.5		
6.6	9.7	1.1	4.6	0.7	3.3	N.D.	0.9		
7.6	2.9	0.1	0.2	0.4	2.2	N.D.	0.0		
8.5	0.0	N.D.	N.D.	N.D.	0.0	N.D.	N.D.		
9.5	0.5	0.0	0.1	0.0	0.3	N.D.	1.0		

Nota: N.D. = não detectado (abaixo do limite de detecção do cromatógrafo); N.A. = não analisado; ^(a) somatório das concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros dos xilenos.

Bioestimulação com injeção de nitrato - concentrações em $\mu\text{g.L}^{-1}$ e mg.L^{-1} .

PM4 – Nível 2,3							
Tempo (anos)	BTEX ^(a) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Benzeno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Tolueno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Etilbenzeno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Xilenos ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Etanol (mg.L^{-1})	Acetato (mg.L^{-1})
0.1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
0.3	4078	1607	1714	221	536	1549	10
0.5	4564	1520	2063	169	812	850	14
0.8	11047	3574	4961	444	2068	160	13
1.1	17083	5239	7955	550	3359	N.D.	6
1.4	30734	9232	15096	1064	5342	N.D.	10
1.7	16146	5932	7261	360	2593	172	3
2.1	6237	2684	2272	163	1118	16	N.D.
2.6	799	270	262	39	227	0	N.D.
3.2	17	3	1	3	10	N.D.	N.D.
3.8	69	16	20	5	28	N.D.	N.D.
4.3	0	0	0	0	0	N.D.	0
5.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Nota: N.D. = não detectado (abaixo do limite de detecção do cromatógrafo); N.A. = não analisado; ^(a)somatório das concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros dos xilenos.

Bioestimulação com injeção de nitrato - concentrações em mg de COI.L⁻¹ para todos os substratos

PM4 – Nível 2,3									
Tempo (anos)	BTEX ^(a)	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	Xilenos	Etanol	Acetato		
0.1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.		
0.3	3.7	1.5	1.6	0.2	0.5	807.0	2.0		
0.5	4.2	1.4	1.9	0.2	0.7	442.7	2.9		
0.8	10.1	3.3	4.5	0.4	1.9	83.4	2.6		
1.1	15.6	4.8	7.3	0.5	3.0	N.D.	1.1		
1.4	28.1	8.5	13.8	1.0	4.8	N.D.	2.1		
1.7	14.8	5.5	6.6	0.3	2.3	89.4	0.6		
2.1	5.7	2.5	2.1	0.1	1.0	8.6	N.D.		
2.6	0.7	0.2	0.2	0.0	0.2	0.0	N.D.		
3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	N.D.	N.D.		
3.8	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	N.D.	N.D.		
4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	N.D.	0.0		
5.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		

Nota: N.D. = não detectado (abaixo do limite de detecção do cromatógrafo); N.A. = não analisado; ^(a)somatório das concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros dos xilenos.

ANEXO B - Valores das concentrações de oxigênio dissolvido, nitrato, ferro ferroso, sulfato, metano e potencial de oxi-redução em cada área experimental

Atenuação natural monitorada

PM4 – Nível 2,0						
Tempo (anos)	Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Ferro Ferroso (mg.L ⁻¹)	Sulfato (mg.L ⁻¹)	Metano (mg.L ⁻¹)	Potencial de oxi-redução (mV)
0.0	9.6 ^(a)	N.D.	1.6	2.3	N.A.	153
0.1	8.8 ^(a)	N.D.	1.7	1.7	N.A.	168
0.3	2.2	N.D.	2.0	1.5	N.A.	87
0.5	4.4	N.D.	10.1	0.6	N.A.	50
0.7	5.4	N.D.	14.4	0.1	11.1	-14
0.9	2.3	N.D.	67.4	1.4	N.D.	-120
1.4	2.8	N.D.	19.9	1.0	0.4	-86
1.9	2.4	N.D.	34.4	N.D.	26.2	-32
3.1	1.1	N.D.	6.3	0.1	23.5	175
3.8	0.8	0.1	11.4	0.2	73.1	-111
5.7	0.9	N.D.	2.5	0.1	59.9	-93
6.6	0.1	0.2	0.8	0.2	21.2	-76
7.6	0.5	0.0	1.9	1.4	0.2	220
8.5	0.2	41.9	0.0	4.4	0.1	269
9.5	0.3	5.1	0.6	3.6	0.1	266

Nota: N.D. = não detectado (abaixo do limite de detecção do cromatógrafo); N.A. = não analisado; ^(a) valores duvidosos que não foram utilizados.

Bioestimulação com injeção de nitrato

PM4 – Nível 2,3						
Tempo (anos)	Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Ferro Ferroso (mg.L ⁻¹)	Sulfato (mg.L ⁻¹)	Metano (mg.L ⁻¹)	Potencial de oxidação-redução (mV)
0.1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
0.3	NA	0.2	33.6	N.D.	52.9	N.A.
0.5	0.5	0.2	8.4	0.8	37.7	153
0.8	0.3	N.D.	2.2	N.D.	42.1	98
1.1	0.3	0.0	4.4	0.3	3.3	254
1.4	0.4	0.0	7.2	0.0	2.5	248
1.7	0.4	0.1	1.8	0.1	0.2	221
2.1	0.3	21.5	0.5	1.3	0.0	298
2.6	0.2	239.3	0.2	2.8	N.D.	295
3.2	1.5	38.4	0.0	9.5	N.D.	373
3.8	0.6	41.3	N.D.	7.1	N.D.	108
4.3	0.9	39.8	0.00	6.5	0.0	160
5.4	4.1	9.9	0.00	6.0	N.D.	49

Nota: N.D. = não detectado (abaixo do limite de detecção do cromatógrafo); N.A. = não analisado.