LIMITAÇÕES DA BIOMASSA AUTÓCTONE NA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS EM SUBSOLOS

HENRY XAVIER CORSEUIL
Professor do Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina

Neste trabalho foram investigadas as taxas de biodegradação de benzeno, tolueno e xileno por microogranismos autóctones presentes em aqüíferos arenosos naturais. Foi observado que, apesar das condições altamente favoráveis de nutrientes e de receptores de elétrons, o início da mensurável oxidação microbiana desses compostos de fácil degradação era retardado em sistemas contendo pequenas populações microbianas. Tais retardos variaram inversamente com o número inicial de micróbios capazes de degradar um composto particular, o que sugere a necessidade do desenvolvimento de alguma população crítica de microorganismos.

1. INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de contaminantes orgânicos são conhecidos por serem facilmente degradados biologicamente em laboratório, o que sugere uma larga eficiência dos processos biológicos para remediação de sistemas subsuperficiais contaminados. No entanto, taxas de biotransformações muito menores são normalmente observadas em ambientes naturais. Em particular, retardamentos significantes são geralmente verificados antes que ocorra uma demonstrável degradação de compostos orgânicos recém introduzidos. Fatores relatados que afetam o período destes retardos incluem a indução enzimática, as mudanças genéticas e o número de microorganismos capazes de degradar compostos específicos (Wiggins et al., 1987; Aelion *et al.*, 1987; Aamand *et al.*, 1989; Spain, 1990).

Os retardos causados no início da mensurável degradação, mesmo desconsiderando as causas específicas, devem ser incluídos nas previsões do transporte e destino de contaminantes em ambientes subsuperficiais, e em estimativas das taxas de bioremediação (Wiggins *et al.*, 1987). Atualmente não existe nenhum método para se prever a magnitude do retardo entre a introdução de um contaminante e o início de sua mensurável biodegradação (Alexander e Scow, 1989). Este estudo investiga a cinética de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos e examina os retardos associados ao início da mensurável utilização do substrato em materiais de aquífero arenosos em condições ótimas de crescimento. Explora-se a hipótese de que estes retardos possam ser atribuídos ao número insuficiente de microorganismos autóctones contaminante-específicos, ou seja, à necessidade destes microorganismos atingirem uma população suficiente para produzir uma demonstrável degradação do contaminante. Como é sabido, as taxas de utilização do substrato são diretamente proporcionais à biomassa. Neste contexto, retardos aparentes no início da atividade podem ser na realidade os períodos necessários para a ocorrência de populações críticas; isto é, períodos de desenvolvimento de uma população crítica (DPC). Apesar de ser um ponto óbvio, isto é geralmente desconsiderado em avaliações laboratoriais e em aplicações de bioremediação em campo, que tendem a focalizar principalmente as exigências e deficiências de receptor de elétron e de nutrientes.

Os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno (compostos BTX), escolhidos para este investigação, são constituintes comuns de águas subterrâneas contaminadas por derramamentos de gasolina. Vários experimentos foram desenvolvidos

em bateladas e em colunas. Parâmetros biocinéticos e os efeitos da temperatura no crescimento microbiano foram determinados em experimentos em batelada com microorganismos isolados de um material de aqüífero não contaminado. Os efeitos da concentração do substrato e das condições de fluxo na biomassa nativa responsável pela degradação dos compostos BTX foram investigados em experimentos em colunas. O trabalho foi conduzido para estabelecer uma firme base científica que permita determinar se as limitações de biomassa precisam ser consideradas em aplicações de engenharia dos processos no local para descontaminação de sistemas subsuperficiais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O material de aqüífero arenoso usado neste estudo foi obtido de uma instalação de produção de gás natural em Kalkaska, Michigan, EUA, onde foi detectada uma grande pluma de benzeno, tuoleno e xileno em 1984 (Chiang *et al.*, 1989). O material foi coletado em uma área nã contaminada da estação, a uma profundidade de 1 a 2 m, e refrigerado a 6°C. Análise dos sólidos de Kalkaska reveleram uma composição de 99.8% de areia e 0.2% de silte e argila, e um conteúdo de carbono orgânico total de 0.07%.

Uma solução sintética com nutrientes foi usada para fornecer as condições ambientais favoráveis para o crescimento dos microorganismos presentes nas areias do aqüífero testado. Esta solução era feita com a adição de: 0.2g de $MgSO_4.7H_2O$, 0.1g de $CaCl_2$, 0.05 mg de $FeSO_4.7H_2O$, 0.25 mg de $NaMoO_4.2H_2O$, 0,43 g de K_2HPO4, 0,23 g de KH_2PO_4 e 0,05 g de KNO_3, completados a um litro de água deionizada. Nitrato era usado como fonte de nitrogênio para limitar o crescimento de microorganismos nitrificantes, que poderiam diminuir a disponibilidade de receptores de elétrons para a degradação dos contaminantes através do aumento da demanda de oxigênio.

Os hidrocarbonetos monoaromáticos usados foram analizados ou por cromatografia gasosa precedido por separação em equipamentos de **purge and trap** (Environchem model 810A, Environchem, Inc.) ou por análise de **head space** (em um HP 5890 GC equipado com um analisador de **head space** modelo HP 19395A, Hewlett Packard). Os compostos eram separados isotermicamente a 75°C e detectados por ionização com chama. Padrões externos eram preparados rotineiramente para testar as curvas de calibração. Os limites de detecção para os instrumentos utilizados eram 0.1 ppb (com uma amostra de 10ml) e 10 ppb, respectivamente, para as análises em **purge and trap** e em **head space**. O oxigênio dissolvido era medido usando-se um medidor de oxigênio (YSI modelo 5300 Biological Oxygen Monitor, Yellow Spring) equipado com um microssistema de fluxo contínuo. O equipamento era capaz de detectar níveis de oxigênio de até 0.1 mg/l.

Os números de microorganismos presentes nas soluções foram quantificados por contagem de placas. As diluições eram feitas em uma solução tampão de fosfato de potássio contendo 0.5 mg/l de Tween 80, usado como agente desagregador (Chang e Rittmann, 1988). As diluições apropriadas eram aplicadas a placas contendo 0.5% de ágar-nutriente-triptone (TNA) de acordo com o Standard Methods (1989). As placas eram mantidas a 30°C e contadas após três dias. O uso deste meio, que permite a estimativa somente do número total de heterótrofos, foi apropriado neste estudo porque os experimentos foram realizados na presença de apenas um hidrocarboneto de cada vez, e sem a presença de nenhuma outra fonte adicional de carbono. Uma técnica de contagem de placa usando vapores de benzeno, tolueno e xileno foi também testada, mas descartada devido ao longo período (duas semanas) necessário para se obter colônias suficientemente grandes para serem contadas. A enumeração das bactérias aderidas às partículas de areia foram feitas através da agitação por 20 minutos de 10 gramas de areia em 100 ml de uma solução estéril contendo 0.1% de sódio pirofosfato (Wilson *et al.*, 1983). Os microorganismos liberados por esta técnica foram então quantificados pelo método da contagem de placas.

2.1. Determinação dos parâmetros biocinéticos.

Quatro coeficientes biocinéticos foram determinados independentemente para benzeno, tuoleno e *o*-xileno: i) o coeficiente da máxina taxa específica de utilização do substrato (MTEUS), k; ii) o coeficiente de meia-velocidade, K_s; iii) o coeficiente de produção, Y; e iv) o coeficiente de decaimento celular, b. Estes coeficientes foram determinados usando-se microorganismos obtidos de experimentos em colunas de areia de Kalkaska que foram previamente alimentadas continuamente com uma solução aquosa contendo 2 mg/l de benzeno, tuoleno ou *o*-xileno (usados individualmente como fonte de carbono), por dez dias ou até que os contaminantes tivessem sido completamente degradados. Os estudos cinéticos foram realizados em sistemas em bateladas usando uma série duplicada de frascos de vidro de 5 ml fechados com tampa revestida com teflon. As amostras do efluente de cada coluna contendo microorganismos adaptados eram coletadas e homogeneizadas, e 100 µl eram então adicionados aos frascos de 5 ml. Cada um destes frascos servia como um reator separado para a geração de um ponto para a subsequente análise da taxa de biodegradação. Isto minimizou a propagação de erro experimental de um ponto para outro. As soluções dos compostos a serem estudados eram preparadas em cilindros de vidro completamente cheios para evitar a volatização dos hidrocarbonetos, e adicionadas com seringas com vedação de gás aos frascos que eram fechados rapidamente. Frascos extras, usados como controle, eram preparados sem a presença de microorganismos e contendo 100 mg/l de azida de sódio. Dois frascos eram imediatamente analisados para a determinação das concentrações iniciais de contaminante e biomassa. Análises periódicas dos hidrocarbonetos eram então realizadas. Os parâmetros eram estimados usando análise de regressão não-linear com o software Systat 5.1 (Systat, Inc.).

2.2. Sistema em coluna de areia.

Os reatores com areia consistiam de colunas de vidro com diâmetro interno de 2.54 cm operados em fluxo ascendente. Após o enchimento das colunas, cada sistema era lavado com 200 ml de solução sintética de água subterrânea autoclavada para remover bolhas de ar. Uma carga de areia de 50 gramas era usada em cada experimento, o que correspondia a uma altura de aproximadamente 6.1 cm. Experimentos com traçador (NaCl) demonstraram que as colunas eram enchidas corretamente e as condições de fluxo se aproximavam às de um reator ideal de fluxo de pistão. As soluções aquosas contendo as concentrações desejadas dos compostos estudados eram preparadas em cilindros de vidro sem espaços vazios, como descrito anteriormente, e bombeadas para os reatores com uma bomba peristáltica Miniplus 2 (Gilson Medical Electronics, S.A.). Para minimizar a adsorção nas superfícies todos os tubos eram de aço inoxidável ou viton. Os materiais eram autoclavados antes de uso, e as amostras eram coletadas

com seringas com vedação de gás e imediatamente analisadas para evitar perdas por biodegradação ou volatização. Os experimentos eram realizados à temperatura ambiente (22°C) quando não especificados, e a velocidades intersticiais variando entre 0.2 m/dia e 2m/dia, o que estabelecia tempos de detenção hidráulica de aproximadamente 7.5 horas e 45 minutos, respectivamente. Experimentos em colunas, onde a atividade microbiana foi inibida com a adição de azida de sódio, foram realizados para confirmar que a sorção dos hidrocarbonetos monoaromáticos nas areias de Kalkaska, que tinham baixo conteúdo orgânico (0.07%), era modesto, completamente reversível, e insignificante como um mecanismo de remoção. Estes experimentos serviram também como controles para os estudos de degradação em condições de fluxo contínuo. Não foi observada nenhuma perda que possa ser atribuída à volatiliação ou à inapropriada amostragem dos compostos estudados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros biocinéticos.

Geralmente os modelos que descrevem crescimento biológico e utilização do substrato são baseados na cinética de Monod. As relações das taxas para utilização do substrato e crescimento líquido microbiano em reatores em bateladas foram dadas por Lawrence e McCarty (1970):

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{kXS}{K_s + S} \quad (1) \qquad \frac{dX}{dt} = \frac{YkSX}{K_s + S} - bX \quad (2)$$

onde S = concentração do substrato (mg/l); t = tempo; 5 –concentração microbiana (mg/l); e, k (mg-substrato (mg-células)$^{-1}$ dia $^{-1}$); K_s (mg/l); Y (mg células por mg de substrato), e b (dia $^{-1}$) são como definido anteriormente. A Equação 2 é baseada na suposição de que o crescimento microbiano manifesta um perfil hiperbólico.

McCarty (1975) demonstrou a validade de uma relação entre as energias livre da reação e a máxima produção de células para bactérias autotróficas e heterotróficas. Este modelo foi usado para determinar os valores do coeficiente de produção, Y, que para benzeno, tuoleno e xileno foi respectivamente, 0.65, 0.66, e 0.67. Detalhes dos cálculos foram apresentados por Corseuil (1992).

O coeficiente de decaimento, b, foi determinado usando-se amostras coletadas do efluente de uma coluna de areia que foi alimentada por mais de 10 dias com *o*-xileno, que foi o tempo necessário para completa degradação do hidrocarboneto. Vários frascos de 5 ml foram completados com a amostra e então realizou-se diariamente análises de contagem de placas. Este procedimento foi repetido duas vezes, a primeira em um período de 5 dias e a segunda em 13 dias. Os resultados experimentais e uma simulação usando um modelo de decaimento de primeira ordem são apresentados na Figura 1 para o experimento de 5 dias. Os valores dos parâmetros de ajuste para a regressão não linear dos dados experimentais para os 5 dias e para os 13 dias são apresentados na Tabela 1. Um valor de b = 0.11/dia, que está dentro do intervalo de confiança de 95% para ambos os experimentos, foi usado para os microorganismos degradadores de xileno. Para as subsequentes simulações de modelo, os coeficiente de decaimento para benzeno e tuoleno foram considerados os mesmos do xileno.

Para obter uma única estimativa de parâmetros, os valores para a máxima taxa específica de utilização do substrato, k, e para o coeficiente de meia velocidade, K_s, foram determinados em experimentos independentes em batelada usando-se análises de regressão não linear. O coeficiente k foi determinado em experimentos a alta concentração de substrato, para o qual foi assumido que a concentração inicial do substrato, S_0, era muito maior do que K_s. As concentrações iniciais dos compostos BTX foram mantidas a níveis menores do que 4 mg/l para evitar a possibilidade de limitações de oxigênio. Quando K_s é muito menor do que a concentração inicial do substrato, a taxa de utilização do substrato é de ordem zero em relação a S. Para este caso, é fácil obter a solução simultânea das Equações 1 e 2. A Equação 3 fornece o seguinte modelo de ordem zero de utilização do substrato com crescimento microbiano:

$$S = S_0 - \frac{k \quad X_0}{(Yk - b)} [e(Yk-b)t - 1] \quad (3)$$

Experimentos com baixa concentração inicial de substrato foram usados para determinar o coeficiente de meia velocidade. De acordo com a cinética de Monod, a taxa de utilização do substrato é muito mais dependente do coeficiente K_s a baixas concentrações do substrato do que a altas concentrações. A solução da forma integrada da Equação 1, na qual a suposição de que $X = Y(S_0\text{-}S) + X_0$ foi usada para eliminar a biomassa variável, foi apresentada por Robinson e Tiedje (1983):

$$C_1 \ln\{[Y(S_0 - S) + X_0]/X_0\} - C_2 \ln(S/S_0) = \mu_{max} t \quad (4)$$

onde $C_1 = (K_s Y + S_0 Y + X_0)/(YS_0 + X_0)$; $C_2 = (K_s Y/YS_0 + X_0)$; X_0 é a biomassa inicial; S_0 é a concentração inicial do substrato; e $\mu max = kY$, a máxima taxa de crescimento específico. A Equação 4 foi usada na análise de regressão não linear para estimar K_s. A concentração da biomassa em mg foi convertida do número de células considerando-se uma célula microbiana com um peso seco de $2x10^{-10}$mg (McCarty).

O xileno foi o primeiro composto a ser estudado por ser o contaminante mais persistente na área onde ocorreu o derramamento em Kalkaska. Os dados nas Figuras 2 e 3 de experimentos a altas concentrações de xileno revelam uma diferença aproximada de 40-45% nos períodos de retardo antes do início da rápida degradação nos dois diferentes níveis de biomassa. A completa degradação de 3.7 mg/l de xileno em um nível de biomassa mais elevado ocorreu em apenas 2,75 dias, enquanto que o sistema com menor biomassa necessitou de 3,75 dias para a degradação de 2,15 mg/l de xileno. A resultante da taxa geral de conversão a um nível maior de biomassa, 1,35 mg/l-dia, foi deste modo aproximadamente 2,4 vezes a taxa de conversão de 0,57 mg/l-dia a um nível menor de biomassa.

Os valores de ajustamento dos dados apresentados nas Figuras 2 e 3 para a regressão não linear são apresentados na Tabela 2, juntamente com os valores dos parâmetros de dois outros

experimentos realizados a concentrações de *o*-xileno na faixa de 20 μg/l e diferentes concentrações iniciais de biomassa. Como apresentado na Tabela 3, estes dois últimos experimentos foram usados para a estimativa de K_s. Um valor de k =3,11/dia (Tabela 2) foi usado no ajuste da regressão não linear. Os pequenos valores de K_s obtidos indicam que este parâmetro poderia ser eliminado dos cálculos do modelo (Equação 4) sem que houvesse efeito real nas simulações. Os números da Tabela 3 indicam também que, para este caso particular, K_s não pode ser estimado corretamente usando-se experimentos a uma concentração inicial de substrato na faixa de 20μg/l. Estes resultados validam a suposição de cinética de ordem zero em relação ao substrato ($S_0 \gg K_s$) para os experimentos à alta concentração de xileno. Novas simulações foram realizadas usando-se o modelo de ordem zero, Equação 3, e os dados à baixa concentração para estimar o coeficiente da máxima taxa específica de utilização do substrato (k). Os valores estimados de k para as baixas concentrações de *o*-xileno estão praticamente dentro do intervalo de confiança de 95% das simulações para as altas concentrações de *o*-xileno (Tabela 2).

Experimentos similares aos descritos acima para *o*-xileno foram também realizados para benzeno e tolueno. A Figura 4 mostra os dados e a simulação do modelo de ordem zero para benzeno a alta concentração inicial de substrato. O mesmo valor para a máxima taxa específica de utilização do substrato, k, foi obtido à alta (ppm) e baixa (ppb) concentração de benzeno, o que é uma indicação de que K_s é pequeno se comparado com 22 μg/l (Tabela 2). Para as condições testadas, estes resultados mostram que o coeficiente de meia velocidade (K_s) pode ser negligenciado para concentrações superiores a aproximadamente 20μg/l.

Dados experimentais e a simulação do modelo para a determinação do valor de k para tolueno são apresentados na Figura 5. Nesta simulação as concentrações iniciais do substrato e da biomassa, S_0 e X_0, foram respectivamente, 1,44 mg/l e 0,10μg/l ($5x10^2$ células/ml). O valor estimado de k foi 2,73 dia^{-1}, com um intervalo de confiança de 2,72 - 2,75 dia^{-1}. Controles com azida de sódio mostraram perdas menores que 5% para todos os experimentos em batelada. Um resumo dos parâmetros biocinéticos obtidos para benzeno, tolueno, e *o*-xileno usando o modelo de ordem zero com crescimento microbiano é apresentado na Tabela 4.

3.2. Efeitos da temperatura.

A temperatura é um fator ambiental crítico para as taxas de degradação microbiana. A temperatura média da água subterrânea na área contaminada em Kalkaska é inferior a 10°C (Chiang *et al.*, 1989). Experimentos em batelada foram realizados com microorganismos degradadores de *o*-xileno a três temperaturas diferentes para determinar os efeitos deste parâmetro nas máximas taxas de utilização do substrato. A regressão não linear foi usada no ajuste dos dados para estimar k para cada temperatura. Os dados e as simulações do modelo de ordem zero para a degradação de *o*-xileno a 8,22 e 29°C são apresentados na Figura 6, e os resultados estatísticos na Tabela 5.

As variações na taxa da reação em função da temperatura podem ser descritos pela equação de Arrhenius. As taxas (k) para cada temperatura foram então colocadas em um gráfico versus 1/T (°K) para se determinar a energia de ativação (Figura 7). Destes dados foi determinado que a energia de ativação tinha um valor de E_a = 16,4 kcal/mol com um I.C. de 95% de ± 0.13 kcal/mol. Uma vez que as temperaturas das águas naturais variam em uma faixa relativamente pequena, a equação de Arrhenius pode ser simplificada, e o termo E_a/RT_1T_2 substituído por um coeficiente de temperatura Q. A máxima taxa de utilização do substrato para *o*-xileno pode então ser ajustada para os efeitos da temperatura usando a seguinte equação simplificada:

$$\frac{k_1}{k_2} = 1{,}104^{(T1 - T2)}$$

Embora se considere que as taxas de reações catalizadas enzimaticamente decrescem um fator dois para cada 10°C de decréscimo de temperatura (Atlas e Bartha, 1987), a Equação 5 prevê que a máxima taxa de utilização do substrato para *o*-xileno irá decrescer um fator 3 para cada 10°C de decréscimo de temperatura. Um comportamento similar pode ser provavelmente assumido para os outros compostos estudados, benzeno e tolueno.

3.3. Experimentos em coluna.

Experimentos à alta (ppm) concentração inicial de benzeno, tolueno e (*o* +*p*) xileno foram realizados para examinar os efeitos de retardo e as taxas de biodegradação por microorganismos autóctones presentes nos solos de Kalkaska em condições de fluxo contínuo e limitantes de oxigênio. Os estudos foram realizados à temperatura ambiente e velocidade intersticial de 2,0 m/dia. Os contaminantes orgânicos foram adicionados individualmente como única fonte de carbono à concentração afluente de 8-9 mg/l (aproximadamente 4,5 mg/l de cada um dos isômetros no caso do xileno) e à concentração de oxigênio dissolvido variando entre 7,0 e 8,0 mg/l.

As curvas de degradação para benzeno, tolueno, e (o +p) xileno e a percentagem de oxigênio utilizado pela população microbiana autóctone nas colunas de areia de Kalkaska variaram proporcionalmente com o tempo, o que indica a conexão direta entre os contaminantes orgânicos e a utilização do oxigênio (Figuras 8-10). Em todos os casos, a biodegradação depois de um certo tempo atingiu um limite devido ao consumo total de oxigênio que resultou na estabilização das concentrações efluentes após aproximadamente 12 dias para o benzeno e 5 dias para o tolueno e xileno. O início da degradação nestes três experimentos em coluna, medido pelo consumo de oxigênio, ocorreu imediatamente para o benzeno, seguido pelo tolueno com um dia e pelo xileno com aproximadamente três dias. No entanto, uma ordem invertida foi observada em relação ao tempo necessário para a máxima utilização do oxigênio. Após um período maior de retardo para o início da utilização de oxigênio, os microorganismos degradadores de xileno atingiram mais rapidamente o nível de consumo total de oxigênio do que os degradadores de tolueno e benzeno, o que está de acordo com os estudos biocinéticos em batelada apresentandos anteriormente.

Análises de contagem de placas nos efluentes das colunas revelaram a presença de diferentes tipos dominantes de bactérias para os três hidrocarbonetos monoaromáticos nos experimentos em condições limitantes de oxigênio. A população do microorganismo predominante era aproximadamente uma ordem de grandeza maior do que dos outros dois ou três tipos de bactérias presentes em cada caso. As contagens de placa das populações microbianas nativas aderidas à areia do aqüífero original não contaminado foram feitas usando-se extrações com pirofosfato de sódio para se determinar os números iniciais de microorganismos capazes de degradar cada contaminante. Embora seja impossível determinar o número exato de microorganismos espe-

cificamente capazes de degradar cada composto nos sólidos do aqüífero, estas análises revelaram que os microrganismos degradadores de xileno estavam presentes em um número muito menor (~10^3 células/g sólidos secos) do que os degradadores de benzeno e tolueno (~10^4 células/g de sólidos secos). O número total de heterótrofos presentes na areia original era da ordem de 10^4-10^5/g de sólidos secos.

Experimentos em colunas de areia em condições de fluxo contínuo foram realizados com benzeno e *o*-xileno para estudar os efeitos de retardo na presença de níveis traços de hidrocarbonetos. A influência da velocidade foi também avaliada nestes experimentos, e observada ter um grande impacto na degradação de benzeno. Os resultados à concentração de 25 μg/l e velocidade intersticial de 2,0 m/dia mostraram completa remoção de benzeno através das colunas após 12 dias. As contagens de placas ao final do experimento revelaram que neste período a população microbiana aderida ao solo aumentou aproximadamente duas ordens de grandeza (de 10^4 células/g de sólidos secos para 10^6 células/g de sólidos secos). O mesmo estudo foi repetido para velocidade intersticial de 0,22 m/dia onde menos de 2 μg/l de benzeno apareceram no efluente da coluna nas primeiras 10 horas e, após 30 horas, o contaminante não era mais detectado a um limite analítico de 0,1 μg/l. Uma explicação para o efeito observado da velocidade intersticial, que com certeza está associado ao efeito de carga, relaciona-se ao número inicial de microorganismos degradadores de benzeno presentes de Kalkaska; ou seja, a população autóctone poderia estar presente em numero suficiente para metabolizar a massa de 1,2 μg de benzeno adicionada por dia a baixa (0,22 m/dia) velocidade mas não a massa de 11,1 μg/dia adicionada a alta (2 m/dia) velocidade.

Como indicado na Figura 11, o mesmo fenômeno foi observado com *o*-xileno a uma concentração afluente de 25 μg/l e velocidades intersticiais de 0.22, 0.67, e 2.0 m/dia. Os microorganismos autóctones foram capazes de degradar *o*-xileno a níveis inferiores a 0.1 μg/l. Análises de contagem de placa no final dos experimentos indicaram que os microorganismos aderidos na areia aumentaram de 10^4 para aproximadamente 5 a $7x10^5$/g de sólidos secos. A degradação total de *o*-xileno ocorreu entre 5 e 7 dias para as três velocidades estudadas. O fato de que o parâmetro velocidade não foi tão significante para os experimentos com xileno do que foi com benzeno pode ser atribuído ao menor número inicial de microorganismos degradadores de xileno presentes na areia do aqüífero (aproximadamente 10^3 células/g de sólidos secos). É provável que esta baixa densidade microbiana não foi suficiente para influenciar no início da mensurável degradação tão rapidamente como no experimento com benzeno à baixa velocidade, onde a biomassa inicial era da ordem de 10^4 células/g de sólidos secos.

A temperatura de água subterrânea pode afetar significativamente as taxas de crescimento microbiano e os tempos necessários para a bioremediação mesmo se todas as outras necessidades microbianas (oxigênio e nutrientes) forem satisfeitas. Para testar os efeitos de temperatura em condições de fluxo contínuo, foi realizado um experimento usando as condições de velocidade intersticial e temperatura similares àquelas observadas no local em Kalkaska (0.22 m/dia e 8°C). Uma coluna com a areia de Kalkaska foi alimentada com uma mistura contendo benzeno, tolueno e *o*-xileno (único experimento com uma solução mista), cada contaminante à concentração de aproximadamente 0,6 mg/l. Baixas concentrações foram escolhidas para evitar condições limitantes de oxigênio de modo que se pudesse observar somente o efeito da temperatura nas taxas de desaparecimento dos compostos. Nestas condições, o desaparecimento total de benzeno e tolueno ocorreu após 16 dias, e de *o*-xileno após 24 dias (Figura 12). Um modelo simples de reator de batelada de mistura completa incorporando ordem zero para degradação do contaminante com crescimento microbiano, como definido na Equação 3, foi usado para prever as taxas de desaparecimento dos compostos BTX nas mesmas condições de fluxo e temperatura observadas no local em Kalkaska, e em condições ótimas de nutrientes e receptor de elétrons. A Equação 5 foi usada para ajustar as taxas de máxima utilização do substrato (k) para os contaminantes a 8°C sendo que o número inicial estimado de microorganismos degradadores de benzeno e tolueno foi 1,25 μg/l (10^4/g), e de xileno 0,125 μg/l (10^3/g), usando-se os coeficientes de produção (Y) e de decaimento (b) mostrados na Tabela 4 e o modelo de ordem zero, é previsto que benzeno e tolueno desaparecerão em 15 dias, e xileno em 20 dias. Estas projeções estão bastante próximas dos tempos obtidos experimentalmente. É interessante salientar que a ordem de desaparecimento observada no laboratório é exatamente a mesma ocorrida no local em Kalkaska. Quatro anos após a detectação dos contaminantes, a área de contaminação coberta pelas plumas de 10 μg/l de benzeno e tolueno era de aproximadamente 45 x 30 metros, enquanto que o limite da pluma dos 10 μg/l de xileno estava distribuído em uma área de 300 x 100 metros.

Os períodos de desenvolvimento crítico da população microbiana de aproximadamente duas semanas encontrados neste estudo para *o*-xileno, ou até mesmo aqueles de seis semanas observados para *p*-nitrofenol por Aelion *et al.* (1987), são pequenos se comparados com os períodos envolvidos em condições típicas de campo, onde as heterogeneidades e complexidades fazem com que as taxas de crescimento microbiano e de degradação dos contaminantes sejam muito mais desfavoráveis (Alexander e Scow, 1989; Chiang *et al.*, 1989; Downey e Elliot, 1990). Os valores dos coeficientes de meia velocidade (K_s) medidos nos testes de laboratório para os hidrocarbonetos monoaromáticos foram bastante baixos porém, de acordo com os valores observados por Robertson e Buton (1987) para a degradação de tolueno por microorganismos de água salgada. No entanto, estes baixos valores de K_s provavelmente não são representativos das condições subsuperficiais de campo. Os experimentos de laboratório foram cuidadosamente projetados e controlados para facilitar o contato entre contaminantes, nutrientes e micróbios. As condições de heterogeneidades no campo funcionarão de modo a diminuir o contato entre substrato e microorganismos, contribuindo para valores maiores de K_s em sistemas subsuperficiais, como confirmado por Focht e Shelton (1987).

Para se fazer alguma perspectiva de como os tempos para o desenvolvimento das populações observados em laboratório poderiam ser relacionados à prática de bioremediação, uma estimativa com modelo foi feita para prever o tempo de desaparecimento de xileno em uma situação de contaminação típica de campo. A Equação 4 foi empregada para fazer os cálculos baseados nos parâmetros determinados neste estudo para a areia de Kalkaska (X_o = 0.125 μg/l, k = 0,69 dia^{-1}, Y = 0,67, b = 0,11 dia^{-1} e T = 8°C). Um coeficiente de meia velocidade de (K^s) = 10 mg/l sugerido por McCarty (1985) foi empregado como representativo das condições de campo. Para este cenário o modelo previu que, em condições favoráveis de oxigênio, 50% de um nível inicial

de contaminação de xileno de 0,2 mg/l estaria ainda presente dois anos após o derramamento. Aproximadamente quatro anos seriam necessários para a completa degradação de xileno.

Embora, os números obtidos para o modelo simples de Monod, empregado no exemplo acima, não possam ser considerados estimativas exatas para o desaparecimento de contaminantes em qualquer sistema ambiental subsuperficial, os cálculos claramente sugerem que a insuficiência de grandes populações ativas de microorganismos pode ser um fator principal contribuinte para os longos períodos observados para a remediação de materiais de aqüíferos contaminados.

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo confirmam que populações suficientemente grandes de organismos autóctones de aqüíferos arenosos não previamente contaminados são capazes de degradar benzeno, tolueno e xileno em períodos relativamente pequenos em condições favoráveis de crescimento e em presença de adequadas quantidades de oxigênio. No entanto, os resultados também confirmam que as baixas populações de microorganismos tipicamente presentes em sistemas subsuperficiais podem resultar em significantes períodos de retardos antes do início da mensurável biodegradação, mesmo em condições altamente favoráveis de oxigênio e nutrientes. Estes retardos, referidos aqui como períodos para o desenvolvimento da população, variaram inversamente com o número de microorganismos contaminante-específicos inicialmente presentes no solo do aqüífero, o que sugere a necessidade da obtenção de concentrações críticas de biomassa. Embora esta última afirmação não seja novidade, ela é raramente abordada adequadamente em aplicações de biotecnologia para a remediação subsuperficial "in-situ". Estas aplicações geralmente focalizam o estabelecimento de condições apropriadas de receptor de elétrons e de nutrientes, e assumem um desenvolvimento garantido de suficientes populações microbianas. Os resultados deste trabalho sugerem que isto pode não ser uma prática apropriada, e que mais atenção deve ser dada à possível necessidade de se aumentar as populações microbianas autóctones para assegurar que as concentrações de biomassa sejam suficientemente altas para a confirmação das taxas de degradação do contaminante.

6. REFERÊNCIAS

1 — Aamand, J.; C. Jorgensen; E. Arvin e B. Jensen (1989), "Microbial Adaptation to Degradation of Hydrocarbons in Polluted and Unpolluted Groundwater," *Journal of Contaminant Hydrology*, 4, 299-312.

2 — Aelion, C. M.; C. M. Swindoll e F. K. Pfaender (1987), "Adaptation to and Biodegradation of Xenobiotic Compounds by Microbial Communities from a Pristine Aquifer," *Appl Environ Microbiol*, 53, 2212-2217.

3 — Alexander, M e K. M. Scow (1989), "Kinetics of Biodegradation in Soil." In: Swawney, B. L.; Browns, K(Eds) *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*. Soil Science Society of America 22, 243-269.

4 — Atlas, R.M. e R. Bartha (1987), *"Microbial Ecology: Fundamentals and Applications,"* (2nd ed), The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California.

5 — Chang, H. T. e B. E. Rittmann (1988), "Comparative study of biofilm shear loss on different adsorptive media," *J. Water Pollut. Control Fed., 60, 262-*.

6 — Chiang, C.Y.; J.P. Salanitro; E. Y. Chai; J.D. Colthart e C.L. Kein (1989), "Aerobic Biodegradation of Benzene, Toluene and Xylene in a Sandy Aquifer-Data Analysis and Computer Modeling," Ground Water, 27,6, 823-834.

7 — Corseuil, X.C. (1992), "Enhanced Degradation of Monoaromatic Hydrocarbons in Sandy Aquifer Materials by Microbial Inoculation Using Biologically Active Carbon Reactors," *Ph. D. Dissertation*, The University of Michigan, Ann Arbor, MI.

8 — Downey, D. C. e M.G. Elliott (1990), "Performance of Selected In Situ Soil Decontamination Technologies: An Air Force Perspective, "*Environmental Progress*,9, 169-173.

9 — Focht, D.D. e D. Shelton (1987), "Growth Kinetics of *Pseudomonas alcaligenes* C-O Relative to Inoculation and 3-Chlorobenzoate Metabolism in Soil," *Appl. Environ. Microbiol., 53, 1846-1849.*

10 — McCarty, P.L. (1975), "Stoichiometry of Biological Reactions," Progress in Water Technology, 7, 157-.

11 — McCarty, P.L. (1985), "Application of Biological Transformations in Ground Water," *Proceedings, Second International Conference on Groundwater Quality Research*, Oklahoma State University, Stillwater, Ok.

12 — Robertson, B.R. e D. K. Button (1987), "Toluene Induction and Uptake Kinetics and Their Inclusion in the Specific-Affinity Relationship foi Describing Rates of Hydrocarbon Metabolism," *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2193-2205.

13 — Robinson, J.A. e J.M. Tiedje (1983), "Nonlinear Estimation of Monod Growth Kinetic Parameters from a Single Substrate Depletion Curve," *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1453-1458.

14 — Spain, J.C. (1990), "Microbial Adaptation in Aquatic Ecosystems," In: *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*, Racke, K.D. and J.R. Coats (Eds), American Chemical Society 14, 181-190.

15 — *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed., American Public Health Association: Washington, DC, 1989.

16 — Wiggins, BA.; S.H. Jones e M. Alexander (1987), "Explanation for the Acclimation Period Preceding the Mineralization of Organic Chemicals in Aquatic Environments," *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 791-795.

17 — Wilson, J.T.; J.F. McNabb; D. L. Balkwill e W.C. Ghiorse (1983), "Enumeration and Characterizations of Bacteria Indigenous to a Shallow Water-Table Aquifer," *Ground Water*, 21, 134-142.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a assistência do prof. Dr. Walter J. Weber, Jr., do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Michigan, local onde foi realizado este trabalho.

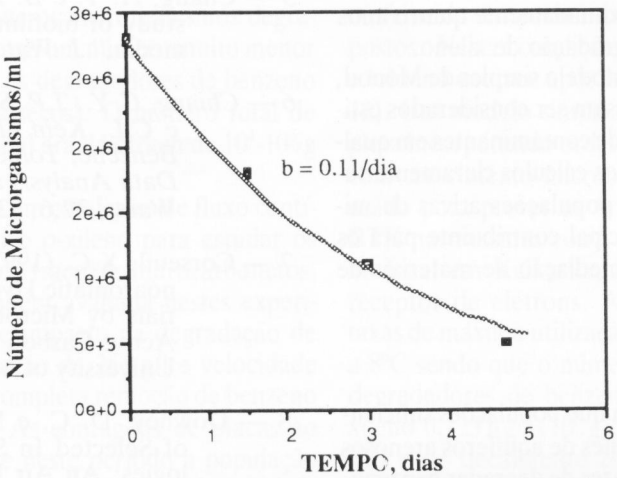

Figura 1.
Dados experimentais e simulação de modelo para a determinação do coeficiente de decaimento para *o*-xileno

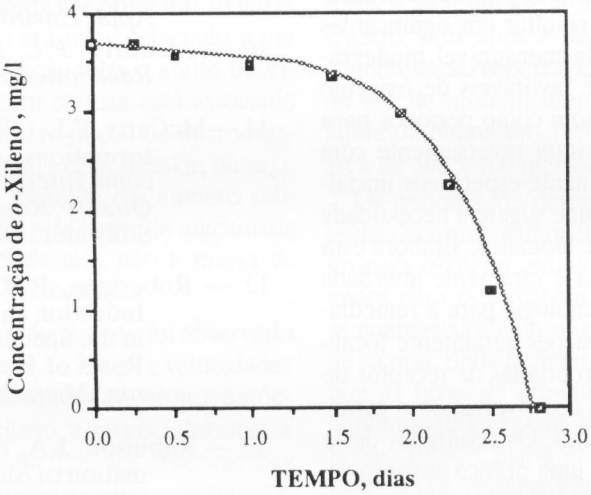

Figura 2.
Dados e simulação de modelo para a biodegradação de *o*-xileno

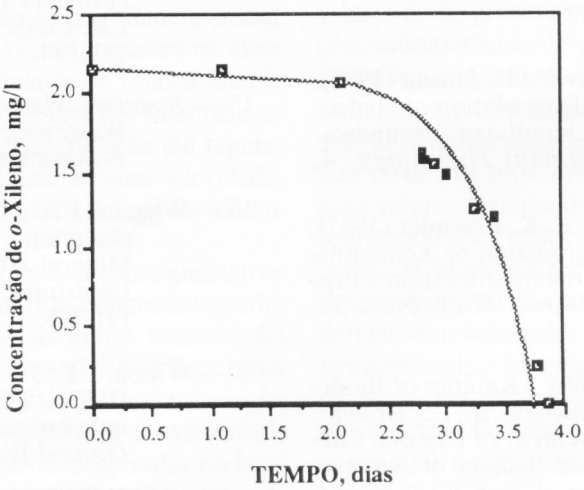

Figura 3.
Dados e simulação de modelo para a biodegradação de *o*-xileno

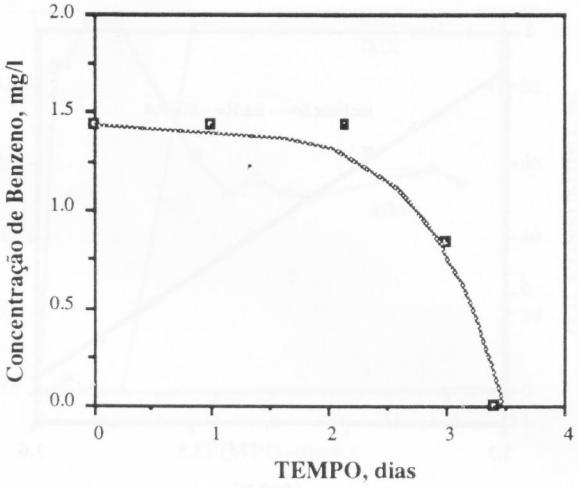

Figura 4.
Dados e simulação de modelo para a biodegradação de benzeno5

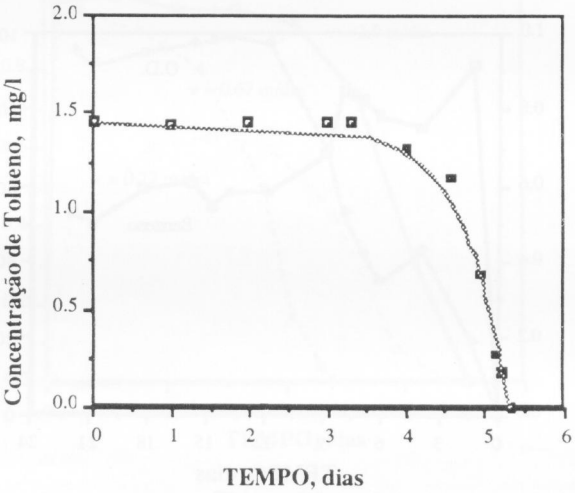

Figura 5.
Dados e simulação de modelo para a biodegradação de tolueno

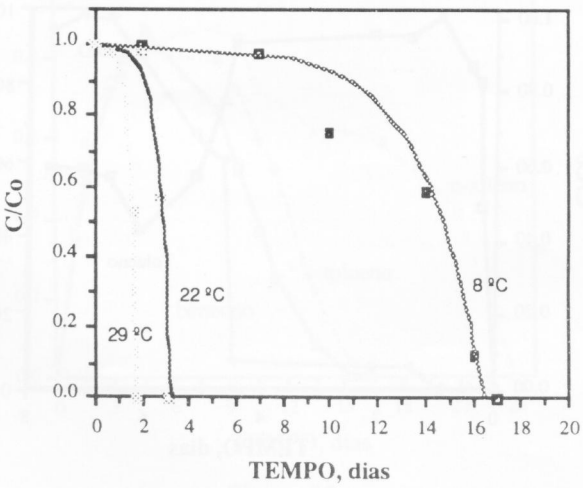

Figura 6.
Dados e simulação de modelo para a biodegradação de *o*-xileno a diferentes temperaturas

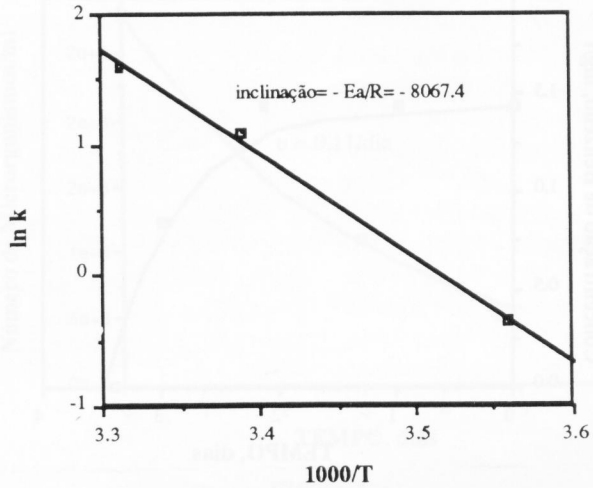

Figura 7.
Efeito da temperatura nas máximas taxas de utilização específica do substrato para *o*-xileno.

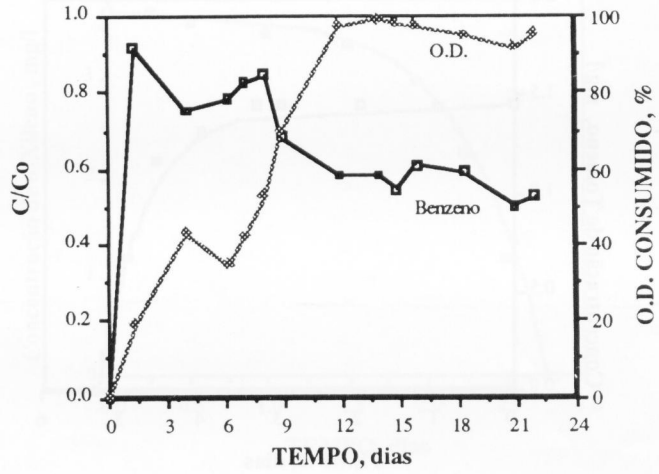

Figura 8.
Curvas de degradação de benzeno (C_o = 8.9 mg/l) e de consumo de oxigênio dissolvido

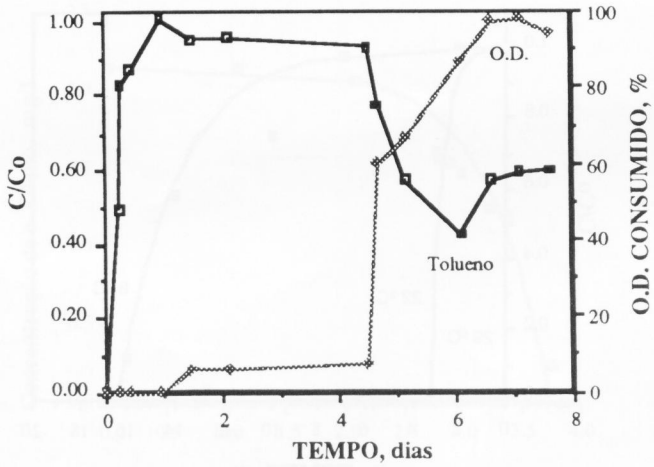

Figura 9.
Curvas de degradação de tolueno (C_o = 8.13 mg/l) e de consumo de oxigênio dissolvido

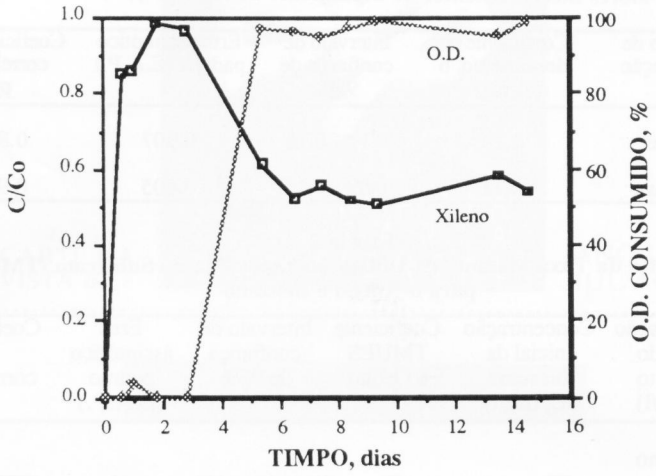

Figura 10.
Curvas de degradação de (*o* + *p*) xileno (C_o = 8.13 mg/l) e de consumo de oxigênio dissolvido

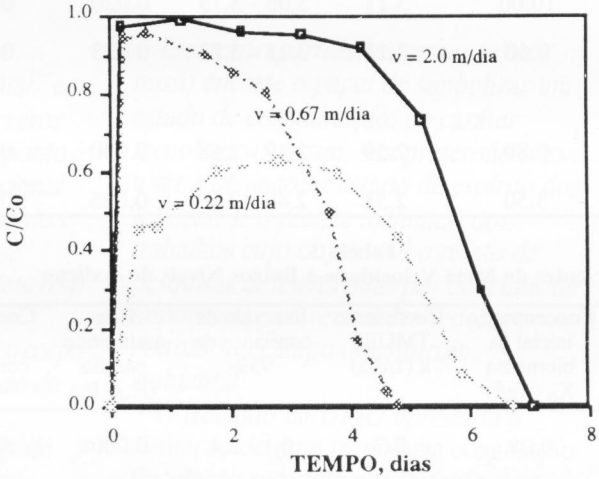

Figura 11.
Curvas de degradação de (*op*) xileno (C_o = 25 μg/l) para diferentes velocidades intersticiais

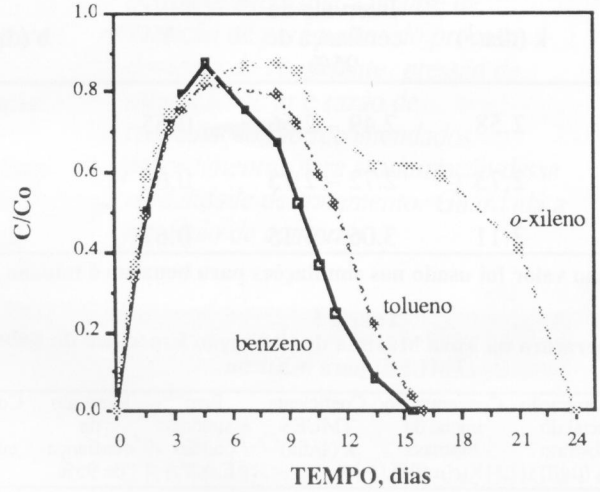

Figura 12.
Curvas de degradação para os compostos BTX em ums solução mista (C_o = 0.6 mg/l de cada composto) a T = 8°C e v_s = 0.22 m/dia

Tabela 1.
Valores dos coeficientes de decaimento bacteriano para *o*-xileno

Período de observação	Coeficiente de decaimento, b (1/dia)	Intervalo de confiança de 95%	Erro assintótico padrão (E.A.P.)	Coeficiente de correlação R^2
5 dias	0.14	0.11 - 0.16	0.007	0.995
13 dias	0.11	0.09 - 0.12	0.005	0.992

Tabela 2.
Coeficientes da Taxa Máxima de Utilização Específica do Substrato (TMUES) para *o*-Xileno e Benzeno

Concentração inicial do substrato S_0 (µg/l)	Concentração inicial da biomass X_0 (µg/l)	Coeficiente TMUES k (1/dia)	Intervalo de confiança de 95%	Erro assintótico padrão (E.A.P.)	Coeficiente de correlação R^2
o-Xileno					
20.5	0.08	3.03	2.93 - 3.13	0.042	0.987
22.0	0.60	3.06	2.99 - 3.14	0.036	0.992
3700	10.00	3.11	3.06 - 3.15	0.020	0.997
2150	0.60	3.18	3.13 - 3.23	0.023	0.986
Benzeno					
22.0	0.80	2.59	2.49 - 2.68	0.030	0.994
1440	3.50	2.58	2.49 - 2.66	0.025	0.993

Tabela 3.
Coeficientes de Meia Velocidade a Baixos Níveis de *o*-xileno

Concentração inicial do substrato S_0 (µg/l)	Concentração inicial da biomassa X_0 (µg/l)	Coeficiente TMUES k (1/dia)	Intervalo de confiança de 95%	Erro assintótico padrão (E.A.P.)	Coeficiente de correlação R^2
20.5	0.08	0.7	0 1 - 2.4	0.0008	0.977
22.0	0.60	0.1	-2.0 - 1.1	0.001	0.984

Tabela 4.
Parâmetros Biocinéticos para os Compostos BTX - Areia de Kalkaska

composto	k (dia^{-1})	Intervalo de confiança de 95%	Y	b (dia^{-1})*
Benzeno	2.58	2.49 – 2.66	0.65	-
Tolueno	2.73	2.72 – 2.75	0.66	-
o-Xileno	3.11	3.06 – 3.15	0.67	0.11

*** O mesmo valor foi usado nas simulações para benzeno e tolueno**

Tabela 5.
Efeito da Temperatura na Taxa Máxima de Utilização Específica do Substrato (TMUES) para *o*-Xileno

Temp. (°C)	Concentração inicial do substrato S_0 (µg/l)	Concentração inicial da biomass X_0 (µg/l)	Coeficiente TMUES k (1/dia)	Erro assintótico padrão (E.A.P.)	Intervalo de confiança de 95%	Coeficiente de correlação R^2
8	2.81	4.0	0.69	0.006	0.67 - 0.70	0.987
22	2.25	4.0	2.97	0.040	2.84 - 3.09	0.997
29	2.25	4.0	4.97	0.090	4.67 - 5.24	0.982