

**Avaliação da biodegradação do benzeno e do tolueno na presença de biodiesel de soja sob condições metanogênicas**

Cássio Moraes Schambeck

Orientador: Prof. Henry Xavier Corseuil

Co-orientadora: Helen Simone Chiaranda

2009/2



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental**

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO BENZENO E DO  
TOLUENO NA PRESENÇA DE BIODIESEL DE SOJA SOB  
CONDIÇÕES METANOGÊNICAS**

**Cássio Moraes Schambeck**

**Trabalho apresentado à Universidade  
Federal de Santa Catarina para Conclusão  
do Curso de Graduação em Engenharia  
Sanitária e Ambiental**

**Orientador  
Professor PhD. Henry Xavier Corseuil**

**Co-orientadora  
Helen Simone Chiaranda, M.Sc.**

**FLORIANÓPOLIS – SC  
MARÇO/2010**

Schambeck, Cássio Moraes

Avaliação da biodegradação do benzeno e do tolueno na presença de biodiesel de soja sob condições metanogênicas.

Cássio Moraes Schambeck – Florianópolis, 2010.

x, 77f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Título em inglês: Assessing the biodegradation of benzene and toluene in the presence of soybean biodiesel under methanogenic conditions.

1. Biodiesel. 2. Hidrocarbonetos Monoaromáticos. 3. Metanogênese.

**CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E  
AMBIENTAL**

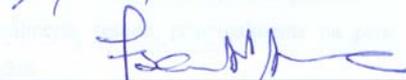
**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO BENZENO E DO  
TOLUENO NA PRESENÇA DE BIODIESEL DE SOJA SOB  
CONDIÇÕES METANOGENICAS**

**CÁSSIO MORAES SCHAMBECK**

**Trabalho submetido à Banca Examinadora como parte dos  
requisitos para Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia  
Sanitária e Ambiental – TCC II**

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Melissa Mezzari, Dra.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Fernando Soares Pinto Sant'Anna, Dr.

  
\_\_\_\_\_  
Helen Simone Chiaranda, M.Sc.  
(Co-orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Henry Xavier Corseuil, Dr.  
(Orientador)

**FLORIANÓPOLIS - SC  
MARÇO/2010**

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, por todas as verdades que me fizeram ver, pelo apoio incondicional e por me darem asas e me fazerem voar.

Ao Professor Henry, por ter me dado a oportunidade de grande crescimento e aprendizado ao me escolher para trabalhar no Remas. Jamais me esquecerei da grande realização que senti no dia que consegui a bolsa de iniciação científica.

À minha co-orientadora, “chefe” e amiga Helen, pela extrema paciência e disponibilidade para escutar (ou ler) os meus mais improváveis (insanos) comentários. Seu pupilo não seria nem metade do que ele é hoje se não fossem suas dicas muito preciosas, as quais nem sempre eram tomadas como certas na primeira vez, mas fizeram, sem dúvida, toda diferença.

À minha companheira de experimento Débora, pois sem sua ajuda eu não teria conseguido levar meu TCC adiante.

Ao Márcio Busi, por se fazer sempre disponível e incrivelmente acessível para tirar todas as dúvidas e dar orientações salvadoras durante toda a parte experimental.

À Ana Paula, pela ajuda gentilmente cedida, principalmente na parte inicial de montagem do experimento e nas reações.

À Marilda e ao Alexandre, pela companhia, risadas, apoio, muita ajuda e amizade ao longo de todo este tempo.

A toda equipe do laboratório Remas, desde os integrantes que já rumaram para outros caminhos aos que ainda jogam neste time. Todos vocês, de alguma maneira, contribuíram para que o laboratório fosse mais que um ambiente de trabalho e se tornasse um local prazeroso de estar.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Contextualização .....	1
1.2 Objetivos .....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Biodiesel .....	4
2.2 Hidrocarbonetos Monoaromáticos (BTEX) .....	6
2.3 Biodegradação Anaeróbia .....	7
2.3.1 <i>Sulfato-redução</i> .....	9
2.3.2 <i>Metanogênese</i> .....	10
2.4 Biodegradação do biodiesel e da mistura diesel/biodiesel .....	14
2.5 Biodegradação anaeróbia do benzeno e tolueno .....	16
2.6 Modelo energético de biodegradação .....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1 Montagem dos microcosmos .....	22
3.2 Procedimentos analíticos .....	25
3.2.1 <i>Determinação da concentração de benzeno, de tolueno e de metano</i> .....	26
3.2.2 <i>Determinação da concentração de nitrato, sulfato e acetato</i> .....	26
3.2.3 <i>Análise microbiológica</i> .....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	29
4.1 Biodegradação dos contaminantes sob condições metanogênicas .....	29
4.1.1 <i>Determinação da biodegradação do benzeno e do tolueno na ausência e presença de biodiesel</i> .....	29
4.1.2 <i>Acetato e Metano</i> .....	33
4.1.3 <i>Nitrato e sulfato</i> .....	36
4.2 Modelo energético de biodegradação via metanogênese .....	39
4.3 Análise microbiológica .....	41
5. CONCLUSÕES .....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
APÊNDICE A .....	54
APÊNDICE B .....	64

APÊNDICE C.....	68
APÊNDICE D .....	72
ANEXO.....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Fórmula estrutural dos hidrocarbonetos monoaromáticos que compõem o grupo BTEX.....	6
Figura 2.2 - Rotas metabólicas e grupos de microorganismos envolvidos no processo de biodegradação anaeróbia com foco na metanogênese...12	
Figura 2.3 - Transferência de elétrons para produção de energia e síntese celular.....	20
Figura 3.1 - Microcosmos utilizados no experimento.....	25
Figura 4.1 - Variação da concentração de benzeno e tolueno no reator contendo benzeno e tolueno (BT).....	30
Figura 4.2 - Variação da concentração de benzeno e tolueno no reator contendo biodiesel, benzeno e tolueno (BBT).....	31
Figura 4.3 - Variação da concentração de benzeno e tolueno no reator contendo biodiesel, benzeno, tolueno e HgCl <sub>2</sub> (BBT HG).....	32
Figura 4.4 - Variação da concentração de acetato e metano no reator contendo benzeno e tolueno (BT).....	33
Figura 4.5 - Variação da concentração de acetato e metano no reator contendo biodiesel, benzeno e tolueno (BBT).....	34
Figura 4.6 - Variação da concentração de acetato e metano no reator contendo biodiesel, benzeno, tolueno e HgCl <sub>2</sub> (BBT HG). ....	36
Figura 4.7 - Variação da concentração de nitrato e sulfato no reator contendo benzeno e tolueno (BT). . ....	37
Figura 4.8 - Variação da concentração de nitrato e sulfato no reator contendo biodiesel, benzeno e tolueno (BBT).....	38
Figura 4.9 - Variação da concentração de nitrato e sulfato no reator contendo biodiesel, benzeno, tolueno e HgCl <sub>2</sub> (BBT HG).....	39
Figura 4.10 - Concentração total bacteriana nos reatores no início (i) e final (f) do experimento... ..	43
Figura 4.11 - Concentração bacteriana nitrato-redutora nos reatores no início (i) e final (f) do experimento.....	43
Figura 4.12 - Concentração bacteriana sulfato-redutora nos reatores no início (i) e final (f) do experimento.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos BTEX..7	
Tabela 2.2 - Comparação energética de algumas reações presentes na biodegradação anaeróbia do benzeno e do tolueno.....9	
Tabela 2.3 - Meias-reações de síntese celular ( $R_c$ ), dos receptores de elétrons ( $R_a$ ) e dos doadores de elétrons ( $R_d$ ).....21	
Tabela 3.1 - Composição da água sintética.....22	
Tabela 3.2 - Valores experimentais iniciais utilizados na montagem dos microcosmos.....24	
Tabela 4.1 - Reações de oxi-redução do íon palmitato, do benzeno, do tolueno, e do acetato.....40	

## RESUMO

A interferência dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno e tolueno na biodegradação metanogênica do biodiesel de soja foi estudada em experimentos laboratoriais de microcosmos. Três microcosmos foram montados com água sintética, inóculo metanogênico e contaminantes: um contendo benzeno e tolueno; outro, benzeno, tolueno e biodiesel; e o último era um controle biológico contendo  $\text{HgCl}_2$  para o reator com biodiesel. O período de duração do experimento foi de 97 dias. Na ausência de biodiesel, foi observado um decaimento rápido e simultâneo do benzeno e tolueno, sem produção de quantias significativas de acetato e metano, fato que contribuiu para suspeita da ocorrência de processos aeróbios de biodegradação. No microcosmo com biodiesel, não houve biodegradação do benzeno e do tolueno, com uma baixa formação de acetato e metano atribuída a biodegradação do biodiesel. Após certo tempo, é possível ter havido uma interrupção nos processos de biodegradação neste reator devido ao acúmulo de gases, os quais tornaram a biodegradação termodinamicamente desfavorável. Através do cálculo da produção teórica de metano, verificou-se que a formação de metano a partir do biodiesel é maior do que a partir do benzeno, do tolueno e do acetato, e que todo acetato formado no reator com biodiesel foi biodegradado a metano. A análise microbiológica mostrou que no reator biologicamente ativo e com biodiesel, a presença do biocombustível estimulou o aumento em até 3 vezes das bactérias totais e em até 45 vezes das bactérias sulfato-redutoras, corroborando para hipótese de que a sulfato-redução foi a principal via metabólica para a biodegradação neste reator.

**Palavras-chave:** biodiesel; hidrocarbonetos monoaromáticos; metanogênese.

## ABSTRACT

The interference of monoaromatic hydrocarbons benzene and toluene on methanogenic biodegradation of soybean biodiesel was studied in laboratory microcosm assays. Three microcosms were assembled with synthetic water, methanogenic inoculum, and contaminants: one containing benzene and toluene; another containing benzene, toluene and biodiesel; and the last one was a biological control for the reactor with biodiesel. The experiment was run during 97 days. In the absence of biodiesel, a fast and simultaneous decline of benzene and toluene was noticed, with no production of meaningful amounts of acetate and methane, which contributed to the suspicion of the occurrence of an aerobic process of biodegradation. In the microcosm with biodiesel, there was no biodegradation of benzene and toluene, with acetate and methane production due to biodiesel biodegradation. After some time, the interruption of the biodegradation in this reactor might have occurred because of gas accumulation, which made the biodegradation thermodynamically unfavorable. By calculating the theoretical production of methane, it was verified that the methane formation from biodiesel is bigger than from benzene, toluene and acetate, and that all the acetate formed in the reactor with biodiesel was biodegraded to methane. The microbiologic analysis demonstrated that in the biologically active reactor with biodiesel, the presence of the biofuel stimulated the increase of the total bacteria by 3 times and the sulfate-reducing bacteria by 45 times, confirming the hypothesis that sulfate reduction was the main pathway for the biodegradation in this reactor.

**Key words:** biodiesel; monoaromatic hydrocarbons; methanogenesis.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Contextualização

As conseqüências ambientais negativas provocadas pelos combustíveis fósseis e a preocupação com o abastecimento mundial de petróleo incentivou a busca por combustíveis renováveis, como os biocombustíveis. Para ser uma alternativa viável, o biocombustível deve fornecer um ganho líquido de energia, ter benefícios ambientais, ser economicamente competitivo e poder ser produzido em grandes quantidades sem reduzir os estoques de alimentos (HILL et al., 2006). Entre os biocombustíveis líquidos mais utilizados nos dias atuais, destaca-se o etanol e biodiesel (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). No Brasil, desde janeiro de 2005, o emprego de biodiesel passou a ser autorizado pelo governo através do acréscimo de 2% ao diesel comercial (BRASIL, 2005), sendo este o passo inicial para a implementação do biodiesel na matriz energética nacional.

O biodiesel não contém compostos de petróleo, mas pode apresentá-los na medida em que este biocombustível compõe uma mistura com o óleo diesel. Deste modo, as misturas com diesel apresentarão hidrocarbonetos aromáticos, dentre os quais se destacam os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três isômeros do xileno (chamados de compostos BTEX). Estes são importantes contaminantes presentes no solo e nas águas subterrâneas e, geralmente, se originam de vazamentos de tanques subterrâneos, da disposição inadequada de resíduos, de derramamentos ou acidentes durante o transporte de combustíveis de origem fóssil. A atenção especial dada a este grupo de contaminantes é devido a sua relativa alta solubilidade em água e elevada toxicidade (CHAPELLE, 1993), podendo migrar do solo para a água subterrânea e contaminar locais de abastecimento de água mesmo longe de sua origem de contaminação.

Ao mesmo tempo em que estas energias alternativas ganham grande destaque como possível solução para uma crise energética mundial, pouco se conhece sobre os reais impactos de sua interação com o meio ambiente subsuperficial. Geralmente, os sistemas de distribuição e armazenamento de combustíveis, como os de misturas de diesel com biodiesel, estão localizados na subsuperfície (ex.: dutos, oleodutos e tanques de postos de serviço) e em um cenário de contaminação de um

aquífero, a inter-relação dos compostos do diesel com os do biodiesel é ainda pouco conhecida.

Alguns estudos em laboratório têm sido focados em como o biodiesel estimularia a biodegradação do diesel em ambiente aquático. A biodegradação é um processo de grande importância no desaparecimento de contaminantes, já que reduz sua massa e os transformam em subprodutos não-tóxicos, minimizando os riscos à saúde pública e ao meio ambiente (CHAPELLE, 1993). Gomes (2008) avaliou a biodegradação anaeróbia do biodiesel de soja na presença dos compostos BTEX e observou que o biodiesel teve um efeito negativo no processo de biodegradação, pois os hidrocarbonetos monoaromáticos foram mais lentamente removidos na presença de biodiesel que em sua ausência. Já Pasqualino et al. (2006), investigando a biodegradação aeróbia do biodiesel por meio do teste de evolução de CO<sub>2</sub>, concluíram que em todos os experimentos realizados o biodiesel aumentou a biodegradabilidade do diesel fóssil e da gasolina, sugerindo o efeito de sinergismo do biodiesel nos processos de biodegradação.

No caso de derramamentos de combustíveis, os ambientes subsuperficiais contaminados com hidrocarbonetos se tornam frequentemente anaeróbios devido ao consumo do oxigênio pelos microorganismos de maneira mais rápida do que ele possa ser reposto, e pelo fato do oxigênio possuir baixa solubilidade em água (DOU et al., 2008b). Assim, espera-se que as reações anaeróbias tenham um papel fundamental na diminuição da massa dos contaminantes presentes em uma mistura biodiesel/diesel através da biodegradação dos mesmos. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer sob condições fermentativas, desnitrificadoras, ferro-redutoras, sulfato-redutoras e metanogênicas (BEDIENT et al. 1997). No caso da metanogênese, um dos subprodutos metabólicos da biodegradação é o acetato, que consumido pelos microorganismos, gera como produto final o metano e o gás carbônico (CHERNICHARO, 1997).

O potencial para a biodegradação de contaminantes de interesse pode ser confirmado com o uso de microcosmos, através da comparação da remoção nos microcosmos bióticos e abióticos. Além disto, o aparecimento de subprodutos nos microcosmos podem ser usados para confirmar a biodegradação de um composto (WIEDEMEIER et al., 1998), como por exemplo, o acetato e metano.

Com isto, este trabalho se propõe a compreender melhor a dinâmica dos processos anaeróbios de biodegradação do biodiesel de

soja na presença de benzeno e tolueno através de experimentos realizados em microcosmos no laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas (REMAS). A escolha do biodiesel de soja deve-se ao fato deste compreender cerca de 90% da produção nacional (MELLO et al., 2007), se destacando perante os demais. O benzeno foi selecionado por ser considerado recalcitrante, altamente tóxico, e o mais solúvel dentre os hidrocarbonetos pertencentes ao grupo BTEX (CHAPELLE, 1993). Já o tolueno foi escolhido por ser, geralmente, o monoaromático mais facilmente biodegradado dentre os compostos BTEX e o segundo mais solúvel (CHAPELLE, 1993). Deste modo, os dois compostos apresentam comportamentos diferentes quando submetidos a um processo de biodegradação.

Compreendendo melhor a influência de um contaminante sobre o outro nos processos de biodegradação que ocorrem em um cenário de contaminação, pode-se escolher a técnica de remediação mais adequada para um local. Com isto, os resultados advindos deste trabalho podem servir como base para tomada de decisão em uma área subterrânea impactada por derramamentos de misturas de combustíveis fósseis e renováveis, como diesel e biodiesel.

## **1.2 Objetivos**

O objetivo geral deste estudo é avaliar, em condições metanogênicas, como a biodegradação do biodiesel de soja interfere na biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno e tolueno.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a produção de acetato e metano como produtos intermediário e final, respectivamente, da biodegradação metanogênica do biodiesel de soja, do benzeno e do tolueno;
- Estimar a produção teórica de metano nos microcosmos a partir do modelo energético de biodegradação;
- Utilizar técnicas de biologia molecular para detectar e quantificar os principais grupos de microorganismos associados aos processos de biodegradação anaeróbios ocorridos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biodiesel

O biodiesel vem, pouco a pouco, se tornando um dos biocombustíveis mais utilizados no setor de transportes nos dias atuais. O seu crescente uso foi facilitado pela sua habilidade de poder ser empregado em misturas com combustíveis convencionais, como por exemplo, o diesel. Nos Estados Unidos, misturas com 20% de biodiesel (B20)<sup>1</sup> têm sido consideravelmente utilizadas na frota de veículos, enquanto que na Europa os padrões legais permitem 5% de biodiesel em misturas com diesel (B5) (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). No Brasil, a introdução do biodiesel na matriz energética ocorreu em 2005 (BRASIL, 2005), e desde 1º de janeiro de 2010, ficou determinada a adição mínima obrigatória de 5% em volume de biodiesel ao óleo diesel comercial (CNPE, 2009).

O biodiesel é composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos que são produzidos quimicamente através da combinação de um óleo vegetal ou gordura animal com um álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador, que pode ser um ácido ou uma base, em uma reação chamada de transesterificação (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). A proporção e quais ésteres compõem o biodiesel varia conforme a natureza da matéria-prima utilizada. Na caracterização da composição dos biodieseis de soja e mamona, Gomes (2008) obteve os seguintes ésteres (com 18 a 20 carbonos) em porcentagens diferentes para cada tipo de biodiesel: palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato e ricinolenato, sendo este último presente somente no biodiesel de mamona (Tabela 2.1).

Diversas matérias-primas são utilizadas para a produção de biodiesel e variam de um país para o outro, podendo-se citar os óleos vegetais de colza, soja, semente de girassol, palma e pinhão manso (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). O Brasil possui uma grande diversidade de insumos agrícolas para a produção de óleos vegetais e, conseqüentemente, de biodiesel, entretanto, muitas culturas ainda têm caráter extrativista, não havendo plantios comerciais que permitam

---

<sup>1</sup> BX é a denominação utilizada para uma mistura de diesel/biodiesel, onde X é a porcentagem em volume de biodiesel presente (ANP, 2009).

avaliar suas reais potencialidades. Diante deste aspecto, a soja representa 90% da produção brasileira de óleos vegetais (MELLO et al., 2007).

**Tabela 2.1** - Composição química do biodiesel puro de soja e mamona (% em massa).

<i>Ésteres</i>	<i>Biodiesel de Soja (%)</i>	<i>Biodiesel de Mamona (%)</i>
Palmitato	12,1	2,6
Estearato	4,4	1,6
Oleato	28,1	6,7
Linoleato	42,0	12,0
Linolenato	13,3	1,2
Ricinoleato	-	76,0

Fonte: Gomes (2008).

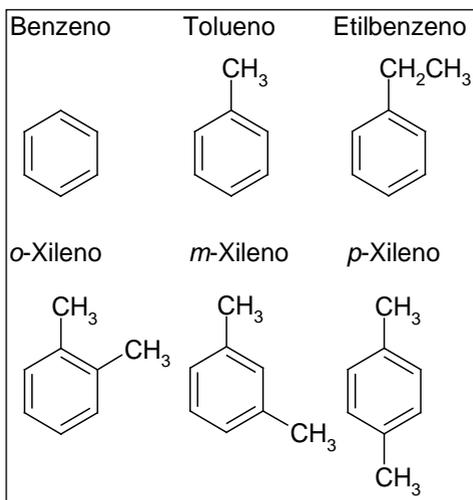
Como vantagens, o biodiesel fornece 93% de energia a mais que a necessária para sua produção, diminui os gases que atuam no efeito estufa em até 41% quando comparado com o diesel, reduz diversos dos grandes poluentes atmosféricos e tem baixo impacto na saúde humana e no meio ambiente (HILL et al., 2006). Em pesquisas realizadas para avaliar a toxicidade do biodiesel e diesel no solo com base na respiração dos microorganismos e na atividade das enzimas desidrogenases, observou-se que o biodiesel pode ser considerado um composto não-tóxico (LAPINSKIENĖ et al., 2006).

O biodiesel também vem sendo utilizado para a recuperação de locais impactados por combustíveis fósseis, surgindo como uma boa alternativa de biorremediação, já que a biodegradação dos combustíveis fósseis é acelerada com a adição de biodiesel (PASQUALINO et al., 2006). A capacidade do biodiesel estimular a degradação do petróleo cru nas costas de praias contaminadas por vazamentos vem sendo comprovada, e assim, a limpeza de costas utilizando biodiesel pode reduzir os efeitos deletérios ao meio ambiente e aos organismos que nele vivem (PEREIRA & MUDGE, 2004; MUDGE & PEREIRA, 1999). Em estudos realizados para avaliar a eficácia da adição de biodiesel na biorremediação de locais impactados com piche de carvão, constatou-se que o biodiesel, devido a sua baixa toxicidade e fácil biodegradação, pode ser uma opção de tratamento mais ambientalmente correta para

aumentar a degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) do piche, já que aumenta a biodisponibilidade e a solubilidade dos HPAs no solo (TAYLOR & JONES, 2001). Assim, o biodiesel surge como um biocombustível promissor e com grande potencial de uso no cenário mundial, haja vista suas características favoráveis em diversos aspectos que superam os combustíveis fósseis.

## 2.2 Hidrocarbonetos Monoaromáticos (BTEX)

A partir do momento em que o biodiesel é misturado ao diesel, a mistura passará a conter os hidrocarbonetos do petróleo. Dentre os hidrocarbonetos, os compostos monocíclicos aromáticos são os contaminantes mais freqüentemente encontrados nas águas subterrâneas e os mais perigosos (HOLLIGER et al., 1997). Os de maior interesse são os aromáticos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros *para*, *meta* e *orto*-xileno), os quais possuem sua estrutura baseada no anel benzênico (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) (BEDIENT et al., 1997). Estes hidrocarbonetos estão ilustrados na Figura 2.1.



**Figura 2.1** - Fórmula estrutural dos hidrocarbonetos monoaromáticos que compõem o grupo BTEX.

A toxicidade dos BTEX é um fator que direciona a atenção para este grupo de hidrocarbonetos. Dos compostos BTEX, o benzeno é considerado o mais tóxico, sendo carcinogênico e passível de causar danos à medula óssea e ao sistema nervoso. O tolueno é classificado como moderadamente tóxico, mas é muito menos tóxico que o benzeno, já que é rapidamente excretado do organismo (TOXNET, 2009).

No óleo diesel comercial, os hidrocarbonetos monoaromáticos totalizam 17,7% em massa e possuem uma concentração<sup>2</sup> de 0,002 g.g<sup>-1</sup> para o benzeno, 0,018 g.g<sup>-1</sup> para o tolueno, 0,024 g.g<sup>-1</sup> para o etilbenzeno e 0,037 g.g<sup>-1</sup> para os xilenos totais (KAIPPER, 2003).

Embora os compostos BTEX tenham uma pequena proporção na constituição de um combustível como um todo, eles são os hidrocarbonetos que possuem a maior solubilidade em água (CHAPELLE, 1993). Com isso, espera-se que em um caso de contaminação de um aquífero por combustíveis fósseis, os BTEX sejam os compostos que apresentarão maior mobilidade no meio aquático subsuperficial, podendo migrar para locais afastados e contaminar mananciais ou outras fontes de abastecimento de água. A Tabela 2.2 expõe algumas características dos hidrocarbonetos BTEX.

**Tabela 2.2** - Propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos BTEX  
Fonte: TOXNET (2009).

Hidrocarboneto	Fórmula Estrutural	Massa Molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg.L <sup>-1</sup> )	Densidade (g.cm <sup>-3</sup> )
<b>Benzeno</b>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	78,11	1790	0,8787
<b>Tolueno</b>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92,14	526	0,8636
<b>Etilbenzeno</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	169	0,8670
<b><i>p</i>-xileno</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	198	0,8610
<b><i>m</i>-xileno</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	162	0,8684
<b><i>o</i>-xileno</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	178	0,8801

### 2.3 Biodegradação Anaeróbia

Os processos biológicos são de extrema importância para o desaparecimento de contaminantes no ambiente subsuperficial

<sup>2</sup> Esta concentração é dada em grama do composto por grama de óleo diesel.

impactado, pois os microorganismos transformam compostos tóxicos em formas não-tóxicas através de reações de oxidação-redução (CHAPELLE, 1993). A biodegradação consiste no mais importante processo que influencia o destino dos contaminantes em sistemas subsuperficiais e depende das características geoquímicas do aquífero, da população microbiana presente e das propriedades do contaminante (WIEDEMEIER, 1999).

Na maioria das vezes, para ocorrer a completa biodegradação de compostos orgânicos, 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 microorganismos nos ambientes naturais são o oxigênio ( $O_2$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), manganês ( $Mn^{+4}$ ), ferro ( $Fe^{+3}$ ), sulfato ( $SO_3^{-2}$ ), e dióxido de carbono ( $CO_2$ ), em ordem decrescente de transferências de energia, respectivamente (CHAPELLE, 1993). A ausência de certos receptores de elétrons é um fator que pode modificar a configuração da biodegradação de um contaminante no meio em que se encontra (RITTMANN & MCCARTY, 2001). Em sistemas aquáticos subterrâneos, a disponibilidade de oxigênio é, na maioria das vezes, limitada devido ao consumo do oxigênio pelos microorganismos a uma taxa maior do que ele possa ser repostado, tornando, assim, o meio anaeróbico (FERNANDES, 2002; GOMES, 2008). Estudos revelam que os processos anaeróbicos predominam no ambiente subsuperficial (HEAD et al., 2003). Além disto, muitas vezes os processos anaeróbicos são a única solução possível para remover contaminantes, devido a dificuldade em injetar oxigênio no ambiente subsuperficial (HOLLIGER, 1997).

Os processos de oxidação anaeróbica de compostos orgânicos podem ocorrer através de processos metabólicos de fermentação, com ausência de receptores de elétrons, ou de respiração, com a presença do nitrato, sulfato ou dióxido de carbono, por exemplo, como receptores de elétrons (CHERNICHARO, 1997). A Tabela 2.3 expõe algumas reações anaeróbicas de oxidação dos hidrocarbonetos benzeno e tolueno na presença de variados receptores de elétrons com as respectivas energias livres de Gibbs<sup>3</sup> ( $\Delta G^0_r$ ).

---

<sup>3</sup> Energia livre de Gibbs: é a energia livre disponível para que a reação ocorra. Valores negativos indicam que a reação é espontânea (LEHNINGER et al., 1993).

Assim sendo, as reações de biodegradação anaeróbias possuem um papel de grande importância na diminuição da massa de contaminantes no ambiente subsuperficial, principalmente devido à variedade de receptores de elétrons que podem ser utilizados (HOLLIGER et al., 1997; FARHADIAN et al. 2008). Nos itens que seguem serão detalhados os processos anaeróbios de maiores interesses para este trabalho, conforme a disponibilidade de receptores nos experimentos: sulfato-redução e metanogênese, com maior ênfase neste último.

**Tabela 2.3** - Comparação energética de algumas reações presentes na biodegradação anaeróbia do benzeno e do tolueno

<b>Benzeno</b>		
Receptor	Reação de oxi-redução	$\Delta G_r^{\circ}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 6H <sup>+</sup> + C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> → 6CO <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O + 3N <sub>2</sub>	-3245
Mn <sup>+4</sup>	30H <sup>+</sup> + 15MnO <sub>2</sub> + C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> → 6CO <sub>2</sub> + 15Mn <sup>+2</sup> + 18H <sub>2</sub> O	-3202
Fe <sup>+3</sup>	60H <sup>+</sup> + 30Fe(OH) + C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> → 6CO <sub>2</sub> + 30Fe <sup>+2</sup> + 78H <sub>2</sub> O	-2343
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	7.5H <sup>+</sup> + 3.75SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> + C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> → 6CO <sub>2</sub> + 3.75H <sub>2</sub> S + 3H <sub>2</sub> O	-514
CO <sub>2</sub>	4.5H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> → 2.25CO <sub>2</sub> + 3.75CH <sub>4</sub>	-136
<b>Tolueno</b>		
Receptor	Reação de oxi-redução	$\Delta G_r^{\circ}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	7.2NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 7.2H <sup>+</sup> + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> → 7CO <sub>2</sub> + 7.6H <sub>2</sub> O + 3.6N <sub>2</sub>	-3875
Mn <sup>+4</sup>	36H <sup>+</sup> + 18MnO <sub>2</sub> + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> → 7CO <sub>2</sub> + 18Mn <sup>+2</sup> + 22H <sub>2</sub> O	-3824
Fe <sup>+3</sup>	72H <sup>+</sup> + 36Fe(OH) + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> → 7CO <sub>2</sub> + 36Fe <sup>+2</sup> + 94H <sub>2</sub> O	-2792
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	9H <sup>+</sup> + 4.5SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> → 7CO <sub>2</sub> + 4.5H <sub>2</sub> S + 4H <sub>2</sub> O	-598
CO <sub>2</sub>	5H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> → 2.5CO <sub>2</sub> + 4.5CH <sub>4</sub>	-143

Nota: Os valores de  $\Delta G_r^{\circ}$  estão nas condições padrão: temperatura de 278 K, pressão de 1 atm e solutos com 1 molar de concentração.

Fonte: Wiedemeier et al. (1998).

### 2.3.1 Sulfato-redução

Na sulfato-redução, após o esgotamento no nitrato e se não houver a presença de ferro, o sulfato atua como receptor de elétrons na oxidação de vários compostos orgânicos, em uma reação onde sulfato é reduzido ao gás sulfeto (H<sub>2</sub>S) (CHAPELLE, 1997), o qual é tóxico, corrosivo e com odor desagradável (RITTMANN & MCCARTY, 2001). As bactérias redutoras do sulfato (BRS) ou sulforedutoras são microorganismos que atuam neste processo e são conhecidas pela sua

grande versatilidade. Quando o sulfato está presente, as BRS o reduzem na presença de um doador de elétrons, e quando ele está ausente, elas realizam processos fermentativos, com a formação de hidrogênio (H<sub>2</sub>), acetato e outros subprodutos (RITTMANN & MCCARTY, 2001). Dois grandes grupos de BRS podem ser destacados: o de espécies que oxidam seus substratos de forma incompleta até acetato, compreendendo a *Desulfobulbus* sp., a *Desulfomonas* sp., e grande parte do gênero *Desulfotomaculum*, sendo que *Desulfovibrio* pertence a este grupo; e outro composto por espécies que oxidam completamente seus substratos orgânicos até CO<sub>2</sub>, abrangendo os gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema* (CHERNICHARO, 1997). É possível que os membros do gênero *Desulfotomaculum* tenham adotado um estilo de vida sintrófico para se desenvolver em ambientes metanogênicos com baixas concentrações de sulfato e, assim, perderam sua habilidade ancestral na redução do sulfato a sulfeto (IMACHI, 2006).

A capacidade de utilizar acetato e hidrogênio torna as bactérias sulforedutoras competidoras por substratos comuns aos das metanogênicas (item 2.3.3). Entretanto, estudos recentes revelam que para certas condições ambientais, mesmo na presença de sulfato, o principal destino do acetato é a metanogênese, o que sugere que as BRS tenham perdido sua capacidade de respiração com sulfato e optaram por um estilo de vida junto com os metanogênicos (GIEG et al., 2008; STRUCHTEMEYER et al., 2005; IMACHI, 2006).

### 2.3.2 *Metanogênese*

A formação biológica de metano 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 um processo de respiração onde o carbono presente tanto na forma de acetato (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) quanto dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é utilizado como receptor final de elétrons, obtendo-se como produto final o gás metano (CH<sub>4</sub>), constituindo uma das mais importantes vias de respiração encontradas em ambientes anaeróbios subsuperficiais (CHAPELLE, 1997). O acetato é um dos mais importantes intermediários da biodegradação anaeróbia e é utilizado na metanogênese para mineralização de materiais orgânicos (HATTORI, 2008). O metano é um gás inodoro, contribuinte

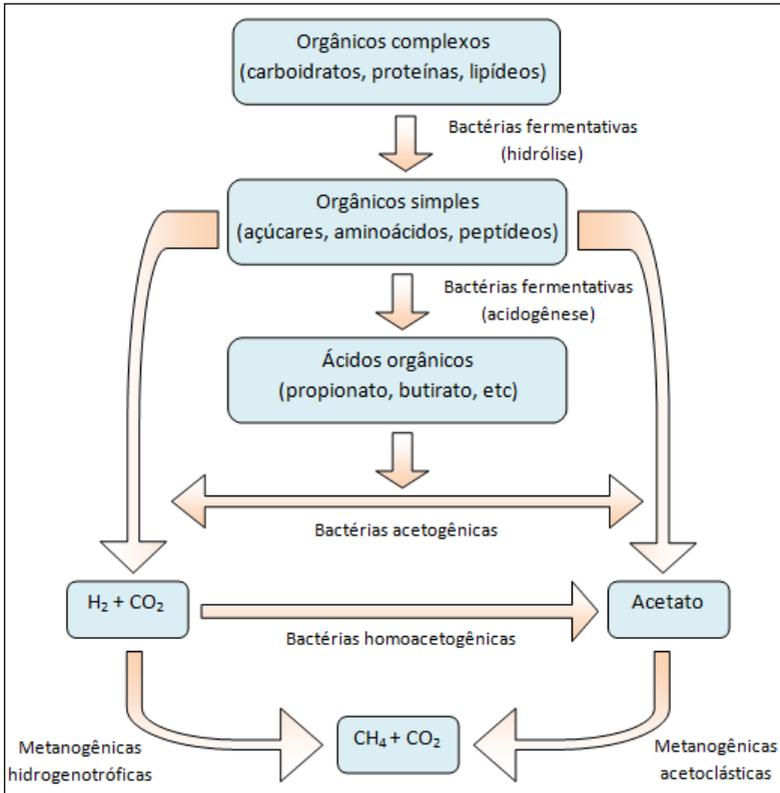
para o efeito estufa e cuja solubilidade em água é baixa (22 mg/L a 25°C) (TOXNET, 2009).

A conversão anaeróbia da matéria orgânica em metano e gás carbônico ocorre em etapas seqüenciais, como ilustrado no esquema da Figura 2.2, e envolve a presença de, no mínimo, três grupos fisiológicos de microorganismos (CHERNICHARO, 1997):

- Bactérias fermentativas ou acidogênicas – convertem por hidrólise e fermentação compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas, lipídios) em outros mais simples, como ácidos orgânicos, hidrogênio e dióxido de carbono. Alguns autores ainda fazem uma subdivisão em bactérias fermentativas primárias e secundárias, conforme o substrato no qual atuam (SCHINK, 1997; HATTORI, 2008). Destacam-se os gêneros *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*.

- Bactérias sintróficas ou acetogênicas – convertem os compostos intermediários produzidos pelas bactérias fermentativas em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. As bactérias mais conhecidas encontradas em ambientes anaeróbios pertencem ao gênero *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas*. Dentre estas bactérias, existe ainda um grupo de microrganismos chamados de homoacetogênicos, os quais produzem acetato a partir do CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> ou da fermentação de um açúcar (MUYZER & STAMS, 2008).

- Metanogênicos – utilizam os produtos da biodegradação realizada na etapa anterior, como acetato e hidrogênio, para a conversão em metano e dióxido de carbono. Esta conversão é feita por um grupo especial de microrganismos estritamente anaeróbios denominados de arqueas metanogênicas. Em função de sua fisiologia as arqueas metanogênicas ainda são subdivididas em: acetoclásticas, aquelas que oxidam acetato a gás carbônico e metano, englobando as famílias *Methanosaetaceae* e *Methanosarcinaceae*; e hidrogenotróficas, que reduzem o gás carbônico a metano usando o hidrogênio como fonte de energia, sendo os gêneros *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* e *Methanocorpusculum* os mais freqüentemente isolados.



**Figura 2.2** - Rotas metabólicas e grupos de microorganismos envolvidos no processo de biodegradação anaeróbica com foco na metanogênese. Fonte: Adaptado de Chernicharo (1997) e Schink (1997).

A biodegradação microbiológica de materiais orgânicos em ecossistemas metanogênicos é um processo com várias etapas em que grupos subsequentes de microorganismos usam os produtos dos primeiros grupos da cadeia como substratos (DOLFING, 2001). Este sistema configura uma relação sintrófica, na qual um organismo depende do outro para o seu crescimento (MUYZER & STAMS, 2008). No caso da metanogênese, a energia disponível para os microorganismos é muito baixa e isto os força a atuarem em uma

cooperação extremamente eficiente, algumas vezes muito perto do equilíbrio termodinâmico ( $\Delta G=0$ ) (JACKSON & MCINERNEY, 2002).

A taxa de utilização de um substrato depende da remoção dos produtos finais por outros microorganismos, como por exemplo, microorganismos que utilizam o acetato e hidrogênio, para que assim o meio se torne termodinamicamente favorável (WARIKOO, 1996; HEIDER & FUCHS, 1997). A produção de acetato é termodinamicamente inibida pela presença de grandes concentrações de acetato e hidrogênio, ou seja, para que as reações acetogênicas possam ocorrer é necessária a remoção destes dois compostos pela ação de microorganismos acetoclásticos e hidrogenotróficos (CHENICCHARO, 1997).

Há dois processos metanogênicos a partir do acetato, conforme consta na Tabela 2.4. O primeiro é a metanogênese acetoclástica (1), onde há a formação de metano e gás carbônico. É uma reação exergônica ( $\Delta G < 0$ ), assim, teoricamente, ocorre na ausência dos consumidores de hidrogênio. O segundo processo consiste de duas reações, a oxidação sintrófica do acetato (2), onde há a oxidação do acetato a  $\text{CO}_2$  com a produção de  $\text{H}_2$ , seguida pela metanogênese hidrogenotrófica (3). Energeticamente, a oxidação sintrófica do acetato é extremamente desfavorável ( $\Delta G > 0$ ), mas ela pode ocorrer se houver consumo de hidrogênio pelos metanogênicos, resultando em uma equação final (4) termodinamicamente favorável. A oxidação sintrófica do acetato é catalisada pelas bactérias oxidadoras do acetato, enquanto o consumo metanogênico de  $\text{H}_2$  é realizado pelos metanogênicos hidrogenotróficos. Esses dois microorganismos obrigatoriamente necessitam um do outro visto que as bactérias precisam dos consumidores de hidrogênio e as arqueas necessitam de produtores de hidrogênio (HATTORI, 2008). Logo, percebem-se como as questões termodinâmicas desempenham um papel essencial na biodegradação de compostos orgânicos.

**Tabela 2.4 - Possíveis destinos do acetato e do hidrogênio no metabolismo metanogênico**

Processo	Reação	$\Delta G_r^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
(1) Metanogênese acetoclástica	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
(2) Oxidação sintrófica do acetato	$\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	+104.6
(3) Metanogênese hidrogenotrófica	$\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow 3\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_4$	-135.6
(4) soma do processo (2)+(3)	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0

Fonte: Adaptado de Hattori (2008).

Estudos têm sido realizados para avaliar a importância da termodinâmica em relação aos fatores biológicos na determinação de qual via metanogênica será seguida na degradação dos hidrocarbonetos alcanos do petróleo. Dolfig et al. (2008) determinaram as condições limites para que as diferentes possíveis reações metanogênicas na degradação dos alcanos se tornassem exergônicas, e isso foi chamado de "janela de oportunidade". A oxidação dos alcanos a acetato ligada à metanogênese acetoclástica ofereceu a maior "janela de oportunidade" por ser mais tolerante a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>. Deste modo, a formação de metano a partir do acetato é via metanogênica mais provável de ocorrer em ambientes petrolíferos.

## 2.4 Biodegradação do biodiesel e da mistura diesel/biodiesel

A biodegradabilidade do biodiesel puro e da sua mistura com diesel nos ambientes naturais tem sido investigada nos últimos anos, devido principalmente a implementação deste biocombustível na matriz energética de vários países. Existem poucos relatos da biodegradação do biodiesel sob condições anaeróbicas. A maioria dos estudos é focada na avaliação da biodegradação aeróbia do biodiesel no solo e em ambientes aquáticos.

A biodegradabilidade aeróbia do biodiesel de soja e de colza, e da mistura do biodiesel de colza com diesel em diferentes proporções no ambiente aquático foi estudada por Zhang (1998), sendo este um dos primeiros estudos do gênero. Os resultados mostraram que os compostos

do biodiesel são facilmente biodegradados. Além disto, aumentando a quantidade dos ésteres metílicos do biodiesel de colza na mistura, a taxa de degradação do diesel se eleva, chegando a ser três vezes maior que a do diesel como única fonte de carbono disponível. Isso pode ser uma evidência de cometabolismo<sup>4</sup>, onde os microorganismos utilizam os constituintes do biodiesel como fonte de energia para promover a degradação dos compostos do diesel. Outra pesquisa que avaliou a biodegradabilidade do B2, B5 e B20 em solos e em ambientes aquáticos, também mostrou uma biodegradação mais rápida para as misturas com maiores proporções de biodiesel, mas não foi verificado um aumento na degradação do diesel por vias de cometabolismo (MARIANO et al., 2008).

Essa fácil biodegradabilidade do biodiesel também ocorreu em experimentos de microcosmos aeróbios contendo água do mar na presença de biodiesel e de misturas com diferentes proporções de diesel/biodiesel. Foi verificado que os ésteres foram degradados aproximadamente a mesma taxa que os n-alcanos do diesel, e mais rapidamente que demais hidrocarbonetos presentes (DEMELLO, 2007).

Do mesmo modo, Prince et al. (2008) encontraram a tendência de ocorrer primeiramente a degradação dos ésteres e dos n-alcanos em experimentos que avaliaram a biodegradação aeróbia de B20 por um inóculo não aclimatado de água de chuva. Em seguida, os iso-alcanos e os compostos aromáticos simples e alquilados foram os degradados, acompanhados pelos naftalenos. Os resultados deste estudo mostraram que os hidrocarbonetos do diesel e os ésteres alquílicos do biodiesel são rapidamente degradados aerobicamente em ambientes aquáticos quando o diesel está presente em baixas quantidades (100-400ppm). Assim como estes estudos, outras pesquisas também comprovaram o efeito positivo nos processos de biodegradação provocado pela presença do biodiesel na mistura com diesel em ambientes aquáticos e no solo sob condições aeróbias (PASQUALINO et al., 2006; LAPINSKIENĖ et al., 2006).

A biodegradação anaeróbia do biodiesel e do diesel no solo pode chegar a 81,2% e 47,9%, respectivamente, após 60 dias, sendo que a

---

<sup>4</sup> Processo no qual a presença de um microrganismo estimula a degradação de um contaminante orgânico sem que o micróbio obtenha benefício direto (ou seja, não obtém energia) (WIEDEMEIER et al., 1999).

formação do ácido butírico e metanol como produtos intermediários prevalece no biodiesel, enquanto que no diesel há poucos produtos de fermentação (LAPINSKIENĖ & MARTINKUS, 2007). Em ambiente aquático, ensaios de laboratório desenvolvidos por Stolz et al. (1995) obtiveram uma completa biodegradação dos ésteres do biodiesel de soja em 14 dias em condições de nitrato-redução. Experimentos anaeróbios em microcosmos com água subterrânea, biodiesel e BTEX realizados por Gomes (2008) revelaram uma biodegradação de 86% para o biodiesel de soja em 41 dias, enquanto que o biodiesel de mamona foi biodegradado em somente 42% após 92 dias. Na presença de biodiesel de soja os compostos BTEX foram degradados mais lentamente que na sua ausência, obtendo uma remoção de 35% para o benzeno, 100% para o tolueno, 60% para o etilbenzeno e 60% para os xilenos. Deste modo, observa-se que o benzeno foi o composto mais recalcitrante nos microcosmos enquanto que o tolueno foi o composto preferencial e mais rapidamente biodegradado.

Em termos de requisito de energia, o biodiesel parece ser uma fonte de carbono muito melhor para o crescimento microbiano que o diesel, com um aumento linear na biomassa à medida que se aumenta a porcentagem de biodiesel na mistura (OWSIANIAK et al., 2009). As razões para o aumento da biodegradabilidade do biodiesel e de sua mistura com o diesel não são na sua maior parte conhecidas. Uma possibilidade pode ser que a adição de uma fonte de carbono alternativa (biodiesel) pode levar a um aumento na população microbiana, aumentando deste modo a biodegradação. Outra opção seria a possibilidade dos microorganismos cometabolizarem os substratos (SCHLEICHER et al., 2009). Além disso, pelo fato do biodiesel ser majoritariamente constituído por ésteres alquílicos, compostos constantemente sintetizados na natureza, muitos microorganismos podem biodegradá-los facilmente. Já o diesel é constituído de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e policíclico aromáticos, os quais são degradados por um número mais restrito de microorganismos (LAPINSKIENĖ & MARTINKUS, 2007).

## **2.5 Biodegradação anaeróbia do benzeno e tolueno**

Vários estudos em microcosmos e em escala real, onde as concentrações de oxigênio são mantidas praticamente nulas, indicaram a

biodegradação anaeróbia do benzeno e do tolueno. Em alguns casos, nutrientes ou receptores de elétrons foram inseridos nos experimentos para estimular a biodegradação. As taxas de biodegradação 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, evidenciando que este processo varia dependendo do local (ARONSON & HOWARD, 1997).

O principal problema a ser superado na degradação de compostos aromáticos é a estabilidade química do anel benzênico (HEIDER & FUCHS, 1997). Entre os compostos BTEX, a biodegradação anaeróbia do tolueno é, provavelmente, a mais conhecida. Ele é degradado na presença de nitrato, manganês, ferro, sulfato ou CO<sub>2</sub> como receptor de elétrons. O primeiro passo no catabolismo do tolueno é a adição de fumarato ao grupo metil para formar benzil-succinato com a mediação da enzima benzil succinato sintase (*bssA*) (CHAKRABORTY & COATES, 2004), sendo esta enzima encontrada inclusive em locais onde há condições metanogênicas (BELLER & EDWARDS, 2000; DA SILVA & ALVAREZ, 2004; WASHER & EDWARDS, 2007). A via bioquímica para degradação anaeróbia do benzeno é ainda desconhecida e diversas possibilidades existem (CHAKRABORTY & COATES, 2004).

O Ferro (III) também é reportado como receptor de elétrons na degradação de tolueno e benzeno. Jahn et al. (2005) realizaram um experimento anaeróbico onde foram utilizadas culturas enriquecidas crescendo separadamente em cada composto BTEX como fonte de carbono e ferro como receptor de elétron. O tolueno foi degradado imediatamente, com um aumento na concentração de Ferro(II), enquanto o benzeno apresentou uma fase lag até o início da biodegradação.

Na presença de nitrato, microorganismos pertencentes ao gênero *Dechloromonas* podem degradar o tolueno e benzeno a mesma taxa quando estes são disponibilizados juntos ou separadamente (CHAKRABORTY et al., 2005). Entretanto, em outro estudo onde se avaliou a biodegradação dos BTEX no solo sob condições também nitrato-redutoras, revelou que o tolueno foi o composto que se degradou mais rapidamente, enquanto que o benzeno foi o penúltimo, ficando na frente somente do *p*-xileno. Maiores taxas de biodegradação dos BTEX foram observadas nas amostras com adição de acetato de sódio quando comparadas com as que tinham somente BTEX. Isto pode ser atribuído

ao estímulo da biodegradação por um substrato primário que promoveu o crescimento bacteriano ou devido à presença do acetato que aumentou o cometabolismo na biodegradação dos BTEX (DOU et al., 2008b).

No meio aquático, sob condições nitrato-redutoras e sulfato-redutoras, o tolueno também foi o composto monoaromático mais rapidamente biodegradado, enquanto que o benzeno permaneceu em penúltimo lugar, na frente do *p*-xileno (DOU et al., 2008a). Para o benzeno e tolueno, a taxa de degradação aumentou até certo valor de concentração inicial, e depois diminuiu. Isso indica que altas concentrações iniciais podem ser tóxicas às culturas de microorganismos e inibir a degradação.

Em estudo feito em microcosmos por Edwards & Grbić-Galić (2004) em condições metanogênicas, os únicos compostos BTEX que foram totalmente mineralizados foram o tolueno e *o*-xileno, e a presença de outros receptores de elétrons, principalmente o oxigênio, inibiu a biodegradação. Em outro experimento, também sob condições metanogênicas, a presença do tolueno inibiu a biodegradação do benzeno em colunas metanogênicas de fluxo contínuo. A remoção do benzeno só aumentou quando se diminuiu a concentração de tolueno afluente à coluna (DA SILVA & ALVAREZ, 2004).

Por outro lado, pesquisas indicam que consórcios metanogênicos também podem utilizar como substratos compostos aromáticos tidos como recalitrantes, como o benzeno (HEIDER & FUCHS, 1997). Weiner & Lovley (1998) conseguiram uma rápida biodegradação do benzeno em sedimentos metanogênicos previamente contaminados por petróleo. Após 13 dias da injeção de benzeno, 53% do hidrocarboneto já havia sido mineralizado sem uma aparente fase lag, indicando que não é necessária a presença de outros receptores de elétrons para ocorrer a biodegradação do benzeno.

## 2.6 Modelo energético de biodegradação

O modelo energético de biodegradação foi desenvolvido por McCarty (1969) e é fundamentado na termodinâmica clássica, em que a energia livre liberada pelo uso de determinado substrato é utilizada para produção de biomassa e energia na presença de um receptor de elétrons. Deste modo, com o uso deste modelo pode-se estimar a quantidade de produtos finais, como metano, produzidos na degradação de contaminantes orgânicos, assim como a quantidade de biomassa gerada.

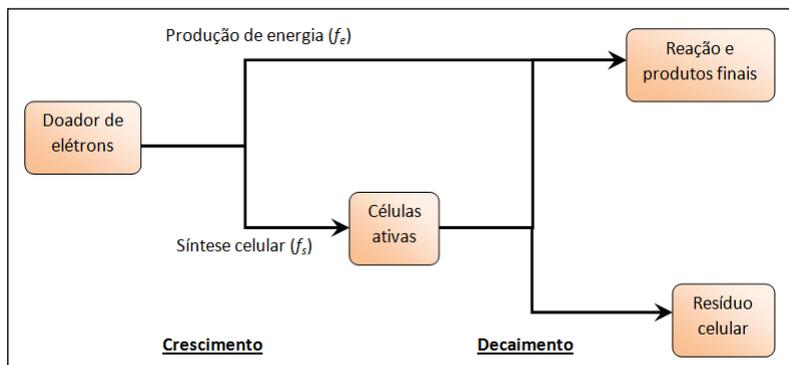
Reações químicas balanceadas são baseadas no conceito de estequiometria, que é uma parte da química pertinente às relações quantitativas entre produtos e reagentes. Nas reações mediadas por microrganismos, diversos aspectos dificultam a estequiometria, como: a oxidação e redução de mais de uma espécie nas reações de biodegradação na maioria das vezes; o papel desempenhado pelos microrganismos de catalisar as reações e também o de serem produtos das reações; e, por fim, o fato dos microrganismos executarem a maior parte das reações químicas a fim de capturar parte da energia liberada para a produção de novas células e manutenção da atividade celular.

Desta forma, é necessário conhecer três itens para realizar a estequiometria de uma reação de biodegradação:

- 1) A fórmula empírica que represente as células microbianas;
- 2) Como ocorre a divisão da energia do substrato entre geração de energia e síntese celular; e
- 3) A proporção do substrato utilizado para sintetizar biomassa para a energia ganha do catabolismo e a necessária para o anabolismo.

A proporção relativa dos elementos presente nas células microbianas depende de características dos microrganismos envolvidos nas reações, dos substratos utilizados e da viabilidade de nutrientes requeridos para o crescimento. Uma das fórmulas empíricas mais utilizadas no balanceamento de reações biológica é  $C_5H_7O_2N$ , que representa uma célula bacteriana.

Quando os microrganismos usam um substrato doador de elétrons, uma porção destes elétrons é transferida ao receptor para gerar energia ( $f_e$ ) e a outra para a síntese de novas células ( $f_s$ ). As células microbianas também decaem devido à predação e a sua manutenção, e, deste modo, parte de  $f_s$  é transferida ao receptor de elétrons para gerar mais energia e parte é convertida em resíduos orgânicos de células não ativas. Este processo de transferência de elétrons pode ser observado na Figura 2.3.



**Figura 2.3** - Transferência de elétrons para produção de energia e síntese celular. Fonte: adaptado de Rittmann & McCarty (2001).

Para que se possa escrever a equação geral de biodegradação, é necessário conhecer as meias-reações envolvidas. A equação 2.1 é a equação geral para a construção de diversas reações estequiométricas de síntese celular, e representa o consumo líquido de reagente e a produção de produtos quando os microrganismos consomem um elétron equivalente do doador. Ela engloba três meias-reações: a do receptor de elétrons ( $R_a$ ), a de síntese celular ( $R_c$ ) e a do doador de elétrons ( $R_d$ ). A Tabela 2.5 expõe algumas dessas meias reações. No Apêndice A são apresentados maiores detalhes das formulações para os cálculos do modelo energético de biodegradação segundo Rittmann & McCarty (2001).

$$R = f_e R_a + f_s R_c - R_d \quad (2.1)$$

**Tabela 2.5** - Meias-reações de síntese celular ( $R_c$ ), dos receptores de elétrons ( $R_a$ ) e dos doadores de elétrons ( $R_d$ ).

<i>MEIAS-REAÇÕES</i>	<i><math>\Delta G^\circ</math> (kJ por elétron equivalente)</i>
<b>Reação para a síntese celular (<math>R_c</math>)</b>	
Amônio como fonte de nitrogênio*	
1. $1/5 \text{ CO}_2 + 1/20 \text{ HCO}_3^- + 1/20 \text{ NH}_4^+ + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/20 \text{ C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 9/20 \text{ H}_2\text{O}$	
Nitrato como fonte de nitrogênio*	
2. $5/28 \text{ CO}_2 + 1/28 \text{ NO}_3^- + 29/28 \text{ H}^+ + \bar{e} = 1/28 \text{ C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 11/28 \text{ H}_2\text{O}$	
<b>Reação para os receptores de elétrons (<math>R_a</math>)</b>	
Oxigênio	
3. $1/4 \text{ O}_2 + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/2 \text{ H}_2\text{O}$	-78,72
Nitrato	
4. $1/5 \text{ NO}_3^- + 6/5 \text{ H}^+ + \bar{e} = 1/10 \text{ N}_2 + 3/5 \text{ H}_2\text{O}$	-72,20
Sulfato	
5. $1/8 \text{ SO}_4^{2-} + 19/16 \text{ H}^+ + \bar{e} = 1/16 \text{ H}_2\text{S} + 1/16 \text{ HS}^- + 1/2 \text{ H}_2\text{O}$	20,85
Dióxido de carbono	
6. $1/8 \text{ CO}_2 + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/8 \text{ CH}_4 + 1/4 \text{ H}_2\text{O}$	23,53
Fe (III)	
7. $\text{Fe}^{3+} + \bar{e} = \text{Fe}^{2+}$	-74,27
<b>Reação para os doadores de elétrons (<math>R_d</math>)</b>	
Doadores orgânicos (reações heterotróficas)	
Acetato	
8. $1/8 \text{ CO}_2 + 1/8 \text{ HCO}_3^- + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/8 \text{ CH}_3\text{COO}^- + 3/8 \text{ H}_2\text{O}$	27,40
Palmitato (íon)	
9. $15/92 \text{ CO}_2 + 1/92 \text{ HCO}_3^- + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/92 \text{ CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^- + 31/92 \text{ H}_2\text{O}$	27,26
Benzeno	
10. $1/5 \text{ CO}_2 + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/30 \text{ C}_6\text{H}_6 + 2/5 \text{ H}_2\text{O}$	26,67 <sup>(a)</sup>
Tolueno	
11. $7/36 \text{ CO}_2 + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/36 \text{ C}_7\text{H}_8 + 7/18 \text{ H}_2\text{O}$	26,22 <sup>(a)</sup>
Piruvato	
12. $1/5 \text{ CO}_2 + 1/10 \text{ HCO}_3^- + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/10 \text{ CH}_3\text{COCOO}^- + 2/5 \text{ H}_2\text{O}$	35,09

Nota: \* Reação sem  $\Delta G^\circ$  porque as espécies reduzidas não são quimicamente definidas.

Fonte: Rittmann & McCarty (2001); <sup>(a)</sup> Gomes (2008).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar a biodegradação metanogênica do biodiesel de soja na presença dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno e tolueno foram preparados experimentos em microcosmos no laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas (REMAS). Foi avaliada a variação dos contaminantes monoaromáticos, receptores de elétrons (sulfato e nitrato), e subprodutos das reações (acetato e metano) através de análises em cromatografia gasosa e líquida. A detecção e quantificação dos microorganismos foi realizada por meio de PCR quantitativo (qPCR).

#### 3.1 Montagem dos microcosmos

Os microcosmos consistiam em frascos âmbar de um litro que foram preenchidos com água sintética (meio líquido), inóculo metanogênico, e os contaminantes (benzeno, tolueno e biodiesel puro de soja). Neste estudo, os microcosmos funcionaram como reatores em batelada, ou seja, as amostras retiradas para análise provinham sempre do mesmo frasco, não foram considerados do tipo “sacrifício”, no qual os frascos analisados não retornavam para o experimento.

Para a confecção da água sintética foram utilizados os compostos químicos presentes na Tabela 3.1. Estes compostos foram diluídos em água deionizada nas concentrações indicadas.

**Tabela 3.1** - Composição da água sintética

Composto	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	531
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	16
<b>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	12
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	6,7
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0,002
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,002
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub></b>	0,001
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	0,0004

Fonte: Von Gunten & Zobrist (1993).

O inóculo metanogênico utilizado foi uma amostra de lodo proveniente de um reator UASB, mantido a temperatura ambiente (em torno de 22°C) operado por cerca de 2 anos no Laboratório de Tratamento Biológico de Efluentes (LTBE) do Departamento de Engenharia Química da UFSC. A origem do inóculo (lodo) foi o sistema de tratamento de efluentes da empresa de bebidas AMBEV, localizada no município de Lages - SC. No laboratório (LTBE), ele foi adaptado a um processo contínuo de degradação da matéria orgânica, com a atividade metanogênica comprovada.

Para verificar se o inóculo se desenvolveria na água sintética confeccionada foi realizado um teste. Em um frasco com 100 mL de água sintética foram adicionados 1mL de inóculo e 80mg de acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), e a mistura foi incubada a 35°C por um período de 6 dias. Após este período, uma seringa foi espetada no frasco e o êmbolo se deslocou, comprovando a atividade microbiana devido à pressão criada no interior do frasco pelos gases produzidos.

Foram preparados três microcosmos diferentes, cuja composições iniciais são detalhadas na Tabela 3.2. Após algumas semanas do início do experimento, foi injetado mais biodiesel no reator chamado BBT (50  $\mu\text{L}$ ), que continha biodiesel, benzeno e tolueno. No reator BT, que possuía somente benzeno e tolueno, estes hidrocarbonetos foram reinjetados periodicamente (*re-spike*), com uma quantidade maior (20 mg) nas últimas semanas. No início do experimento foi injetado benzeno e tolueno neste microcosmo a partir de uma solução previamente preparada, extraindo-se a parte dissolvida. A partir da metade do experimento, começou a se injetar os produtos puros. O reator BBT HG funcionou como controle, já que além da presença de biodiesel, benzeno e tolueno, houve a adição de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), um inibidor da atividade microbiológica que serviu para diferenciar perdas bióticas das abióticas.

**Tabela 3.2** - Valores experimentais iniciais utilizados na montagem dos microcosmos

Nome do reator	Água sintética (mL)	Inóculo (mL)	Benzeno (mg)	Tolueno (mg)	Biodiesel (µL)	HgCl <sub>2</sub> (g)
<b>BBT</b> (biodiesel + benzeno + tolueno)	988	12	5	5	100*	-
<b>BBT HG</b> (biodiesel + benzeno + tolueno + HgCl <sub>2</sub> )	988	12	5	5	100	1
<b>BT</b> (benzeno + tolueno)	988	12	5*	5*	-	-

Nota: \* Estes valores iniciais foram modificados no *re-spike*.

A amostra de biodiesel utilizada foi a de soja, a qual foi cedida pelo Instituto de Tecnologia do Paraná. As especificações do biodiesel de soja encontram-se no Anexo 1. O biodiesel foi obtido via rota metílica e foi usado como catalisador o metilato de sódio. O benzeno e tolueno utilizados eram padrões analíticos da marca Merck, com uma pureza de 99,9% para o tolueno e 99,7% para o benzeno.

Antes da adição dos compostos indicados na Tabela 3.1 na água sintética, esta foi aquecida até 60°C para retirada de parte do oxigênio dissolvido. Depois, os microcosmos foram purgados com gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) durante 10 minutos (Figura 3.1), adicionado o inóculo, inserção por mais 10 minutos de N<sub>2</sub>, e só então foram injetados os contaminantes. Os frascos foram fechados com tampa específica para experimento anaeróbio (*mininert valve*), lacrados com veda-rosca para garantir a não entrada de oxigênio, e incubados no escuro a uma temperatura média de 26 ± 2 °C (Figura 3.1).



**Figura 3.1** – Microcosmos utilizados no experimento. Em A o microcosmo está sendo desaerado com  $N_2$ . Detalhe para a tampa utilizada no experimento. Em B os microcosmos estão prontos para serem incubados.

### 3.2 Procedimentos analíticos

Em cada análise foi retirado um volume total de 6 mL de amostra de cada microcosmo. No momento em que o volume do reator chegou próximo de 900 mL foi injetada mais água sintética para compensar a perda de volume, com uma alteração no valor da concentração de 10%. Para garantir a não entrada de oxigênio, antes da retirada de cada amostra, um volume de 6 mL de gás nitrogênio era injetado, contrabalanceando a pressão negativa que se formava no interior do reator. Além disso, durante a retirada das amostras, o gás nitrogênio era direcionado para a abertura da tampa.

Inicialmente, a retirada das amostras dos microcosmos para análise era realizada duas vezes na semana. Em seguida, a frequência passou a ser semanal, e com o passar do tempo este intervalo entre análises foi estendido para duas semanas somente para o reator BBT, devido ao comportamento apresentado pelo reator. O horário para retirada das amostras era fixado em torno das 14:00 horas.

### 3.2.1 *Determinação da concentração de benzeno, de tolueno e de metano*

Para análise de benzeno, tolueno e metano (na fase aquosa) foram necessários 4 mL de amostra, sendo 2 mL para os monoaromáticos e 2 mL para o metano. Cada alíquota foi diluída em 8 mL de água ultra-pura, obtendo um volume final de 10 mL (diluição 2:10). Para as análises dos compostos BTEX e metano, foi utilizado um cromatógrafo a gás da HP (Hewlett Packard), modelo 6890 – serie II, com Headspace Auto Sampler HP – estático (modelo 7694) equipado com detector por ionização em chama (FID), conectado a um computador com o Software ChemStation Plus. O gás de arraste empregado foi o hélio, com velocidade de 2,0 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna capilar era constituída de sílica fundida HP 1 (metil siloxano) no 19095z-123 (HP, USA). As temperaturas do injetor e detector foram mantidas, respectivamente, a 260°C e 280°C, para os BTEX, e a 190°C e 250°C, para o metano. A temperatura foi programada da seguinte maneira para os BTEX: de 70°C até 120°C a 5°C.min<sup>-1</sup> e até 210°C a 30°C.min<sup>-1</sup>. Para o metano as análises foram realizadas a temperaturas de 40°C até 250°C a 30°C.min<sup>-1</sup>. O limite de detecção do CG nas condições de análise foi de 1µg.L<sup>-1</sup> tanto para os compostos BTEX quanto para o metano. As soluções-padrão para BTEX foram preparadas com o padrão *UST Modified Gasoline Range Organics*, da SUPELCO, segundo a norma EPA/8015A – *Aromatic Volatile Organics by Gas Chromatography* (USEPA, 1996). Para o metano, a solução-padrão foi preparada a partir do padrão 99,999% de pureza: o gás-padrão foi borbulhado num recipiente contendo água ultra-pura, até a obtenção do equilíbrio entre as duas fases (gasosa e aquosa). Conhecendo-se a pressão parcial e a constante da Lei de Henry para o metano, foi possível calcular sua concentração na fase aquosa (STUMM e MORGAN, 1981).

### 3.2.2 *Determinação da concentração de nitrato, sulfato e acetato*

Para a análise dos ânions nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) e acetato (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada reator em cada análise. Os ânions foram analisados por cromatografia iônica, em cromatógrafo da marca Dionex (modelo ICS-1000), equipado com detector de condutividade iônica. A coluna utilizada foi AS4A-SC. Os padrões utilizados são todos da marca J.T.BAKER e o método

empregado foi o *Chromatography with Chemical Suppression of Eluent Conductivity* – do *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1992). Como fases móveis foram utilizados o carbonato e bicarbonato de sódio.

### 3.2.3 Análise microbiológica

A análise microbiológica foi realizada com amostras de cada reator no início e final do experimento. Para tal, foi coletado uma alíquota de 2 mL e armazenada em frascos *Eppendorf* sob refrigeração. As amostras líquidas foram coletadas com os reatores em repouso (sem agitação), com exceção da amostra final do reator BT. Para extração de DNA foi utilizado o kit *MoBio UltraClean™ Microbial DNA Isolation* (Carlsbad, CA). O DNA foi extraído de acordo com as recomendações do kit. Após o processo de extração, 100 $\mu$ L de DNA foram obtidos e armazenados em frascos de 2 mL (*Eppendorf*), livres de DNA e RNA, e estocados em freezer para análises posteriores em PCR quantitativo (qPCR). O limite de detecção do equipamento varia de acordo com o gene em uma faixa de 100 a 1000 células.mL<sup>-1</sup>. Utilizou-se os métodos de reação em cadeia da polimerase (*real-time quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) para as análises. O qPCR foi utilizado para quantificar bactérias totais, redutoras de nitrato, redutoras de sulfato e metanogênicas. A quantificação das bactérias totais foi determinada utilizando os *primers* BACT1369F e PROK1492R (BELLER et al., 2002). A concentração das bactérias redutoras de nitrato foi estimada utilizando os *primers* nirK1F/nirK5R e nirS1F/nirS6R. A quantificação das bactérias redutoras de sulfato foi obtida utilizando-se os *primers* 361F e 685R. A concentração das bactérias metanogênicas foi estimada utilizando-se os *primers* ME1F e ME2R. As análises foram realizadas no equipamento *Mastercycler ep realplex* (*Eppendorf*). Os kits para reação de PCR foram o *Taqman* e *Sybr-Green* (*Applied Biosystems*, EUA). Todos os *primers* e sondas foram obtidos da empresa *Integrated DNA Technologies* (*Coralville*, IA, EUA). A programação de temperatura para quantificar as bactérias totais foi a seguinte: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto. Para a detecção das bactérias nitrato-redutoras, sulfato-redutoras e metanogênicas utilizou-se a seguinte programação de temperatura: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido por 55 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto,

95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, *melting curve* por 20 minutos, e, por fim, 95°C por 15 segundos. Com os valores dos números de ciclos (CT) e com a curva de calibração, foi obtida a concentração de bactérias por amostra, esta determinada de acordo com Da Silva & Alvarez (2004).

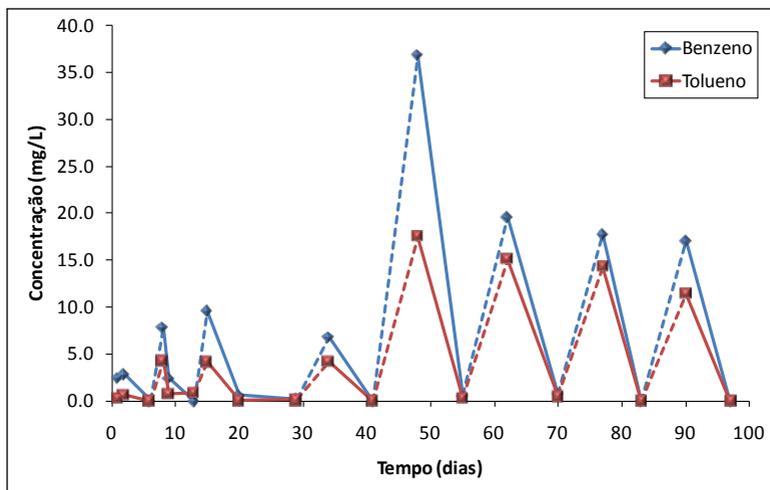
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Biodegradação dos contaminantes sob condições metanogênicas

Através dos resultados de concentração obtidos dos cromatogramas, foram plotados gráficos de concentração x tempo para avaliar a dinâmica da biodegradação dos contaminantes, da variação de acetato, de metano e dos receptores de elétrons. A análise destes gráficos permitiu avaliar a interferência do biodiesel de soja na biodegradação dos hidrocarbonetos benzeno e tolueno, e como o modelo de microcosmos utilizado interferiu nos processos bióticos de degradação. O tempo de duração total do experimento foi de 97 dias (aproximadamente 3 meses) para todos os reatores. Os resultados obtidos em cromatografia nas análises dos microcosmos estão presentes no Apêndice C.

#### 4.1.1 *Determinação da biodegradação do benzeno e do tolueno na ausência e presença de biodiesel*

Avaliar a variação da concentração de contaminantes em um reator é um meio de estudar e perceber a ocorrência de processos de biodegradação. Nos três microcosmos montados, inicialmente, foi injetada a mesma quantidade de benzeno e tolueno, pretendendo-se uma concentração final de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  em cada frasco, porém, este valor foi variável na prática. Somente no reator BT (benzeno + tolueno) foi realizado o *re-spike* com diferentes concentrações de benzeno e tolueno ao longo do experimento, com valores que variaram de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $35 \text{ mg.L}^{-1}$ . Este reator serviu como referência para comparar o decaimento dos hidrocarbonetos monoaromáticos na ausência e na presença de biodiesel. A Figura 4.1 mostra a variação da concentração de benzeno e tolueno no reator BT ao longo dos 97 dias de experimento.

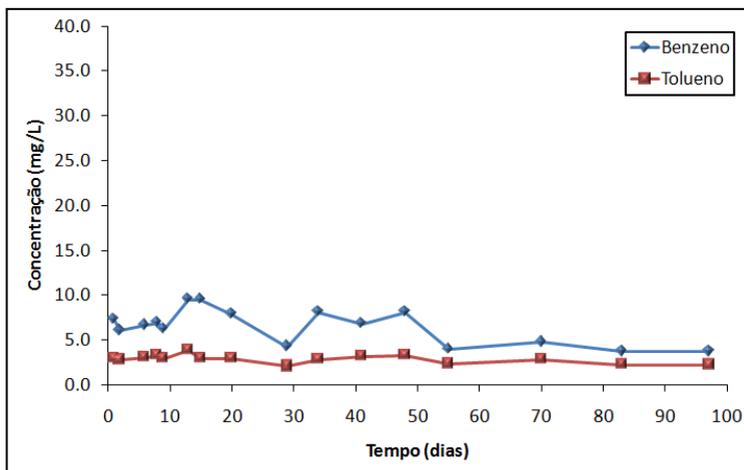


**Figura 4.1** - Variação da concentração de benzeno e tolueno no reator contendo benzeno e tolueno (BT). A linha pontilhada indica o período compreendido entre o dia da mínima concentração e o de reinjeção.

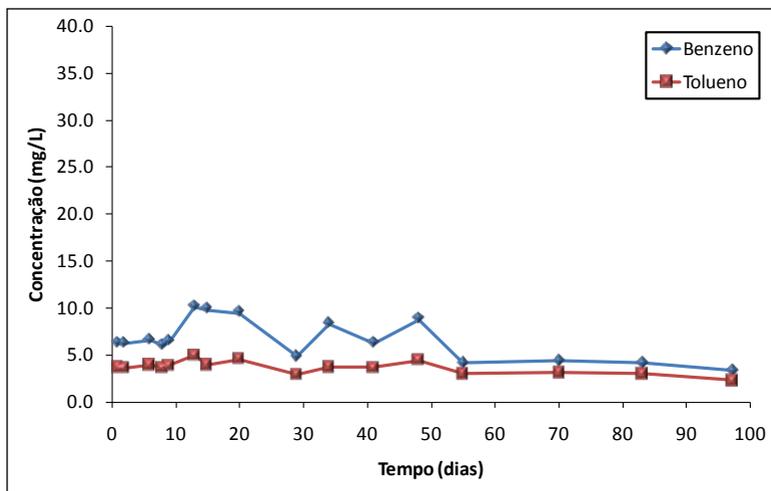
Com base no exposto na Figura 4.1, observa-se que, no geral, os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno e tolueno decaíram de uma maneira rápida durante todo o período experimental, com um intervalo de uma semana entre o dia de máxima concentração (*re-spike*) e o dia de concentração zero. Devido a este comportamento, já que o aguardado era um decaimento mais lento do tolueno e, principalmente, do benzeno, suspeitou-se da entrada de ar no reator. No início do experimento, o benzeno e tolueno injetados provinham de uma solução aquosa de onde era extraída a parte dissolvida. Mesmo desaerada com  $N_2$ , esta solução poderia conter oxigênio residual que era continuamente inserido no reator. Com isto, a partir do 48º dia, foi iniciado o *re-spike* destes hidrocarbonetos puros, a fim de evitar a entrada de oxigênio, e em concentrações mais elevadas. Entretanto, o rápido decréscimo da concentração continuou a ocorrer de forma acelerada, indo de 36,8  $mg.L^{-1}$  e 17,5  $mg.L^{-1}$  no 48º dia, à 0,6  $mg.L^{-1}$  e 0,3  $mg.L^{-1}$  no 55º dia, para o benzeno e tolueno, respectivamente. Weiner & Lovley (1997) reportaram uma rápida biodegradação de benzeno em sedimentos metanogênicos, com uma mineralização de 53% do benzeno após 13 dias, sendo uma taxa de biodegradação mais lenta que a observada no

reator BT, no qual em uma semana o benzeno já estava ausente. Também não foi observada uma biodegradação preferencial de um composto em relação ao outro já que o benzeno e tolueno foram consumidos praticamente à mesma taxa, assim como o observado no experimento de Chakraborty et al. (2005), este, porém, sob condições de nitrato-redução. Devido a estas condições apresentadas e a outras expostas nos itens subsequentes, presume-se que a biodegradação destes compostos não tenha ocorrido por processos exclusivamente metanogênicos.

Em relação ao reator BBT (biodiesel + benzeno + tolueno), e ao seu controle biológico, o reator BBT HG (biodiesel + benzeno + tolueno + cloreto de mercúrio) a variação de benzeno e tolueno é ilustrada na Figura 4.2 e Figura 4.3, respectivamente.



**Figura 4.2** - Variação da concentração de benzeno e tolueno no reator contendo biodiesel, benzeno e tolueno (BBT).

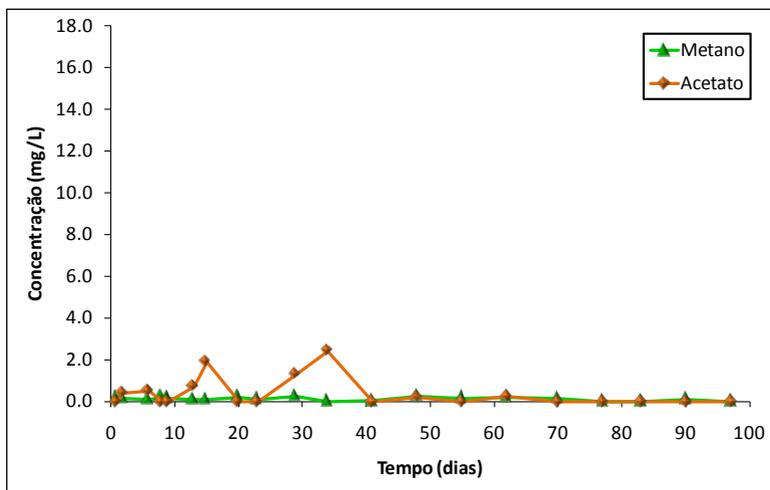


**Figura 4.3** - Variação da concentração de benzeno e tolueno no reator contendo biodiesel, benzeno, tolueno e  $\text{HgCl}_2$  (BBT HG).

Com base na análise dos dois gráficos, observa-se que o benzeno e tolueno se comportaram de maneira muito semelhante tanto no reator BBT quanto no BBT HG. Houve uma pequena alteração na concentração de tolueno, variando em torno do valor inicial de  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Já o benzeno variou mais acentuadamente ao longo do experimento, com picos de até  $9,5 \text{ mg.L}^{-1}$  no 13º dia, e posterior diminuição e estabilização da concentração nas semanas finais. Quando ocorre um aumento ou decaimento na concentração dos contaminantes no reator ativo biologicamente o mesmo acontece no seu controle biológico. Isto evidência a importância de um controle biológico para se fazer a estimativa da biodegradação. Visto que os dois microcosmos foram operados nas mesmas condições, mesmo com um decaimento final na concentração de benzeno, não é atribuída nenhuma biodegradação ao benzeno e ao tolueno nos reatores. Logo, é possível que o biodiesel adicionado tenha influenciado no destino dos hidrocarbonetos monoaromáticos de modo a ser preferencialmente biodegradado. Isto sugere que os microorganismos não tenham utilizado os compostos do biodiesel para promover a degradação do benzeno e do tolueno, ou seja, não houve a ocorrência de cometabolismo.

#### 4.1.2 Acetato e Metano

A presença de acetato nos reatores é um indicativo de que possa estar ocorrendo processos anaeróbios de biodegradação da matéria orgânica. Este intermediário formado pode ser biodegradado com a posterior formação de metano, cuja presença deste gás dissolvido indica a ocorrência de metanogênese. Com isto, foram medidas as concentrações destes dois compostos nos reatores a fim de se comprovar a ocorrência da metanogênese na biodegradação anaeróbia do biodiesel, do benzeno e do tolueno. A variação da concentração de acetato e metano do reator BT é apresentada na Figura 4.4.



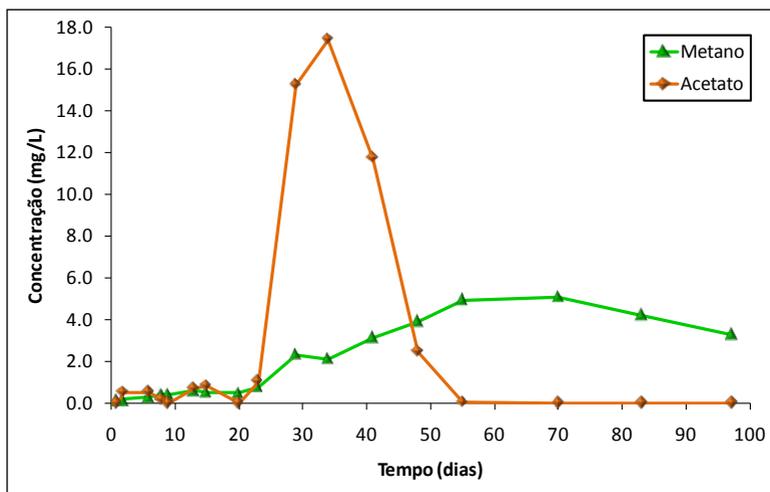
**Figura 4.4** - Variação da concentração de acetato e metano no reator contendo benzeno e tolueno (BT).

Analisando a Figura 4.4, nota-se que nos primeiros dias de experimento houve uma presença de acetato, em torno de  $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ , possivelmente devido a biodegradação da matéria orgânica que estava presente no inóculo, já que este provinha de um lodo de tratamento de efluentes. Com o passar do tempo, houve uma baixa produção de acetato no reator BT, com dois picos de concentração ocorridos no 15º e 34º dia no valor de  $1,9 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $2,4 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Nos demais dias, a concentração se manteve praticamente nula.

A concentração de metano no reator se manteve bastante baixa, com uma formação máxima de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  na análise seguinte àquela onde se obteve a maior formação de acetato. Esta muito pequena produção de metano é coerente com a baixa produção de acetato, já que se espera que boa parte do metano que possa estar presente venha do acetato biodegradado.

Com isto, supõe-se que a rápida biodegradação ocorrida do benzeno e tolueno tenha ocorrido não por processos estritamente anaeróbios, mas também por vias aeróbias, já que não houve significativa formação de acetato e metano como seria esperado para este reator. O fato de haver uma constante reinjeção de benzeno e tolueno no reator, ou seja, maiores aberturas ao ambiente exterior, pode ter levado à entrada de oxigênio.

Já no reator BBT, a situação foi inversa à ocorrida no reator BT, como expõe a Figura 4.5.



**Figura 4.5** - Variação da concentração de acetato e metano no reator contendo biodiesel, benzeno e tolueno (BBT).

Nos primeiros dias de experimento houve uma baixa produção de acetato, no entanto, a partir do 23º dia, esta concentração começou a aumentar, assim como a de metano, indicando a ocorrência da biodegradação metanogênica. Como era esperado primeiro a

biodegradação do biodiesel, e a olho nu a bolha de biodiesel sobrenadante não era mais visível, no 24º dia foi adicionado mais 50 uL de biodiesel. Na análise seguinte à adição do biodiesel a concentração de acetato ascendeu de maneira rápida atingindo um pico de 17,4 mg.L<sup>-1</sup> no 34º dia, e, em seguida, decaiu até zerar do 55º dia em diante.

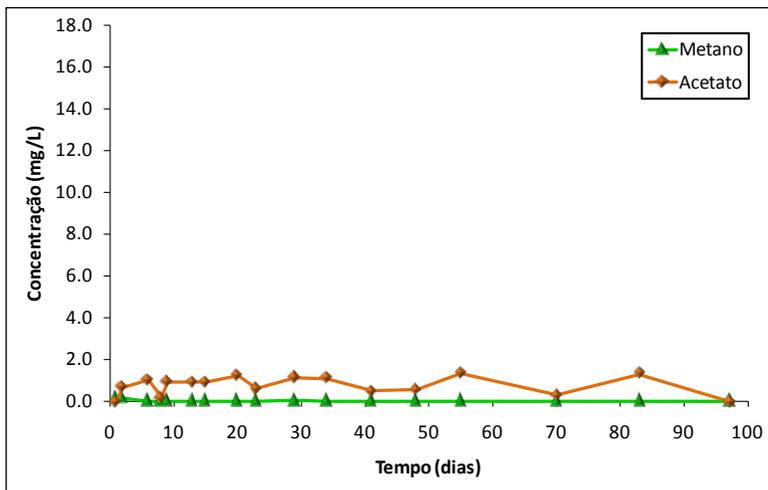
Logo após a subida da concentração de acetato no reator, a concentração de metano começou a aumentar de maneira contínua, atingindo um pico de 5,1 mg.L<sup>-1</sup> no 51º dia. Esta concentração pode ter sido ainda maior, mas como o metano é um gás pouco solúvel, pode ter ocorrido escape para o *headspace* (espaço sem líquido do microcosmo). Na Figura 4.5, pode-se perceber claramente como a formação de acetato acarretou, posteriormente, a elevação da concentração de metano, fato que sugere que o acetato formado foi totalmente biodegradado a metano. Com isto, já que se presume que não tenha ocorrido a biodegradação de benzeno e tolueno neste reator, como descrito na seção 4.1.1, é atribuída a formação de metano à atividade microbiológica na degradação do biodiesel.

Com a massa de matéria orgânica inserida no reator, era esperado uma formação ainda maior de acetato e, conseqüentemente, de metano, alcançando valores próximos à solubilidade deste gás (22 mg.L<sup>-1</sup>). Da Silva & Alvarez (2004) em experimento com colunas metanogênicas de fluxo contínuo onde se avaliou o potencial de bioaugmentação para aumentar a taxa de biodegradação anaeróbia dos BTEX, obteve concentrações maiores de metano com valores que variaram de 18 mg.L<sup>-1</sup> a 23 mg.L<sup>-1</sup>.

Com os valores de metano e acetato obtidos, acredita-se que, após certo tempo, a biodegradação dos contaminantes tenha cessado devido ao acúmulo de subprodutos, como H<sub>2</sub>S (sulfeto) e H<sub>2</sub>. Para que a biodegradação possa ocorrer via metanogênese, as condições do meio devem ser ideais dentro de uma faixa limite, como por exemplo, uma baixa concentração de H<sub>2</sub>, cuja remoção é realizada pelos microrganismos hidrogenotróficos. Como o reator é um ambiente fechado, sem trocas com o meio exterior, principalmente por não ter havido constantes *re-spikes* como no reator BT, este acúmulo de gases pode ter tornado o ambiente termodinamicamente desfavorável, inibindo a atividade de degradação dos contaminantes presentes pelos microrganismos.

A variação de acetato e metano no reator BBT HG é ilustrada no gráfico da Figura 4.6. Percebe-se que há uma baixa concentração de

acetato durante todo experimento, variando em torno de  $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ . A presença deste acetato não é atribuída à biodegradação do biodiesel, do benzeno ou do tolueno, mas sim à presença de éter etílico em 0,1% no cloreto de mercúrio, o qual pode ter dado origem ao acetato. Isto se confirma com a formação nula de metano ao longo do experimento, exceto nos dois primeiros dias, com uma concentração de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , devido provavelmente a pré-existência deste gás no inóculo utilizado.



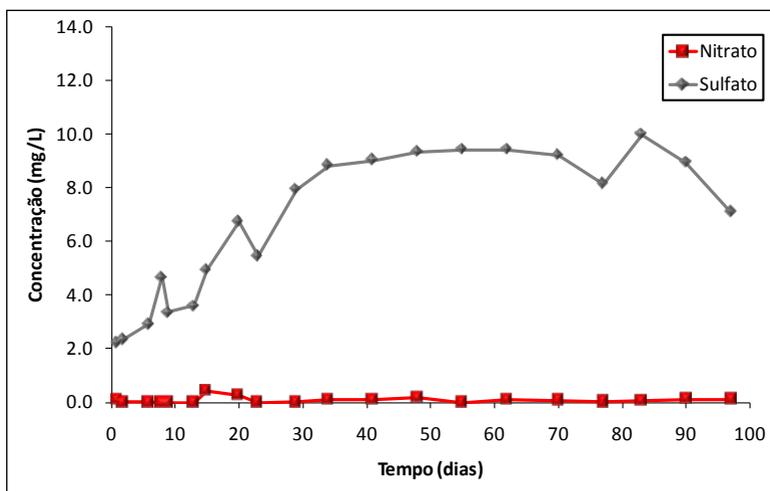
**Figura 4.6** - Variação da concentração de acetato e metano no reator contendo biodiesel, benzeno, tolueno e  $\text{HgCl}_2$  (BBT HG).

#### 4.1.3 Nitrato e sulfato

Uma baixa concentração de nitrato e sulfato é um condicionante para que o  $\text{CO}_2$  seja utilizado como receptor de elétrons e, assim, ocorra a metanogênese. Deste modo, acompanhar as concentrações destes dois receptores de elétrons é necessário para comprovar que as condições metanogênicas foram estabelecidas.

No reator BT (Figura 4.7), a concentração do ânion nitrato se manteve bastante baixa, com a concentração máxima de  $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$  obtida no 15º dia. Para o sulfato, as concentrações foram maiores e aumentaram com o passar do tempo, sendo o valor máximo obtido de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  no 83º dia. Esta elevação de sulfato no reator é atribuída a sua

solubilização do lodo e ao fato dele não ter sido utilizado pelos microrganismos como receptor de elétrons. Neste reator, nunca foi sentido o odor fétido característico de sulfeto, o qual é um subproduto da sulfato-redução, confirmando a hipótese do não uso do sulfato e de que as reações anaeróbias não foram as principais responsáveis pela biodegradação dos contaminantes.

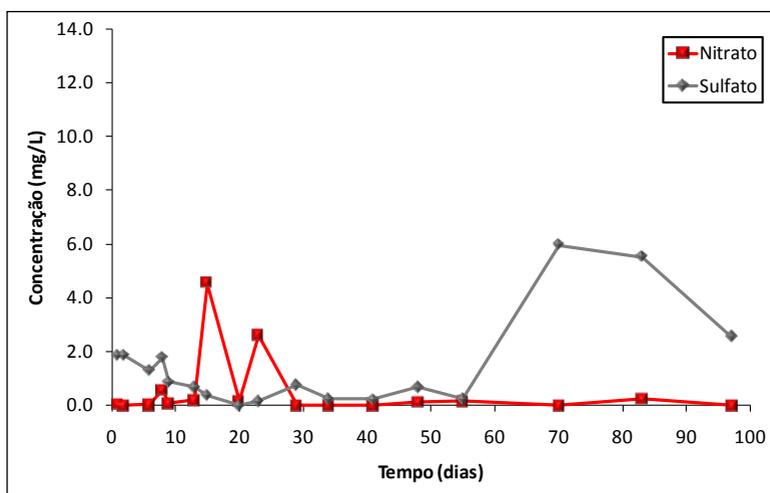


**Figura 4.7** - Variação da concentração de nitrato e sulfato no reator contendo benzeno e tolueno (BT).

Em relação ao reator BBT (Figura 4.8) a concentração de nitrato também foi baixa, com exceção dos dois picos no primeiro mês, provavelmente devido à agitação do frasco e solubilização do ânion. O sulfato teve sua concentração diminuída até o 55º dia e depois houve uma considerável elevação. A partir do 55º dia também aconteceu a queda da concentração de acetato e o aumento da de metano. Como sugerido em 4.1.2, a partir de certo momento não houve mais a biodegradação neste microcosmo, e isto se confirma com o aumento final da concentração de sulfato. Com a inibição do processo biodegradativo, o sulfato parou de ser utilizado pela microbiota, com uma taxa de solubilização maior que a de consumo, acarretando seu acúmulo no meio. Além disto, até o 55º dia a amostra extraída do reator exalava um forte cheiro de sulfeto. Portanto, possivelmente o sulfato

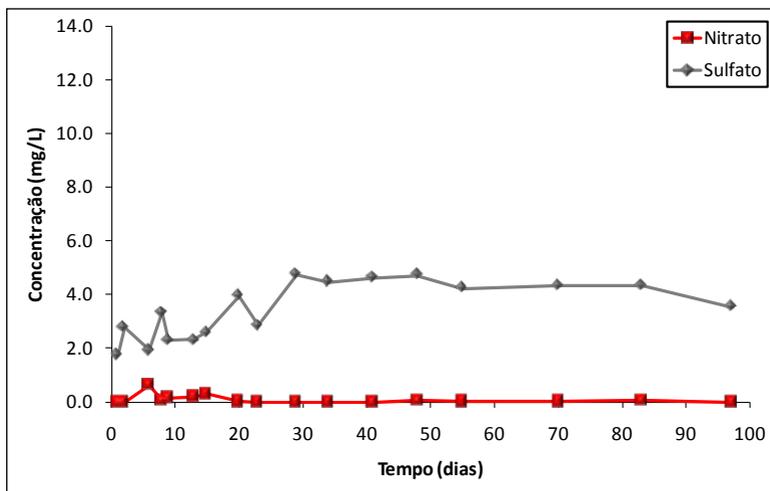
também foi utilizado como receptor de elétrons para a biodegradação do biodiesel neste reator.

Zengler et al. (1999) empregaram culturas enriquecidas com microorganismos metanogênicos para avaliar a biodegradação metanogênica de alcanos de cadeia longa, e constatou que com baixas concentrações de sulfato ( $\leq 192 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a produção de metano foi favorecida. Isto é devido, provavelmente, aos microorganismos sulfato-redutores que possibilitaram condições propícias para o crescimento de metanogênicos. Deste modo, os baixos valores de concentração de sulfato presentes nos reatores não inibiriam a metanogênese, como se pode comprovar mesmo com a baixa produção de metano obtida no reator BBT.



**Figura 4.8** - Variação da concentração de nitrato e sulfato no reator contendo biodiesel, benzeno e tolueno (BBT).

No reator BBT HG (Figura 4.9) a concentração de nitrato também foi desprezível como nos demais reatores. A concentração de sulfato seguiu uma tendência parecida com a observada no reator BT (Figura 4.7), com um aumento nas primeiras semanas e posterior estabilização, fato também atribuído a solubilização do ânion ao longo do tempo.



**Figura 4.9** - Variação da concentração de nitrato e sulfato no reator contendo biodiesel, benzeno, tolueno e  $\text{HgCl}_2$  (BBT HG).

## 4.2 Modelo energético de biodegradação via metanogênese

Com o uso modelo energético de biodegradação foram desenvolvidas as reações balanceadas de biodegradação para o benzeno, o tolueno, o íon palmitato e o acetato, com formação de biomassa e outros produtos finais, como o metano. Deste modo, pretendeu-se avaliar a produção teórica de metano a partir da biodegradação destes substratos orgânicos. Devido à dificuldade encontrada em achar as meias-reações e as respectivas energias livres para os outros ésteres constituintes do biodiesel, os cálculos foram feitos somente para o íon palmitato. A Tabela 4.1 apresenta as reações finais obtidas via metanogênese, cujos cálculos são demonstrados no Apêndice A.

Com base nas reações apresentadas na Tabela 4.1, observa-se que a produção de metano (em mols) a partir do íon palmitato é cerca de três vezes maior que a do benzeno, 2,5 vezes maior que a do tolueno e 11 vezes maior que a do acetato. Com base nisto, supondo o caso de um derramamento de 1 litro de biodiesel de soja, a produção de metano a partir do íon palmitato seria de aproximadamente 71,5 g.

**Tabela 4.1-** Reações de oxidação-redução do íon palmitato, do benzeno, do tolueno, e do acetato.

---

$\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2^- + 0,18 \text{NH}_4^+ + 7 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,18 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 10,82 \text{CH}_4 + 3,09 \text{CO}_2 + 0,82 \text{HCO}_3^-$
Íon palmitato
$\text{C}_6\text{H}_6 + 0,06 \text{HCO}_3^- + 0,06 \text{NH}_4^+ + 4,3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,06 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 3,6 \text{CH}_4 + 2,2 \text{CO}_2$
Benzeno
$\text{C}_7\text{H}_8 + 0,071 \text{HCO}_3^- + 0,071 \text{NH}_4^+ + 4,71 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,071 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 4,32 \text{CH}_4 + 2,36 \text{CO}_2$
Tolueno
$\text{CH}_3\text{COO}^- + 0,032 \text{CO}_2 + 0,016 \text{NH}_4^+ + 0,92 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,016 \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 0,98 \text{HCO}_3^- + 0,95 \text{CH}_4$
Acetato

---

Para um cenário hipotético de derramamento de 1 litro de gasolina comercial, a quantidade de metano produzida a partir do benzeno e do tolueno seria de 3,3 g e 17,3 g, respectivamente. Agora, supondo o vazamento de 1 litro de óleo diesel comercial, espera-se que sejam produzidos 1,3 g de metano a partir do benzeno e 10,8 g a partir do tolueno (os cálculos para a produção de metano estão demonstrados no Apêndice B). Desta forma, com base na biodegradação do íon palmitato, espera-se que haja uma grande produção de metano no derramamento de biodiesel em águas subterrâneas a partir do momento que o ambiente entrar em condições metanogênicas. Já em relação aos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno e tolueno, a produção de metano esperada no derramamento subsuperficial de gasolina é maior que a aguardada para o diesel. Estes resultados foram obtidos somente para uma fração dos constituintes destes combustíveis, não representando sua totalidade.

As reações de oxidação-redução obtidas na Tabela 4.1 também foram utilizadas para calcular a produção teórica de metano a partir das quantidades de biodiesel, benzeno e tolueno inseridas nos microcosmos e da quantidade de acetato produzida. No reator que continha biodiesel e era possível a atividade microbiológica (reator BBT), com a quantidade total de biodiesel de soja inserida de 150 µL (100 µL iniciais + 50 µL no *re-spike*) é esperada uma produção teórica de 10,7 mg de metano a partir do íon palmitato. Para a quantidade de 5 mg de benzeno e tolueno inseridas no início do experimento em todos os reatores, uma quantidade teórica

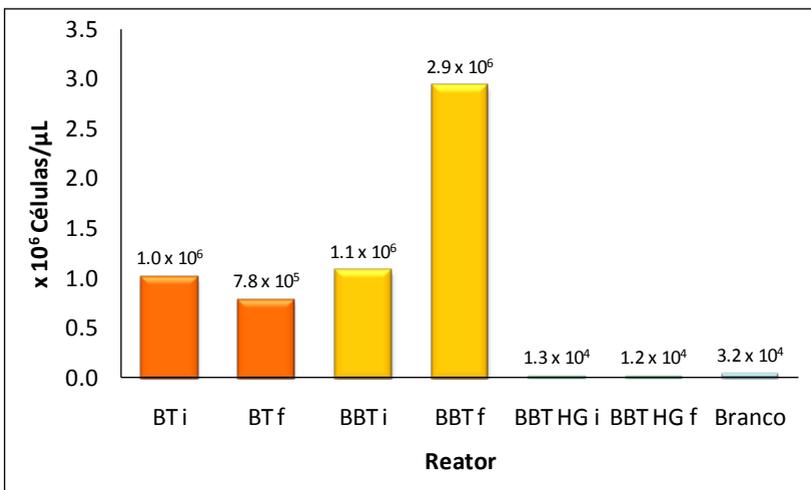
de 3,7 mg e 3,5 mg, respectivamente, de metano é formada teoricamente. Estes valores foram diferentes daqueles obtidos experimentalmente, sendo que somente o reator BBT obteve uma concentração de metano próxima à teórica ( $5,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), que é atribuída à biodegradação do biodiesel e não à dos hidrocarbonetos monoaromáticos. Desta forma, supõe-se que a quantidade restante de metano necessária para se chegar à teórica do íon palmitato possa ter sido armazenada no *headsapce* ou então que não tenha ocorrido mais biodegradação do biodiesel a partir de determinado momento. Destaca-se que o metano formado também é proveniente da biodegradação dos demais ésteres do biodiesel, ou seja, a formação de metano obtida experimentalmente não é devida exclusivamente ao palmitato. Para o reator com somente benzeno e tolueno (BT), como as quantidades de metano obtidas foram mínimas (em torno de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), acredita-se que este reator não tenha entrado em metanogênese e, assim, é desnecessária uma comparação de produção experimental e teórica de metano. Em relação ao acetato, houve uma produção significativa de 17,4 mg em torno do 34º dia no reator com biodiesel e ativo biologicamente (BBT). Para esta quantidade, a produção teórica de metano é de 4,5 mg, o qual é um valor próximo do máximo obtido experimentalmente de 5,1 mg. Como as análises não eram realizadas diariamente, é presumível que no intervalo entre duas análises consecutivas (entre o 29º e 34º dia) tenha ocorrido uma maior produção de acetato, cujo valor seria de acordo com a produção teórica de metano. Isto reforça a hipótese de que somente parte do biodiesel tenha sido biodegradado. Assim sendo, pode-se inferir que a biodegradação do biodiesel gerou o produto intermediário acetato, que foi completamente biodegradado e teve como destino final a sua biotransformação em metano.

### 4.3 Análise microbiológica

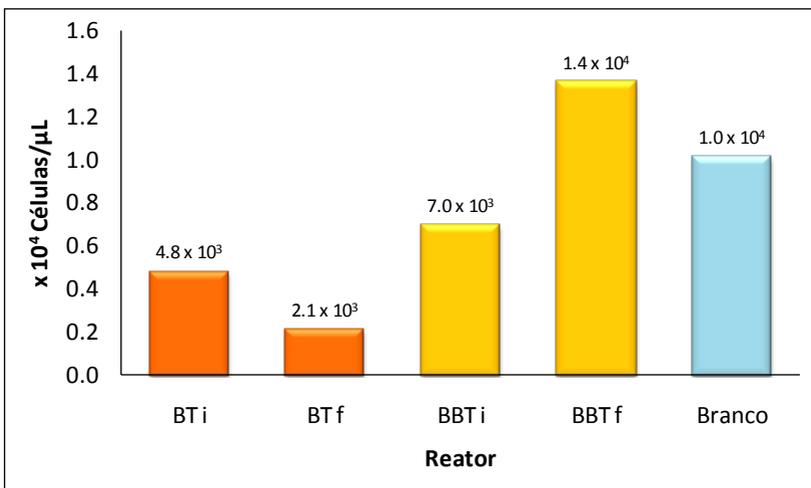
A partir dos resultados das análises obtidas no PCR, pode-se quantificar as bactérias totais assim como os principais grupos microbianos existentes nos reatores (nitrato-redutores, sulfato-redutores e arqueas metanogênicas). Esta análise pode ajudar a justificar ou compreender melhor os processos de anaeróbios de biodegradação que possam estar ocorrendo, visto que certos microorganismos são associados a determinadas rotas metabólicas. Maiores detalhes sobre as análises realizadas em PCR nesta etapa estão inclusos no Apêndice D.

A Figura 4.10 expõe a quantidade total de bactérias existentes nos reatores no início e no final do experimento. Observa-se que no reator com somente benzeno e tolueno (BT) houve um leve decréscimo na quantidade de bactérias, mesmo com a fonte orgânica de substrato constantemente inserida. Como as concentrações caíam rapidamente neste reator, é possível que fosse necessária uma maior carga orgânica para proporcionar um significativo aumento populacional bacteriano. No reator com biodiesel, benzeno e tolueno (BBT) e ativo biologicamente, a presença do biodiesel favoreceu o desenvolvimento da microbiota local, com um aumento populacional de aproximadamente 3 vezes em relação a quantidade inicialmente presente. Isto leva a acreditar que a introdução de uma fonte de carbono facilmente biodegradável (biodiesel) leva a uma tendência de aumento da população microbiana. Owsianiak et al. (2009) observaram que há uma relação linear entre biomassa e quantidade de biodiesel presente em uma mistura, logo, a introdução de biodiesel acarreta o aumento da população bacteriana. A quantidade de bactérias no reator com biodiesel, benzeno, tolueno e cloreto de mercúrio (BBT HG) foi relativamente baixa e menor que a presente no branco (livre de DNA), logo, posteriormente não foi realizada a quantificação de nitrato-redutores, sulfato-redutores e metanogênicos pra este reator.

Em relação aos microrganismos nitrato-redutores (Figura 4.11), nota-se que somente o reator com biodiesel, benzeno e tolueno e biologicamente ativo (BBT) no final do experimento obteve uma concentração celular um pouco superior a alcançada no branco. Assim, os demais reatores foram considerados como detentores de concentrações bacterianas desprezíveis. Como a concentração de nitrato em todos os reatores foi muito baixa, era realmente esperado a ausência ou baixo número de redutores de nitrato. Como o reator BBT apresentou dois picos de nitrato durante o experimento, é possível que esta maior concentração tenha estimulado o desenvolvimento de bactérias nitrato-redutoras mesmo que em baixa quantidade.



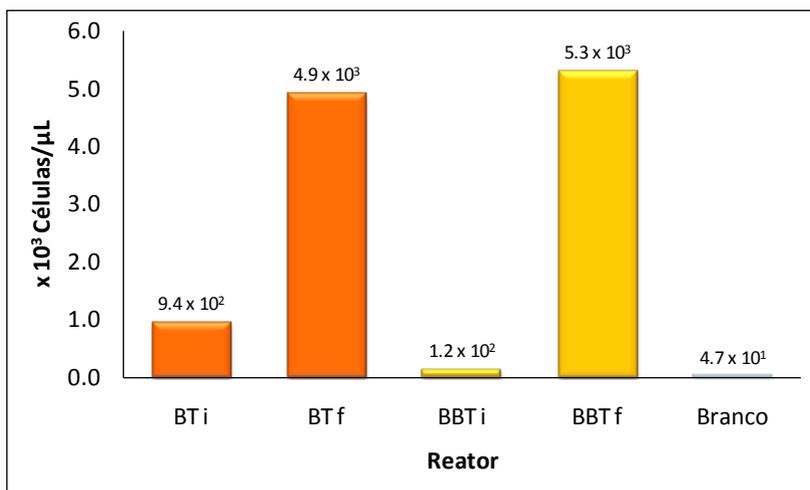
**Figura 4.10** - Concentração total bacteriana nos reatores no início (i) e final (f) do experimento.



**Figura 4.11** - Concentração bacteriana nitrato-redutora nos reatores no início (i) e final (f) do experimento.

Houve um grande aumento da população bacteriana de redutoras de sulfato, como pode ser conferido na Figura 4.12. No reator com benzeno e tolueno (BT), o incremento foi de aproximadamente 5 vezes. Isto é atribuído ao fato da amostra final do reator BT ter sido a única retirada após o microcosmo ser agitado. Já no reator com benzeno, tolueno e biologicamente ativo (BBT), o aumento populacional foi de quase 45 vezes em relação à quantidade inicial. Como já comentado anteriormente (4.1.3), este reator apresentou características como forte cheiro de sulfeto e decaimento do sulfato, as quais configuram evidências típicas da presença de microorganismos utilizadores de sulfato para biodegradação da matéria orgânica.

Não foram encontradas populações significativas de microorganismos metanogênicos em nenhum dos reatores, apesar da produção de metano ocorrida no reator BBT. Pelo fato dos microorganismos metanogênicos possuírem uma elevada especificidade de substratos e serem altamente sensíveis em relação às características do meio, eles podem não ter encontrado condições propícias para se proliferarem nos reatores. Isto corrobora com a hipótese de que a sulfato-redução foi uma das principais vias metabólicas na biodegradação dos contaminantes presentes nos reatores.



**Figura 4.12** - Concentração bacteriana sulfato-redutora nos reatores no início (i) e final (f) do experimento.

## 5 CONCLUSÕES

A influência da presença do biodiesel de soja na biodegradação do benzeno e do tolueno sob condições metanogênicas foi investigada neste estudo. O experimento foi conduzido em laboratório através de microcosmos anaeróbios contendo água sintética, inóculo metanogênico e os contaminantes biodiesel, benzeno e tolueno. As conclusões para este estudo se basearam nas análises cromatográficas ao longo dos 97 dias de experimento, nas reações de biodegradação com produção de biomassa e nas análises microbiológicas em PCR quantitativo.

A biodegradação do benzeno e do tolueno na ausência do biodiesel foi bastante rápida e independente da concentração inicial inserida, com um intervalo de geralmente uma semana para não se detectar mais os hidrocarbonetos. Não houve uma biodegradação preferencial de um composto em relação ao outro, já que o benzeno e o tolueno foram consumidos ao mesmo tempo. Devido ao rápido decaimento, à formação desprezível de acetato e metano, e à ausência de odor fétido característico e conseqüente não decaimento do sulfato, a biodegradação do benzeno e tolueno ocorreu, também, por vias aeróbias.

Já no caso do benzeno e do tolueno na presença de biodiesel, não ocorreu biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos. É atribuída somente biodegradação ao biodiesel, o qual pode ter inibido a biodegradação do benzeno e do tolueno. Esta biodegradação do biodiesel ocorreu por via metanogênica, já que após a produção de acetato houve o aumento da concentração de metano, e também por sulfato-redução, devido ao decaimento do sulfato e ao odor característico de sulfeto. Porém, após certo tempo, a biodegradação pode ter ser tornado termodinamicamente desfavorável devido ao acúmulo de gases como  $H_2$  e  $H_2S$ , inibindo a atividade microbiológica na degradação dos contaminantes. Isto evidencia que uso de microcosmos pode dificultar a avaliação da biodegradação por tornar o meio desfavorável à atuação da biomassa.

Segundo o modelo energético de McCarty, a produção de metano a partir do íon palmitato é três vezes maior que a de benzeno, 2,5 vezes maior que a de tolueno e 11 vezes maior que a de acetato. Com isto, espera-se que a partir do momento em que o meio se encontrar em condições metanogênicas, a formação de metano a partir do biodiesel será maior que para outros combustíveis, como gasolina e diesel. A produção teórica de metano calculada a partir do benzeno, tolueno e do

biodiesel (íon palmitato) para os reatores foi maior que a obtida experimentalmente, corroborando para a hipótese de que condições plenamente metanogênicas não tenham sido alcançadas e que houve uma interrupção na biodegradação. Já para o acetato formado no reator com biodiesel, a formação teórica de metano a partir deste intermediário foi muito próxima da experimental. Desse modo, pode-se inferir que a o produto intermediário acetato foi completamente biodegradado a metano.

Na análise microbiológica, constatou-se que a presença do biodiesel favoreceu o aumento da biomassa (bactérias totais) em até 3 vezes quando comparado com o início do experimento ou com o reator ausente de biodiesel. Desse modo, o biodiesel atuou como uma fonte de carbono facilmente biodegradável que estimulou o crescimento microbiano. A população de sulfato-redutoras no reator sem biodiesel aumentou devido ao fato da análise final do reator ter sido realizada com uma amostra retirada sob agitação, o que pode ter influenciado no resultado. Como este reator não apresentou consumo de sulfato e odor fétido, não é esperado um aumento na concentração deste grupo de microorganismos. Já no reator com biodiesel, a população de bactérias sulfato-redutoras aumentou grandemente, com um aumento de aproximadamente 45 vezes quando comparado ao início do experimento. Levando-se em conta o elevado número de sulfato-redutoras, a ausência de populações microbianas metanogênicas e a baixa quantidade de nitrato-redutoras, a sulfato-redução foi a principal via metabólica anaeróbia na biodegradação dos contaminantes no microcosmo com biodiesel.

Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que o biodiesel interfere na biodegradação do benzeno e tolueno de maneira a ser primeiramente biodegradado, até mesmo sob condições metanogênicas. Porém, a metanogênese não foi a via de biodegradação anaeróbia predominante nos microcosmos. Destaca-se também o uso cauteloso de microcosmos como artifício para avaliar a biodegradação, já que por se tratar de um ambiente fechado, diferentemente do meio subterrâneo, pode haver acúmulo de subprodutos que inibam a biodegradação, e, assim, mascarar um resultado. Além disso, o biodiesel favoreceu o desenvolvimento e aumento da biomassa local, podendo, conseqüentemente, aumentar a biodegradação de contaminantes presentes no ambiente subsuperficial.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Glossário ANP**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 7 de julho de 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 18th edition, Washington, DC, 1992.

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.

BEDIENT, P. B.; RIFAI, H. S.; NEWLL, C. J. **Ground water contamination**: transport and remediation. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1997. 604p.

BELLER, H. R.; EDWARDS, E. A. Anaerobic Toluene Activation by Benzylsuccinate Synthase in a Highly Enriched Methanogenic Culture, **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5503-5505, 2000.

BELLER, H.R.; KANE, S.R.; LEGLER, T.C.; ALVAREZ, P.J.J. A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. **Environmental Science Technology**, 36 (18), 3977 -3984. 2002.

BRASIL, Lei Nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov>>. Acesso em 6 de jun. 2009.

CHAKRABORTY, R.; COATES, J. D. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.60, n.4, p.437-446, 2004.

CHAKRABORTY, R. et al. 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 & Geochemistry**. 1 ed. South Carolina: John Wiley & Sons, 1993. 424p.

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 DE POLÍTICA ENERGÉTICA - CNPE. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei no 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Resolução Nº 6, de 16 de setembro de 2009.

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.

DEMELLO, J. A., et al. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study, **Marine Pollution Bulletin**, v.54, p.894-904, 2007.

DOLFING, J.; LARTER, S. R.; HEAD, I. M. Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation, **The ISME Journal**, v.2, p.442-452, 2008.

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

DOU, J. et al. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction, **Journal of Hazardous Materials**, v.151, p.720-729, 2008a.

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, p.585-592, 2008b.

EDWARDS, A. E.; GRBIĆ-GALIĆ, D. Anaerobic Degradation of Toluene and o-Xylene by a Methanogenic Consortium, **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.1, p.313-322, 2004.

FARHADIAN, M., et al. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review, **Bioresource Technology**, v.99, p.5296–5308, 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. 233p. Tese de doutorado em Química – Universidade Federal de Santa Catarina.

GIEG, L. M.; DUNCAN, K. E.; SUFLITA, J. M. Bioenergy Production via Microbial Conversion of Residual Oil to Natural Gas, **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.10, 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.

HATTORI, S. Syntrophic Acetate-Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments, **Microbes and Environments**, v.23, n.2, p118-127, 2008.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; LARTER, S. Review article Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil, **Nature**, v.426, p.244-352, 2003.

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

HILL, J. et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels, **PNAS**, v.103, n.30, p.11206-11210, 2006.

HOLLIGER, et al. Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants, **FEMS Microbiology Reviews**, v.20, p.517-523, 1997.

IMACHI, H. Non-Sulfate-Reducing, Syntrophic Bacteria affiliated with Desulfotomaculum Cluster I Are Widely Distributed in Methanogenic Environments, **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, 2006.

JACKSON, B. E.; MCINERNEY, M. J. Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits, **Nature**, v.415, p.454-456, 2002.

JAHN, K. M.; HADERLEIN, S. B.; MECKENSTOCK, R. U. Anaerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-Xylene in Sediment-Free Iron-Reducing Enrichment Cultures, **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.3355-3358, 2005.

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.

LAPINSKIENĖ, A.; MARTINKUS, P.; RĚBŽDAITĚ, V. Ecotoxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil, **Environmental Pollution**, v.142, p.432-437, 2006.

LAPINSKIENĖ, A.; MARTINKUS, P. Research on Anaerobic Biodegradation of Fats, Biodiesel Fuel and Diesel Fuel in Soil Medium, **Environmental Research, Engineering and Management**, v.1, n.39, p.30-37, 2007.

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

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

MELLO, F. O. T.; PAULILLO, L. F.; VIAN, C. E. F. O BIODIESEL NO BRASIL: panoramas, perspectivas e desafios. **Informações Econômicas**, v.37, n.1, 2007.

MARIANO, A. P. et al. Biodegradability of diesel and biodiesel blends, **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.1323-1328, 2008.

MUDGE, S. M.; PEREIRA, G. M. Stimulating the Biodegradation of Crude Oil with Biodiesel Preliminary Results, **Spill Science & Technology Bulletin**, v.5, p.353-355, 1999.

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

OWSIANIAK, M. et al. 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.

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.

PEREIRA, G. M.; MUDGE, S. M. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels, **Chemosfere**, v.54, p.297-304, 2004.

PETROBRÁS DISTRIBUIDORA. **Características do óleo diesel**. Disponível em: <<http://www.br.com.br/wps/portal/PortalDeConteudo>>. Acesso em jul. 2009.

PRINCE, R. C.; HAITMANEK, C.; LEE, C. C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20, **Chemosphere**, v.71, p.1446-1451, 2008.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/sigmaaldrich/home.html?change=true>>. Acesso em jul. 2009.

SCHLEICHER, T. et al. Microbiological stability of biodiesel–diesel-mixtures, **Bioresource Technology**, v.100, p.724-730, 2009.

SCHINK, B. Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.2, p.262-280, 1997.

STOLZ, J. F. et al. **Aerobic and Anaerobic Biodegradation of the Methyl Esterified Fatty Acids of Soy Diesel in Freshwater and Soil Environments**. Biofuels Compendium - Biodiesel - Fate And Transport, 1995. Disponível em: <<http://www.epa.gov/OUST/altfuels/biofate.htm>>. Acesso em 26 mai. 2009.

STRUCHTEMEYER, C. G. et al. Evidence for Aceticlastic Methanogenesis in the Presence of Sulfate in a Gas Condensate-Contaminated Aquifer, **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.5348-5353, 2005.

STUMM, W.; MORGAN, J.J. **Aquatic Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 780p.

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

TOXNET – Toxicology Data Network. **Harzadous Substances Data Bank (HSDB)**, 2009. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>>. Acesso em 6 de jun. 2009.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Choosing the correct procedure**. Chapter two, 1996 a. CD-ROM

VON GUNTEN, U.; ZOBRIST, J. Biogeochemical changes in groundwater-infiltration systems: Column studies. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.57, n.16, p.3895-3906, 1993.

WASHER, C. E.; EDWARDS, E. A. Identification and Expression of Benzylsuccinate Synthase Genes in a Toluene-Degrading Methanogenic Consortium, **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.4, p.1367-1369, 2007.

WARIKOO, V. et al. Interspecies Acetate Transfer Influences the Extent of Anaerobic Benzoate Degradation by Syntrophic Consortia, **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.1, p. 26-32, 1996.

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

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. et al. **Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface**. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1999. 617p.

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

ZHANG, X. et al. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment, **Transactions of ASAE**, v.41, p.1423-1430, 1998.

ZENGLER, K. et al. Methane formation by long-chain alkanes by anaerobic microorganisms, **Nature**, v.401, p.266-269, 1999.

## **APÊNDICE A**

Cálculo das reações de oxi-redução heterotróficas do íon palmitato, do benzeno e do tolueno com produção de biomassa via metanogênese

**Cálculo das reações de oxidação-redução heterotróficas do íon palmitato, do benzeno e do tolueno com produção de biomassa via metanogênese**

Para se obter os valores de  $f_e$  e  $f_s$  (item 2.6, equação 2.1), é necessário conhecer quantos equivalentes de elétrons do doador devem ser oxidados por equivalentes de células formadas ( $A$ ). O valor de  $A$  é obtido matematicamente através da equação:

$$A = -\frac{\frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{pc}}{\varepsilon}}{\varepsilon \Delta G_r}$$

Na equação acima, a variável  $\Delta G_p$  representa a energia requerida para converter a fonte de carbono em um intermediário orgânico, e é calculada pela diferença entre as energias das meias-reações do intermediário e do doador de elétrons. O piruvato é utilizado, geralmente, como intermediário representativo. Conforme o sinal de  $\Delta G_p$ , o expoente  $n$  assume diferentes valores. Para um  $\Delta G_p$  positivo,  $n$  é igual a +1, e para o caso contrário,  $n$  vale -1. A energia necessária para transformação do piruvato em carbono celular é  $\Delta G_{pc}$ . Deve-se levar em conta que parte da energia é perdida nas transferências de elétrons, sendo esta perda considerada pelo termo  $\varepsilon$ , que representa a eficiência na transferência de energia. Normalmente, adota-se um valor de 0.6 para  $\varepsilon$ . O termo  $\Delta G_r$  representa a energia liberada por equivalente do doador oxidado e é obtida pela diferença das energias livres das meias-reações do doador de elétrons e do receptor de elétrons (RITTMANN & MCCARTY, 2001).

Conhecido o valor de  $A$ , é possível o cálculo de  $f_e$  e  $f_s$  (a soma de  $f_e$  e  $f_s$  é igual a 1) com o emprego da equação abaixo:

$$f_e = 1 - f_s = \frac{A}{1 + A}$$

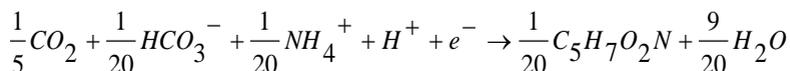
## ÍON PALMITATO

- Meias-reações

Abaixo são expostas as meias-reações que serão utilizadas nos cálculos conforme exposto na

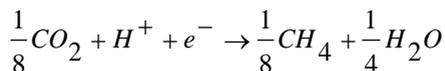
Tabela 2.5.

$R_c$  - Reação de síntese celular utilizando o amônio como fonte de nitrogênio:

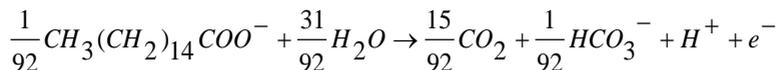


Foi escolhido o amônio como fonte de nitrogênio pelo fato da água sintética ser formada por compostos químicos que liberam este cátion em solução.

$R_a$  - Reação para produção de energia utilizando o dióxido de carbono como receptor de elétrons:



$R_d$  - Reação para o doador de elétrons íon palmitato:



- Cálculo de A:

$$A = - \frac{\frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{pc}}{\varepsilon}}{\varepsilon \Delta G_r}$$

Onde  $A$  é o equivalente de elétrons do íon palmitato oxidados por equivalente de elétrons de células sintetizadas.

$\Delta G_p$  é a energia necessária para converter a fonte de carbono para o intermediário orgânico. Considerando como fonte de carbono o íon palmitato, como intermediário o piruvato e que  $\Delta G_p$  é a diferença das energias das meias-reações destes dois compostos, temos que  $\Delta G_p = \Delta G^\circ_{\text{(piruvato)}} - \Delta G^\circ_{\text{(palmitato)}} = (35,09) - (27,26) = \mathbf{7,83 \text{ kJ/e}^- \text{ eq}}$ .

$\Delta G_r$  é a energia liberada por equivalente do doador de elétrons (palmitato) oxidado para geração de energia. É obtida pela diferença das energias livres das meias-reações do receptor de elétrons e do doador de elétrons. Logo,  $\Delta G_r = \Delta G^\circ_{\text{(dióxido de carbono)}} - \Delta G^\circ_{\text{(palmitato)}} = (23,53) - (27,26) = \mathbf{-3,73 \text{ kJ/e}^- \text{ eq}}$ .

$\Delta G_{pc}$  é a energia necessária para converter o intermediário (piruvato) em carbono celular. Para o caso de ter o cátion amônio como fonte de nitrogênio seu valor é igual a **18,8 kJ/ e<sup>-</sup> eq**.

$\varepsilon$  representa a eficiência da energia transferida seu valor assumido é igual a **0,6**.

Assim,

$$A = - \frac{\left( \frac{7,83}{0,6^{+1}} \right) + \left( \frac{18,8}{0,6} \right)}{0,6^{(-3,73)}} = 19,83$$

- Cálculo de  $f_s$  e  $f_e$ :

Conhecendo o valor de  $A$  pode-se calcular  $f_s$  e  $f_e$  pelas seguintes equações:

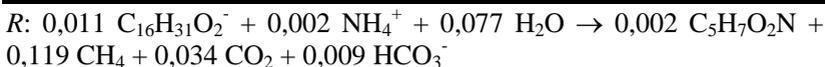
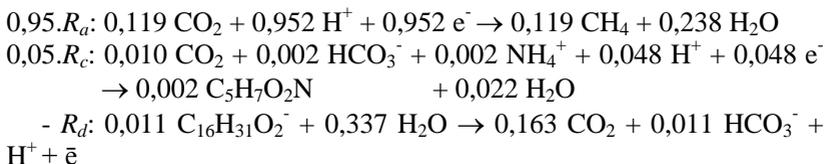
$$f_s = \frac{1}{1 + A} = \frac{1}{1 + 19,83} = 0,05$$

mas,  $f_e + f_s = 1$ , então  $f_e = 0,95$

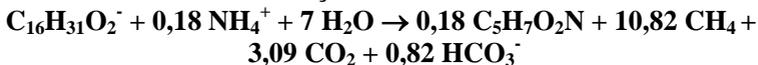
- Cálculo de  $R$

Calculados os valores de  $f_e$  e  $f_s$  pode-se então obter a reação geral através da seguinte equação:

$$R = f_e R_a + f_s R_c - R_d$$



**Reação geral simplificada de biodegradação do íon palmitato com formação de biomassa:**



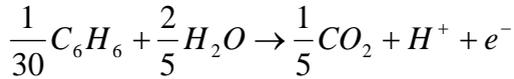
**BENZENO**

Para o benzeno e tolueno foram assumidas as mesmas considerações feitas para o íon palmitato, onde a única diferença é a mudança do doador de elétron.

- Meias-reações

$R_c$  e  $R_a$  são as mesmas utilizadas para o íon palmitato.

$R_d$  - Reação para o doador de elétrons benzeno:



- Cálculo de  $A$ :

$$A = -\frac{\frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{pc}}{\varepsilon}}{\varepsilon \Delta G_r}$$

$$\Delta G_p = \Delta G^\circ (\text{piruvato}) - \Delta G^\circ (\text{benzeno}) = (35,09) - (26,67) = \mathbf{8,42 \text{ kJ/e}^- \text{ eq.}}$$

$$\Delta G_r = \Delta G^\circ (\text{dióxido de carbono}) - \Delta G^\circ (\text{benzeno}) = (23,53) - (26,67) = \mathbf{-3,14 \text{ kJ/e}^- \text{ eq.}}$$

$$\Delta G_{pc} = \mathbf{18,8 \text{ kJ/e}^- \text{ eq.}}$$

$$\varepsilon = \mathbf{0,6.}$$

Assim,

$$A = -\frac{\left(\frac{8,42}{0,6^{+1}}\right) + \left(\frac{18,8}{0,6}\right)}{0,6^{(-3,14)}} = 24,08$$

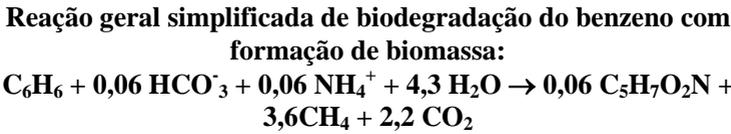
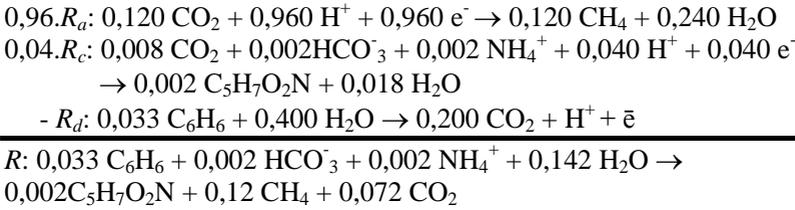
- Cálculo de  $f_s$  e  $f_e$ :

$$f_s = \frac{1}{1 + A} = \frac{1}{1 + 24,08} = 0,04$$

$$\text{mas, } f_e + f_s = 1, \quad \text{então } f_e = 0,96$$

- Cálculo de  $R$

$$R = f_e R_a + f_s R_c - R_d$$

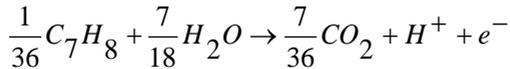


## TOLUENO

- Meias-reações

$R_c$  e  $R_a$  são as mesmas utilizadas para o íon palmitato.

$R_d$  - Reação para o doador de elétrons tolueno:



- Cálculo de A:

$$A = - \frac{\frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{pc}}{\varepsilon}}{\varepsilon \Delta G_r}$$

$$\Delta G_p = \Delta G^\circ_{\text{(piruvato)}} - \Delta G^\circ_{\text{(tolueno)}} = (35,09) - (26,22) = \mathbf{8,87 \text{ kJ/e}^-} \text{ eq.}$$

$$\Delta G_r = \Delta G^\circ_{\text{(dióxido de carbono)}} - \Delta G^\circ_{\text{(tolueno)}} = (23,53) - (26,22) = \mathbf{-2,69 \text{ kJ/e}^-} \text{ eq.}$$

$$\Delta G_{pc} = \mathbf{18,8 \text{ kJ/ e}^-} \text{ eq.}$$

$$\varepsilon = 0,6.$$

Assim,

$$A = -\frac{\left(\frac{8,87}{0,6+1}\right) + \left(\frac{18,8}{0,6}\right)}{0,6(-2,69)} = 28,57$$

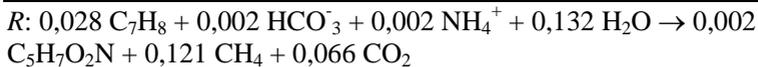
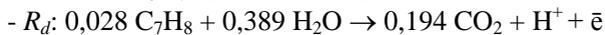
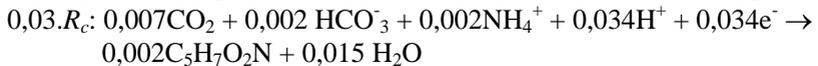
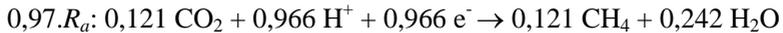
- Cálculo de  $f_s$  e  $f_e$ :

$$f_s = \frac{1}{1+A} = \frac{1}{1+28,57} = 0,03$$

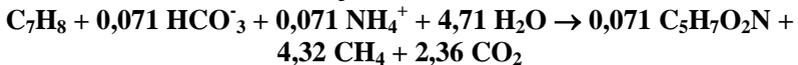
$$\text{mas, } f_e + f_s = 1, \quad \text{então } f_e = 0,97$$

- Cálculo de  $R$

$$R = f_e R_a + f_s R_c - R_d$$



**Reação geral simplificada de biodegradação do tolueno com formação de biomassa:**

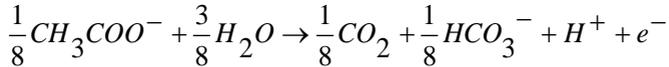


## ACETATO

- Meias-reações

$R_c$  e  $R_a$  são as mesmas utilizadas para o íon palmitato.

$R_d$  - Reação para o doador de elétrons acetato:



- Cálculo de  $A$ :

$$A = -\frac{\frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{pc}}{\varepsilon}}{\varepsilon \Delta G_r}$$

$$\Delta G_p = \Delta G^\circ_{\text{(piruvato)}} - \Delta G^\circ_{\text{(acetato)}} = (35,09) - (27,40) = \mathbf{7,69 \text{ kJ/e}^- \text{ eq.}}$$

$$\Delta G_r = \Delta G^\circ_{\text{(dióxido de carbono)}} - \Delta G^\circ_{\text{(acetato)}} = (23,53) - (27,40) = \mathbf{-3,87 \text{ kJ/e}^- \text{ eq.}}$$

$$\Delta G_{pc} = \mathbf{18,8 \text{ kJ/e}^- \text{ eq.}}$$

$$\varepsilon = \mathbf{0,6.}$$

Assim,

$$A = -\frac{\left(\frac{7,69}{0,6^{+1}}\right) + \left(\frac{18,8}{0,6}\right)}{0,6(-3,87)} = 19,01$$

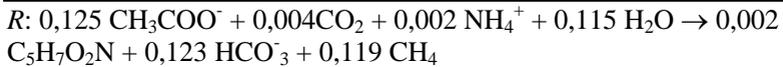
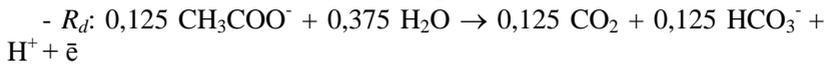
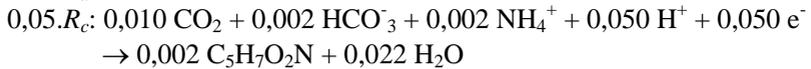
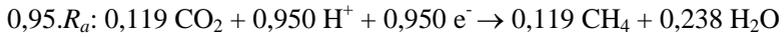
- Cálculo de  $f_s$  e  $f_e$ :

$$f_s = \frac{1}{1+A} = \frac{1}{1+19,01} = 0,05$$

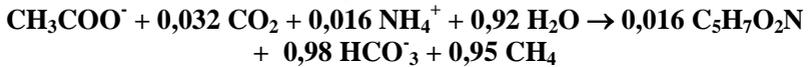
$$\text{mas, } f_e + f_s = 1, \quad \text{então } f_e = 0,95$$

- Cálculo de  $R$

$$R = f_e R_a + f_s R_c - R_d$$



**Reação geral simplificada de biodegradação do acetato com  
formação de biomassa:**



## **APÊNDICE B**

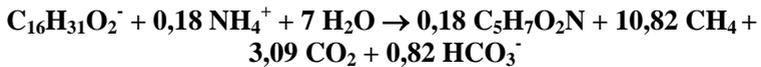
Cálculo da produção teórica de metano a partir do íon palmitato, do benzeno e do tolueno

## Cálculo da produção teórica de metano a partir do íon palmitato, do benzeno e do tolueno

Através das reações balanceadas de biodegradação obtidas com o auxílio do modelo energético de biodegradação (RITTMANN & MCCARTY, 2001), pode-se quantificar a massa de metano produzida teoricamente a partir da degradação do íon palmitato presente no biodiesel, do benzeno e do tolueno. O cálculo estequiométrico da biodegradação via metanogênese para o íon palmitato, para o benzeno e para o tolueno foi calculado no Apêndice A.

### 1. Íon Palmitato

Reação estequiométrica de biodegradação com produção celular para o íon palmitato:

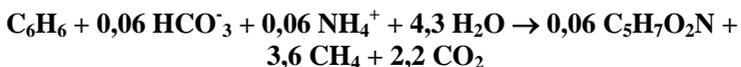


Observa-se que para cada mol de palmitato biodegradado (255 g) é formado 10,82 mols de metano (173,1 g). Levando-se em consideração que 12,1% do biodiesel de soja é composto por palmitato (GOMES, 2008), e que a massa específica do biodiesel de soja é 870,6 kg/m<sup>3</sup>, no derramamento de 1 L de biodiesel de soja, espera-se que haja uma produção teórica de aproximadamente 71,5 g de metano proveniente do íon palmitato.

Para os microcosmos, com a quantidade total de biodiesel de soja inserida no reator de 150 µL (100 µL iniciais + 50 µL no *re-spike*) espera-se uma produção teórica de 10,7 mg de metano.

### 2. Benzeno

Reação estequiométrica de biodegradação com produção celular para o benzeno:



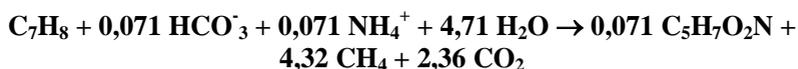
Nota-se que para cada mol de benzeno biodegradado (78 g) são formados 3,6 mols de metano (57,6 g). Levando-se em consideração que 0,59 % (em massa) da gasolina comercial brasileira é composta por benzeno (FERNANDES, 1997), que a densidade da gasolina é aproximadamente 0,75<sup>5</sup> (TOXNET, 2009), no derramamento de 1 L de gasolina, espera-se que haja uma produção teórica de aproximadamente 3,3 g de metano a partir do benzeno.

Já para o caso hipotético de derramamento de 1 L de diesel comercial brasileiro, cuja densidade é de 0,85<sup>6</sup> (PETROBRÁS, 2009) e cuja presença de benzeno é de 0,002g.g<sup>-1</sup> (KAIPPER, 2003), seriam produzidos cerca de 1,3 g de metano.

No caso dos microcosmos, com a quantidade inicial inserida nos reatores de 5 mg, espera-se uma produção teórica de 3,7 mg de metano.

### 3. Tolueno

Reação estequiométrica de biodegradação com produção celular para o tolueno:



Para cada mol de tolueno biodegradado (98 g) é formado 4,32 mols de metano (69,1 g). Levando-se em consideração que 3,28 % (em massa) da gasolina comercial brasileira é composta por tolueno (FERNANDES, 1997), que a densidade da gasolina é aproximadamente 0,75 (TOXNET, 2009), no derramamento de 1 L de gasolina, espera-se que haja uma produção teórica de aproximadamente 17,3 g de metano a partir do tolueno.

Supondo, agora, o cenário de derramamento de 1 L de diesel comercial brasileiro, cuja densidade é de 0,85 (PETROBRÁS, 2009) e a presença de tolueno é de 0,018g.g<sup>-1</sup> (KAIPPER, 2003), seriam produzidos a partir da biodegradação do tolueno cerca de 10,8 g de metano.

---

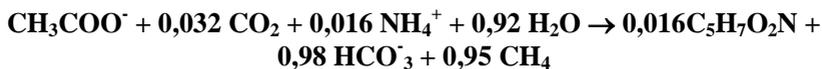
<sup>5</sup> No site o valor da densidade da gasolina é de 0,7-0,8. Adotou-se o valor médio de 0,75.

<sup>6</sup> No site o valor da densidade do óleo diesel é de 0,82-0,88. Adotou-se o valor médio de 0,85.

No caso dos microcosmos, considerando a quantidade inicial inserida nos reatores de 5 mg, espera-se que seja produzido teoricamente de 3,5 mg de metano a partir da biodegradação do tolueno.

#### **4. Acetato**

Reação estequiométrica de biodegradação com produção celular para o acetato:



Nota-se que para cada mol de acetato biodegradado (59 g) é formado 0,95 mol de metano (15,2 g). Como a concentração máxima de acetato obtida nos microcosmos foi de em torno de 17,4 mg.L<sup>-1</sup> (reator BBT), espera-se uma produção teórica de metano de 4,5 mg.L<sup>-1</sup>.

## **APÊNDICE C**

Resultados das análises cromatográficas realizadas nos reatores

## **Resultados das análises cromatográficas realizadas nos reatores**

<b>REATOR BT (benzeno + tolueno)</b>							
<b>Dia</b>	<b>Data</b>	<b>Benzeno (mg/L)</b>	<b>Tolueno (mg/L)</b>	<b>Metano (mg/L)</b>	<b>Acetato (mg/L)</b>	<b>Nitrato (mg/L)</b>	<b>Sulfato (mg/L)</b>
1	25/03/09	2,485	0,260	0,145	n.d.	0,077	2,276
2	26/03/09	2,850	0,653	0,138	0,405	0,012	2,387
6	30/03/09	0,016	n.d.	0,059	0,499	0,023	2,948
8	01/04/09	7,861	4,239	0,203	n.d.	n.d.	4,678
9	02/04/09	2,461	0,736	0,135	n.d.	n.d.	3,373
13	06/04/09	n.d.	0,835	0,059	0,714	n.d.	3,610
15	08/04/09	9,591	4,122	0,071	1,867	0,423	4,954
20	13/04/09	0,649	0,072	0,205	n.d.	0,245	6,742
23	16/04/09	n.a.	n.a.	0,090	n.d.	n.d.	5,458
29	22/04/09	0,230	0,122	0,217	1,274	0,021	7,918
34	27/04/09	6,822	4,210	n.d.	2,387	0,099	8,820
41	04/05/09	n.d.	n.d.	0,013	n.d.	0,092	9,012
48	11/05/09	36,779	17,471	0,230	0,204	0,171	9,315
55	18/05/09	0,585	0,257	0,133	n.d.	n.d.	9,401
62	25/05/09	19,539	15,009	0,156	0,246	0,103	9,401
70	02/06/09	0,765	0,479	0,107	n.d.	0,064	9,192
77	09/06/09	17,714	14,269	n.d.	n.d.	0,034	8,132
83	15/06/09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,050	9,967
90	22/06/09	17,040	11,411	0,089	n.d.	0,119	8,918
97	29/06/09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,104	7,100

Nota: n.a. = não analisado; n.d. = não detectado (abaixo do limite mínimo de detecção).

<b>REATOR BBT (biodiesel + benzeno + tolueno)</b>							
<b>Dia</b>	<b>Data</b>	<b>Benzeno (mg/L)</b>	<b>Tolueno (mg/L)</b>	<b>Metano (mg/L)</b>	<b>Acetato (mg/L)</b>	<b>Nitrato (mg/L)</b>	<b>Sulfato (mg/L)</b>
1	25/03/09	7,250	2,962	0,159	n.d.	0,0322	1,852
2	26/03/09	6,021	2,743	0,182	0,507	n.d.	1,847
6	30/03/09	6,613	3,060	0,292	0,522	0,027	1,291
8	01/04/09	6,919	3,261	0,424	0,157	0,561	1,773
9	02/04/09	6,225	2,946	0,414	n.d.	0,0603	0,858
13	06/04/09	9,501	3,907	0,592	0,692	0,1827	0,662
15	08/04/09	9,445	2,922	0,527	0,809	4,5216	0,375
20	13/04/09	7,828	2,896	0,490	n.d.	0,1652	0,005
23	16/04/09	n.a.	n.a.	0,785	1,025	2,579	0,154
29	22/04/09	4,253	2,046	2,323	15,213	n.d.	0,750
34	27/04/09	8,076	2,817	2,110	17,385	n.d.	0,223
41	04/05/09	6,780	3,131	3,117	11,710	n.d.	0,220
48	11/05/09	8,097	3,303	3,900	2,447	0,1158	0,664
55	18/05/09	3,945	2,309	4,924	0,028	0,1465	0,234
62	25/05/09	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
70	02/06/09	4,729	2,788	5,064	n.d.	n.d.	5,926
77	09/06/09	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
83	15/06/09	3,741	2,243	4,199	n.d.	0,236	5,486
90	22/06/09	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
97	29/06/09	3,761	2,181	3,283	n.d.	n.d.	2,540

Nota: n.a. = não analisado; n.d. = não detectado (abaixo do limite mínimo de detecção).

<b>REATOR BBT HG (biodiesel + benzeno + tolueno + cloreto de mercúrio)</b>							
<b>Dia</b>	<b>Data</b>	<b>Benzeno (mg/L)</b>	<b>Tolueno (mg/L)</b>	<b>Metano (mg/L)</b>	<b>Acetato (mg/L)</b>	<b>Nitrato (mg/L)</b>	<b>Sulfato (mg/L)</b>
1	25/03/09	6,251	3,695	0,132	n.d.	n.d.	1,778
2	26/03/09	6,247	3,627	0,132	0,663	n.d.	2,793
6	30/03/09	6,585	3,925	n.d.	0,984	0,629	1,938
8	01/04/09	6,043	3,596	n.d.	0,188	0,050	3,329
9	02/04/09	6,454	3,889	n.d.	0,905	0,153	2,313
13	06/04/09	10,051	4,924	n.d.	0,880	0,194	2,317
15	08/04/09	9,793	3,911	n.d.	0,880	0,282	2,600
20	13/04/09	9,458	4,526	n.d.	1,183	0,040	3,949
23	16/04/09	n.a.	n.a.	n.d.	0,579	n.d.	2,847
29	22/04/09	4,825	2,939	0,023	1,091	n.d.	4,731
34	27/04/09	8,300	3,682	n.d.	1,077	n.d.	4,462
41	04/05/09	6,256	3,668	n.d.	0,468	n.d.	4,607
48	11/05/09	8,780	4,427	n.d.	0,558	0,057	4,706
55	18/05/09	4,134	3,002	n.d.	1,296	0,038	4,228
62	25/05/09	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
70	02/06/09	4,379	3,126	n.d.	0,294	0,040	4,318
77	09/06/09	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
83	15/06/09	4,123	2,995	n.d.	1,279	0,066	4,318
90	22/06/09	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
97	29/06/09	3,360	2,343	n.d.	n.d.	n.d.	3,552

Nota: n.a. = não analisado; n.d. = não detectado (abaixo do limite mínimo de detecção).

## **APÊNDICE D**

Resultados das análises em PCR quantitativo nos reatores



Os valores de CT<sup>7</sup> obtidos para cada reator são apresentados a seguir. Para as bactérias nitrato-redutoras foram utilizados dois *primers* diferentes, por isso a designação NiK e NiS.

**Valores de CT (número de ciclos) para cada amostra analisada.**

Amostra	Bactérias totais	Nitrato-redutoras (NiK)	Nitrato-redutoras (NiS)	Sulfato-redutoras	Metanogênicas
<b>BT i</b>	22.27	33.72	33.58	30.38	45.05
<b>BBT i</b>	22.19	34.55	32.23	33.39	4.23*
<b>BBT HG i</b>	28.32	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>BT f</b>	22.63	38.79	33.97	27.96	n.d.
<b>BBT f</b>	20.8	34.23	30.94	27.85	n.d.
<b>BBT HG f</b>	28.37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Branco</b>	27.03	38.07	31.24	41.47	52.43

\*Baixo valor de CT porém a curva não ficou adequada.

Nota: n.a. = não analisado; n.d. = não detectado (abaixo do limite mínimo de detecção).

Com uso da curva de calibração e da fórmula utilizada por Da Silva & Alvarez (2004), foram confeccionadas as equações para determinação da quantidade de bactérias totais, nitrato-redutoras e sulfato-redutoras somente, já que não se obteve uma boa amplificação para as metanogênicas. As equações obtidas estão presentes abaixo. Para a quantificação das bactérias nitrato-redutoras, foram somados os valores de CT obtidos para as nitrato-redutoras NiK e NiS, obtendo, desta maneira, o valor total final.

**Equações utilizadas para a quantificação bacteriana.**

Bactérias Totais	$y = 10^{13} e^{(-0.7232x)}$
Nitrato-redutoras	$y = 10^{12} e^{(-0.5898x)}$
Sulfato-redutoras	$y = 10^{12} e^{(-0.6843x)}$

Nota: y = número de bactérias por µL; x = valor de CT.

<sup>7</sup> Número de ciclos necessários para obter amplificação significativa do DNA. Corresponde ao valor da abscissa quando a curva de amplificação intercepta a reta vermelha no gráfico de amplificação do DNA.

## **ANEXO**

Análise do biodiesel de soja realizada pelo Instituto de Tecnologia do  
Paraná

### 1. IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL: Biodiesel soja.

2. ACONDICIONAMENTO DO MATERIAL: Acondicionado em embalagem em vidro âmbar de 1 L.

### 3. RESULTADOS E MÉTODOS UTILIZADOS:

Ensaio	Métodos	Resultados	Especificação Resolução ANP n°7	Unidade
Corrosividade ao Cobre	NBR 14.359	1b	1 (máx.)	3h a 50°C
Estabilidade a Oxidação, 110°C	EN 14.112	7,0	6 (mín.)	h
Contaminação Total	EN 12.662	20	24 (máx.)	mg/kg
Índice de Acidez	NBR 14.448	0,40	0,50 (máx.)	mgKOH/g
Índice de Iodo	EN 14.111	130,0	Anotar	gI <sub>2</sub> /100g
Massa Específica a 20°C	NBR 7.148	870,6	850 - 900	kg/m <sup>3</sup>
Microrresíduo de Carbono	ASTM D 4.530	0,02	0,050 (máx.)	% massa
Ponto de Entupimento	NBR 14.747	-10 Obs. 1	19 (máx.)	°C
Ponto de Fulgor, corrigido	NBR 14.598	170,5 Obs. 2	100 (mín.)	°C
Teor de Cinzas Sulfatadas	NBR 6.294	0,007	0,020 (máx.)	% massa
Teor de água – Karl Fischer	NBR 11.348	459	500 (máx.)	mg/kg
Viscosidade Cinemática a 40°C	NBR 10.441	4,545	3,0 - 6,0	mm <sup>2</sup> /s (cSt)
Cálcio+Magnésio	EN 14.538	Menor que 1,0 Obs. 3	5 (máx.)	mg/kg
Sódio + Potássio	EN 14.538	Menor que 2,0 Obs. 3	5 (máx.)	mg/kg
Fósforo	EN 14.107	2,0	10 (máx.)	mg/kg
Teor de Etanol	EN 14.110	0,02	0,20 (máx.)	% massa
Teor de Éster	EN 14.103	97,1	96,5 (mín.)	% massa
Glicerina Livre	EN 14.105	0,00	0,02 (máx.)	% massa
Glicerina Total	EN 14.105	0,20	0,25 (máx.)	% massa
Monoglicerídeos	EN 14.105	1,80	Anotar	% massa
Diglicerídeos	EN 14.105	0,23	Anotar	% massa
Triglicerídeos	EN 14.105	0,03	Anotar	% massa

Atenção: os resultados expressam a média de duas determinações por ensaio.

### 4. PADRÕES UTILIZADOS:

Butanotriol CAS: 42890-76-6 Lote: LB51277 – Supelco  
Tricaprin CAS: 621-71-6 Lote: LB51416 – Supelco  
Heptadecanoic Acid, Methyl Ester CAS: 1731-92-6 Lote: 1345375 – Altech  
Etanol Absoluto P.A., Lote: K37200483 – Merck  
Cálcio 1000 mg/L, Lote: B6115053 – AccuStandard  
Fósforo 1000 mg/L, Lote: B4125065 – AccuStandard

Magnésio 1000 mg/L, Lote: B5065029 – AccuStandard  
Potássio 1000 mg/L, Lote: B6055079 – AccuStandard  
Sódio 1000 mg/L, Lote: B6125125 – AccuStandard

#### **5. OBSERVAÇÕES:**

- 1 – O limite máximo de 19°C é válido para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Bahia, devendo ser anotado para as demais regiões. O biodiesel poderá ser entregue com temperaturas superiores ao limite supramencionado, caso haja acordo entre as partes envolvidas.
- 2 – O resultado relatado, refere – se ao Procedimento A, da Norma citada acima para Ponto de Fulgor.
- 3 – Limite de detecção do equipamento – 1,0 e 2,0 mg/kg.