

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

María Pilar Serbent

**INFLUÊNCIA DO ETANOL E DO SULFATO NA
BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM
ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADAS COM MISTURAS
DE COMBUSTÍVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. Fernando Soares Pinto Sant'Anna
Co-orientador: Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil

Florianópolis

2012

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

Serbent, María Pilar

Influência do etanol e do sulfato na biodegradação de compostos aromáticos em águas subterrâneas contaminadas com misturas de combustíveis [dissertação] / María Pilar Serbent ; orientador, Fernando Soares Pinto Sant'Anna ; co-orientador, Henry Xavier Corseuil. - Florianópolis, SC, 2012.

192 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Águas subterrâneas contaminadas com combustíveis. 3. Combustível E10. 4. Técnicas de Biorremediação com adição de sulfato. 5. Atenuação Natural Monitorada. I. Sant'Anna, Fernando Soares Pinto . II. Corseuil, Henry Xavier . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

María Pilar Serbent

**INFLUÊNCIA DO ETANOL E DO SULFATO NA
BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM
ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADAS COM MISTURAS
DE COMBUSTÍVEIS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 28 de setembro de 2012.

Prof., Dr. Flávio Rubens Lapolli
Coordenador do Curso

Prof. Dr. Fernando Soares
Pinto Sant'Anna, Orientador

Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil,
Co-orientador

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Dr.^a María Angeles Lobo Recio,
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Aos meus pais,
Ana M. Páez e José R. Serbent

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais e meus irmãos, os quais me inculcaram a importância do esforço e do trabalho. Obrigada também por eles terem me ensinado a sonhar e a sorrir sempre, apesar das dificuldades, a ter sensibilidade social e respeito, a ser uma pessoa agradecida e comprometida. Amo vocês. À minha mãe Ana, a pessoa mais importante na minha vida. Obrigada por cuidar de mim, me apoiar sempre, por me estimular a seguir o meu caminho, mesmo que seja um pouco longe do lar. Sem ela nada seria possível para mim. *Gracias mami por todo...* Ao meu pai querido, *in memoriam*, considerando uma memória ativa, latente e presente, por ter sido um pai e uma pessoa maravilhosa da qual sinto muita falta todos os dias, mas continua sendo parte de mim a cada minuto da minha vida.

Ao Programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (PEC-PG-CNPq) pela bolsa de estudos e à Petrobrás-FEESC, pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado.

Aos meus orientadores Dr. Fernando Sant'Anna e Dr. Henry Corseuil, pela confiança depositada, pela orientação, pelo incentivo e apoio durante esta jornada, por manter a calma e me fazer manter a calma, coisa não muito fácil, em reiteradas ocasiões. Agradeço também pelos conselhos, sugestões, esclarecimentos e pelo carinho para trabalhar juntos na dissertação e no artigo. Por indicar o caminho durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pelo estímulo para trabalhar e pela boa disposição para responder as dúvidas. Agradeço também ao Dr. Henry pela concessão da bolsa para finalizar o mestrado e por me permitir fazer piadinhas de futebol!

Aos professores que aceitaram conformar a banca examinadora, Dr. Willian Gerson Matias, Dra. María Angeles Lobo Recio, Dr. Hugo Moreira Soares, Dra. Rejane Helena Ribeiro da Costa. Muito obrigada a todos pelas importantes contribuições em relação a este trabalho.

Quero agradecer também ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da UFSC, especialmente ao Prof. Daniel Da Silva, pelo ensino, pelo estímulo, pelo carinho, pelas suas palavras.

À toda a equipe do REMAS, especialmente a Ana Schneider, Marilda Fernandes, Cristina Nunes, Renata Pacheco, Lucas Coelho e Fabiana Serafim pela solicitude e disposição em contribuir para a minha formação, pelo ânimo e pelo carinho nas horas de trabalho. À Djema e Alice pela solicitude, apoio, amizade e por responder calmamente aos

meus pedidos de auxílio, até nos finais de semana! À Suhita, pelo carinho e pela disposição para ajudar sempre, inclusive à distância. À Ana, Cássio, Lorena, Márcia, Marilda, Naiara, Patrícia, Tiago e Rodolfo por suas revisões e sugestões.

Ao professor Zê Carlos (REMAS) e o professor Alexandre (MIP) assim como à Dra. Melissa Mezzari pelo incentivo e confiança.

Meus agradecimentos aos queridos amigos que conheci durante o mestrado, seguindo a ordem em que se “atravessaram”, felizmente, no meu caminho: Camile, Fran, Jorge, *Chico*, Naiara, Bárbara, Herminio, Cássio, Neto, Raphael, Tiago Lemos, Fernando, Márcia, Lorena, Débora, Juliana, Helen, Suhita, Ana, Deise, Jamile, Wanderli, Tiago Belli, Karina, Edivan, Marie, Tiago Vitor, Jossy, Lucila, Hugo, Guilherme, Raquel, Daniele e Alejandro. Escrevo cada nome e um sorriso constante me acompanha por me sentir tão grata de ter tido a oportunidade de conhecer tantas pessoas maravilhosas. Faltam-me as palavras para agradecer pela amizade, carinho, alegria, força, companhia e amor com que me trataram na correria do mestrado. Muito obrigada pelos inúmeros bons momentos vividos dentro, e fora, da Universidade Federal de Santa Catarina. Vocês fazem e farão parte de mim para sempre!

Às minhas amadas amigas Carla e Mariana, que me acolheram durante o meu primeiro ano aqui em Floripa, mas fazem parte de mim todos os dias da minha vida. Aos amigos Murilo, André, Lilian, Félix, Dani, Gina pelo carinho e amizade. Aos amigos Marcelo, Martin, Henrique, Belén e a galera argentina de intercâmbio (primeiro semestre de 2010) Romina, José, Diana, Jimena e Silvina. À Patrícia e a Carol, companheiras de casinha, pelo carinho no convívio.

Aos companheiros do Comitê Facilitador da Sociedade Civil Catarinense para a Rio+20 e a Cúpula dos Povos, por compartilharem sonhos, lutas, compromisso e por terem sido uma fonte de energia nestes últimos meses.

Agradeço de uma maneira especial ao Rodolfo, pelo carinho, pela companhia, pela compreensão, pelo ensino e por aguentar as minhas impicâncias, sem desistir.

E finalmente... “eu agradeço ao povo brasileiro, norte, centro, sul inteiro”... (no ritmo do Caetano com sua voz maravilhosa) por ser parte de mim, desde criança, quando sonhava com as paisagens e personagens que o Monteiro Lobato descrevia e chegaram até mim na versão em espanhol “Los cuentos de Naricita”, uma tradução da coleção do “Sítio do Pica-pau Amarelo” que a minha querida avó Anita tinha na sua biblioteca.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A contaminação do solo e da água subterrânea com compostos derivados de petróleo vem-se intensificando como resultado da extração, refino, distribuição e armazenamento desses produtos. Entre os compostos encontrados na gasolina destacam-se os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) que, por serem altamente tóxicos, representam perigo potencial ao ambiente em caso de derramamento. A biorremediação é um processo que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias perigosas, constituindo uma alternativa para a remediação de derramamentos de óleos e tratamento de ambientes contaminados. Este trabalho teve por finalidade avaliar a influência do etanol e de sulfato na biodegradação de gasolina E10 (mistura de gasolina com 10% de etanol em volume) a partir de experimentos de campo. Para atender esses objetivos, após um derramamento controlado do combustível E10, foi feita uma injeção de sulfato, seguida por monitoramento contínuo da migração e da degradação dos compostos presentes na mistura estudada, a partir de análises hidrogeoquímicas. Foram utilizadas também ferramentas de biologia molecular para verificar as características da degradação, a partir da identificação dos microrganismos presentes. O comportamento do etanol, os hidrocarbonetos monoaromáticos, os receptores de elétrons, os subprodutos metabólicos e os dados de cinética de degradação do experimento de Bioestimulação com Injeção de Sulfato de E10 (BIS-E10) foram comparados com resultados provenientes de um experimento de Atenuação Natural Monitorada (ANM) com combustível E24 (ANM-E24). As taxas de atenuação do benzeno, tolueno e BTEX totais foram superiores em condições de menor proporção de etanol na mistura (E10) e presença de sulfato, quando comparadas com as correspondentes para o experimento de ANM, com E24 e sem adição de sulfato. A presença de subprodutos metabólicos (nitrito, ferro (II) e sulfeto) e de bactérias nitrito-redutoras (nirS), bactérias do gênero *Geobacter* e bactérias da classe Delta-proteobactérias na água subterrânea, suportam a ocorrência da degradação anaeróbia do combustível E10 por processos de nitrato-redução, ferro(III)-redução, sulfato-redução, concomitantemente, mediante a utilização dos receptores de elétrons correspondentes. Por outro lado, a ausência de metano e de Arqueas metanogênicas demonstraram que o processo metanogênico não atuou na degradação do etanol e dos compostos BTEX na área de BIS-E10, sendo este o

processo predominante na degradação do etanol e dos compostos BTEX no experimento de ANM.

Palavras-Chave: Contaminação de águas subterrâneas, Biocombustível E10, Bioestimulação, Sulfato, Atenuação Natural Monitorada.

ABSTRACT

Contamination of soils and groundwater with compounds derived from petroleum has been increasing, as a result of extraction, refining, distribution and storage of these products. Among the compounds found in gasoline BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene) stand out by for its toxicity which represents potential danger to the environment in case of spill. Bioremediation is a process that uses naturally occurring microorganisms to degrade substances, representing an alternative for cleaning oil spills and treating contaminated environments. The current work aimed to evaluate the influence of ethanol and sulfate in gasoline E10 (blend of 10% ethanol in volume) biodegradation from field experiment. In order to meet these goals, after a controlled release of the E10 fuel, an anaerobic biostimulation with sulfate injection (BSI) was done followed by continuous monitoring of migration and degradation of the compounds in the mixture studied through hydrogeochemical analyzes. Molecular biology tools were used to identify microorganisms which are associated with redox degradation process. The behavior of ethanol, monoaromatic hydrocarbons, electron acceptors and metabolic by-products, and the data of degradation kinetics of E10 experiment (BSI-E10) were compared with those obtained from a Monitored Natural Attenuation experiment with E24 fuel (MNA-E24). The kinetics of benzene, toluene and total BTEX degradation was faster in the case of BSI-E10 experiment, when compared with the MNA-E24 experiment, with more content of ethanol in the blend and without sulfate addition. The presence of metabolic by-products (nitrite, iron (II) and sulfide) and specific bacterial communities (nitrite reductase (*nirS*), *Geobacter* and Deltaproteobacteria) in groundwater, support the concomitance of anaerobic degradation of E10 fuel by nitrate-, iron- and sulfate-reducing processes, using the corresponding electron acceptor. Moreover, the absence of methane and methanogenics archea demonstrated that methanogenic did not act in the ethanol and BTEX degradation in the BSI experiment, meanwhile, this process, was predominant for the ethanol and BTEX degradation of in the MNA experiment.

Keywords: Groundwater contamination, E10 fuel, Biostimulation, Sulfate, Monitored Natural Attenuation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura química dos compostos BTEX.	40
Figura 2.2 – Esquema do zoneamento subterrâneo em relação à saturação de água.....	46
Figura 2.3 – Evolução geoquímica da água subterrânea.	54
Figura 2.4 – Correlação entre o POR e a energia liberada para diferentes receptores de elétrons.....	55
Figura 2.5 – Especificação química do sulfeto na água doce em função do pH.	58
Figura 2.6 – Representação esquemática das etapas envolvidas na reação de PCR com o corante SYBR Green I.....	68
Figura 2.7 – Representação esquemática das etapas envolvidas na reação de PCR com o corante TaqMan.....	69
Figura 3.1 – Localização da Área de estudo.....	72
Figura 3.2 – Configuração experimental da área E10.	75
Figura 3.3 – (A) Ilustração dos níveis, suporte e filtros para cada poço de monitoramento (PM), (B) Sistema de identificação das mangueiras segundo o nível de profundidade.....	76
Figura 3.4 – Localização dos piezômetros utilizados na determinação do nível do lençol freático da área E10.....	77
Figura 3.5 – Monitoramento do nível do lençol e dados de precipitação na área experimental E10.	78
Figura 3.6 – Área da Fonte de contaminação. (A) abertura de 1.5 m², (B) solução com a mistura de brometo de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio, (C e D) liberação do combustível E10..	80
Figura 3.7 – Esquema do sistema de injeção do experimento E10..	81

Figura 3.8 – Fluxograma da metodologia implementada para as determinações analíticas a partir da coleta	84
Figura 3.9 – Sistema de filtração a vácuo	89
Figura 3.10 – Kit de extração de DNA	90
Figura 3.11 – Resumo das atividades próprias da extração de DNA a partir da filtração das amostras de água subterrânea, de acordo com o protocolo de extração DNA MOBIO Power Soil TM kit (Carlsband, CA).	92
Figura 3.12 – Esquema da Placa utilizada para a reação de PCR (A), colocação das amostras (B).	96
Figura 3.13 – Sistema integrado para PCR em Tempo Real.	96
Figura 3.14 – Programação de temperatura para as análises de PCR utilizando TaqMan.....	97
Figura 3.15 – Programação de temperatura para as análises de PCR utilizando SYBR Green I.....	97
Figura 4.1 – Variação das concentrações de brometo na área de BIS-E10, em diferentes níveis de profundidade, ao longo do tempo.	105
Figura 4.2 – Variação das concentrações de etanol na área de BIS-E10, em diferentes níveis de profundidade, ao longo do tempo.	107
Figura 4.3 – Variação das concentrações de BTEX totais na área de BIS-E10, em diferentes níveis de profundidade, ao longo do tempo.	108
Figura 4.4 – Variação das concentrações de oxigênio dissolvido na área de BIS-E10, em diferentes níveis de profundidade, ao longo do tempo.....	110

Figura 4.5 – Variação da concentração de etanol ao longo do tempo no PM8, nível de profundidade 5 metros para o experimento de BIS-E10 (A) e no PM4 nível de profundidade 2 metros para o experimento de ANM-E24 (B).....	112
Figura 4.6 – Concentração dos compostos BTEX ao longo do tempo no PM8, nível de profundidade 5 metros para o experimento de BIS-E10 (A) e no PM4 nível de profundidade 2 metros para o experimento de ANM-E24 (B).....	113
Figura 4.7 – Variação temporal da concentração de receptores de elétrons dissolvidos na água subterrânea. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).	122
Figura 4.8 – Variação temporal da concentração de acetato. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).	124
Figura 4.9 – Variação temporal da concentração de nitrito. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).	126
Figura 4.10 – Variação temporal da concentração de Ferro (II). A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).	127
Figura 4.11 – Variação temporal da concentração de sulfeto. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B)	

Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).	129
Figura 4.12 – Variação temporal da concentração de metano. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).	130
Figura 4.13 – Variação temporal das concentrações de microrganismos presentes nas amostras de água subterrânea.	132
Figura 4.14 – Variação temporal do potencial redox (POR). A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Valores máximos de concentração de BTEX permitidos de acordo com os padrões de potabilidade de água para consumo humano.....	41
Tabela 2.2 – Propriedades físico-químicas do etanol e dos compostos BTEX.....	44
Tabela 3.1 – Nível da água subterrânea ao redor da área de estudo.	76
Tabela 3.2 – Campanhas de amostragem: datas e poços amostrados por coleta.....	82
Tabela 3.3 – Programação para as análises de compostos orgânicos	87
Tabela 3.4 – Valores operacionais usados como Limites de Detecção para as análises físico-químicas.....	88
Tabela 3.5 – Tipos e sequências de oligonucleotídeos dos iniciadores utilizados nas análises microbiológicas.....	94
Tabela 3.6 – Quantidades dos reagentes para o Mix da PCR	95
Tabela 3.7 – Critérios utilizados na quantificação do DNA presente nas amostras de água subterrânea para os distintos microrganismos analisados.....	99
Tabela 4.1 – Comparação dos valores das constantes de atenuação de primeira ordem do benzeno e do tolueno calculadas a partir de dados de experimentos de campo.....	118
Tabela 4.2 – Análise qualitativa do gene <i>bssA</i> e relação com as concentrações dos contaminantes analisados.....	136

LISTA DE REAÇÕES

Reação 1	56
Reação 2	56
Reação 3	56
Reação 4	57
Reação 5	57
Reação 6	57
Reação 7	59
Reação 8	59
Reação 9	59
Reação 10	60
Reação 11	61
Reação 12	61
Reação 13	61
Reação 14	61
Reação 15	61

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	45
Equação 2.....	62
Equação 3.....	63
Equação 4.....	98
Equação 5.....	100
Equação 6.....	100
Equação 7.....	102

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
ANA	Atenuação Natural Acelerada
ANM	Atenuação Natural Monitorada
ANP	Agência Nacional de Petróleo
ASRS	<i>Anion Self-Regenerating Suppressor</i> , Supressora de ânions
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CT	<i>Cycle Threshold</i> , ciclo umbral
E10	Mistura de gasolina com 10% de etanol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos de América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FPT	<i>Federal-Provincial-Territorial Canadian Committee on Drinking Water</i> , Comitê Canadense sobre Água Potável
LD	Limite de detecção
NAPL	<i>Light nonaqueous phase liquids</i> , líquido leve de fase não aquosa
N.A	Não analisado
N.D	Não detectado
NHRHC	<i>National Health and Medical Research Council</i> , Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica de Austrália
NRC	<i>National Resource Council</i> , Conselho Nacional de Pesquisa de Canadá
OD	Oxigênio dissolvido
PCR	Reação em cadeia da Polimerase

PEBD	Polietileno de baixa densidade
PETROBRÁS	Petróleo brasileiro S/A
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Poços de injeção
PM	Poços de monitoramento
PZ	Piezômetro
POR	Potencial redox
PVC	Cloreto de polivinila
REMAS	Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas
SC	Santa Catarina
SRM	<i>Sulfate-reducing microorganisms</i> , Microorganismos Redutores de Sulfato
SST	Sólidos suspensos totais
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i> , Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> , Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

K_{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
K_{oc}	Coeficiente de partição do composto entre o carbono orgânico do solo e a água
p_{iL}	Pressão de vapor
K_H	Constante de Henry
ρ_i	Densidade
K	Condutividade Hidráulica
HP	<i>Horsepower</i> , cavalos força
RPM	Revoluções por minuto
M	Concentração molar
bp	pares de bases
k	Taxa de atenuação
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	33
1 INTRODUÇÃO.....	33
1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	33
1.2 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	34
1.3 OBJETIVOS.....	38
CAPÍTULO II.....	39
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	39
2.1 BIOCOMBUSTIVEL E10: COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS.....	39
2.1.1. Gasolina.....	40
2.1.2. Etanol.....	42
2.1.3. Propriedades Físico-químicas do etanol e dos BTEX.....	42
2.2 CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS POR DERRAMAMENTO DE COMBUSTÍVEIS.....	45
2.2.1. Importância das águas subterrâneas.....	45
2.2.2. Distribuição dos contaminantes em subsuperfície.....	47
2.3 BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS: INFLUÊNCIA DO ETANOL NA BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BTEX.....	48
2.3.1. Biodegradação anaeróbia.....	49
2.3.2. Fatores de influência na Biodegradação.....	49
2.3.3. Termodinâmica dos receptores de elétrons.....	53
2.4 INDICADORES GEOQUÍMICOS DA BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	62
2.4.1. Subprodutos metabólicos.....	62
2.4.2. Cinética da biodegradação.....	62

2.5	TECNOLOGIAS DE BIOREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADAS POR COMBUSTÍVEIS ..	63
2.5.1.	Biorremediação	64
2.5.2.	Técnicas de Monitoramento da Biorremediação <i>in situ</i> ...	65
2.5.3.	Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	67
CAPÍTULO III.....		71
3	METODOLOGIA.....	71
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	71
3.1.1.	Caracterização Hidrogeológica	72
3.1.2.	Caracterização Hidrogeoquímica	73
3.2	CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL	74
3.2.1.	Instalação dos Poços de Monitoramento e Injeção	74
3.2.2.	Liberação Controlada do Combustível E10 na Área Experimental.....	79
3.2.3.	Sistema de injeção de sulfato	80
3.3	MONITORAMENTO	82
3.3.1.	Campanhas de amostragem.....	82
3.3.2.	Coleta de Amostras de Águas Subterrâneas, Equipamento de Amostragem e Monitoramento	82
3.4	ANÁLISES DE CAMPO	85
3.5	ANÁLISES DE LABORATÓRIO	85
3.5.1.	Análises Físico-Químicas.....	85
3.5.2.	Análises Moleculares	88
3.6	DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS COMPOSTOS.....	101
3.7	CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DOS BTEX	101
CAPÍTULO IV.....		103
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	103

4.1	DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO ETANOL, BTEX TOTAIS, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E BROMETO	103
4.2	INFLUÊNCIA DO ETANOL NA BIODEGRADAÇÃO DOS BTEX	111
4.3	CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DOS BTEX.....	116
4.4	INFLUÊNCIA DO SULFATO NA BIODEGRADAÇÃO DOS CONTAMINANTES PRESENTES NO E10.....	120
4.4.1.	Disponibilidade dos receptores de elétrons	121
4.4.2.	Subprodutos metabólicos da biodegradação dos contaminantes.....	123
4.4.3.	Comunidades microbianas associadas à biodegradação dos contaminantes.....	131
4.4.4.	Determinação qualitativa do gene <i>bssA</i>	135
4.4.5.	Outros fatores de influencia na biodegradação de contaminantes orgânicos	137
	CAPÍTULO V.....	141
5	CONCLUSÕES.....	141
	RECOMENDAÇÕES	143
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
	ANEXOS	169
	APÊNDICES.....	181

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O texto da dissertação está dividido em cinco capítulos; o primeiro capítulo contextualiza esta pesquisa abordando aspectos gerais sobre a utilização de biocombustíveis e as problemáticas ambientais associadas com a contaminação de ambientes subsuperficiais, que justificam a realização deste tipo de trabalho. Apresentam-se também os objetivos a serem atingidos e a estrutura de organização da dissertação nos capítulos subsequentes.

O capítulo 2 refere-se aos assuntos relevantes do tema proposto; descrevem-se algumas características do biocombustível utilizado, com ênfase na questão da contaminação das águas subterrâneas, e apresentam-se alguns conceitos fundamentais para a compreensão de processos de biodegradação, suas implicações e abordagens de estudo. Além disso, são apontados diversos trabalhos desenvolvidos em relação aos temas mencionados, a modo de revisão do estado da arte.

O capítulo 3, correspondente a materiais e métodos. Caracteriza primeiramente a área onde foi desenvolvido o experimento e logo a metodologia adotada na análise das variáveis indicadoras de biodegradação. Nesta seção descreve-se também o tratamento dos dados obtidos. No capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados em função dos objetivos do trabalho. As conclusões gerais que sintetizam as principais considerações referentes ao desenvolvimento da pesquisa e as recomendações para futuros trabalhos são apresentadas no capítulo 5. Finalmente, são apresentadas as referências que contribuíram para a realização deste trabalho, e na seção referente a anexos e apêndices têm-se algumas informações importantes para uma melhor compreensão deste documento. Nos anexos A e B são mostrados os cálculos relativos à quantidade de reagentes (sulfato de sódio e hidróxido de sódio) utilizados no experimento. No anexo C é apresentada uma caracterização da área antes da liberação do E10, no anexo D são apresentados os valores de solubilidade efetiva, segundo a Lei de Raoult e no anexo E é mostrada uma representação em planta de uma área experimental cujos dados foram comparados com os obtidos na área onde foi desenvolvido este trabalho. No apêndice A é apresentado um gráfico com os dados de precipitação após a liberação do

biocombustível E10 e nos apêndices B, C e D são mostrados os valores de concentração dos compostos analisados, para cada um dos experimentos comparados. No apêndice E são discriminados os resultados das análises moleculares, e, finalmente, no apêndice F é mostrado um mapa conceitual elaborado para a abordagem deste trabalho de pesquisa.

1.2 CONTEXTUALIZAÇÃO

Na atualidade, a questão dos recursos energéticos é um tema de preocupação universal. A escassez dos recursos fósseis, associada ao incessante crescimento da demanda e aos diversos fenômenos climáticos ocasionados em virtude do excesso de gases poluentes do ar, principalmente o dióxido de carbono, têm impulsionado, no mundo inteiro, o desenvolvimento de políticas que favoreçam fontes energéticas alternativas.

Frente a este panorama, a utilização de biocombustíveis torna-se uma alternativa promissora, sendo incluídos nesta categoria os derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis de petróleo e gás natural em motores à combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os principais biocombustíveis disponíveis são o etanol, o biogás, o bioéter e o biodiesel. O etanol como aditivo em combustíveis fósseis é amplamente utilizado em diferentes teores de mistura, desde 5 até 85% (v/v). As misturas de etanol de baixo nível, com teores de até 10%, são classificadas como "substancialmente similares" à gasolina, podendo, assim, serem empregadas nos motores sem qualquer modificação (USEPA, 1991; BNDES-CGEE, 2008). Dentre os vários países que usam etanol em sua gasolina, Alemanha (BMU, 2011), China (FAO, 2006), Colômbia (REY, 2006), EUA (EIA, 2007), Jamaica e Tailândia (FAO, 2006) possuem uso obrigatório de E10 (gasolina com 10% de etanol em volume) em todo o território, ou em alguns estados; enquanto que na Austrália o uso é opcional (DHS, 2010). Em Malawi, a utilização de E10 está sujeita à disponibilidade de etanol no mercado (DONALD, 2011). Na União Europeia existe uma proposta sobre a obrigatoriedade do uso de 10% de biocombustíveis até 2020 (BNDES- CGEE, 2008).

No Brasil, o desenvolvimento na utilização do etanol como combustível foi estabelecido em 1975, com o início do Programa Brasileiro de Etanol, o Pró-Álcool, a partir do qual o governo aprovou a mistura de etanol na gasolina entre 1,1% e 25% em cada litro de

combustível. O objetivo deste programa foi reduzir os custos da importação de 550 milhões de barris de petróleo, equivalentes a US\$ 11,5 bilhões, além de evitar a emissão de 110 milhões de toneladas de gás carbônico na atmosfera (MASIERO; LOPES, 2008). A gasolina comercial brasileira possui uma mistura de etanol entre 20 a 25% (v/v), dependendo da disponibilidade de álcool no mercado, estando hoje vigente a Portaria MAPA nº678, de 31 de agosto de 2011, que fixa em 20% o percentual obrigatório de adição de álcool etílico anidro combustível à gasolina (BRASIL, 2011a). O Brasil é considerado um pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, sendo atualmente o etanol, produzido a partir da cana-de-açúcar, e o biodiesel, os principais biocombustíveis utilizados no país (ANP, 2010).

A contaminação de recursos naturais associada ao uso de combustíveis fósseis é outro aspecto importante a ser apreciado quando são discutidas as problemáticas ambientais relacionadas a estas fontes de energia. Dentre as diversas formas de contaminação que comprometem o solo e a água, aquela envolvendo produtos derivados de combustíveis fósseis vem se intensificando como resultado da maior extração, refino, distribuição e armazenamento de petróleo e seus derivados. Esta problemática torna-se ainda mais preocupante já que a contaminação por combustíveis pode alcançar águas subterrâneas, levando o problema a ecossistemas mais remotos.

Nas últimas décadas, as águas subterrâneas passaram a exercer um importante papel como fonte de abastecimento, constituindo uma grande reserva estratégica de água doce do planeta. Sua abundância, qualidade, baixo custo de exploração e facilidade de captação fazem deste recurso uma emergente alternativa ao aumento dos custos relacionados ao uso de águas superficiais cada vez mais poluídas. Estima-se, atualmente, que dois bilhões de pessoas no mundo utilizam água subterrânea (IUGS, 2007). Segundo os dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico de 2008, no Brasil há um expressivo aproveitamento de mananciais subterrâneos através de poços artesianos, verificando-se esta utilização em 3545 (63,7%) municípios (IBGE, 2008). Isto mostra um aumento com respeito ao mencionado no Censo de 2000 (IBGE, 2003), no qual se informava que aproximadamente 61% da população brasileira era abastecida com água subterrânea, sendo que 6% se auto abastecia com águas de poços rasos, 12% de nascentes ou fontes e 43% de poços profundos. Outra vantagem deste recurso relaciona-se com as possibilidades de exploração tanto em áreas rurais como urbanas (SILVA *et al.*, 2002).

As fontes e causas da contaminação das águas subterrâneas são numerosas e tão diversas como as atividades humanas (UNESCO, 2002). Dentre estas, destacam-se as atividades agrícolas, tanques e/ou fossas sépticas, aterros sanitários, depósitos subterrâneos de produtos químicos e lançamento de dejetos industriais nos corpos d'água (BEDIENT; RIFAI; NEWELL, 1994; UNESCO, 2002). Outra fonte de risco para este recurso é representado pelo número crescente de acidentes com vazamentos de combustíveis, o que vem despertando a atenção da comunidade científica, na busca por soluções eficazes (BEDIENT; RIFAI; NEWELL, 1994; CORSEUIL; MARINS, 1997; HOLLIGER *et al.*, 1997; AZAMBUJA; CANCELIER; NANNI, 2000; CORSEUIL; KAIPPER; FERNANDES, 2004; MARIANO, 2006; CASTELLO; MOREIRA; BRAGA, 2011).

Dentre os muitos compostos nocivos ao meio ambiente, os hidrocarbonetos monoaromáticos presentes em concentrações significativas na gasolina, conhecidos coletivamente como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), destacam-se por apresentar elevadas mobilidade e toxicidade (capacidade inerente de um agente causar efeitos adversos em um organismo vivo) quando comparados a outros hidrocarbonetos de petróleo (TISSOT; WELTE, 1984 *apud* NAKAGAWA; SATO; FUKUI, 2008; DEAN, 1985 *apud* REINHARD *et al.*, 1997; DOU *et al.*, 2008). Os BTEX são considerados compostos perigosos que, em contato com os seres humanos podem atacar o sistema nervoso central, fígado, rins e pulmões e causar doenças como câncer e leucemia (KULKAMP, 2003). Por serem altamente tóxicos, estes compostos, quando detectados, devem ser removidos do ambiente para mitigar seus impactos, o que às vezes constitui um grande desafio tecnológico.

Devido à ampla utilização global das águas subterrâneas, a proteção deste recurso adquire um valor de vital importância. Embora se considere que as mesmas sejam menos vulneráveis à contaminação do que as superficiais, já que existe uma camada de solo que as protege, as ações de remediação podem ser mais dispendiosas ou inclusive não haver tecnologia adequada para tal, por ser um dos meios mais difíceis de remediar (US EPA, 1999; LOVLEY, 2001, UNESCO, 2002).

Dentre as estratégias de descontaminação existentes, as técnicas *in situ* destacam-se por causarem menos alterações ao meio ambiente, serem mais econômicas e por apresentarem facilidades em suas aplicações. Nas últimas décadas tem aumentado o interesse em metodologias biológicas, coletivamente denominadas como

biorremediação intrínseca ou atenuação natural monitorada, que poderiam auxiliar a reduzir o risco de poluentes orgânicos no solo e efetivamente restaurar sítios contaminados (ANDREONI; GIANFREDA, 2007). Estas metodologias baseiam-se na ocorrência natural dos microrganismos os quais podem utilizar substâncias tóxicas como fonte de energia ou alimento, e, assim, degradá-las num processo conhecido como biodegradação.

Embora o uso de biocombustíveis apresente benefícios, a adição de etanol à gasolina pode trazer complicações maiores num cenário de contaminação em ambientes subterrâneos. O crescente uso da gasolina misturada com etanol associado à potencial liberação deste produto no subsolo, tem estimulado o interesse nos processos de biodegradação e as interações entre o etanol e os BTEX em plumas de contaminação tanto em solos como em águas subterrâneas (CORSEUIL *et al.*, 1998; HEERMANN; POWERS, 1998; ALVAREZ, 2002; SILVA; ALVAREZ, 2004; SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005; CHEN; BARKER; GUI, 2008; MONTEIRO RAMOS, 2010).

Por ser o etanol um cossolvente, a sua presença aumenta significativamente a solubilidade aquosa dos hidrocarbonetos de petróleo. Desta maneira, pode incrementar o impacto destes compostos tóxicos ao influenciar a degradação, migração e destino dos mesmos na água subterrânea (HEERMANN; POWERS, 1998; CORSEUIL; KAIPPER; FERNANDES, 2004). Pode-se esperar, assim, que a contaminação de aquíferos por uma mistura de álcool e gasolina seja mais complexa que a produzida somente pela gasolina pura.

Apesar de existirem pesquisas sobre o efeito do etanol na degradação dos BTEX, ainda permanecem muitas questões relacionadas à sua influência na degradação dos hidrocarbonetos sob diferentes proporções do álcool na mistura e condições de receptores de elétrons e nutrientes. Considerando que o incentivo à produção e à incorporação do etanol como combustível tem-se tornado uma política mundial, as pesquisas relacionadas à compreensão dos processos de degradação de misturas de combustíveis e a avaliação de técnicas que estimulem a biodegradação destas misturas adquirem grande relevância.

O presente projeto foi desenvolvido no Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas (REMAS), da Universidade Federal de Santa Catarina que, em parceria com a Petrobras, tem uma trajetória de mais de 15 anos de estudos na Linha de Pesquisa de biodegradação de combustíveis nas águas subterrâneas.

1.3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a influência do etanol e do sulfato na biodegradação de compostos aromáticos em águas subterrâneas contaminadas com misturas de gasolina e etanol.

Os objetivos específicos são os seguintes:

- Avaliar a degradação dos compostos BTEX frente a distintas proporções de etanol na mistura;
- Avaliar a degradação dos compostos BTEX da gasolina em presença/ausência de sulfato;
- Identificar as populações de microrganismos responsáveis pela degradação anaeróbia *in situ* dos contaminantes do combustível E10 mediante a utilização da técnica de RT-PCR (Reação em Cadeia da enzima Polimerase em Tempo Real).

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente trabalho contou com uma metodologia de revisão bibliográfica em função dos resultados de um estudo de relevância, realizado a partir de palavras-chave (SILVA, 2010). A aplicação desta metodologia visou à contextualização e fundamentação científica do tema proposto, mediante a identificação dos principais autores, conceitos, metodologias e resultados já obtidos. Para isto, foi realizado um levantamento bibliográfico inicial a partir da consulta de bases de dados nacionais e internacionais, previamente selecionadas, e da leitura dos artigos escolhidos.

2.1 BIOCOMBUSTÍVEL E10: COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS

Embora o conceito de biocombustíveis tenha sido vislumbrado há muito tempo, foi a partir da década de 60 do século passado que foi retomada a idéia de utilizar derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural na geração de energia. Dentre os eventos que marcaram estas iniciativas destaca-se a promulgação do *Clean Air Act* nos Estados Unidos, que permitiu uma ordenação jurídica para regular as emissões contaminantes (US EPA, 2012a). Na atualidade, os principais biocombustíveis disponíveis no mercado são o etanol (produzido a partir de cana-de-açúcar ou milho), o biogás (produzido a partir da biomassa), o bioéter (produzido a partir de biomassa), e o biodiesel (produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais). O etanol de cana-de-açúcar, usado puro ou adicionado à gasolina, é considerado um biocombustível avançado, capaz de reduzir as emissões de gases do efeito estufa em pelo menos 50%, quando comparado com a gasolina, segundo a agência de proteção ambiental norte-americana - *Environmental Protection Agency*, US EPA (2010).

O E10 é um biocombustível constituído por gasolina e etanol (anidro)¹, em uma proporção de 90% e 10% em volume,

¹Álcool anidro: álcool com no mínimo 99,5 % de pureza que é usado como aditivo na gasolina (US EPA, 2009a).

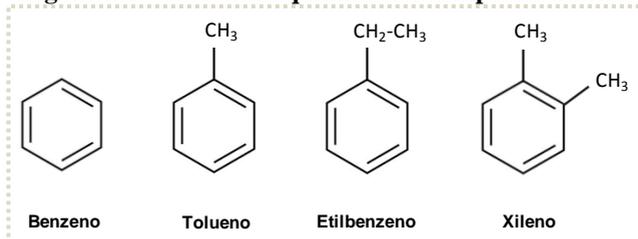
respectivamente. Nos itens a seguir, são descritas as principais características da gasolina e do etanol, as quais permitem entender o comportamento dos compostos e assim avaliar o destino e transporte dos mesmos no meio ambiente.

2.1.1. Gasolina

A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos inflamáveis e voláteis, derivados do petróleo, com 3 a 12 carbonos. Em sua composição, os componentes majoritários são parafinas com cadeias ramificadas e cicloparafinas (alcanos e cicloalcanos), hidrocarbonetos aromáticos e olefinas (alcenos) (SAX; LEWIS, 1987). Não existe uma fórmula química específica que a defina, sendo a sua composição extremamente variável, dependendo da origem e do tipo de petróleo que a gerou, dos processos utilizados no refino e da existência ou não de aditivos que são adicionados para melhorar a octanagem da mistura.

Dentre os componentes da gasolina, os hidrocarbonetos monoaromáticos, conhecidos coletivamente como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), destacam-se por sua concentração na gasolina, a sua solubilidade aquosa, e sua estimada toxicidade ou carcinogenicidade (BARKER; PATRICK, 1985 *apud* RISER-ROBERTS, 1992). A estrutura química de um composto determina suas propriedades físico-químicas e, desta maneira, seu comportamento e distribuição no ambiente. Os anéis benzênicos presentes na estrutura dos hidrocarbonetos aromáticos (Figura 2.1) lhes confere estabilidade química, dificultando a sua degradação pelos microrganismos.

Figura 2.1 – Estrutura química dos compostos BTEX.



No Brasil, a Resolução CONAMA Nº 420/2009 dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade de solos quanto à presença

de substâncias químicas, visando tanto à manutenção de sua funcionalidade e a proteção da qualidade das águas superficiais e subterrâneas como as ações a serem tomadas. Os valores propostos para a água subterrânea, com base em risco à saúde humana, no caso do tolueno ($700\mu\text{g.L}^{-1}$), xileno ($500\mu\text{g.L}^{-1}$) e etilbenzeno ($300\mu\text{g.L}^{-1}$) (BRASIL, 2009), diferem dos valores máximos permitidos para consumo humano definidos nos Anexos VII e X da Portaria nº 2.914/2011. As concentrações máximas permitidas, de acordo com os padrões de potabilidade previstos na mencionada Portaria nº 2.914/11, no caso do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos são $5\mu\text{g.L}^{-1}$, $170\mu\text{g.L}^{-1}$, $200\mu\text{g.L}^{-1}$ e $300\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (BRASIL, 2011b). Diversos países têm adotado, ou adaptado, os parâmetros e respectivos valores guias propostos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e a Organização Mundial da Saúde na definição de suas próprias diretrizes para a qualidade da água potável (PRODUCTIVITY COMMISSION, 2000; DSF, 2006). Na Tabela 2.1 apresenta-se uma comparação entre os padrões de potabilidade do Brasil e de alguns países que utilizam o combustível E10, mostrando as concentrações máximas permitidas para os compostos BTEX.

Tabela 2.1 – Valores máximos de concentração de BTEX permitidos de acordo com os padrões de potabilidade de água para consumo humano.

	Benzeno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Tolueno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Etilbenzeno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Xilenos ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência
Brasil	5	170	200	300	BRASIL (2011b)
Austrália	1	800	300	600	NHMRC (2011)
Canadá	5	24	2,4	300	FPT (2010)
EUA	5	1000	700	10000	US EPA (2009b)
ONU	10	700	300	500	WHO (2006)
UE	1	-	-	-	Council. Dir. (1998)

Em virtude da dificuldade de se caracterizar um vazamento envolvendo petróleo e os seus derivados, uma vez que não é possível um teste individual para cada um dos seus componentes, os BTEX são utilizados como parâmetros quantitativos de uma contaminação (DEQ, 1992; MARGESIN; WALDER; SCHINNER, 2003).

2.1.2. Etanol

O etanol é um álcool derivado de biomassa vegetal que pode ser utilizado puro ou como aditivo em combustíveis fósseis, em diferentes teores de mistura (US EPA, 1991). Por ser um produto de fontes renováveis, o consumo do etanol com esses fins vem aumentando no mundo inteiro (USEPA, 2010). O etanol, ou álcool etílico, caracteriza-se por ser um composto orgânico de cadeia curta, infinita solubilidade aquosa e deriva principalmente da fermentação da cana-de-açúcar ou do milho. Com respeito ao etanol, não existem especificações na legislação sobre as concentrações máximas permitidas para águas e solos (US EPA, 1977), sendo considerado uma ótima alternativa como combustível e oxigenante da gasolina (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007).

2.1.3. Propriedades Físico-químicas do etanol e dos BTEX

As propriedades físico-químicas definem o transporte e destino dos compostos orgânicos no ambiente, assim como também as taxas de remoção por degradação química e biológica. Em situações de contaminação de ambientes subsuperficiais por combustíveis é fundamental ter conhecimento sobre o comportamento destes contaminantes. Para isto, torna-se importante considerar as propriedades que influenciam a mobilidade dos compostos orgânicos: massa molecular, solubilidade em água, pressão de vapor e os coeficientes de partição entre os meios, como a constante da Lei de Henry e os coeficientes de partição octanol-água e carbono orgânico-água (SCHWARZENBACH; GSCHWEND; IMBODEN, 2003). Algumas propriedades físico-químicas dos compostos BTEX e do etanol são mostradas, a continuação, na Tabela 2.2. Uma vez que um determinado composto orgânico entra em contato com a água, algumas moléculas deixam a fase orgânica e dissolvem na água, enquanto outras moléculas de água entram na fase orgânica. Quando o fluxo de moléculas que saem e entram na fase orgânica, está balanceado, significa que o sistema alcançou o equilíbrio e, neste momento, a quantidade de moléculas orgânicas presentes na água representa a solubilidade em água de um determinado composto orgânico.

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) é definido como a relação entre a concentração em equilíbrio de um composto orgânico

entre o octanol e a água. O octanol é escolhido como parâmetro por ser o solvente orgânico mais comumente utilizado para prever a partição dos compostos orgânicos entre fases orgânicas e a água. Desta forma, o K_{ow} descreve a tendência de partição de um composto entre uma fase orgânica e uma fase aquosa podendo determinar o caráter hidrofóbico dos compostos. Assim, quanto maior for esta relação, maior é a hidrofobicidade do composto. Outro fator de importância no comportamento de um composto é o K_{oc} , coeficiente de partição do contaminante na fração orgânica do solo, o qual depende das propriedades físico-químicas deste contaminante e da porcentagem de carbono orgânico do solo (SCHWARZENBACH; GSCHWEND; IMBODEN, 2003). O baixo valor de K_{oc} do etanol constitui uma vantagem em caso de derramamentos deste composto, seja puro ou adicionado à gasolina, pois representa uma baixa sorção pelo solo.

A pressão de vapor (p_{iL}) representa a afinidade de um determinado composto pela fase gasosa, em relação às fases líquidas ou sólidas, e provê, também, importante informação quantitativa das forças de atração entre as moléculas de um composto na fase condensada. O conhecimento da pressão de vapor de um composto é importante na determinação das constantes de equilíbrio para a partição dos compostos orgânicos entre a fase gasosa e outras fases, líquidas ou sólidas.

A densidade (ρ_i) é obtida como o quociente entre a quantidade de massa m e o volume v que essa quantidade ocupa. Quando se estabelece uma razão entre a densidade de uma substância e a densidade da água fala-se de densidade relativa. Outra propriedade essencial para calcular a transferência de determinados compostos para o ar e a água é a Constante de Henry (K_H), a qual se define como a razão de partição ar-água que caracteriza a abundância de um composto na fase gasosa em equilíbrio com a fase aquosa (BEDIENT *et al.*, 1994; SCHWARZENBACH; GSCHWEND; IMBODEN, 2003).

Tabela 2.2 – Propriedades físico-químicas do etanol e dos compostos BTEX.

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)	Log K _{ow}	Log K _{oc}	Ponto de ebulição (°C)	Log p _{iL} (atm)	Densidade específica	Constante de Henry - K _H (atm·m ³ ·mol ⁻¹)
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,05	infinita	-0,31	0,09	78,3	3,90	0,7893	5,0E-6
Benzeno	C ₆ H ₆	78,1	1780	2,13	1,91	80,1	4,10	0,8765	5,5E-3
Tolueno	C ₇ H ₈	92,2	515	2,69	2,37	110,6	3,57	0,8669	6,71E-3
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	106,2	152	3,13	2,73	136,2	3,09	0,8670	8,87E-3
orto-(o)-xileno	C ₈ H ₁₀	106,2	220	3,15	2,75	144,4	2,95	0,8802	5,58E-3
meta-(m)-xileno	C ₈ H ₁₀	106,2	160	3,20	2,79	139,1	3,04	0,8842	7,20E-3
para-(p)-xileno	C ₈ H ₁₀	106,2	215	3,18	2,77	138,1	3,07	0,8611	5,70E-3

FONTE: Mackay *et al.* (2006a)

Notas: valores determinados a 25 °C

Para misturas de contaminantes a solubilidade efetiva de cada composto é proporcional à sua fração molar conforme a Lei de Raoult:

$$S_{ei} = x_i \cdot S_i$$

Equação 1

Onde:

S_{ei} : solubilidade efetiva do composto i na mistura;

x_i : fração molar (x_i) de um composto na mistura;

S_i : solubilidade do composto puro i .

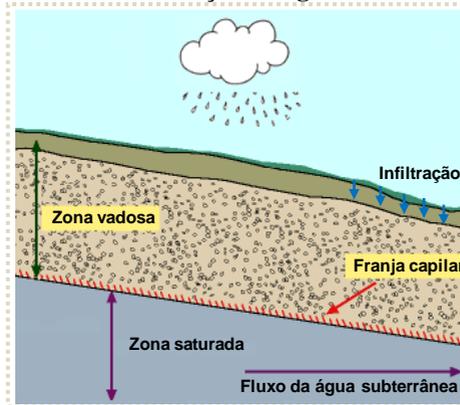
A máxima solubilidade aquosa de cada um dos compostos BTEX de acordo com a Lei de Raoult é mostrada no ANEXO D.

2.2 CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS POR DERRAMAMENTO DE COMBUSTÍVEIS

2.2.1. Importância das águas subterrâneas

Define-se como água subterrânea aquela que ocorre abaixo do nível de saturação ou nível freático, presente nas formações aflorantes e parcialmente saturadas, e nas formações geológicas profundas totalmente saturadas (FEITOSA *et al.*, 2008). Ao se infiltrar no solo, a água da chuva passa por uma porção do terreno chamada de zona não saturada, a qual se estende desde a superfície do solo até a parte superior da franja capilar, onde os poros estão preenchidos com água e ar (Figura 2.2). A região acima do nível do lençol, que compreende a franja capilar é denominada zona vadosa. Apesar da mencionada distinção entre uma e outra, os termos zona vadosa e zona não saturada são frequentemente tratados como sinônimos. Parte da água infiltrada no solo é absorvida pelas raízes das plantas e por outros seres vivos ou evapora e volta para a atmosfera. O restante da água, por ação da gravidade, continua em movimento descendente. No seu percurso, o excedente de água acumula-se em zonas mais profundas, preenchendo totalmente os poros e formando a zona saturada (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Esquema do zoneamento subterrâneo em relação à saturação de água.



FONTE: Adaptado de US EPA (2012b).

O limite entre a zona não saturada e saturada é a franja capilar. Quando se perfura um poço raso, o nível da água observado representa a profundidade do lençol freático naquele ponto, que é chamado de nível freático, nível d'água ou nível potenciométrico (IRITANI; EZAKI, 2008). Quanto mais homogêneos o tamanho e a distribuição dos grãos, maior é a interconexão entre poros e a capacidade do aquífero em transmitir água.

A água subterrânea tem se tornado uma fonte alternativa de abastecimento de água para o consumo humano, em virtude tanto da escassez como da poluição das águas superficiais, que encarecem os custos de tratamento, em níveis de potabilidade. Em geral, as águas subterrâneas são potáveis e dispensam tratamento prévio, pois os processos de filtração e depuração do subsolo promovem a purificação da água durante a sua percolação no meio. Uma questão muito importante a ser destacada é que as águas subterrâneas são um recurso frágil, o que significa que, uma vez contaminadas, as atividades de remediação são complexas e caras (NRC, 1994; US EPA, 1999; LOVLEY, 2001; UNESCO, 2002; BRASIL, 2008; FAO, 2011).

A contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de combustíveis que contêm gasolina é uma das possíveis ameaças de sua qualidade devido à alta toxicidade dos hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX. Os casos de contaminação de solo e águas subterrâneas por hidrocarbonetos derivados de petróleo são cada vez mais frequentes. Assim, considera-se que constituem um dos maiores problemas

ambientais para a sociedade (US EPA, 1997a; US EPA, 1999; FINOTTI; CAICEDO; RODRIGUEZ, 2001) pela magnitude do impacto e o potencial dano à saúde humana.

2.2.2. Distribuição dos contaminantes em subsuperfície

Uma vez no ambiente subterrâneo, os contaminantes tendem a se propagar através das zonas vadosa e saturada do solo, podendo estar em quatro estados distintos: como fase livre não aquosa, ou produto puro NAPL, do inglês *non aqueous-phase liquid*; sorvidos na matriz do solo; volatilizados na fração gasosa do solo ou dissolvidos na água (WIEDEMEIER *et al.*, 1999b). A infiltração da precipitação e o fluxo da água subterrânea causarão a dissolução dos compostos solúveis do NAPL e, conseqüentemente, a formação de uma pluma de contaminantes dissolvidos. Após um derramamento, os contaminantes solubilizados na água subterrânea estão sujeitos a diferentes mecanismos de transporte, como advecção, dispersão e sorção, além de processos de biodegradação (WIEDEMEIER *et al.*, 1999b). A advecção é o mecanismo de maior influência na migração do contaminante em subsuperfície, como conseqüência do movimento da água subterrânea. Este mecanismo depende das propriedades do aquífero como a porosidade efetiva, condutividade hidráulica, gradiente hidráulico e é independente das propriedades dos contaminantes. A dispersão pode causar o espalhamento longitudinal, transversal e vertical da pluma e a sorção pode reter o contaminante na matriz do solo.

Em casos de derramamentos de misturas de gasolina e etanol em sistemas subsuperficiais, algumas considerações sobre o transporte e a influência dos compostos na mistura devem ser destacadas. Como o etanol é completamente solúvel em água, transfere-se rapidamente para a fase dissolvida podendo se espalhar por uma área maior e, inclusive, mais longe da fonte de contaminação, acompanhando o fluxo da água subterrânea. O etanol frequentemente está presente na gasolina em concentrações mais altas que os BTEX de tal forma que, nas águas subterrâneas impactadas por misturas de gasolina e etanol, existiriam também maiores concentrações de etanol do que de BTEX (CORSEUIL *et al.*, 1998). Além disso, o etanol atua como cossolvente dos compostos BTEX, é dizer que aumenta a solubilidade destes compostos na água (CORSEUIL; MARINS, 1997; HEERMANN; POWERS, 1998; CORSEUIL; FERNANDES, 1999; POWERS *et al.*, 2001; RUIZ AGUILAR *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002; CORSEUIL; KAIPPER;

FERNANDES, 2004, SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005, MACKAY *et al.*, 2006b; NUNES; CORSEUIL, 2007; FERIS *et al.*, 2008, CHEN; BARKER; GUI, 2008). Isto ocorre porque os BTEX são miscíveis nos álcoois primários que, por sua vez, são altamente solúveis em água, de forma que quando a mistura gasolina-etanol entra em contato com a água, o etanol passa para a fase aquosa aumentando a solubilidade dos BTEX nesta fase. O comportamento dos BTEX se vê afetado pela presença de etanol, devido à possibilidade do aumento da sua solubilidade e mobilidade na água subterrânea. Assim, a presença de etanol em derramamentos de gasolina pode aumentar o tempo que os processos naturais de atenuação levam para eliminar os contaminantes presentes na água subterrânea (COSTA; CORSEUIL; WEND, 2006). Desta maneira, em estudos de contaminação de águas subterrâneas com misturas de combustíveis, a avaliação do comportamento do etanol e a sua influência na degradação dos compostos BTEX se tornam imprescindível.

2.3 BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS: INFLUÊNCIA DO ETANOL NA BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BTEX

O processo de biodegradação transforma os contaminantes orgânicos em compostos inócuos à saúde humana pela quebra ou degradação dos compostos orgânicos por meio do metabolismo de microrganismos (WIEDEMEIER *et al.*, 1996) de forma aeróbia e/ou anaeróbia. Quando ocorre um evento de contaminação de ambientes subterrâneos por hidrocarbonetos, devido à alta demanda bioquímica de oxigênio, os processos anaeróbios acabam se tornando os mecanismos responsáveis pela degradação dos contaminantes (BARCELONA; HOLM, 1991; SUFLITA; SEWELL, 1991; VROBLESKY; BRADLEY; CHAPPELLE *et al.*, 1996; WIEDEMEIER *et al.*, 1999b; HUTCHINS; MILLER, 1998; YERUSHALMI; MANUEL; GUIOT, 1999; ANDERSON; LOVLEY, 2000). A adição de biocombustíveis, como o etanol ou o biodiesel, aos combustíveis derivados de petróleo favorece ainda mais a predominância de condições anaeróbias durante o processo de biodegradação destas misturas em ambientes subterrâneos (CHIARANDA, 2011).

2.3.1. Biodegradação anaeróbia

O esquema geral da degradação anaeróbia de compostos orgânicos é composto pelas etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Para que os compostos orgânicos possam ser transportados através da membrana celular microbiana, eles devem ser transformados em moléculas orgânicas menores (hidrólise) pela ação de enzimas excretadas por microrganismos. Desta maneira, carboidratos serão convertidos em açúcares solúveis, proteínas em aminoácidos enquanto que lipídeos em ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e glicerol (BLOCK; BEALE, 2004). A contaminação da água subterrânea por hidrocarbonetos de petróleo frequentemente resulta em condições anaeróbias no aquífero, pois a degradação microbiana dos compostos orgânicos reduz rapidamente o oxigênio dissolvido (SUFLITA; SEWELL, 1991; VROBLESKY; BRADLEY; CHAPELLE, 1996). Existem na literatura estudos que mostram que as estratégias de tratamento anaeróbias *in situ* são preferíveis em relação às aeróbias, visto que os receptores de elétrons anaeróbios são relativamente baratos, podem ser facilmente adicionados em ambientes subterrâneos, e são quimicamente mais estáveis que o oxigênio, podendo atuar, assim, nas proximidades da fonte de contaminação (BARCELONA; HOLM, 1991; HUTCHINS; MILLER, 1998; YERUSHALMI; MANUEL; GUIOT, 1999; ANDERSON; LOVLEY, 2000). Os receptores de elétrons mais desejáveis são os que possuem alta solubilidade em água, como nitrato e sulfato, por exemplo, assim como alta capacidade para transferir elétrons (WEINER *et al.*, 1998; ULRICH; SUFLITA, 2002).

2.3.2. Fatores de influência na Biodegradação

A biodegradação é um processo que ocorre naturalmente quando existem condições ambientais favoráveis para a atividade metabólica de microrganismos específicos. Ao utilizar compostos orgânicos como fonte de energia ou alimento, os microrganismos podem degradar substâncias tóxicas. Existem requisitos básicos para a biodegradação (BEDIENT; RIFAI; NEWELL, 1994) e, dessa maneira, são vários os fatores que determinam a ocorrência deste processo, incluindo:

Presença de Microrganismos

A capacidade dos microrganismos para transformar formas de matéria orgânica (natural ou sintética) faz deles excelentes agentes para a biorremediação de contaminantes em ambientes subterrâneos. Os compostos xenobióticos são químicos sintéticos que não existem naturalmente na natureza e as suas moléculas são difíceis de serem degradadas. Porém, como os hidrocarbonetos têm estado em contato com microrganismos durante longos períodos geológicos, muitas bactérias têm adquirido a habilidade de utilizá-los como fonte de energia, manifestando assim o potencial para reduzir o impacto ambiental causado por contaminação com estes compostos (ATLAS, 1977).

Indução de enzimas degradadoras

As enzimas influenciam a velocidade das reações químicas, nas células vivas, devido às propriedades catalíticas que apresentam estas proteínas (BLOCK; BEALE, 2004). Os compostos orgânicos serão degradados a uma taxa significativa somente se os microrganismos possuírem enzimas que catalisem a conversão de um determinado produto por meio de uma via metabólica. Portanto, a aclimação ou indução de enzimas que catalisam as reações necessárias na população microbiana, é um fator importante na determinação da biodegradabilidade de determinados compostos (PARIS; STEEN; BAUGHMAN, 1983 *apud* RISER-ROBERTS, 1992). Existem enzimas que estão sempre presentes independentes da condição ambiental da área e são chamadas de enzimas constitutivas. No entanto, as enzimas que iniciam a biodegradação de muitos contaminantes são geralmente induzidas através da ativação de regiões específicas do genoma bacteriano. Quando um indutor está presente, o qual pode ser o substrato a ser degradado, se inicia uma cascata de reações bioquímicas que resultam na transcrição de genes que codificam a síntese das enzimas degradadoras necessárias (BLOCK; BEALE, 2004).

Disponibilidade de nutrientes

Os microrganismos necessitam de nutrientes essenciais, tais como fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, ferro e outros minerais, para os diversos processos próprios do seu metabolismo. Assim, o

nitrogênio é utilizado pelos microrganismos para sintetizar os grupos amino dos aminoácidos, fazendo parte das proteínas; o enxofre na síntese de aminoácidos específicos e para algumas coenzimas, o fósforo para a geração de ATP, para os fosfolipídios componentes da membrana celular e também na síntese de ácidos nucleicos. O potássio, o magnésio e o cálcio também são elementos necessários como cofatores para reações enzimáticas, sendo também o cálcio um constituinte das paredes celulares.

pH

O pH de águas subterrâneas tem um importante efeito na presença e na atividade dos microrganismos. A maioria dos microrganismos presentes na água subterrânea se desenvolvem bem em faixas de pH de 6 a 8 (CHAPELLE, 2001, WIEDEMEIER *et al.*, 1999a), embora alguns deles possam tolerar maiores variações. A alcalinidade é importante na manutenção do pH das águas subterrâneas em relação com o sistema carbonato. Quando há presença de processos de biodegradação, diminui o oxigênio dissolvido e aumenta a concentração de dióxido de carbono (CO₂) o que aumenta a alcalinidade da água subterrânea em aquíferos que possuem bicarbonato (HCO₃⁻) como parte da sua matriz. Isto se deve a que o CO₂ forma ácido carbônico, e este pode dissolver esses minerais aumentando a alcalinidade da água subterrânea.

Temperatura

Outro fator de grande influência para o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos é a temperatura (WIEDEMEIER *et al.*, 1999a). Dependendo da faixa de temperatura, os microrganismos são denominados psicrófilos (0 a 20°C) ou mesófilos (20 a 40°C). As bactérias presentes em ambientes subsuperficiais são geralmente caracterizadas como mesófilas (CHAPELLE, 2001). Temperaturas mais altas estão associadas com atividades enzimáticas mais intensas e, conseqüentemente, taxas de biodegradação mais rápidas. Por outro lado, a temperatura afeta a solubilidade das espécies geoquímicas, como, por exemplo, os receptores de elétrons. Espécies químicas como o oxigênio, que é pouco solúvel em água, diminuem ainda mais a sua solubilidade conforme aumenta a temperatura.

Ausência de substâncias tóxicas ou inibitórias

Uma das principais limitações para a biodegradação de uma substância esta relacionada com a concentração dos contaminantes, o que significa que em concentrações suficientemente altas, certas substâncias, podem causar uma inibição da atividade microbiana (BEDIENT; RIFAI; NEWELL, 1994). Em casos de contaminação de águas subterrâneas, por exemplo, o processo de biodegradação somente ocorrerá uma vez que os processos hidrodinâmicos dispersem e diluam os contaminantes.

Disponibilidade de receptores de elétrons

Os microrganismos obtêm energia, na forma de moléculas de adenosina trifosfato (ATP), através de uma sequência complexa de reações de oxidação e redução onde há uma transferência de elétrons de um composto orgânico a um composto inorgânico em um processo denominado respiração (CHAPELLE, 2001). Os compostos inorgânicos que podem aceitar elétrons permitindo a oxidação completa de substratos orgânicos são chamados receptores de elétrons. Estes compostos desempenham um importante papel na ocorrência da biodegradação dos compostos contaminantes e determinam o modo de metabolismo (aeróbio ou anaeróbio) e as reações específicas que podem ocorrer (BEDIENT; RIFAI; NEWELL, 1994; CHAPELLE, 2001). O papel dos receptores de elétrons na biodegradação dos contaminantes é abordado com maior detalhamento no item 2.3.3.

Condutividade elétrica

Este fator se relaciona com a disponibilidade de receptores de elétrons, já que é a medida da habilidade de uma solução para conduzir a eletricidade e depende da concentração de íons. Desta maneira, conforme aumenta a concentração dos mesmos, aumenta também a condutividade.

Potencial redox

O potencial redox (POR) é uma medida da atividade elétrica que indica a tendência relativa de uma solução a aceitar ou ceder elétrons. A oxidação é caracterizada pela perda de elétrons e a redução pelo ganho

dos mesmos, num processo que ocorre de forma simultânea, ou seja, quando uma substância libera elétrons (oxidação), outra os recebe (redução). Quando um ambiente possui elevadas concentrações de receptores de elétrons, se diz que tem potencial elétrico elevado e é considerado um ambiente oxidante. De acordo com o consumo de nutrientes, e de receptores de elétrons pela atividade microbiana, durante a biodegradação, o potencial redox diminui tornando o ambiente redutor. Devido a alguns processos biológicos que ocorrem somente dentro de uma faixa de valores de potencial redox, isto pode ser usado como um indicador qualitativo das condições aeróbias ou anaeróbias de um ambiente. Em geral, o POR de águas subterrâneas varia entre -400 e 800 mV (WIEDEMEIER *et al.*, 1999b). Assim, por representar uma medida da atividade dos elétrons, torna-se uma variável importante para a análise do processo de biodegradação de compostos orgânicos. Portanto, a avaliação das condições de oxidação-redução na pluma de contaminação na água subterrânea é um pré-requisito para o entendimento do comportamento dos contaminantes, e para a seleção da abordagem de remediação (CHRISTENSEN *et al.*, 2000).

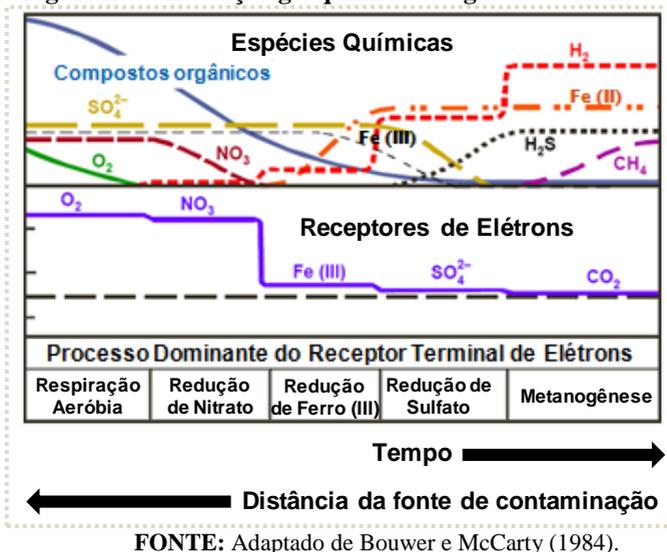
Por ser a biorremediação um processo natural que envolve reações químicas e transformações de compostos orgânicos e inorgânicos, o entendimento dos processos de oxidação-redução podem auxiliar na compreensão das diversas fases de transformação da matéria e do comportamento de alguns microrganismos que participam do processo. Um entendimento dos mecanismos que controlam os processos predominantes de aceitação terminal de elétrons em aquíferos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo é essencial para os estudos de contaminação de águas subterrâneas (VROBLESKY; BRADLEY; CHAPPELLE, 1996).

2.3.3. Termodinâmica dos receptores de elétrons

As leis da termodinâmica determinam a ocorrência dos processos metabólicos próprios dos microrganismos. A energia livre de Gibbs (ΔG°), energia capaz de realizar trabalho, rege a ordem de ocorrência e eficiência das reações, de tal maneira que aquelas com ΔG° mais negativo são as mais favoráveis e acontecem espontaneamente. Segundo a termodinâmica, quanto maior energia livre liberada, maior a eficiência da reação, assim, os microrganismos utilizam preferencialmente aqueles receptores de elétrons que fornecem maior quantidade de energia durante a respiração (WIEDEMEIER *et al.*, 1999a). O valor de ΔG° para

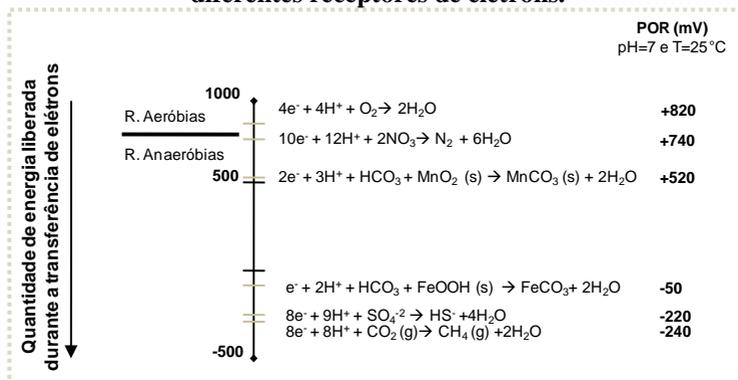
a oxidação da matéria orgânica (em kJ por equivalente-grama de matéria orgânica oxidada) responde à seguinte sequência: respiração aeróbia (-125 kJ/eq), desnitrificação (-119 kJ/eq), redução do manganês (-98 kJ/eq), ferro(III)-redução (-42,2 kJ/eq), sulfato-redução (-25 kJ/eq) e metanogênese (-23 kJ/eq). Assim, a sequência no consumo dos receptores de elétrons obedece à seguinte ordem: $O_2 > NO_3^- > Mn^{+4} > Fe^{+3} > SO_4^{-2} > CO_2$, sendo o metabolismo aeróbio o mecanismo mais favorável termodinamicamente. A Figura 2.3 esquematiza a ordem de utilização dos receptores de elétrons em aquíferos contaminados.

Figura 2.3 – Evolução geoquímica da água subterrânea.



A utilização dos receptores de elétrons no meio impactado pode ser explicada a partir da correlação entre potencial redox e a energia liberada para o entendimento da conformação de zonas de oxidação-redução nas águas subterrâneas (STUMM; MORGAN, 1981; LOVLEY, 2001). Segundo estes autores, os valores de POR dos diferentes processos de degradação seriam: +820 mV para degradação aeróbia, +740 mV para desnitrificação, +520 mV para redução do manganês, -50 mV para ferro(III)-redução, -220 mV para sulfato-redução, e -240 mV para metanogênese (Figura 2.4). Os valores de energia livre de Gibbs negativos, que correspondem a reações mais favoráveis, equivalem a valores de POR positivos.

Figura 2.4 – Correlação entre o POR e a energia liberada para diferentes receptores de elétrons.



FONTE: Adaptado de Stumm e Morgan (1981).

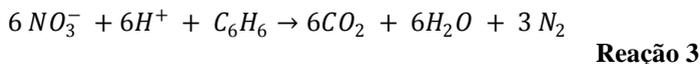
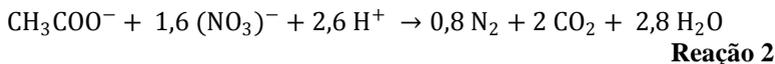
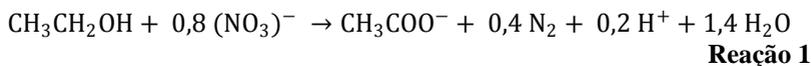
Apesar da ordem mencionada para o uso preferencial dos receptores de elétrons, vários autores têm constatado que pode haver uma simultaneidade no consumo dos vários receptores de elétrons disponíveis no meio (EDMUNDS; MILES; COOK, 1984; BJERG *et al.*, 1995; WIEDEMEIER, 1999b; CHRISTENSEN *et al.*, 2000; CUNNINGHAM *et al.*, 2001; CHAPELLE *et al.*, 2002; BORCH, 2010). Dependendo do tipo de receptor de elétrons presente, das condições de pH e do potencial redox, a biodegradação anaeróbia pode ocorrer através de nitrato-, ferro(III)- e sulfato-redução assim como também por metanogênese. Nos seguintes itens deste capítulo, são descritos os processos de oxidação da matéria orgânica em condições de anaerobiose, que foram relevantes para este trabalho:

Nitrato-redução

A nitrato-redução, ou desnitrificação, é um processo no qual o nitrato (NO_3^-) é utilizado como receptor de elétrons durante a biodegradação da matéria orgânica. Este processo ocorre pela sucessão de reações catalisadas por diferentes microrganismos que podem gerar nitrito (NO_2^-) e nitrogênio molecular (N_2) como subprodutos principais, através da seguinte sequência: $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ (CHAPELLE, 2001). A primeira etapa da desnitrificação é a redução de nitrato a nitrito através da enzima nitrato redutase. Na segunda etapa, o nitrito é reduzido a nitrogênio molecular pela enzima nitrito redutase (Nir) (CHAPELLE, 2001).

A ocorrência de nitrato-redução, em ambientes naturais, pode ser evidenciada pela detecção de baixas concentrações de nitrato em áreas contaminadas onde este receptor já esteve presente, ou através do aumento nas concentrações de nitrito. No entanto, a redução da concentração de nitrato pode também estar relacionada à assimilação bacteriana deste composto como fonte de nutrientes. Outra dificuldade em torno da caracterização deste processo relaciona-se com a instabilidade do nitrito no meio, já que logo após sua produção a partir do nitrato, ele é rapidamente metabolizado pela nitrito redutase, dificultando a sua detecção em forma de nitrito. Desta maneira, o processo de biodegradação de poluentes através da nitrato-redução, embora esteja ocorrendo, pode estar sendo subestimado.

Durante o processo de nitrato-redução, a fonte de carbono é oxidada pelas bactérias desnitrificantes, conforme as equações abaixo, para o caso do etanol (Reação 1 e Reação 2) e benzeno (Reação 3) como substrato (CHEN; BARKER; GUI, 2008):



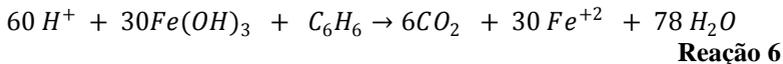
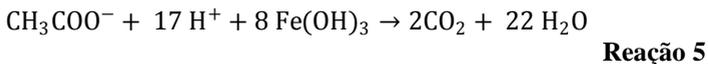
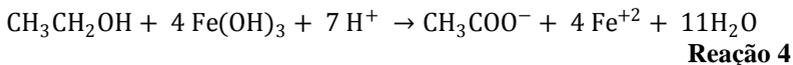
Dentre os processos de remediação ativa, a nitrato-redução é um processo que vem se mostrando eficaz no auxílio do tratamento de áreas impactadas por derivados de petróleo. Reinhard *et al.* (1997), em estudo de campo no qual foi injetada uma solução de nitrato e de sulfato em água subterrânea de posto de combustível, observaram que o nitrato foi consumido preferencialmente em relação ao sulfato na biodegradação dos BTEX, embora o benzeno (o composto de mais difícil degradação) tenha sido degradado com a combinação dos dois receptores de elétrons disponíveis. Cunningham *et al.* (2001), em estudo semelhante, constataram que a biodegradação do tolueno, etilbenzeno e m-xileno, na presença do nitrato, ocorreu em aproximadamente 10 dias, enquanto que em presença de sulfato, esses compostos levaram até 60 dias para serem degradados.

Ferro-redução

A redução do ferro férrico (Fe^{+3}) a ferro ferroso (Fe^{+2}) é um processo mediado por microrganismos conhecidos como bactérias ferro(III)-redutoras pertencentes à família Geobacteraceae. Estes organismos são abundantes na subsuperfície e são filogeneticamente e metabolicamente diversos, mas estão unificados pela habilidade de oxidar matéria orgânica pela redução de metais oxidados (LOVLEY *et al.*, 1993, 1995; CHAPELLE, 2001, LOVLEY, 2001; PFIFFNER *et al.*, 1997). Dentro deste grupo, os organismos do gênero *Geobacter* possuem a habilidade de utilizar ferro(III) e outros metais, como Mn (IV), como receptor de elétrons (LOVLEY *et al.*, 1993), apresentando assim maior competitividade frente às outras comunidades microbianas, que muitas vezes são capazes de utilizar somente um receptor de elétrons. O ferro na forma reduzida (ferro II) é mais solúvel e móvel do que na forma oxidada (ferro III), por isso este subproduto metabólico é normalmente o composto utilizado como indicador da ocorrência de ferro(III)-redução.

O acúmulo de ferro na forma de íon ferroso é também diretamente influenciado pela presença de sulfato, visto que quanto mais se tem sulfato que se reduz a sulfeto, mais se tem sulfeto livre disponível para reagir com o Fe^{+2} dissolvido para a precipitação na forma de sulfeto ferroso (FeS) (SIMON; MEGGYES; MCDONALD, 2002; ROYCHOUDHURY; MERRETT, 2006). Por isso, para a determinação do processo redox, atuante na biodegradação dos contaminantes é importante verificar a disponibilidade dos receptores disponíveis juntamente com os subprodutos metabólicos formados.

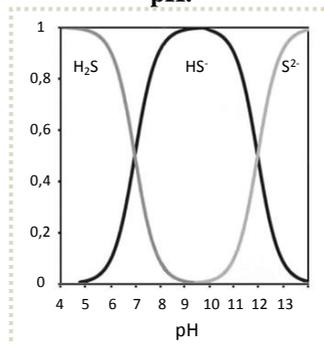
As equações de oxidação do etanol (Reação 4 e Reação 5) e do benzeno (Reação 6) a partir da redução de ferro (III) são mostradas abaixo (WIEDEMEIER *et al.*, 1999; CHEN; BARKER; GUI, 2008):



Sulfato-redução

De acordo com as leis da termodinâmica, uma vez esgotados os primeiros receptores de elétrons biodisponíveis - oxigênio dissolvido, nitrato e ferro (III), o sulfato (SO_4^{-2}) poderia ser usado como receptor de elétrons alternativo para a biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos de petróleo em aquíferos contaminados (POSTGATE, 1979; ATLAS; BARTHA, 1987; VROBLESKY; CHAPELLE, 1994; LOVLEY *et al.*, 1995; PFIFFNER *et al.*, 1997; YERUSHALMI; MANUEL; GIEG *et al.*, 1999; WIEDEMEIER *et al.*, 1999 a,b; ANDERSON; LOVLEY, 2000; SCHROTH, *et al.*, 2001; ULRICH; SUFLITA, 2002; SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005; DOU *et al.*, 2008). Durante o processo de sulfato redução, as bactérias reduzem sulfato (SO_4^{-2}) a sulfeto, nas formas H_2S , HS^- , e S^{2-} , e em consequência, os compostos orgânicos são oxidados, e frequentemente, mineralizados sob a forma de CO_2 e H_2O (SCHROT *et al.*, 2001). Tanto o pH como a temperatura influenciam a forma predominante do sulfeto (SAWYER; McCARTY; PARKIN, 1994; AL-ZUHAIR; EL-NAAS; AL-HASSANI, 2008). Na Figura 2.5 apresenta-se um esquema sobre o efeito do pH no equilíbrio das formas de sulfeto na água doce.

Figura 2.5 – Especiação química do sulfeto na água doce em função do pH.

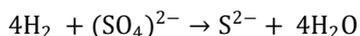


FONTE: Adaptado de Sawyer, McCarty e Parkin (1994).

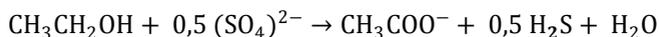
Os Microrganismos Redutores de Sulfato (SRM, do inglês Sulfate-Reducing Microorganisms) recebem esta denominação por tratar-se de microrganismos procarióticos anaeróbios, tanto Bactérias como Arqueas, com a capacidade compartilhada para executar a redução dissimilatória de sulfato. Isto significa que são capazes de utilizar

sulfato como receptor final de elétrons no seu metabolismo energético, oxidando a matéria orgânica e liberando íons sulfeto como subproduto (MUYZER; STAMS, 2008). Os SRM desempenham um importante papel em muitos processos biogeoquímicos devido à sua ampla distribuição em ambientes naturais quanto antrópicos, por exemplo, reservatórios de petróleo e instalações de produção de petróleo respectivamente (SCHROTH, 2001; BARTON; HAMILTON, 2007). Dentre as linhagens filogenéticas dos SRM, as Delta-proteobactérias, que incluem os gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter* e *Desulfobulbus*, representam o grupo mais estudado (BARTON; HAMILTON, 2007). Este grupo inclui também outras bactérias anaeróbias com diferente fisiologia (por exemplo, redutoras de ferro (III) como o gênero *Geobacter*, *Pelobacter* e *Syntrophus*). Pelo fato das bactérias sulfato-redutoras serem organismos filogeneticamente próximos das redutoras de ferro, estas possuem características metabólicas e rotas de biodegradação semelhantes. Entretanto, um importante contraste é que as bactérias do gênero *Geobacter* não conseguem utilizar o sulfato ou enxofre como receptor de elétrons (BARTON; HAMILTON, 2007).

Diversas fontes de carbono podem cumprir o papel de doadores de elétrons na sulfato-redução. Considerando o caráter da fonte energética, podem ocorrer dois tipos de respiração anaeróbia do sulfato: 1) a redução autotrófica do sulfato, em que a fonte energética é o hidrogênio gasoso (H₂), conforme a Reação 7 e 2) a redução do sulfato na qual as fontes energéticas são compostos orgânicos simples (ex. álcoois) (Reação 8) ou subprodutos desta última reação, através de uma oxidação completa, com CO₂ e H₂O como produtos finais (Reação 9) (CHEN; BARKER; GUI, 2008):



Reação 7



Reação 8

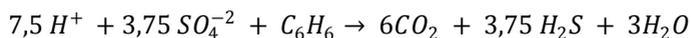


Reação 9

O etanol é usado como fonte de energia por várias bactérias sulfato-redutoras (BRYANT *et al.*, 1977; LAAMBROEK *et al.*, 1984;

BARTON; HAMILTON, 2007; MACKAY *et al.*, 2006b, 2007) de acordo com as considerações da redução do sulfato (Reação 8 e Reação 9). Dentre as fontes de carbono existentes, os compostos BTEX também têm sido indicados como utilizadas por estes microrganismos (SCHROTH, 2001; BARTON; HAMILTON, 2007; RAKOCZY *et al.*, 2011).

Dentre as vantagens do uso de sulfato como receptor de elétrons pode ser ressaltada a maior solubilidade do sulfato, que facilita a possibilidade da adição de altas concentrações à água subterrânea, o que ao mesmo tempo promove uma maior capacidade receptiva de elétrons (WEINER; LAUCK; LOVLEY, 1998; ULRICH; SUFLITA, 2002; SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005; ROYCHOUDHURY; MCCORMICK, 2006). Aliás, na legislação vigente, o valor máximo permitido no padrão de potabilidade, segundo o Ministério da Saúde, é de 250 mg.L⁻¹ contra os 10 mg.L⁻¹ permitidos para o nitrato e os 0,3 mg.L⁻¹ para ferro, por exemplo (BRASIL, 2009). Por sua vez, a adição de sulfato pode ser preferível ao uso de ferro na forma de íon férrico para estimular a degradação do benzeno por não exigir a adição de outros componentes como ácidos húmicos ou quelatos sintéticos (WEINER; LAUCK; LOVLEY, 1998), conforme a seguinte equação (WIEDEMEIER, *et al.*, 1999a):



Reação 10

No entanto, uma das desvantagens em relação a este processo é a formação de sulfeto que em concentrações maiores ou iguais a 100 mg.L⁻¹ torna-se tóxico para algumas populações bacterianas, podendo afetar a biodegradação dos contaminantes (KALYUZHNYI; DE LEON FRAGOSO; RODRIGUEZ MARTINEZ, 1997; O'FLAHERTY *et al.*, 1998; ULRICH; SUFLITA, 2002; SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005; LOPES *et al.*, 2007).

Metanogênese

Neste processo, o carbono presente na matéria orgânica, na forma de dióxido de carbono e/ou acetato, é utilizado como receptor final de elétrons, obtendo metano (CH₄) como produto final (CHAPELLE, 2001). O processo metanogênico envolve a parceria de vários tipos de microrganismos que dependem um dos outros para atingir um fim

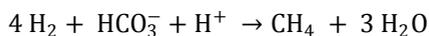
metabólico conforme as equações abaixo (BEDIENT; RIFAI; NEWELL, 1994). O acetato formado a partir de etanol (Reação 11) é utilizado como substrato pelas Arqueas metanogênicas acetoclásticas (Reação 12). As Arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (Reação 13) utilizam o hidrogênio formado durante a acetogênese produzindo metano.



Reação 11

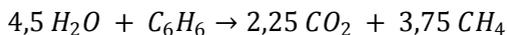


Reação 12

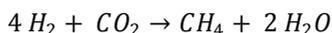


Reação 13

A Reação 14 e Reação 15 mostram a oxidação completa de benzeno pela via metanogênica (WIEDEMEIER, *et al.*, 1999a):



Reação 14



Reação 15

Os microrganismos metanogênicos predominam somente em ambientes subterrâneos deficientes de outras formas de receptores de elétrons inorgânicos (PFIFFNER *et al.*, 1997; CHAPELLE, 2001).

2.4 INDICADORES GEOQUÍMICOS DA BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

2.4.1. Subprodutos metabólicos

Tanto a disponibilidade de receptores de elétrons como a medição dos subprodutos metabólicos, ou formas reduzidas dos receptores de elétrons, são fatores que podem ser usados como um indicador da degradação de matéria orgânica. Essas informações são fundamentais para a identificação dos processos predominantes relacionados aos processos de biorremediação. Por exemplo, para o caso do íon ferro (III) que é insolúvel em água, é possível medir o íon ferro (II), que é solúvel, como indicador da ferro(III)-redução. Em sistemas anaeróbios, onde o CO₂ é o principal receptor de elétrons, há produção de metano, pelo processo de metanogênese. A presença deste composto indica condições altamente redutoras.

2.4.2. Cinética da biodegradação

Uma das expressões utilizadas para descrever os parâmetros cinéticos de compostos orgânicos é a taxa de biodegradação por ser quem controla a distribuição, o transporte e o destino dos contaminantes orgânicos (WIEDEMEIER *et al.*, 1999^a; WEISS; COZZARELLI, 2008). A determinação desta taxa é importante para avaliar processos de biorremediação e podem ser usados dados obtidos em microcosmos, com base em valores da literatura ou com a coleta e análise de dados de campo (WIEDEMEIER, 1999a). A lei de ação das massas afirma que a taxa é proporcional ao produto da constante de biodegradação k pela concentração do reagente C , com uma velocidade determinada pela ordem da reação (n) (CHAPRA, 2008):

$$\frac{dC}{dt} = -k \cdot C^n$$

Equação 2

Na modelagem da biodegradação de poluentes, em solos e águas subterrâneas, são frequentemente utilizados os modelos de decaimento de primeira ordem (WIEDEMEIER *et al.*, 1999a; COZZARELLI *et al.*, 2010, KAO *et al.*, 2010). Assim, para uma reação de ordem 1,

considerando $t_0=0$, a integração da Equação 2 resulta numa equação exponencial (Equação 3):

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

Equação 3

Onde C é a concentração do componente após certo tempo de biodegradação; C_0 é a concentração inicial; k é a taxa de atenuação do composto e t é o tempo. Através da linearização da equação anterior é possível determinar a constante de atenuação pontual, sendo o k_{ponto} igual à inclinação da reta do logaritmo natural da concentração pelo tempo em um determinado ponto (NEWELL *et al.*, 2002).

2.5 TECNOLOGIAS DE BIOREMEDIÇÃO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADAS POR COMBUSTÍVEIS

A bioremediação de águas subterrâneas contaminadas é normalmente uma tarefa complexa que exige o envolvimento de profissionais qualificados e experientes na elaboração de diagnósticos precisos e na definição da alternativa mais adequada para o cumprimento dos padrões preestabelecidos em projeto. Esta atividade é alvo de pesquisas em todo mundo e tal fato resulta no contínuo desenvolvimento de novas técnicas, algumas das quais se estabelecem como alternativas factíveis e outras não se mostram viáveis ou caem em desuso com o tempo. A escolha de uma tecnologia de remediação depende do tipo de contaminante, da hidrogeologia local, das características da fonte e a localização do contaminante na subsuperfície (BEDIENT; RIFAI; NEWELL, 1994). As alternativas que utilizam soluções com menores impactos no subsolo vêm ganhando maior destaque nos últimos anos. Dentre as tecnologias de remediação existentes, a biorremediação tem mostrado vantagens de ser uma estratégia econômica, eficiente e com uma abordagem ecológica satisfatória (DOU *et al.*, 2008), já que, por ser um sistema de estimulação de processos naturais de remediação, causa menor perturbação ao ambiente.

2.5.1. Biorremediação

Como foi introduzido no item 2.3.2, a biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos. Estes são capazes de transformar certos contaminantes em formas que não oferecem riscos de contaminação ao utilizarem o carbono orgânico como fonte de alimentação tanto no solo como em outros ambientes (ATLAS, 1981, BEDIANT; RIFAI; NEWELL, 1994). Portanto, pode-se definir a biorremediação como um processo que explora a biodiversidade e versatilidade metabólica dos microrganismos na transformação dos contaminantes químicos em produtos menos tóxicos (TORSVIK *et al.*, 1990). Do ponto de vista prático, a biorremediação fundamenta-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante, a biodisponibilidade² do contaminante, ou seja, o contaminante deve estar disponível ou acessível ao ataque microbiano ou enzimático, e por último a existência de condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador.

Nos últimos anos, a biorremediação, tornou-se uma tecnologia muito utilizada no tratamento de águas subterrâneas contaminadas por BTEX (NRC, 1994). A capacidade para metabolizar compostos aromáticos e usá-los como fonte de carbono e energia para o crescimento é demonstrada por muitas espécies de microrganismos. Para crescer em tais condições, o microrganismo deve ser capaz de quebrar as moléculas em compostos mais simples, os quais, por sua vez, podem ser compostos intermediários nas vias metabólicas de degradação dos poluentes em questão.

A técnica de biorremediação pode ser aplicada *ex situ* ou *in situ*. A biorremediação *ex situ* tem facilidades quanto ao monitoramento e controle, entretanto, a biorremediação *in situ* apresenta vantagens por ser a sua aplicação mais econômica e menos perturbadora por remover ou imobilizar os contaminantes sem a necessidade de transferir os materiais afetados do lugar. Pela sua capacidade em degradar completamente os contaminantes deixando substâncias potencialmente não tóxicas como produto da biodegradação, as técnicas de biorremediação *in situ* são particularmente atrativas e têm sido aplicadas com sucesso no tratamento de águas subterrâneas contaminadas com

² Um composto é biodisponível quando é livremente disponível para atravessar a membrana celular de um organismo num determinado tempo (SEMPLE *et al.*, 2004).

hidrocarbonetos de petróleo (LEAVITT; BROWN, 1994; NELSON; HICKS; ANDREWS, 1994; YERUSHALMI; MANUEL; GUIOT, 1999).

A biorremediação *in situ* divide-se em duas estratégias conhecidas como Atenuação Natural Monitorada (ANM), e Atenuação Natural Acelerada (ANA). A ANM é uma tecnologia passiva, que consiste no monitoramento da resposta natural do meio contaminado (WIEDEMEIER *et al.*, 1999a). A diferença da técnica anterior, a ANA consiste num processo de remediação ativa, onde existe intervenção direta do homem de forma a acelerar os processos naturais (FAHRADIAN *et al.*, 2008). Esta técnica é caracterizada pelos métodos de bioestimulação e bioaumentação, os quais se distinguem pela adição de receptores ou doadores de elétrons, no primeiro caso, e pela adição dos próprios microrganismos, no caso da bioaumentação. A remediação ativa constitui uma alternativa para a limpeza de derramamentos de óleos e tratamento de ambientes terrestres e aquáticos contaminados, e apresenta benefícios como uma maior segurança e menor perturbação ao meio ambiente.

Uma vez que a biodegradação dos BTEX em ambientes de subsuperfície está diretamente relacionada à biodegradação do etanol, é necessário o desenvolvimento de metodologias de remediação que considerem a natureza da mistura gasolina-etanol. Devido à variabilidade das taxas e padrões de biodegradabilidade, experimentos de campo são vitais para demonstrar se a adição de receptores de elétrons pode melhorar a biodegradação anaeróbia dos BTEX, no contexto das características particulares do local de estudo (VROBLESKY; BRADLEY; CHAPELLE, 1996; SCHREIBER; BAHR, 2002; WIEDEMEIER, *et al.*, 1999b).

2.5.2. Técnicas de Monitoramento da Biorremediação *in situ*

Embora os dados geoquímicos ajudem os pesquisadores a entender tanto as condições ambientais como o destino e as taxas de transformação dos contaminantes, poucas investigações têm combinado essas observações ao conhecimento microbiológico e dos fatores que podem limitar a atividade microbiana *in situ*. Esta combinação de informações hidrogeológicas e microbiológicas é essencial para a avaliação e implementação de estratégias que estão inerentemente associadas à composição e função da comunidade microbiana

(CHAPELLE, 2001; LOVLEY, 2001; WEISS; COZZARELLI, 2008; WINDERL *et al.*, 2008).

A ecologia microbiana molecular visa a compreensão das relações entre microrganismos e suas interações com o ambiente, através da análise de moléculas representativas de organismos ou de processos desencadeados por estes. Estas moléculas podem ser proteínas, enzimas ou ácidos nucléicos, como DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico). A extração de DNA de amostras de ambientes naturais, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa e/ou complemento ao clássico método de cultivo e análises fisiológicos de microrganismos (MALIK *et al.*, 2008; WEISS; COZZARELLI, 2008).

Evidências físico-químicas e moleculares suportam que em sistemas subsuperficiais, os microrganismos do domínio das Arqueas assim como os procariontes³ pertencentes a Eubacteria, são mais abundantes que os pertencentes ao domínio Eukarya (CHAPELLE, 2001; AMEND; TESKE, 2005). Isto poderia estar explicado pelas condições de escassez de oxigênio e ausência de luz, próprias dos ambientes subsuperficiais. Neste contexto, o estudo da estrutura microbiana procariótica torna-se fundamental para a compreensão dos processos metabólicos atuantes, diante da contaminação dos habitats por petróleo e derivados.

Para o caso particular de águas subterrâneas contaminadas com derivados de petróleo, conta-se hoje em dia com vários tipos de abordagens para o monitoramento da biorremediação. Uma dessas alternativas é o biomonitoramento molecular que consiste na utilização de DNA/RNA extraídos de amostras de ambientes naturais para identificar as comunidades microbianas através da comparação de sequências gênicas (MANEFIELD; WHITELEY; BAILEY, 2004). Assim, é possível mostrar que uma comunidade bacteriana nativa inclui bactérias capazes de degradar os contaminantes, e que estas são enriquecidas em zonas contaminadas (BELLER, 2002). A aplicação de técnicas de biologia molecular na investigação de comunidades microbianas em águas subterrâneas vem crescendo nos últimos anos (BELLER, 2002; ULRICH; EDWARDS, 2003; SILVA; ALVAREZ, 2004; ALFREIDER; VOGT, 2007; MUYZER; STAMS, 2008, WEISS;

³ Os organismos procariontes recebem esta denominação pela ausência de membrana nuclear verdadeira na suas células, sendo agrupados no domínio Eubacteria. Os organismos eucariontes são aqueles que possuem membrana nuclear, sendo incluídos no domínio Eukarya (RUSSELL; HERTZ; MCMILLAN, 2011).

COZZARELLI, 2008). As amostras de água permitem ao investigador determinar a concentração de microrganismos e de compostos químicos, em um ponto particular num determinado momento, fornecendo informações úteis sobre os processos que ocorrem no subsolo (RISER-ROBERTS, 1992).

2.5.3. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da enzima Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) é uma técnica de biologia molecular que permite a amplificação exponencial de pequenas quantidades de DNA utilizando elementos do processo natural de replicação desse material genético. O processo fundamenta-se na sucessão das seguintes etapas:

Desnaturação: aumento da temperatura para desnaturar o DNA genômico alvo, isto é, separar a dupla cadeia em cadeias simples.

Anelamento: resfriamento da temperatura para permitir o anelamento (hibridação ou pareamento) dos iniciadores⁴ com a fita molde de DNA. Os iniciadores possuem a função de localizar a sequência alvo por meio de complementaridade entre seus oligonucleotídeos e os da sequência alvo do DNA da amostra que está sob análise. As sequências de nucleotídeos codificam genes que por sua vez são traduzidos e expressos na forma de proteínas. Dessa maneira, certos genes são característicos de determinadas espécies bacterianas e a presença desta proteína, expressa por um determinado gene, pode possuir características interessantes do ponto de vista da degradação de contaminantes orgânicos. Portanto, os iniciadores são selecionados de acordo com sequências complementares à sequência de nucleotídeos que codifica o gene que expressa uma determinada proteína.

*Extensão*⁵: elevação da temperatura para que a enzima Taq DNA Polimerase⁵ sintetize o DNA.

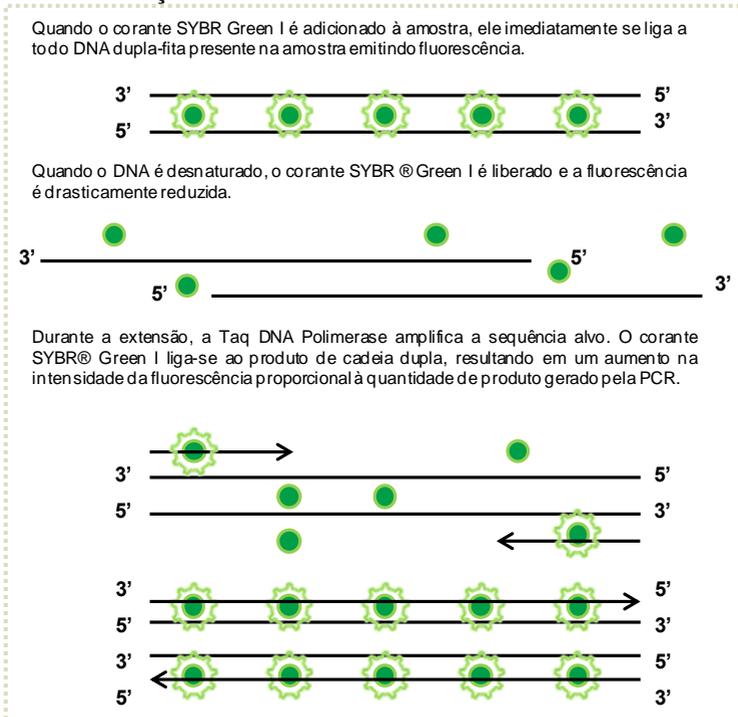
Os produtos de PCR, acumulados nos ciclos de reação, podem ser detectados através de reagentes de amplificação que utilizam corantes capazes de intercalar-se no DNA. Há dois sistemas precursores que deram origem a diferentes produtos similares disponíveis atualmente no

⁴ Sequências de oligonucleotídeos que possuem aproximadamente 20-25 pares de bases e uma porcentagem de guanina e citosina que varia de 40 a 60% da sequência Eukarya (RUSSELL; HERTZ; MCMILLAN, 2011).

⁵ A enzima Taq DNA Polimerase recebe essa denominação devido a ter sido identificada pela primeira vez na bactéria *Thermus aquaticus*, podendo suportar as elevadas temperaturas usadas na PCR (LOGAN; EDWARDS; SAUNDERS, 2009).

mercado: SYBR Green I e TaqMan (NASCIMENTO; RABELLO SUAREZ; SILVA PINHAL, 2010). Uma síntese do processo de amplificação segundo o tipo de corante utilizado é apresentada através da Figura 2.6 e a Figura 2.7, para SYBR Green I e TaqMan respectivamente.

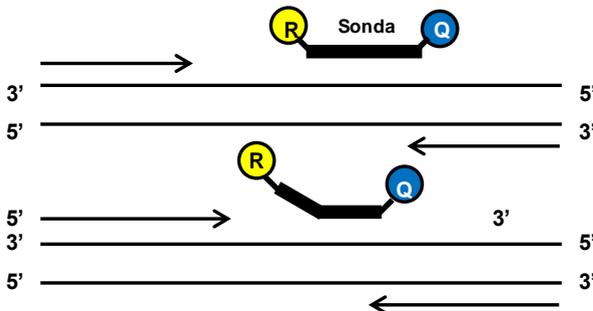
Figura 2.6 – Representação esquemática das etapas envolvidas na reação de PCR com o corante SYBR Green I.



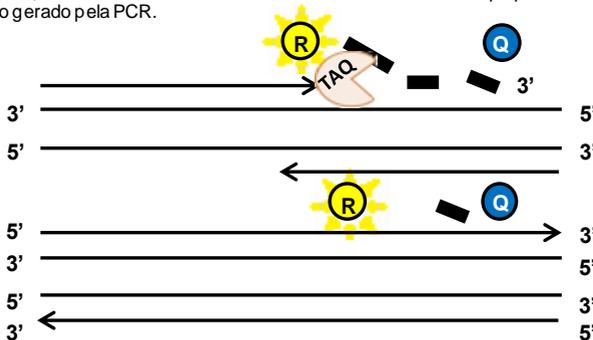
FONTE: Adaptado de Walker e Rapley (2008).

Figura 2.7 – Representação esquemática das etapas envolvidas na reação de PCR com o corante TaqMan.

TaqMan é uma sonda (oligonucleotídeos) que contém um corante fluorescente (R do inglês repórter) na extremidade 5' e um corante silenciador, (Q do inglês quencher) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do Q reduz a fluorescência emitida pelo corante R.



A sonda se anela à sequência complementar da fita de DNA e é clivada com a atividade da Taq DNA polimerase enquanto ocorre a extensão. Esta clivagem separa R de Q, aumentando o sinal de R e remove a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do iniciador continue até o final da fita molde. Moléculas adicionais do corante R são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, aumentando a intensidade de fluorescência em forma proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR.



FONTE: Adaptado de Walker e Rapley (2008).

O grande diferencial da PCR é que permite a amplificação de fragmentos de um gene desejado com muita rapidez. Outras características desta técnica são a precisão, a objetividade de seus resultados e o baixo custo, quando comparada a outros métodos. A PCR é atualmente uma técnica de biologia molecular amplamente difundida nos laboratórios de pesquisa, o que tem permitido um aumento significativo do conhecimento sobre a diversidade bacteriana e os genes.

Uma das variantes desta técnica molecular é a PCR em Tempo-Real (RT-PCR)⁶, a qual pode simultaneamente detectar e quantificar o produto amplificado, durante toda corrida, baseando-se na detecção e quantificação de um sinal fluorescente. O Sistema de PCR em Tempo-Real consta de um sistema óptico acoplado a um Termociclador, e uma estrutura de suporte informático especial (Hardware e Software). Uma vez finalizada a reação, o programa informático cria curvas de amplificação onde ficam refletidos os valores de fluorescência em cada ciclo de PCR, estabelecendo um valor de fluorescência umbral (*threshold*) na fase exponencial da amplificação. Para cada amostra é obtido um valor de CT (do inglês *Cycle Threshold*) correspondente ao número de ciclos nos quais a fluorescência cruza o umbral estabelecido, isto significa a quantidade de ciclos realizados pela PCR necessários para o início da amplificação da sequência em interesse. Assim, os valores de CT são inversamente proporcionais à quantidade de DNA da amostra, quanto maior é o número de ciclos, menor é o número de sequências alvo presentes em uma amostra determinada.

Dentro deste contexto, as vantagens do uso da técnica de PCR quantitativo (qPCR) em Tempo Real para biomonitoramento molecular na investigação de áreas impactadas por derivados de petróleo são: praticidade da análise, alta resolução de detecção, alta especificidade e rapidez (SILVA; ALVAREZ, 2004; SUBLETTE *et al.*, 2006; TAKAHATA *et al.*, 2006; FERIS *et al.*, 2008; SMITH; OSBORN, 2008).

⁶Abreviatura do inglês para Real Time Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) (HIGUCHI *et al.*, 1993 *apud* LOGAN; EDWARDS; SAUNDERS, 2009).

CAPÍTULO III

3 METODOLOGIA

Neste capítulo, caracteriza-se a área de estudo e descrevem-se as análises realizadas. Visto que o local onde foi desenvolvido este experimento de campo utilizou-se em trabalhos anteriores referidos ao combustível E10 (MONTEIRO RAMOS, 2010), a equipe técnica do Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas da Universidade Federal de Santa Catarina (REMAS-UFSC) vem realizando um monitoramento desta área desde 2009. Durante o período de 2010-2012, a autora deste trabalho teve participação, como membro desta equipe, nas análises físico-químicas da área E10, e foi quem desenvolveu integralmente todas as atividades relacionadas às análises moleculares realizadas neste mesmo período na área E10. Para atingir os dois primeiros objetivos, os dados resultantes das determinações físico-químicas, correspondentes à área em estudo, serão comparados com os de uma área experimental próxima, na qual se trabalhou com o combustível E24. Com base no terceiro objetivo deste trabalho, a avaliação dos microrganismos responsáveis pela degradação do E10 será realizada através de análises moleculares de amostras de água subterrânea.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O experimento foi realizado em escala real na Fazenda Experimental da Ressacada (área experimental II), localizada no Sul da Ilha de Santa Catarina, município de Florianópolis, no Bairro da Tapera (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Localização da Área de estudo.



FONTE: Adaptado de Google Earth (2011).

Considerando que o conhecimento profundo de uma área permite uma otimização das ações relacionadas a sua recuperação, no caso deste ambiente ser contaminado, uma descrição das características hidrogeológicas e hidrogeoquímicas da área de estudo é apresentada nos itens subsequentes.

3.1.1. Caracterização Hidrogeológica

A hidrogeologia do local de estudo é um fator importante na caracterização de uma área. Se a mesma tem sido impactada por contaminantes, possibilita a compreensão da velocidade e direção do fluxo da água subterrânea, assim como o destino e os mecanismos de transporte dos contaminantes dissolvidos. Do mesmo modo, esta informação é útil na configuração de uma área e para a interpretação futura dos resultados. A direção preferencial do fluxo da água subterrânea da área E10 foi calculada a partir da leitura dos níveis d'água dos poços de monitoramento ao redor da área experimental, do cálculo da carga potenciométrica de cada poço, da interpolação dos valores de carga potenciométrica e da utilização do Software *Surfer 8.0* para gerar um mapa de contorno da superfície a partir dos cálculos mencionados (MONTEIRO RAMOS, 2010). A Fazenda Experimental da Ressacada apresenta em sua região um aquífero livre, onde o escoamento da água subterrânea ocorre em várias direções devido à presença de águas superficiais e áreas de drenagem que servem como área de descarga do aquífero (LAGE, 2005). A determinação da condutividade hidráulica saturada (K) foi realizada pelo Laboratório de Estudos de Bacias da Universidade Estadual de São Paulo (LEBAC-

UNESP) através de testes de *Slug*⁷ no piezômetro PZ 02(E), localizado nas proximidades da área E10 (Figura 3.4) indicando um valor médio de $4,25E-4 \text{ cm.s}^{-1}$. A partir o valor de K, através da equação de Darcy, calcularam-se as variáveis gradiente hidráulico médio e velocidade da água subterrânea, obtendo-se os valores de 0,6% e 5,2-6,2 m.ano^{-1} respectivamente (COSTA, 2008). A geologia local da área é representada por sedimentos inconsolidados essencialmente arenosos, com predominância de areia fina em sua granulometria (LAGE, 2005).

3.1.2. Caracterização Hidrogeoquímica

A caracterização hidrogeoquímica da Área Experimental E10 foi realizada a partir de amostras de água subterrânea antes da liberação controlada da mistura E10. As variáveis foram selecionadas pela sua relevância na determinação de condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador, conforme as recomendações de Wiedemeier *et al.* (1999b), e são apresentadas na Tabela C1a (ANEXO C). Para isto, foram coletadas amostras de água subterrânea em cinco níveis de amostragem (2-6 m de profundidade), em 10 poços de monitoramento (P1B, P16A, P26A, P28, P30A, P4, P5B, P20A, P18 e a Fonte).

O detalhamento referente à coleta de amostras de águas subterrâneas, ao equipamento de amostragem e monitoramento e às determinações analíticas é apresentado nos itens 3.3.2 e 3.5.1.

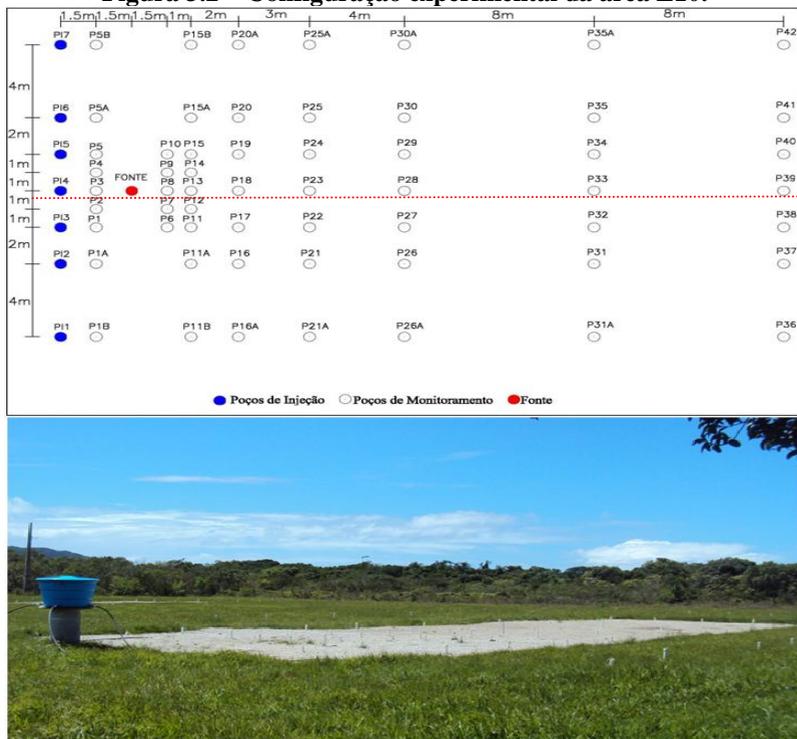
⁷ Testes de *Slug*: ensaio que consiste na inserção ou rápida retirada de um objeto de volume conhecido ao poço de monitoramento para a determinação da condutividade hidráulica (BEDIENT; RIFAI; NEWELL, 1994).

3.2 CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL

3.2.1. Instalação dos Poços de Monitoramento e Injeção

A área experimental possui uma extensão aproximada de 550 m² (30,5 m de comprimento e 18 m de largura). Para diminuir a influência da infiltração de água de chuva e evitar o crescimento de ervas ao redor, a área foi coberta com lona de 200 µm de espessura e brita de 5 mm de diâmetro. Foram instalados, inicialmente, 66 poços multinível, dos quais 65 encontram-se em funcionamento atualmente; 1 (um) poço se localiza na fonte, 6 (seis) correspondem a poços de injeção (PI) e os demais são poços de monitoramento da água subterrânea (PM). Os poços foram estabelecidos de acordo com a direção preferencial do fluxo da água subterrânea e distanciados de forma tal que permitisse o monitoramento do fluxo de massa do contaminante, o deslocamento da pluma de contaminação e a variação hidroquímica do aquífero (Figura 3.2). Em cada poço existem 5 (cinco) pontos de amostragem localizados a 2, 3, 4, 5 e 6 m de profundidade em relação à cota do terreno.

Figura 3.2 – Configuração experimental da área E10.

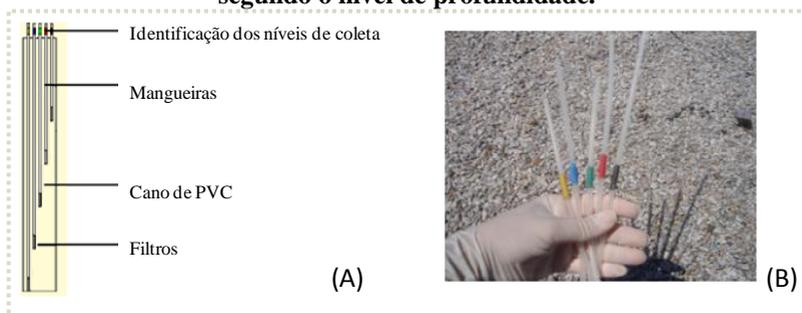


Nota: a linha tracejada vermelha representa a linha central da área E10.

A perfuração dos poços foi realizada por meio de um sistema de percussão com jato de água. Para isto, utilizou-se um gerador elétrico, uma bomba centrífuga de 0,5 HP, canos de PVC de 40 mm de diâmetro e 6 m de comprimento e água subterrânea extraída de um piezômetro próximo à área (MONTEIRO RAMOS, 2010). Os canos auxiliaram na instalação dos poços e, ao mesmo tempo, fornecem um suporte às mangueiras de monitoramento. Para evitar a contaminação das amostras, utilizaram-se mangueiras transparentes inertes e atóxicas de polietileno de baixa densidade (PEBD) com comprimentos respectivos às profundidades a serem monitoradas. No extremo superior das mangueiras, colocaram-se etiquetas de identificação por cores para os diferentes níveis de amostragem. Assim, as cores amarela, azul, verde, vermelho e preto se referem às profundidades 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente (Figura 3.3). No extremo inferior das mangueiras colocou-se um filtro de tela de aço inoxidável para evitar que a possível

ocorrência de entupimentos ou o excesso de sólidos finos prejudiquem as análises. Todos os PM foram protegidos do intemperismo com uma camisa de 0,5 m de tubo PVC de 2", para impedir o ressecamento e dano das mangueiras. Um esquema de um PM com o sistema de identificação dos níveis de amostragem, pode ser visualizado na Figura 3.3.

Figura 3.3 – (A) Ilustração dos níveis, suporte e filtros para cada poço de monitoramento (PM), (B) Sistema de identificação das mangueiras segundo o nível de profundidade.



O nível do lençol freático foi determinado através da leitura de piezômetros antes e depois da liberação do E10 (Tabela 3.1). A localização dos piezômetros pode ser visualizada na Figura 3.4.

Tabela 3.1 – Nível da água subterrânea ao redor da área de estudo.

ANTES DA LIBERAÇÃO DO E10		DEPOIS DA LIBERAÇÃO DO E10	
Piezômetro	Nível d'água	Piezômetro	Nível d'água
PZ 02 (E)	-1,643 m	PZ 02 (E)	-1,655 m
PZ 03 (E)	-1,491 m	PZ 03 (E)	-1,474 m
PZ 01	-1,386 m	PZ 01	-1,373 m
PZ 02	-1,738 m	PZ 02	-1,726 m
PZ 03	-1,652 m	PZ 03	-1,636 m
PZ 04	-0,955 m	PZ 04	-0,934 m
PZ 05	-1,489 m	PZ 05	-1,467 m
PZ 18	-1,127 m	PZ 18	-1,177 m

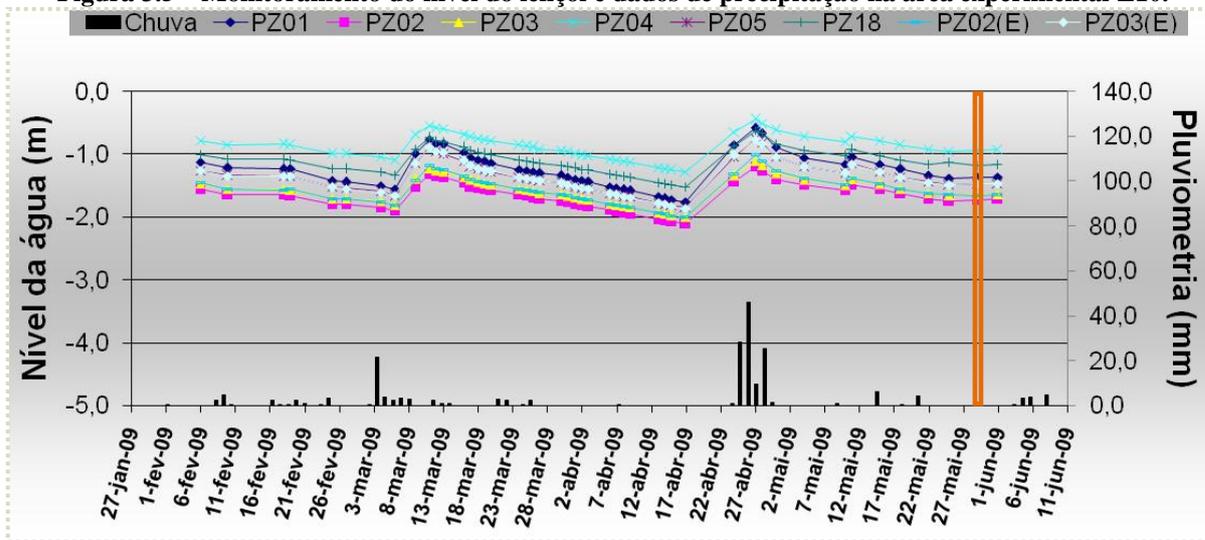
Figura 3.4 – Localização dos piezômetros utilizados na determinação do nível do lençol freático da área E10.



FONTE: Adaptado de Google Earth (2011).

O nível do lençol freático entre os dias da liberação do combustível variou entre 0,8-1,7 m aproximadamente, a partir da cota do terreno. Visto que a precipitação influencia diretamente a altura do nível do lençol, foram considerados os dados de precipitação da área experimental fornecidos pelo Departamento de Controle do Espaço Aéreo (DECEA) de Florianópolis que monitora o Ajardinado Meteorológico do Aeroporto Internacional Hercílio Luz, localizado a aproximadamente a 400 metros da área de estudo. As informações do nível do lençol e da pluviometria da área experimental antes da liberação do combustível E10 podem ser visualizadas na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Monitoramento do nível do lençol e dados de precipitação na área experimental E10.



FONTE: Dados de Pluviometria disponibilizados pelo Departamento de Controle do Espaço Aéreo de Florianópolis.

Nota: Destaque em laranja da data de liberação do E10 (26/05/2009).

Devido à intenção de um experimento prévio desenvolvido na área E10 em condições sulfato redutoras, após a instalação dos poços, foram feitas adequações ao aquífero local com relação ao pH e à concentração de sulfato (MONTEIRO RAMOS, 2010). A alteração das condições naturais do aquífero, na região da área experimental, foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu de uma injeção preliminar de sulfato de sódio e hidróxido de sódio, antes da liberação do produto E10. A segunda etapa consiste na adição dos produtos já mencionados com frequência semanal, e vem sendo realizada após a liberação do produto E10.

3.2.2. Liberação Controlada do Combustível E10 na Área Experimental

Uma vez alcançada a concentração de sulfato desejada, depois da primeira etapa de adequação, realizou-se uma liberação controlada do produto E10 (gasolina com 10% de etanol) na área experimental. A mistura foi feita manualmente (adicionando-se 10 litros de etanol anidro a 90 litros de gasolina pura) (MONTEIRO RAMOS, 2010).

Em 26 de maio de 2009, realizou-se o derramamento controlado de 100 L de uma mistura de gasolina e etanol a 10% (v/v) - biocombustível E10 na região da fonte (Figura 3.6). Junto com o combustível, foi despejada uma solução aquosa com brometo de potássio, hidróxido de sódio e sulfato de sódio. O brometo de potássio, por ser um composto recalcitrante, pode ser usado como traçador do fluxo da água subterrânea, bem como para estimar os parâmetros de transporte (advecção, dispersão, retardo) em uma pluma de contaminação (SCHREIBER; BAHR, 2002). Após a liberação do E10, a região da fonte foi preenchida com o próprio solo da fonte, e toda a área foi coberta com lona plástica de 200 μm de espessura, sobre a qual se colocou uma camada de brita de aproximadamente 5 mm de diâmetro, com o objetivo de diminuir a influência da infiltração direta da chuva e minimizar o crescimento da vegetação.

Figura 3.6 – Área da Fonte de contaminação. (A) abertura de 1,5 m², (B) solução com a mistura de brometo de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio, (C e D) liberação do combustível E10.



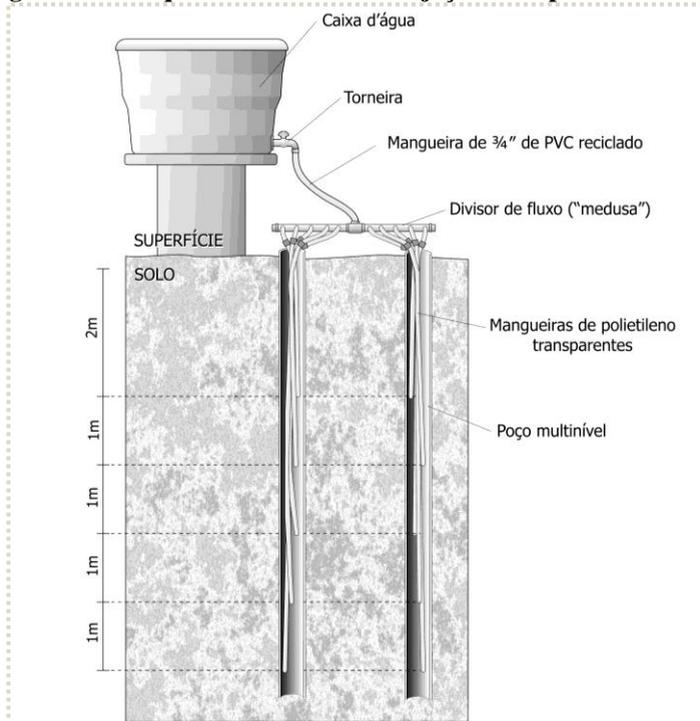
3.2.3. Sistema de injeção de sulfato

Considerando um possível cenário de contaminação com combustível E10 e em vistas a avaliar a influencia do etanol e do sulfato na biodegradação de compostos aromáticos em águas subterrâneas contaminadas foram feitas modificações na área de estudo para poder reproduzir *in situ*, de maneira mais fielmente possível, as características de aquíferos que possuem naturalmente sulfato. Para isso foram utilizados como base os dados de aquíferos americanos, os quais possuem uma concentração média de sulfato (SO_4^{2-}) de 100 mg.L^{-1} (REINHARD *et al.*, 1997; MACKAY *et al.*, 2006b) e pH em torno de 6 (seis). As massas de sulfato de sódio e de hidróxido de sódio a serem adicionadas semanalmente, para alcançar os valores pretendidos, foram determinadas a partir de um cálculo que considera a geometria do aquífero, a velocidade da água subterrânea e as concentrações requeridas (MONTEIRO RAMOS, 2010). Para o cálculo da massa de hidróxido de sódio (composto usado para corrigir o pH) considerou-se que o valor médio de pH da área original, aproximadamente 4,20 (Tabela C.1c - ANEXO C), representava um valor significativamente menor do que os

valores dos aquíferos americanos, pH 6-7. O resultado deste cálculo foi 1050 g de sulfato de sódio e 937 g de hidróxido de sódio (os detalhes dos cálculos mencionados, para o sulfato de sódio e hidróxido de sódio, encontram-se nos Anexos A e B, respectivamente).

A solução de injeção é preparada numa caixa d'água situada a 1,50 m de altura e apoiada sobre uma estrutura de cimento. Nesse recipiente são dissolvidos o sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e o hidróxido de sódio (NaOH) em 100 L de água. Três mangueiras de $\frac{3}{4}$ de diâmetro conectadas à caixa d'água, em um extremo, e aos divisores de fluxo (medusas), no outro extremo, distribuem e direcionam a solução aos 5 (cinco) níveis de cada PI. Os seis PI são injetados, simultaneamente, por gravidade através de um sistema de transporte que leva a solução desde a caixa d'água até as distintas profundidades de cada poço, conforme ilustra a Figura 3.7.

Figura 3.7 – Esquema do sistema de injeção do experimento E10.



FONTE: Adaptado de Monteiro Ramos (2010).

3.3 MONITORAMENTO

3.3.1. Campanhas de amostragem

Após a liberação controlada do E10, foram realizadas, no total, 6 (seis) campanhas de amostragem que incluem coletas e análises (em campo e em laboratório) de amostras de água subterrânea. A primeira ocorreu antes da liberação do produto E10, a modo de determinar as variáveis físico-químicas de referência do local (*background*). O tempo de duração de cada campanha variou conforme a quantidade de poços amostrados. As datas e os poços amostrados por coleta, após a liberação do E10, são descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Campanhas de amostragem: datas e poços amostrados por coleta.

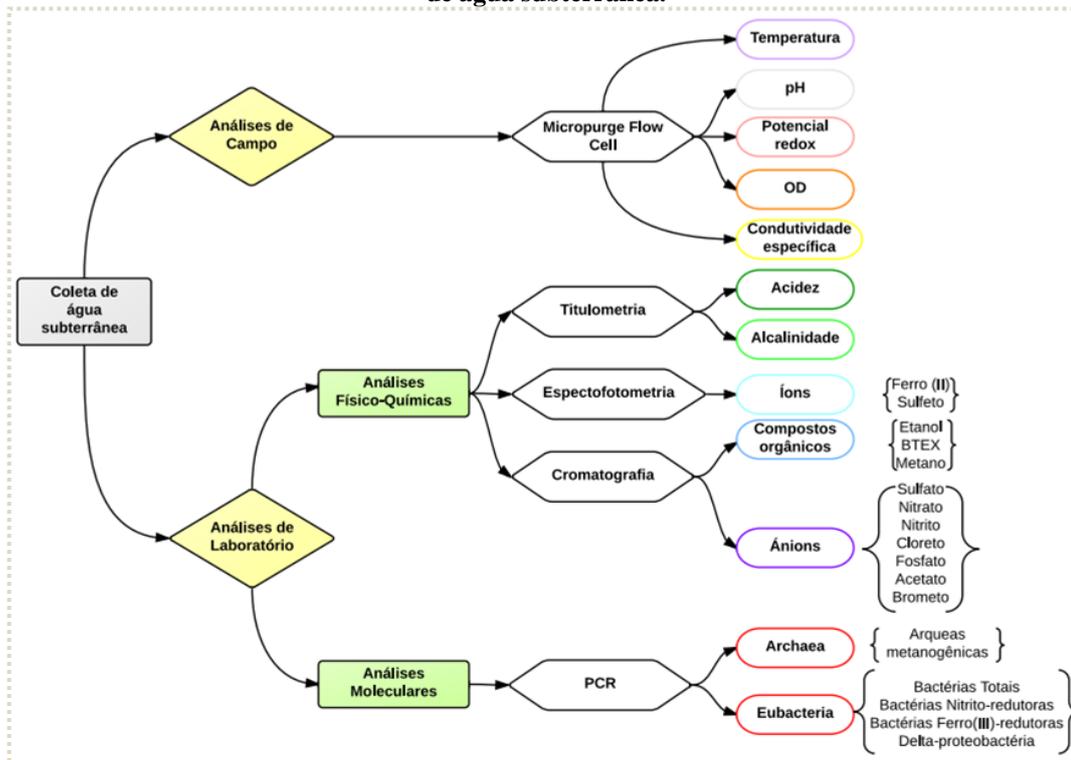
	Data	PM
1	Agosto 2009	4, 8, 13 e Fonte = 4 poços
2	Novembro 2009	1-25, 1A, 5A, 11A, 15A e Fonte = 30 poços
3	Maio 2010	1-25, 1A, 5A, 11A, 15A e Fonte = 30 poços
4	Fevereiro 2011	1-29, 1A, 5A, 11A, 15A e Fonte = 34 poços
5	Setembro 2011	1-30, 1A, 5A, 11A, 15A, 16A, 21A e Fonte = 37 poços
6	Maio 2012	1, 5-8, 10, 13, 14, 16, 18, 21, 23, 26, 28, 36, 21A, 26A e Fonte = 17 poços

3.3.2. Coleta de Amostras de Águas Subterrâneas, Equipamento de Amostragem e Monitoramento

Previamente às coletas, os equipamentos foram montados e calibrados em laboratório. Na coleta de água subterrânea foi utilizada uma bomba peristáltica *Millipore* modelo *Easy-Load*, 33-650 RPM, 0,35 HP, e mangueiras *Masterflex Tygon* (material inerte) para cada PM. Com exceção das variáveis OD, potencial redox, pH e temperatura, medidas em campo, as determinações das concentrações de etanol, BTEX, sulfato, sulfeto, nitrato, nitrito, cloreto, ferro (II), fosfato, acetato, metano e brometo, assim como as análises de acidez e alcalinidade e as determinações moleculares, foram realizadas em

laboratório a partir de amostras de água subterrânea coletadas nas cinco profundidades dos PM. Para isto, as amostras foram transferidas para frascos âmbar de 30 mL para a análise dos ânions, frascos âmbar de 250 mL para o ferro (II), sulfeto, acidez e alcalinidade, frascos de 40 mL para orgânicos voláteis e frascos âmbar de 1 L para as análises moleculares. Após a coleta, as amostras foram preservadas a uma temperatura entre 4 e 5°C. Na seguinte figura é apresentado um esquema resumindo as determinações analíticas realizadas a partir da coleta de água subterrânea.

Figura 3.8 – Fluxograma da metodologia implementada para as determinações analíticas a partir da coleta de água subterrânea.



3.4 ANÁLISES DE CAMPO

OD, Potencial Redox, pH e Temperatura

O oxigênio dissolvido, potencial redox, pH e temperatura foram medidos utilizando um analisador de água *Micropurge Flow Cell* modelo MP20-1380.

3.5 ANÁLISES DE LABORATÓRIO

3.5.1. Análises Físico-Químicas

Acidez e Alcalinidade

A determinação da acidez e da alcalinidade foi realizada mediante o método titulométrico, segundo o *Standard Methods* (APHA, 1992) - Métodos 2310B e 2320B respectivamente. Para estas análises foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 0,02 M e ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,01 M, peagâmetro da marca *ORION*, modelo 9107BN e bureta digital da marca *Brinkmann*. O ponto de viragem foi obtido através do monitoramento do pH da amostra durante a titulação (pH=8,3 para acidez carbônica e pH=4,3 para alcalinidade-bicarbonato). Os resultados foram expressos em mg CaCO₃.L⁻¹.

Íon Ferro (II) e sulfeto

Estas análises foram realizadas por espectrofotometria, segundo o método 3500-Fe D – método 1,10 fenantrolina para o Ferro (II), e o método colorimétrico 4500-S2-D- azul de metileno para sulfetos totais, de acordo com o *Standard Methods* (APHA, 1992). O equipamento é da marca *Hach* – modelo DR/2500 e os reagentes utilizados são: 1,10-fenantrolina e bicarbonato de sódio, para Ferro (II), e os reagentes 1 e 2 para o sulfeto; ácido sulfúrico/oxalato de N,N dimetil-p-fenilenodiamina e solução de azul de metileno respectivamente.

Ânions – Sulfato, Nitrato, Cloreto, Fosfato, Acetato e Brometo

Os ânions Sulfato (SO₄⁻²), Nitrato (NO₃⁻), Nitrito (NO₂⁻), Cloreto (Cl⁻), Fosfato (PO₄⁻³), Acetato (CH₃COO⁻), Brometo (Br⁻) foram analisados por cromatografia líquida (*Dionex* modelo ICS-1000), com

detector de condutividade, em regime isocrático. Este equipamento se encontra conectado a um computador *Pentium II* com Software *Chromeleon*, versão 6.4. Foi utilizada uma coluna AS22 (4 x 250 mm), uma supressora ASRS (*Anion Self-Regenerating Suppressor*) – Ultra II (4mm), um volume de injeção de 25 μL e uma condutividade de 20 μS . Como eluentes foram utilizadas uma solução 4,5 mM de carbonato de sódio e uma solução 1,4 mM de bicarbonato de sódio, a um fluxo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O método utilizado baseou-se no Método EPA/300.1 (US EPA, 1997b). Para a quantificação dos compostos de interesse, utilizou-se uma padronização externa, com curvas de calibração cujas concentrações variaram entre 0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os sais utilizados para a preparação das soluções padrões foram todos da marca *J.T.Baker* e a concentração das soluções individuais foi de 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Compostos orgânicos – Etanol, BTEX e Metano

As amostras foram coletadas em frascos de 40 mL e preservadas em pH inferior a 2, com ácido clorídrico (HCl 1:1). As determinações desses analitos foi realizada com um cromatógrafo a gás *Agilent* (modelo 6890 – série II), com *Headspace AutoSampler* estático (modelo 7694), equipado com detector por ionização em chama e coluna de sílica fundida 1 (metil siloxano) n° 19095z-123, com 0,53 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e espessura do filme de 2,65 μm . Este equipamento se encontra conectado a um computador *Pentium II* com Software *ChemStation*, versão A.10.02. O gás de arraste empregado foi o hélio, com fluxo de 7,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

As soluções-padrão para BTEX e etanol foram preparadas segundo o método EPA/8015A (US EPA, 1996). Para os BTEX, o padrão utilizado para a curva de calibração foi o UST Modified Gasoline Range Organics da *Supelco*, e para o etanol um reagente da indústria *J.T. Baker*, com 99,9% de pureza. A solução padrão para o metano foi preparada a partir de gás metano com 99,5% de pureza da empresa *White Martins*. Para esta última determinação, o gás metano é borbulhado dentro de um recipiente que contém água ultrapura até a obtenção o equilíbrio entre a fase gasosa e a fase aquosa. A partir dos dados de pressão parcial e constante de Henry, para o metano, foi possível calcular a concentração de metano na fase aquosa (STUMM; MORGAN, 1981). A programação da temperatura para as análises dos compostos orgânicos é descrita na Tabela 3.3 a seguir.

Tabela 3.3 – Programação para as análises de compostos orgânicos

Analito	Taxa de aquecimento (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo de permanência da temperatura (min)
BTEX	-	70	2
	5	120	0
	30	210	0
Etanol	-	70	2
	5	120	0
	30	210	0
Metano	-	40	3
	30	250	2

Limites de detecção

Para a determinação das variáveis físico-químicas, cada metodologia específica apresenta distintos limites de detecção (LD). Os valores de LD considerados neste trabalho são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Valores operacionais usados como Limites de Detecção para as análises físico-químicas.

Variáveis	Limite de detecção
Acidez	1 mg.L ⁻¹
Alcalinidade	1 mg.L ⁻¹
Oxigênio dissolvido	0,5 mg.L ⁻¹
Sulfato	0,1 mg.L ⁻¹
Sulfeto	5 µg.L ⁻¹
Nitrato	0,1 mg.L ⁻¹
Nitrito	0,1 mg.L ⁻¹
Cloreto	0,1 mg.L ⁻¹
Ferro (II)	0,01 mg.L ⁻¹
Fosfato	0,1 mg.L ⁻¹
Acetato	0,1 mg.L ⁻¹
Metano	10 µg.L ⁻¹
Brometo	0,1 mg.L ⁻¹
BTEX	1 µg.L ⁻¹
Etanol	1 mg.L ⁻¹

3.5.2. Análises Moleculares

Foi utilizada a técnica de RTQ-PCR, cujo fundamento teórico foi descrito no item 2.5.3 da Revisão Bibliográfica. Os passos que foram subsequentemente realizados para as determinações moleculares são explicitados a continuação:

Filtração das amostras

A técnica molecular requer primeiramente a extração de material biológico presente nas amostras, neste caso DNA de microrganismos. Para isto, coletaram-se amostras de 1L de água subterrânea, em frascos

âmbar (BALDWIN; NAKATSU; NIES, 2008), mantidas a uma temperatura entre 4 e 5°C. As amostras foram logo submetidas a uma filtração à vácuo, utilizando, para isto, kitasato, bomba à vácuo e membrana filtrante da marca *Millipore* de 0,22 µm (Figura 3.9). Para os posteriores cálculos de biomassa, foram registrados tanto o peso do material que ficou retido no filtro quanto o volume filtrado para expressar os resultados em número de genes por grama e/ou por litro (unidades de massa e/ou volume) (FERIS *et al.*, 2008).

Figura 3.9 – Sistema de filtração a vácuo



Extração de DNA

Após a filtração das amostras de água subterrânea foi realizada a extração do DNA de microrganismos presentes nas amostras de águas subterrâneas, de acordo com as recomendações do kit de extração de *DNA MOBIO Power Soil TM kit* (Carlsband, CA). O processo de extração de DNA é realizado pela ação conjunta de soluções químicas específicas e procedimentos físicos de centrifugação e filtração. Para isto é utilizado um kit de extração que consta de uma série de soluções e materiais específicos para os diversos passos envolvidos neste processo (Figura 3.10).

Figura 3.10 – Kit de extração de DNA

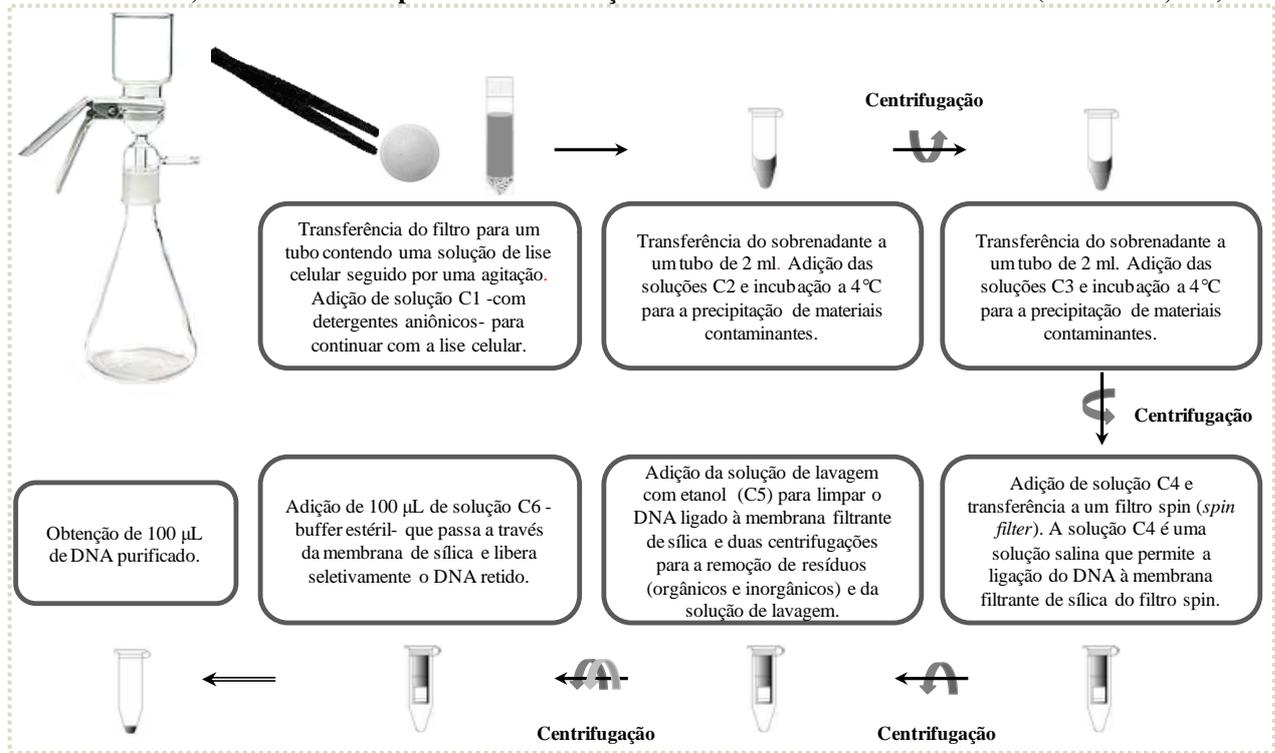
Os filtros onde ficou retido o material das amostras de água subterrânea foram colocados em tubos especiais (*PowerBead Tube*), que contêm uma solução tampão que contribui na dispersão das partículas do solo e na dissolução de ácidos húmicos protegendo os ácidos nucleicos da degradação. O seguinte passo consistiu numa homogeneização rápida e completa e uma posterior lise celular, pela ação de métodos mecânicos e químicos. Para isso, foi realizada uma agitação mecânica e adicionada a solução C1 do kit que possui reagentes como o Dodecil sulfato de sódio (SDS) que é um detergente aniônico necessário para quebrar lipídeos.

Na etapa seguinte foram adicionadas as soluções C2 e C3 para a precipitação de substâncias inorgânicas e orgânicas - como proteínas e ácidos húmicos - com a finalidade de obter um DNA com maior nível de pureza. Para poder isolar o DNA purificado na etapa anterior, utilizaram-se filtros spin, dispositivos específicos contendo uma membrana de sílica filtrante –*spin filter*–. Como o DNA se liga especificamente à sílica em altas concentrações de sal, numa quarta etapa, foi adicionada a solução C4 que consiste numa solução salina concentrada, permitindo assim a ligação específica do DNA à membrana do filtro. Posteriormente, foi utilizada uma solução de lavagem a base de etanol –solução C5– para limpar o DNA que está ligado à membrana filtrante de sílica, retirando o sal residual e outros contaminantes. Após a adição dessa solução são realizadas mais duas centrifugações para remover resíduos orgânicos e inorgânicos e para remover a solução de lavagem residual, a qual poderia interferir em aplicações posteriores como o procedimento de PCR. Por último adicionou-se a solução C6 do kit, que é um buffer estéril que passa

através da membrana de sílica do filtro, como eluente, permitindo assim a liberação seletiva do DNA que estava preso nela. Posteriormente ao processo de extração, aproximadamente 100 μ L de DNA foram coletados e mantidos em tubos de 2 mL (*Eppendorf*), os quais foram subsequentemente armazenados em freezer (-20°C , *MidSci*) para a posterior análise em PCR quantitativo (*BROW et al.*, 2010).

Um resumo das atividades relacionadas ao processo de extração do DNA podem se observar na Figura 3.11.

Figura 3.11 – Resumo das atividades próprias da extração de DNA a partir da filtração das amostras de água subterrânea, de acordo com o protocolo de extração DNA MOBIO Power Soil™ kit (Carlsband, CA).



Tanto a filtração como a extração de DNA e a montagem das placas de PCR foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunobiologia e Parasitologia – MIP, do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

PCR Quantitativo em Tempo Real

Para o estudo das comunidades microbianas associadas aos processos de degradação dos combustíveis, na área experimental, utilizou-se a técnica molecular de reação em cadeia da enzima Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), descrita no item 2.5.3. Para isto, analisou-se quantitativamente o número de genes para Bactérias totais, nitrito-redutoras (*nirS*), ferro(III)-redutoras (*Geobacter*), Bactérias sulfato-redutoras da Classe Delta-proteobactérias e Arqueas metanogênicas presentes em amostras de água subterrâneas. Além disso, determinou-se a presença do gene catabólico que codifica a expressão da enzima *bssA* (benzil-succinato sintase), a qual está relacionada com a degradação anaeróbia de tolueno e xileno em condições anaeróbias (BELLER *et al.*, 2002). Tais grupos microbianos, taxonômicos e funcionais, foram escolhidos com base em estudos que relatam sua associação com a biodegradação anaeróbica de hidrocarbonetos, o que permite avaliar as características das interações entre doador-receptor de elétrons (PIFFNER *et al.*, 1997; ULRICH; EDWARDS, 2003; SILVA; ALVAREZ, 2004; ALFREIDER; VOGT, 2007; MUYZER; STAMS, 2008). As bactérias pertencentes à subunidade Delta das Proteobactérias estão associadas ao processo de ferro(III)- e sulfato-redução, enquanto que as bactérias do gênero *Geobacter* estão associadas exclusivamente ao processo de ferro(III)-redução, como já foi mencionando no item 2.3.3.

Para a análise de RT-PCR foi feita uma mistura de reagentes ou *Master Mix* com o DNA extraído das amostras, iniciador senso (*Forward*) (5' - 3') e anti-senso (*Reverse*) (3' - 5'), água estéril, solução tampão (com o corante SYBR® Green I PCR Master Mix ou TaqMan® Universal PCR Master Mix, dependendo dos iniciadores utilizados (Tabela 3.5) e sonda de oligonucleotídeos, no caso de utilização do corante TaqMan.

Tabela 3.5 – Tipos e sequências de oligonucleotídeos dos iniciadores utilizados nas análises microbiológicas.

Alvo	Sequência	Corante	Bactéria padrão ^a	Referência
Bactérias totais	5'-CGGTGAATACGTTCCCTCGG-3' (BACT1369- F) 5'-GGATTACCTTGTTACGACTT-3' (PROK1492- R) FAM-5'CTTGTACACACCCGCCGTC3'-BHQ-1 (TM1389F) Sonda	TaqMan	<i>Pseudomonas aeruginosae</i> DSM 50071	Suzuki <i>et al.</i> (2000).
Bactérias nitrato-reduzidoras (<i>nirS</i>) ^b	5'-CCTACTTGCCGCCAGCAAGT-3' (NIRS1- F) 5'-CGTTGAACTTAGCCGGT-3' (NIRS6- R)	SYBR Green I	<i>Pseudomonas aeruginosae</i> DSM 50071	Braker <i>et al.</i> (1998).
Bactérias ferro(III)-reduzidoras <i>Geobacter</i>	5'-GCGTGTAGGCGGTTTCTTAA-3' (561- F) 5'-TACCCGCAGACACCTAGTTCT-3' (825- R)	SYBR Green I	<i>Geobacter metallireducens</i> DSM 7210	Stults <i>et al.</i> (2001).
Delta-proteobactérias	5'-AAGCCTGACGCAGCCAA-3' (361- F) 5'-ATCTACGGATTTCACTCCTACA-3' (685- R)	SYBR Green I	<i>Geobacter metallireducens</i> DSM 7210	Stults <i>et al.</i> (2001).
Gen <i>bssA</i>	5'-GTGCCCCATGATGCGCAGC-3'(F) 5'-CGACATTGAACTGCACGTGAGTCG-3'(R)	SYBR Green I	<i>Geobacter metallireducens</i> DSM 7210	Beller <i>et al.</i> (2008).
Arqueas metanogênicas	5'-CGGTGAATACGTCCCTGC-3' (ARCH11369- F) 5'-AAGGAGGTGATCCTGCCGCA-3' (PROK1541- R) FAM-5'CTTGTACACACCCGCCGTC3'-BHQ-1 (TM1389F) Sonda	TaqMan	<i>Methanococcus maripalludis</i> DSM 2067	Suzuki <i>et al.</i> (2000).

Nota: **F** e **R** correspondem aos iniciadores senso e anti-senso respectivamente (do inglês *forward* e *reverse*). ^a Especificação do tipo de microrganismo utilizado como padrão para a curva de calibração. DSM, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen* (abreviação para Coleção Alemã de Microrganismos).^b A ocorrência dessas bactérias foi estimada a partir da detecção de bactérias nitrato-reduzidoras (gene *nirS*) (BRAKER; FESEFELDT; WITZEL, 1998; SILVA; JOHNSON; ALVAREZ, 2007).

As quantidades de cada reagente variam de acordo com a análise que se deseja realizar e são calculadas de acordo com o número de amostras (em triplicata), o branco (água estéril) e a curva de calibração (diluições a partir da bactéria padrão correspondente) para um volume final de 23 μL de Mix de reagentes (SILVA; ALVAREZ, 2004). Para uma determinação a partir de 5 (cinco) amostras da Fonte, por exemplo, dos 5 níveis de profundidade, os cálculos tem que considerar os seguintes valores:

- Fonte n.2, Fonte n.3, Fonte n.4, Fonte n.5 e Fonte n.6, em triplicata = **subtotal de 15.**
- Branco, em triplicata = **subtotal de 3.**
- Curva de calibração a partir de diluições da concentração original da bactéria padrão correspondente: -1, -2, -3, -4, -5 e -6 = **subtotal de 6.**

Assim, tendo um total de 24 reações, podemos fazer os cálculos dos reagentes para o Mix da PCR multiplicando o número de amostras pelo volume de cada reagente. Como os tubos retêm um pequeno volume de líquido, que é difícil de ser extraído totalmente, os cálculos são realizados para um total de 25 (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Quantidades dos reagentes para o Mix da PCR

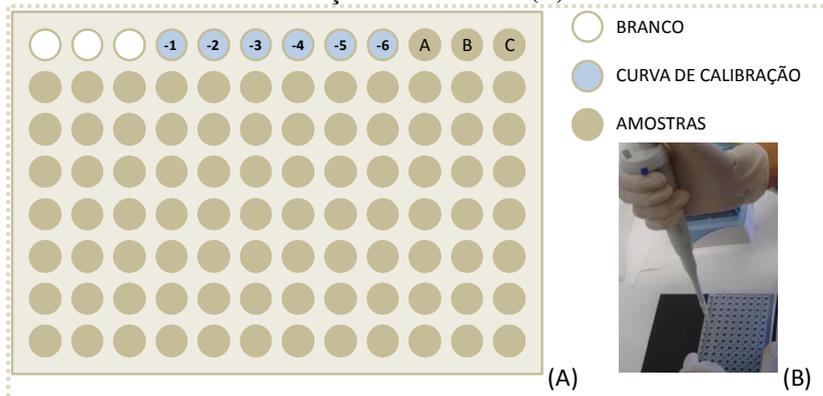
Reagentes	Volume (μL)	Número de amostras	Total
Água	9,875	25	246,88
Solução tampão	12,5	25	312,5
Iniciador senso (<i>forward</i>)	0,25	25	6,25
Iniciador anti-senso (<i>reverse</i>)	0,25	25	6,25
Sonda	0,125	25	3,125
			575

Nota: Para o caso de reações com SYBR Green I como corante, o qual não precisa de sonda, se completa o volume correspondente com água estéril ($9,875 + 0,125 = 10 \mu\text{L}$).

O volume total da reação, ou seja, o volume adicionado em cada poço da placa foi de 25 μL : 23 μL próprios do *Master Mix* e 2 μL do

DNA da amostra (SILVA; ALVAREZ, 2004). As reações de quantificação foram realizadas em placas contendo poços para 96 reações (Figura 3.12).

Figura 3.12 – Esquema da Placa utilizada para a reação de PCR (A), colocação das amostras (B).



A técnica molecular RTQ-PCR foi conduzida no Laboratório REMAS do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, que conta com a infra-estrutura requerida para o desenvolvimento desta técnica. Para isto, utilizou-se o Sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7000 (*Applied Biosystem*) e o software *Realplex* (Figura 3.13).

Figura 3.13 – Sistema integrado para PCR em Tempo Real.



A programação para as análises de PCR realizou-se a partir das seguintes condições de temperatura e tempo: 50°C durante 2 minutos com o objetivo de ativar a atividade da enzima DNA Polimerase; 95°C durante

10 minutos para o a desnaturação do DNA e o anelamento dos iniciadores na fita molde de DNA e finalmente, para o processo de extensão do DNA, foram programados 40 e 55 ciclos, para TaqMan (Figura 3.14) e SYBR Green I (Figura 3.15), respectivamente, a 95°C por 15 s e 58°C durante 1 minuto. Nos casos em que foi utilizado SYBR Green I, posteriormente a série de passos mencionados, acrescentou-se uma curva de fusão (*melting curve*) a 95°C por 15 s; 60°C por 15 s, seguido por 20 min de aquecimento e finaliza com 95°C por 15s (BELLER *et al.*, 2002; SILVA; ALVAREZ, 2004).

Figura 3.14 – Programação de temperatura para as análises de PCR utilizando TaqMan.

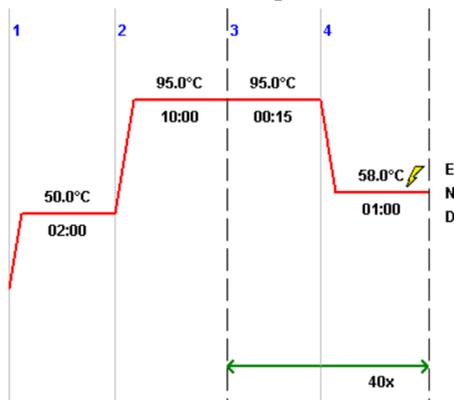
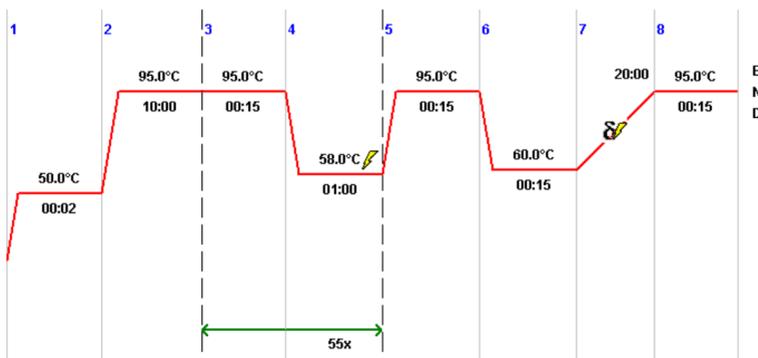


Figura 3.15 – Programação de temperatura para as análises de PCR utilizando SYBR Green I.



Curva Padrão e Análises de CT para quantificação

A quantificação das cópias de gene de cada amostra baseou-se nos valores de CT (média de três repetições analítica,) gerados pela RT-PCR, os quais são logo comparados com uma curva de calibração obtida a partir de organismos padrão (bactérias cuja concentração de DNA é conhecida) (Tabela 3.5). Para isso, diluições em série de 10^{-1} a 10^{-6} , a partir da concentração inicial do DNA da bactéria padrão de culturas de microrganismos específicos, foram usadas.

Para expressar a concentração de DNA da amostra (cópias de gene. μL^{-1}) foi utilizada a Equação 4 (SILVA; ALVAREZ, 2004; SUBLETTE *et al.*, 2006).

$$\frac{\text{Cópias de gene}}{\mu\text{L}} = \left[\frac{\left(\frac{\mu\text{gDNA}}{\mu\text{L}} \right)}{\left(\frac{\text{bp}}{\text{genoma}} \right)} \times \left(\frac{9.1257 \times 10^{14} \text{bp}}{\mu\text{gDNA}} \right) \times \text{cópias de gene/ genoma} \right]$$

Equação 4

A equação anterior permite calcular o número de cópias de gene por ml de amostra, a partir da adoção de critérios em relação à concentração do DNA padrão, tamanho e número de cópias de gene por genoma para os diferentes grupos bacterianos analisados. Os valores utilizados estão descritos na Tabela 3.7. Assumimos o tamanho do genoma (bp.genoma^{-1}) a partir do banco de dados disponível em <<http://www.genomesonline.org>> e os números de cópias do gene por genoma para as curvas padrão a partir da informação disponível em: <<http://ribosome.mmg.msu.edu/rndb/search.php#strain>> (SILVA; ALVAREZ, 2007; DOMINGUEZ *et al.*, 2008; KAZY *et al.*, 2010).

Tabela 3.7 – Critérios utilizados na quantificação do DNA presente nas amostras de água subterrânea para os distintos microrganismos analisados.

Alvo	Concentração inicial do DNA da bactéria padrão ($\mu\text{g DNA}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	Tamanho dos microrganismos ($\text{bp}\cdot\text{genoma}^{-1}$)	Cópias de gene per genoma
Bactérias totais	0,1095	6,6 E+06	4
Bactérias nitrito-redutoras (<i>nirS</i>)	0,1095	6,6 E+06	4
<i>Geobacter</i>	0,1095	4,01 E+06	2
Delta-proteobactérias	0,1095	4,01 E+06	2
<i>Gen bssA</i>	0,1095	4,01 E+06	2
Arqueas metanogênicas	0,1095	1,8 E+06	3

Para poder expressar os resultados em cópias de gene por grama de Sólidos Suspensos Totais (SST) de água subterrânea (cópias de gene.g⁻¹), a partir do DNA extraído do sólido filtrado de amostras de água subterrânea, registrou-se o peso dos filtros antes e depois da filtração das amostras (FERIS *et al.*, 2008). A partir da Equação 4, os resultados expressos em número de cópias de gene.µL⁻¹ foram divididos por 2 (dois) µL de DNA, correspondentes ao volume de DNA utilizado para realizar cada reação da PCR, e multiplicado logo por 100, considerando que para cada filtro saturado com SST de amostras de água subterrânea foi extraído 100 µL de DNA de acordo com as especificações do protocolo de extração.

$$\left(\frac{\text{Cópias de gene}}{\text{g SST}}\right) = \left(\frac{\text{Cópias de gene}}{2 \mu\text{L de solução com DNA}}\right) \cdot \left(\frac{100 \mu\text{L de solução com DNA}}{\text{gSST}}\right)$$

Equação 5

A menor concentração de DNA que pode ser detectada nas determinações moleculares é representada através do limite de detecção (LD). Este valor foi calculado segundo os parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Equação 6

Onde *s* é a estimativa do desvio padrão estimado da resposta e *S* é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. Para a definição do LD dos distintos grupos microbianos analisados, foi realizada uma curva de calibração a partir das bactérias padrão descritas na Tabela 3.5. Os valores de LD calculados para bactérias totais, bactérias redutoras de nitrito (*nirS*), bactérias do gênero *Geobacter*, bactérias da Classe Delta-proteobactérias e Arqueas metanogênicas foram: 3,4E+02, 1,2E+03, 1,3E+03, 8,7E+02 e 1,0E+03 cópias de gene . g de SS⁻¹, respectivamente.

3.6 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS COMPOSTOS

A análise da distribuição espacial dos contaminantes pode ser realizada por meio de programas computacionais que criam mapas probabilísticos. Esses programas trabalham com dados do tipo XYZ a partir das posições espaciais de pontos obtidos no campo, por exemplo, onde as coordenadas são os valores X, posição do ponto no eixo da ordenada leste-oeste, e Y, posição na abscissa norte-sul, e Z é o valor observado da variável nesse ponto. A partir das coordenadas do ponto e dos valores assumidos pela variável nesses pontos, pode-se obter um mapa de distribuição espacial para cada variável, utilizando-se um algoritmo de interpolação (MACKAY *et al.*, 2006b). As análises da distribuição espacial de Oxigênio dissolvido, brometo, etanol e BTEX totais, realizaram-se com o programa *Surfer* 8.0, por meio de mapas probabilísticos, com adoção do método de interpolação de mínima curvatura. A análise da distribuição espacial dos compostos mencionados levou em consideração a variação das concentrações de OD e brometo em diferentes níveis de profundidade na direção predominante do fluxo subterrâneo, num corte vertical, ao longo do tempo. Desta forma, é possível avaliar-se a condição redox predominante (aeróbia ou anaeróbia), assim como avaliar o comportamento dos contaminantes (etanol e BTEX totais) em relação ao traçador brometo, nas diferentes profundidades, ao longo do tempo.

3.7 CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DOS BTEX

Para a determinação da taxa de biodegradação do benzeno e do tolueno, utilizou-se a Equação 3, exposta, primeiramente, na seção 2.4.2 da Revisão Bibliográfica. Esta equação envolve o uso de uma relação de decaimento exponencial, seguindo um modelo de primeira ordem, e constitui uma das expressões mais amplamente utilizadas para o caso específico de hidrocarbonetos dissolvidos em águas subterrâneas (WIEDEMEIER *et al.*, 1999a, COZARELLI *et al.*, 2010; KAO *et al.*, 2010):

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

A análise de regressão para a obtenção do k foi realizada considerando um intervalo de 95% de confiança. Para poder comparar a degradação do benzeno e tolueno em ambas as áreas comparadas, as constantes de atenuação dos hidrocarbonetos aromáticos, por meio da

foram transformadas em tempo de meia vida ($t_{1/2}$), por meio da Equação 7, que é um parâmetro indicador do tempo necessário para que a concentração inicial de um substrato caia à metade do valor inicial (CHAPRA, 2008):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Equação 7

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados aqui apresentados indicam as principais considerações para avaliar a influência do etanol e da presença de sulfato na biodegradação de compostos aromáticos em águas subterrâneas contaminadas com uma mistura de gasolina e etanol.

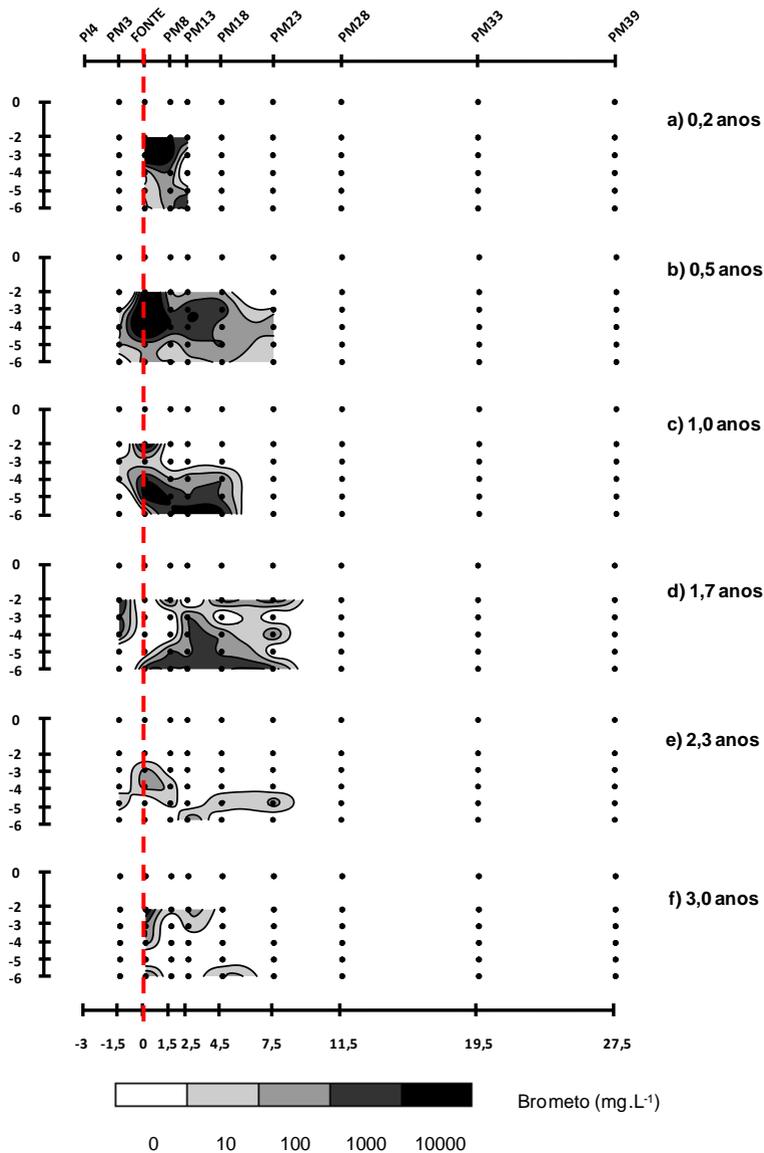
4.1 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO ETANOL, BTEX TOTAIS, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E BROMETO

Na maioria das campanhas de coleta/análise na área sob Bioestimulação com Injeção de Sulfato (BIS) foram monitorados, ao menos, 30 poços (Tabela 3.2). No entanto, para a apresentação dos resultados de distribuição dos contaminantes, foram considerados apenas os poços que representam a direção da linha central da pluma de compostos dissolvidos, de acordo com a direção principal do fluxo da água na área E10 (Figura 3.2). Desta maneira realizou-se uma análise da distribuição vertical dos compostos de interesse a partir das concentrações medidas/determinadas nos seguintes poços de monitoramento: PM3, FONTE, PM8, PM13, PM18, PM23, PM28, PM33, PM39. Nas Figuras 4.1 a 4.4, a seguir, são mostradas as distribuições espaciais do brometo, etanol, BTEX totais e OD ao longo do tempo.

O comportamento do traçador, neste estudo, foi utilizado para se comparar a extensão da migração dos compostos orgânicos que sofrem os efeitos de biodegradação e sorção. A distribuição do traçador brometo na água da Ressacada, em todos os períodos de amostragem, revela um deslocamento contínuo da pluma (Figura 4.1), o que era esperado, já que o brometo não é biodegradável e não adsorve na matriz do solo. Devido a sua natureza recalcitrante, a diminuição da concentração do brometo ao longo do tempo é devido a processos de transporte advectivo e/ou dispersivo, registrando-se, na linha principal da pluma, concentrações acima de 1mg.L^{-1} até sete metros a partir da fonte de contaminação (Figura 4.1). No PM28, situado a 11,5 metros da fonte de contaminação, as concentrações do brometo estiveram abaixo do limite de detecção (menos de $0,1\text{mg.L}^{-1}$), entretanto, aos 1,7 anos, as concentrações de brometo no PM29 n=2, localizado a dois metros do PM28, na mesma linha (a 11,5 metros da fonte) foram de $8,3\text{mg.L}^{-1}$

demonstrando a chegada de brometo. Tendo em vista que os poços amostrados coleta trás coleta dependem dos resultados das medições prévias, e, como ilustra a Figura 4.1, o brometo não se encontrou em concentrações acima ou iguais a 10 mg.L^{-1} mais do que 11,5 metros, aproximadamente, não foram realizadas coletas na linha 19,5 metros após a liberação do combustível.

Figura 4.1 – Variação das concentrações de brometo na área de BIS-E10, em diferentes níveis de profundidade, ao longo do tempo.

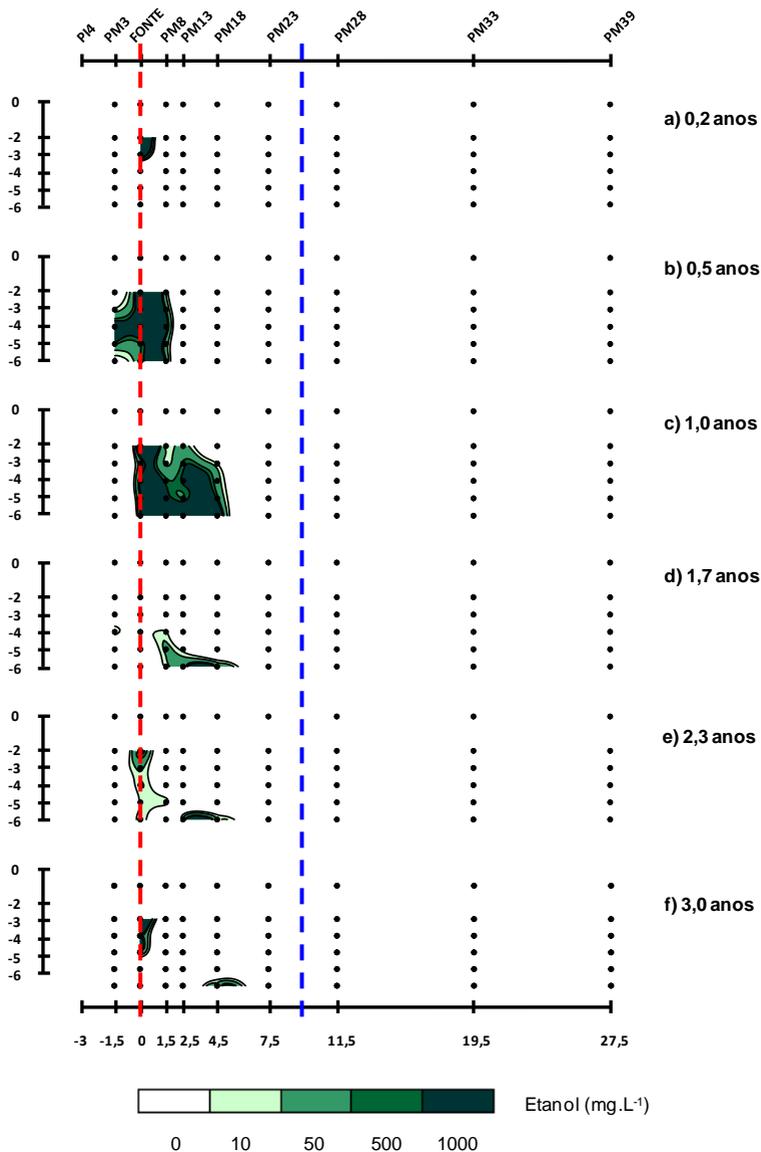


Nota: Todas as distâncias são dadas em metros. A linha tracejada vermelha mostra a posição da Fonte de contaminação.

As plumas de contaminantes, etanol e BTEX totais, espalharam-se pela área alcançando um comprimento máximo de aproximadamente 6,5 metros (Figura 4.2 e Figura 4.3). As maiores concentrações observaram-se 1 ano após a liberação do combustível E10. Em comparação ao comportamento do brometo, a diminuição da concentração de etanol e dos BTEX foram ocasionados não apenas pelos processos de transporte, mas, também, pelos processos de biodegradação.

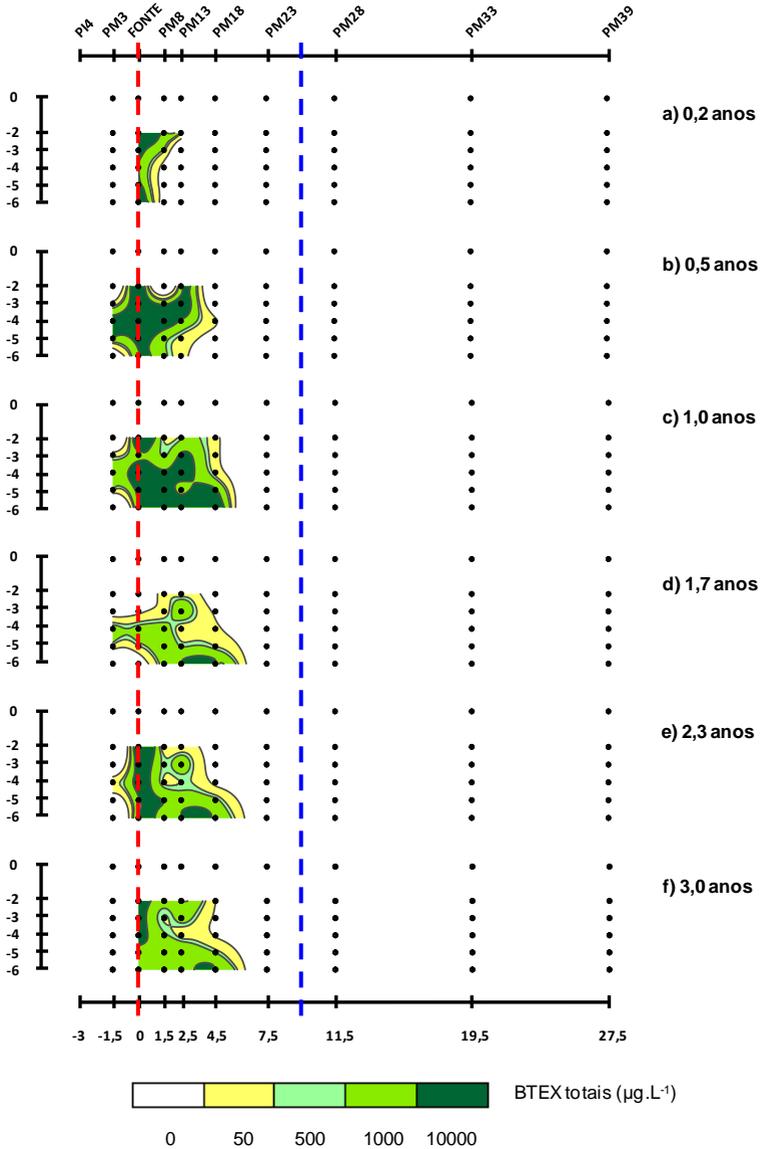
As porções diluídas e extremas da pluma de ambos os contaminantes coincidem com regiões de alta concentração de OD (Figura 4.4) onde as condições aeróbias podem ter sido restabelecidas. Pode-se observar que na quarta coleta (fevereiro de 2011) há um predomínio de valores de concentração mais baixos de BTEX totais. Este comportamento da pluma de contaminação pode ter sido em decorrência da alta precipitação, no mês prévio a dita coleta, quando foram anotadas as maiores intensidade do período de estudo (Figura A1, APÊNDICE A). Este efeito de diluição de compostos hidrocarbonados por precipitação, já tem sido reportado em experimentos de campo, a partir de evidentes registros de redução nas concentrações dos compostos presentes em águas subterrâneas (SWEED; BEDIANT; HUTCHINS, 1996; WIEDEMEIER *et al.*, 1996; AZADPOUR-KEELEY, RUSSELL, SEWELL, 1999; LEE *et al.*, 2001).

Figura 4.2 – Variação das concentrações de etanol na área de BIS-E10, em diferentes níveis de profundidade, ao longo do tempo.



Nota: Todas as distâncias são dadas em metros. A linha tracejada vermelha mostra a posição da Fonte e a linha tracejada azul mostra a máxima extensão do brometo.

Figura 4.3 – Variação das concentrações de BTEX totais na área de BIS-E10, em diferentes níveis de profundidade, ao longo do tempo.

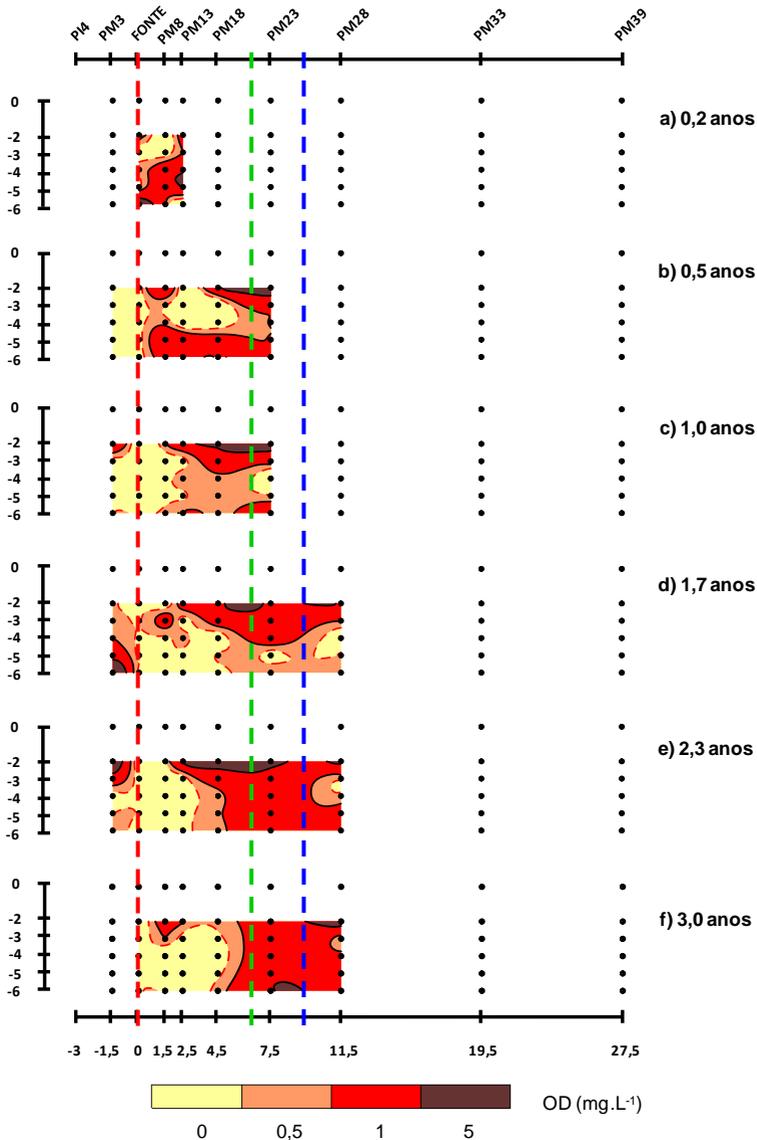


Nota: Todas as distâncias são dadas em metros. A linha tracejada vermelha mostra a posição da Fonte e a linha tracejada azul mostra a máxima extensão do brometo.

Conforme as plumas de contaminação de ambos os contaminantes foram se espalhando, as concentrações de oxigênio dissolvido diminuíram ao longo da linha principal da área, sendo possível observar uma tendência geral ao estabelecimento progressivo de condições anaeróbias. Como critério para distinguir zonas aeróbias e anaeróbias utilizou-se o valor de OD igual a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (WIEDEMEIER, 1999a), isto é, concentrações acima desse valor representam zonas aeróbias e abaixo do mesmo representam zonas anaeróbias (área clara delimitada pela linha pontilhada vermelha, na Figura 4.4). No entanto, este comportamento tem sido interrompido, periodicamente, pela entrada de oxigênio a partir de eventos de precipitação, o que se torna mais evidente no menor nível de profundidade (2 metros). O OD incorporado por recarga, através da precipitação atmosférica, é rapidamente utilizado pelo processo de degradação aeróbia (CHAPELLE *et al.*, 1996). Neste sentido, amostras de água de poços localizados dentro da pluma de contaminação caracterizaram-se por possuir concentrações de OD baixas quando comparadas com as concentrações antes da liberação do combustível E10 (Tabela C.1a - ANEXO C) ou em comparação com amostras de água provenientes de poços localizados fora da pluma de contaminação.

As diferenças temporais no tamanho da área amostrada referem-se ao número crescente de pontos de amostragem ao longo do tempo (Tabela 3.2).

Figura 4.4 – Variação das concentrações de oxigênio dissolvido na área de BIS-E10, em diferentes níveis de profundidade, ao longo do tempo.



Nota: Todas as distâncias são dadas em metros. A linha tracejada vermelha mostra a posição da Fonte, a linha tracejada verde mostra a máxima extensão da pluma de contaminantes e a linha tracejada azul mostra a máxima extensão do brometo.

4.2 INFLUÊNCIA DO ETANOL NA BIODEGRADAÇÃO DOS BTEX

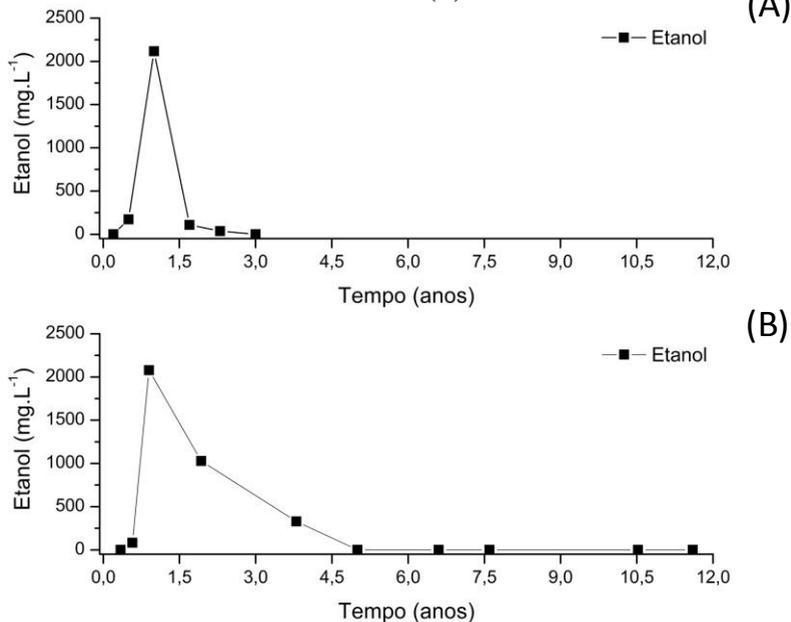
Visando estudar mais detalhadamente a influência do etanol na degradação dos BTEX, foram examinados os dados de todos os PM à jusante da fonte de contaminação, em todas as coletas da área E10. Foi realizada uma somatória das concentrações em todos os níveis de cada PM, ao longo do tempo e escolheu-se o poço e o nível que registrou as maiores concentrações de etanol e BTEX totais. Examinaram-se também os dados de concentração de uma área experimental próxima à área E10, que corresponde a um experimento de campo sobre Atenuação Natural Monitorada, isto é, sem aplicação de tecnologias de bioestimulação, onde foram liberados, em forma controlada, 100 L de gasolina comercial brasileira contendo 24% de etanol⁸. Os experimentos de Atenuação Natural Monitorada com E24 e Bioestimulação com Injeção de Sulfato serão denominados, daqui por diante, como ANM-E24⁹ e BIS-E10 respectivamente. Os poços de monitoramento selecionados para esta análise foram o PM8, nível de profundidade 5 metros (n=5), na área E10 (Figura 3.2) e o PM4, nível de profundidade 2 metros (n=2), na área sob Atenuação Natural Monitorada (ANEXO E). Ambos os PM escolhidos, localizam-se frente à respectiva fonte de contaminação, a uma distância de 2,0 metros, aproximadamente, no sentido preferencial do fluxo da água subterrânea. Devido às diferenças enquanto ao início dos experimentos, as variáveis analisadas não foram consideradas num período comum.

A Figura 4.5 mostra o comportamento do etanol ao longo do tempo de monitoramento para cada experimento.

⁸ Nesse ano, o Governo Federal propôs a edição da Medida Provisória n.º 1662-3, com vistas a elevar para até 24% em volume o percentual de adição de álcool anidro à gasolina (BRASIL, 1998).

⁹ Para mais detalhes da área E24 ver FERNANDEZ (2002).

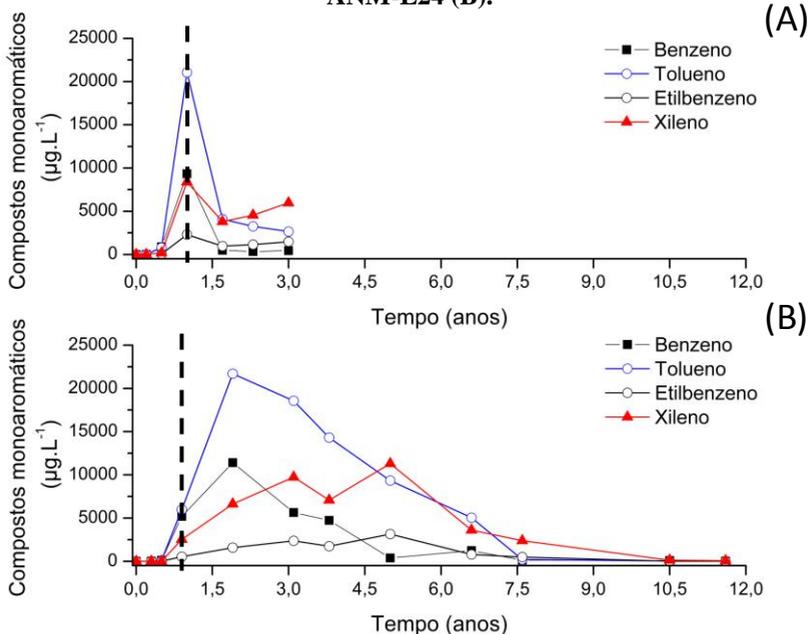
Figura 4.5 – Variação da concentração de etanol ao longo do tempo no PM8, nível de profundidade 5 metros para o experimento de BIS-E10 (A) e no PM4 nível de profundidade 2 metros para o experimento de ANM-E24 (B).



Analisando-se o gráfico comparativo, observa-se que em ambos os experimentos, as maiores concentrações de etanol foram registradas 1 ano após a liberação do respectivo combustível. O etanol foi mais rapidamente consumido na área de BIS-E10, Figura 4.5 (A), não havendo detecção deste álcool aos 3 anos de monitoramento. Por sua parte, nesse mesmo período, as concentrações de etanol na área com ANM-E24 alcançaram os 500 mg.L⁻¹, esgotando-se, somente depois de 5 anos (Figura 4.5 (B)). Em ambos os processos de biorremediação comparados, no experimento de BIS-E10.

A variação da concentração dos compostos BTEX para os dois experimentos comparados é representada na Figura 4.6 a seguir.

Figura 4.6 – Concentração dos compostos BTEX ao longo do tempo no PM8, nível de profundidade 5 metros para o experimento de BIS-E10 (A) e no PM4 nível de profundidade 2 metros para o experimento de ANM-E24 (B).



Nota: A linha tracejada preta mostra o tempo correspondente às máximas concentrações de etanol para cada um dos experimentos.

No experimento de BIS-E10, as maiores concentrações de todos os compostos BTEX registraram-se 1 ano após a liberação do combustível E10. Na última coleta da área de BIS-E10, 3 anos após a liberação do combustível, os valores de concentração foram: $435 \mu\text{g.L}^{-1}$, $2658 \mu\text{g.L}^{-1}$, $1472 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $5964 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno respectivamente (Figura 4.6). Para o caso do experimento de ANM-E24, as concentrações mais elevadas de benzeno e tolueno registraram-se após 2 anos da liberação do E24 e depois de 5 anos para o etilbenzeno e o xileno. Tal fato, relaciona-se com as solubilidades dos diferentes compostos aromáticos analisados, sendo estes últimos os compostos que apresentam menor solubilidade aquosa dentre os compostos BTEX (Tabela 2.2). Esta diferença entre os picos de concentração do etanol e os hidrocarbonetos, no experimento de ANM-E24, mostra um retardo no início do decaimento destes

compostos aromáticos, que somente ocorreu após o decaimento do etanol. Após 3 anos as concentrações de todos compostos BTEX foram superiores às concentrações registradas na área E10, para o mesmo intervalo de tempo: 5644 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 18558 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 2366 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 9738 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno respectivamente (Figura 4.6). Valores de concentração na mesma ordem de magnitude às medidas para o tempo 3 anos no experimento de BIS-E10 foram encontradas somente após 5 anos de monitoramento. Somente depois de um período de 11,6 anos, as concentrações dos compostos BTEX individuais para o experimento de ANM-E24 estariam abaixo dos valores máximos permitidos pela legislação brasileira. Embora os valores de concentração dos compostos aromáticos no experimento de BIS-E10 sejam menores que os derivados do experimento de ANM-E24, após 3 anos de monitoramento ainda encontram-se acima dos valores máximos permitidos pela legislação brasileira (Tabela 2.1).

Apesar de que na área com ANM foi liberado, em volume, mais do dobro de etanol, nos dois experimentos o pico de máxima concentração do etanol foi obtido um ano após a contaminação, o que poderia estar associado a diferença de velocidade da água subterrânea (aproximadamente 2,8 m.ano^{-1} na área sob ANM, e 5,7 m.ano^{-1} nas áreas sob BIS). Isto é, a menor velocidade na área de ANM assim como a maior massa de álcool teria demorado a remoção do etanol, já que, como se observou na Figura 4.5 no experimento de ANM-E24, a concentração do etanol começou diminuir 1 ano após a liberação do combustível E24 e para o caso dos compostos BTEX, o decréscimo na concentração somente ocorreu depois de 1,9 anos de monitoramento. Na área de BIS-E10, a atenuação do álcool e dos compostos monoaromáticos a 1,5 metros de distância da fonte de contaminação, começou no mesmo período de tempo, aproximadamente 1 ano após a liberação do combustível (Figura 4.5 e Figura 4.6). É importante considerar que, devido à frequência das coletas, pode ter existido um intervalo de tempo entre a degradação de um e outro composto. No experimento de ANM-E24, a persistência do etanol foi maior ao longo do tempo, ou seja, leva mais tempo para ocorrer a atenuação, e, somente após o decaimento significativo da concentração do álcool iniciou-se a biodegradação dos BTEX. Já na área sob BIS, o decaimento das concentrações de benzeno e tolueno começou em forma simultânea com o início do processo de atenuação do etanol. Existem autores que têm expressado que numa mistura gasolina-etanol, uma mudança na formulação da gasolina, em relação à porcentagem de etanol na mistura,

poderia impactar o comportamento dos BTEX em águas subterrâneas contaminadas (HEERMANN; POWERS, 1998, CHEN; BARKER; GUI, 2008). Estudos de campo com E10 foram efetuados anteriormente com diferentes resultados. Por um lado, Mackay *et al* (2006b) observaram que a presença do álcool resultou em maiores concentrações de benzeno, provocando um maior alongamento das plumas de contaminação. Esses autores reportaram também que as concentrações dos compostos aromáticos somente decaíram após o decréscimo nas concentrações de etanol. Por outro lado, Freitas *et al.* (2011) obtiveram taxas de decaimento dos compostos BTEX semelhantes às calculadas para gasolina pura, demonstrando que o etanol, numa proporção de 10% (v/v), não impacta na degradação dos compostos BTEX. No presente trabalho, a baixa proporção do etanol na mistura não estaria interferindo na degradação dos compostos aromáticos visto que as concentrações de ambos os tipos de contaminantes, álcool e hidrocarbonetos aromáticos, benzeno e tolueno, começaram a diminuir no mesmo período de tempo. Isto também é representado nos mapas de distribuição espacial dos contaminantes (Figura 4.2 e Figura 4.3), já que houve uma diminuição no tamanho das plumas de benzeno e tolueno em períodos em que o etanol ainda foi constatado. Dessa maneira, podemos esperar que a análise pontual dos resultados obtidos em um poço permita ter uma noção geral do que está acontecendo na área experimental de BIS-E10.

O decaimento das concentrações de BTEX, no mesmo período em que se registrou um decaimento na concentração do etanol, poderia ser atribuído a um aumento da biomassa estimulada durante a biodegradação do álcool. Corseuil *et al.* (1998), em ensaios de microcosmos em condições sulfato-redutoras, manifestaram que o etanol contribuiu na degradação de tolueno, com o desenvolvimento de bactérias degradadoras de tolueno, inicialmente em baixas concentrações. Por outro lado, os resultados de um experimento de campo, realizado com o combustível E24, mostraram que a massa de microrganismos desenvolvida com a biodegradação do etanol foi responsável pela redução na concentração dos BTEX, uma vez esgotado o álcool, pela intensificação da taxa de biodegradação anaeróbia (NUNES; CORSEUIL, 2007).

4.3 CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DOS BTEX

No ambiente subterrâneo, as reações de biodegradação dos compostos orgânicos dissolvidos ocorrem em taxas específicas para cada composto, segundo as condições ambientais predominantes. Admitiu-se a biodegradação como o principal fator influente no valor da constante de atenuação (k) por ter representado, em estudos de campo, 80% do valor da constante de atenuação dos compostos BTEX (KAO *et al.*, 2010). Foram calculados os valores de k_{ponto} para benzeno, tolueno e BTEX totais presentes na mistura com 10% de etanol (v/v) em um meio bioestimulado com sulfato (área de BIS-E10) com base nas medições do poço de monitoramento 8, nível de profundidade 5 metros.

A constante de atenuação para o etanol não foi calculada devido ao efeito dos processos de transporte sobre o etanol. Isto é, mesmo sem biodegradação, por ser completamente solúvel em água, a concentração do etanol diminuiria com os processos advectivos de transporte. Os valores de k para o etilbenzeno e o xileno não foram calculados, já que as menores solubilidades destes compostos, em comparação com o benzeno e o tolueno, fazem com que seja necessário mais tempo para que atinjam o pico de concentração máxima considerado na estimativa das respectivas taxas. Através da linearização da equação de biodegradação (Equação 3) foram obtidos os valores da constante de atenuação pontual para o benzeno, tolueno e BTEX totais, sendo k_{ponto} igual à inclinação da reta do logaritmo natural da concentração pelo tempo em um determinado ponto (NEWELL *et al.*, 2002). Estes valores foram comparados com os valores obtidos por Schambeck (2012) para o experimento de ANM-E24. As concentrações dos hidrocarbonetos, expressadas originalmente em $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram transformadas em miligramas de Carbono Orgânico Total. L^{-1} para poder comparar combustíveis com diferentes proporções de etanol na mistura. A análise de regressão linear foi realizada com o auxílio da planilha eletrônica Excel, para um nível de confiança de 95%.

As taxas de degradação calculadas para benzeno, tolueno e BTEX totais na área E10 apresentam valores superiores aos registrados para ANM (Tabela 4.1). Os valores de k_{ponto} , calculados com base nos dados do PM8 (n=5), permitem confirmar que no experimento de ANM-E24 a degradação dos compostos BTEX começa depois e é mais demorada que no experimento de BIS. Isto parece indicar que quanto mais demora a degradação do etanol, os valores da taxa de degradação dos compostos aromáticos diminuem. Pode-se afirmar, considerando os valores de

k_{ponto} , que os compostos BTEX na área contaminada com uma mistura com 10% de etanol (v/v) e com adição de sulfato, estão sendo atenuados mais rapidamente que no experimento com uma mistura com 24% de etanol (v/v). Estes resultados são coerentes com as considerações termodinâmicas que colocam o processo de sulfato-redução como mais favorável que a metanogênese (STUMM; MORGAN, 1981; WIEDEMEIER *et al.*, 1999a). É importante destacar que, estatisticamente, para o nível de confiança utilizado, uma regressão é apreciada como significativa quando o valor-p resulta menor que 0,05. Entretanto, considera-se que amostras pequenas tendem a produzir valores-p grandes, ainda que exista um importante efeito em um ponto de vista prático. Por razões de custos operacionais, em reiteradas circunstâncias, a frequência com que são feitas as amostragens de campo para avaliar a contaminação de ambientes subsuperficiais é reduzida, limitando, assim, o número de coletas. Assim, poder-se-ia esperar que um número maior de amostras reduza o valor-p. Além disso, o experimento de ANM-E24 é um experimento mais antigo, de maneira que o número de amostras consideradas, para a determinação da taxa de degradação, foi superior ao do experimento de BIS (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Comparação dos valores das constantes de atenuação de primeira ordem do benzeno e do tolueno calculadas a partir de dados de experimentos de campo.

Experimento*	Combustível	Substrato	Período (a) (anos)	k (ano ⁻¹)	$t_{1/2}$ (anos)	$t_{1/2}$ + lag (anos)	N ^(b)	R ²	Valor-p	Referência
Atenuação Natural Monitorada	E24	Benzeno	1,9 a 7,6	0,72	0,96	2,86	6	0,89	0,01	Schambeck (2012)
		Tolueno	1,9 a 6,6	0,30	2,31	4,21	5	0,94	0,01	
		BTEX totais	1,9 a 7,6	0,41	1,68	-	6	0,88	0,01	
Bioestimulação com injeção de sulfato (BIS)	E10	Benzeno	1,0 a 3,0	2,62	0,26	1,26	3	0,89	0,23	Este trabalho
		Tolueno	1,0 a 3,0	1,46	0,47	1,47	3	0,87	0,23	
		BTEX totais	1,0 a 3,0	1,18	0,59	-	3	0,79	0,3	

Notas: * Os valores apresentados foram calculados a partir de dados correspondentes aos poços de monitoramento PM4, nível de profundidade 2 m para o experimento de ANM e o PM8, nível de profundidade 5 m para o experimento de BIS.

^(a) Período correspondente ao decaimento das concentrações dos contaminantes após a liberação do combustível.

^(b) Número de dados utilizados na análise de regressão.

Os valores das respectivas constantes de atenuação calculadas para a área de BIS-E10, em relação ao benzeno, tolueno e BTEX totais foram, aproximadamente, 3 vezes superiores às registradas para o experimento de ANM-E24 (Tabela 4.1). No presente trabalho, a taxa de degradação do benzeno correspondente à área de BIS-E10 foi maior que a do tolueno. Isto coincide com os resultados de Cozarelli *et al.* (2010), que reportaram maiores taxas de degradação para o benzeno, em comparação com o tolueno, em um estudo *in situ* sobre a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos nas águas subterrâneas. Por ser o composto de maior solubilidade, o benzeno torna-se mais biodisponível para o ataque microbiológico, podendo, assim ser degradado a uma taxa mais rápida. Em experimentos realizados em microcosmos, Lawrence *et al.* (2009) obtiveram menores taxas de biodegradação dos compostos BTEX para o combustível E10, quando comparado com as misturas E50 e E95. Para os autores, a presença de etanol causa um crescimento acidental de bactérias degradadoras de BTEX e que, por esta razão, conforme aumenta a concentração de etanol na mistura, maior a taxa de crescimento dessas bactérias e, por conseguinte, maior é a taxa de biodegradação dos BTEX.

Como foi descrito no item 3.7, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é calculado a partir do valor de k , a qual foi obtida considerando como $t=0$ o tempo correspondente aos picos de concentração máxima para o benzeno e o tolueno, isto é, 1 ano após a liberação do combustível E10. Para a obtenção do valor de $t_{1/2}$ somou-se o tempo relativo à fase *lag*¹⁰ no qual os compostos estavam se dissolvendo e aumentando a sua concentração na água subterrânea até atingir o pico de concentração. No caso do experimento de ANM com E24, os picos de concentração para o benzeno e o tolueno ocorreram 1,9 anos após a liberação do combustível, e, assim, o valor de $t_{1/2}$ contemplando a fase *lag* corresponderia a um tempo de permanência do benzeno e do tolueno mais de duas vezes maior do que para o experimento de BIS-E10 (Tabela 4.1). Na área sob ANM, a persistência do etanol é maior ao longo do tempo devido à maior proporção de etanol no combustível E24 o que provocou retardo no início da biodegradação de seus compostos BTEX e redução em suas velocidades de atenuação quando comparado ao combustível E10 (10% v/v de etanol).

¹⁰ Assumimos como fase *lag* o período de tempo prévio à degradação dos contaminantes, próprio da fase de adaptação da comunidade bacteriana às novas condições do meio.

Em experimentos de campo com E10, avaliando o efeito do etanol na degradação dos BTEX totais, Mackay *et al.* (2006b) reportaram taxas de atenuação de 0,06 e 0,59 dia⁻¹ para o benzeno e o tolueno, respectivamente. Mesmo que a presença do etanol tenha interferido negativamente na velocidade de degradação dos compostos BTEX, as taxas reportadas por esses autores são significativamente maiores às evidenciadas neste trabalho. As concentrações de hidrocarbonetos medidas para o poço de monitoramento PM8, n=5, nos tempos 1 e 3 anos (Tabela B1 - APÊNDICE B), foram superiores em mais de 1 ordem de grandeza do que as reportadas por Mackay *et al.* (2006b) (1-3 mg.L⁻¹, aproximadamente). Isto poderia explicar as menores taxas de atenuação calculadas neste trabalho, para os compostos BTEX. Além disso, a disponibilidade de sulfato, naturalmente alta nos aquíferos norte-americanos, com concentrações de 100 µg.L⁻¹ aproximadamente (MACKAY *et al.*, 2006b), poderiam suprir rapidamente os requerimentos nutricionais dos microrganismos, acelerando a taxa de degradação dos compostos aromáticos. Em experimentos realizados em microcosmos, para uma mistura de BTEX e etanol, Silva, Ruiz-Aguilar e Alvarez (2005) observaram um aumento na biodegradação destes compostos com o acréscimo de receptores de elétrons (nitrato, ferro na forma de íon férrico e sulfato) em relação à ANM, para um tempo de incubação de um ano. Embora tenham diminuído os valores da concentração dos compostos aromáticos no experimento de BIS-E10, como foi mencionado no item 4.2, ainda encontram-se acima dos níveis permitidos pela legislação de forma que se deve continuar com o monitoramento desta área.

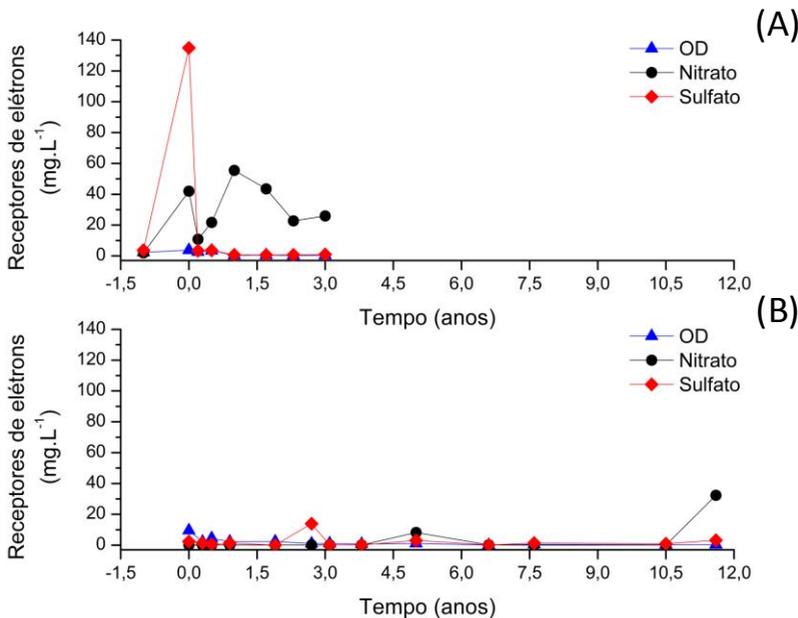
4.4 INFLUÊNCIA DO SULFATO NA BIODEGRADAÇÃO DOS CONTAMINANTES PRESENTES NO E10

Para analisar a influência da presença de sulfato na biodegradação do etanol e dos BTEX, os resultados obtidos a partir das análises de água subterrânea da área de BIS-E10 foram comparados com os de um experimento de campo de ANM-E24, próximo à área de estudo, conforme foi descrito no início da seção de resultados e discussões. Dessa maneira, foram considerados os dados provenientes do PM8, nível de cinco metros de profundidade (n=5), e do PM4, nível de dois metros de profundidade (n=2) para os experimentos de BIS-E10 e ANM-E24 respectivamente.

4.4.1. Disponibilidade dos receptores de elétrons

A depleção de nutrientes e de receptores de elétrons pode ser usada como indicador da biodegradação de compostos orgânicos. O esgotamento do oxigênio pode ser percebido pela sua diminuição assim como pelo uso dos outros receptores de elétrons. Este comportamento do OD estaria representando em forma geral o que aconteceu na área toda, de acordo com as apreciações realizadas no item 4.1. O ferro (III) possui uma solubilidade baixa, assim, a sua presença e utilização foram evidenciadas de maneira indireta, a partir da formação de ferro (II) como subproduto. Com respeito ao nitrato, a presença de concentrações elevadas deste receptor de elétrons, acima de 50 mg.L^{-1} , em áreas pontuais da Fazenda Ressacada, tem sido associada ao fato da região ter sido utilizada, anteriormente, em práticas agrícolas e como área de pastagem (COSTA, 2008). A associação entre a disponibilidade de nitrato como receptor de elétrons para a degradação de contaminantes com a atividade agrícola tem sido reportada para outras áreas (LYNGKILDE; CHRISTENSEN, 1992; CASTAÑEDA *et al.*, 2003). As variações na concentração de receptores de elétrons dos experimentos de BIS-E10 e ANM-E24 são mostradas na Figura 4.7. Os menores valores de concentrações dos receptores de elétrons foram encontrados no tempo 1,7 anos (quarta coleta). Isto poderia ser explicado pelo efeito de diluição provocado por precipitação, como foi descrito no item 4.1, já que os maiores valores de precipitação nos últimos dois anos de monitoramento foram registrados no mês prévio a essa campanha de amostragem (Figura A1, APÊNDICE A).

Figura 4.7 – Variação temporal da concentração de receptores de elétrons dissolvidos na água subterrânea. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).



Nota: as concentrações iniciais (0,0 anos) baseiam-se nos dados de *background* de cada área em particular.

De acordo com a caracterização da água subterrânea antes da liberação controlada de E10, a concentração média de oxigênio dissolvido (OD) era de 2,31 mg.L⁻¹ (Tabela C.1a - ANEXO C); após a liberação do combustível as concentrações de oxigênio dissolvido na área sob BIS foram diminuindo até valores abaixo de 0,5 mg.L⁻¹. A Figura 4.7 (A) permite visualizar o estabelecimento de condições anaeróbias no meio a partir do tempo 1 ano, seguindo o padrão já observado na Figura 4.4 para a área E10.

Por outro lado, o ânion nitrato mostrou um decaimento após a terceira coleta (1 ano) no período em que as concentrações dos contaminantes começaram a diminuir (Figura 4.5 e Figura 4.6). O decaimento deste receptor de elétrons estaria constatando seu uso por parte dos microrganismos presentes no meio. Para o caso do sulfato, registraram-se concentrações baixas e constantes durante todo o tempo

de experimento (Figura 4.7 (A)). Depois de um ano de monitoramento, as concentrações se mantiveram abaixo de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, indicando a utilização deste receptor de elétrons na degradação dos contaminantes, já que este foi injetado semanalmente em quantias elevadas.

No experimento de ANM-E24, Figura 4.7 (B), as concentrações de oxigênio caíram a valores característicos da anaerobiose após a liberação do respectivo combustível. Com respeito ao nitrato, as concentrações deste receptor de elétrons se mantiveram abaixo de 10 mg.L^{-1} ao longo de 10,5 anos, ocorrendo um pico de concentração aos 11,6 anos. Isto poderia estar associado com uma entrada de nitrato nessa área, já que antes da liberação do combustível os valores medidos desse receptor de elétrons para o PM4 n=2, já eram baixos ($2,33 \text{ mg.L}^{-1}$). Após a contaminação, as concentrações de sulfato, ao longo do tempo de monitoramento, foram de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ aproximadamente.

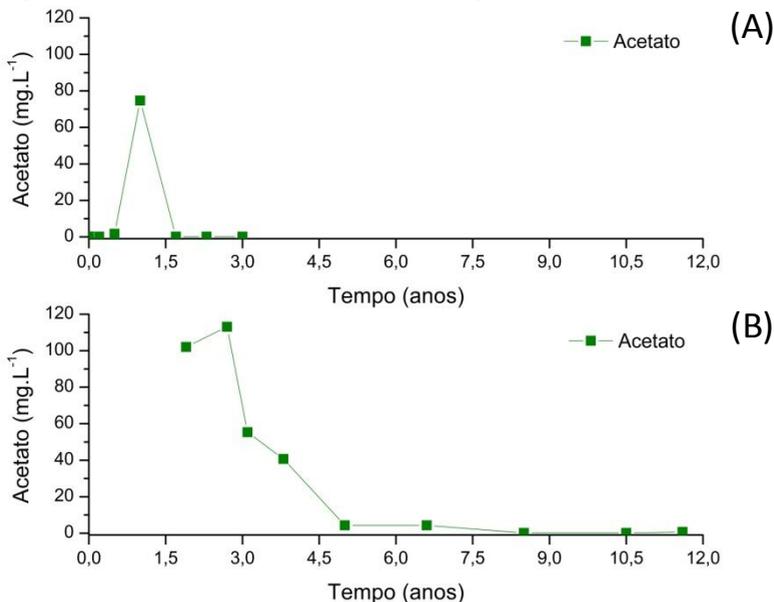
4.4.2. Subprodutos metabólicos da biodegradação dos contaminantes

As concentrações das formas reduzidas dos receptores de elétrons podem ser usadas como um indicador da degradação de matéria orgânica. Para a análise do comportamento dos contaminantes e da cinética de degradação, assim como a relação com os receptores de elétrons, subprodutos metabólicos e comunidades bacterianas foi escolhido o poço imediatamente a jusante da fonte e o nível em que foram detectadas as maiores concentrações dissolvidas do etanol e dos compostos BTEX.

O subproduto metabólico acetato é um composto intermediário da biodegradação de compostos orgânicos. A Figura 4.8 mostra a variação da concentração deste subproduto nos experimentos de Bioestimulação com Injeção de Sulfato (BIS-E10) e de Atenuação Natural Monitorada (ANM-E24) ao longo do tempo. No experimento de BIS-E10, as concentrações mais elevadas de acetato, acima de 70 mg.L^{-1} , foram registradas no poço em estudo 1,0 anos após a liberação do combustível E10 (Figura 4.8 (A)), que representa o período com maiores concentrações de etanol e de compostos BTEX (Figura 4.5 (A) e Figura 4.6 (A)). A produção de acetato antecipada na área E10 estaria relacionada à biodegradação, também antecipada, dos contaminantes na área. Por ser um composto intermediário, após ser produzido o acetato é rapidamente consumido. Desta maneira, a partir do pico de concentração registrado no tempo 1 ano, houve um decaimento de acetato em

correspondência com o início da diminuição nas concentrações dos contaminantes Figura 4.8 (A).

Figura 4.8 – Variação temporal da concentração de acetato. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).



Nota: As concentrações iniciais (0,0 anos) referem-se aos valores de acetato antes da liberação do combustível em cada área.

No experimento de ANM-E24, as concentrações de acetato somente foram medidas depois de 1,9 anos de monitoramento (Figura 4.8 (B)). Os valores medidos estiveram na faixa de 50-100 mg.L⁻¹, aproximadamente, para o intervalo de 1,9 a 3,1 anos (Figura 4.8 (B)). Após o esgotamento do etanol, a partir dos 2,7 anos, a produção de acetato estaria associada unicamente à biotransformação dos compostos BTEX (Figura 4.5 (B) e Figura 4.6 (B)). Em ambas as áreas, houve produção de acetato, contudo, no poço de monitoramento do experimento sob ANM, a quantia formada foi superior àquela presente no poço do experimento sob Bioestimulação com Injeção de Sulfato. As menores concentrações de acetato registradas no experimento de BIS-E10, quando comparadas com as correspondentes ao experimento de

ANM-E10, estariam relacionadas ao baixo teor de etanol no combustível usado. Isto pode significar que o maior volume de etanol gera mais acetato e que na área de BIS o intervalo de tempo entre geração e utilização deste produto poderia ser menor. Em estudos de campo, Kuivila *et al.* (1989) e Badecker *et al.* (1993) observaram que os valores de concentração de acetato proveniente da biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo não ultrapassaram os 3 mg.L⁻¹. Desta maneira, em casos de contaminações subsuperficiais por misturas de gasolina e etanol, elevadas concentrações de acetato no meio corresponderiam, principalmente, à degradação do etanol. Em outros experimentos de campo realizados com misturas de etanol e gasolina em proporção de 24-25 % (v/v) de álcool, concluiu-se que o acetato gerado é proveniente predominantemente da oxidação do etanol já que ele está presente em uma proporção maior que os compostos BTEX (NUNES, 2006; COSTA, 2008).

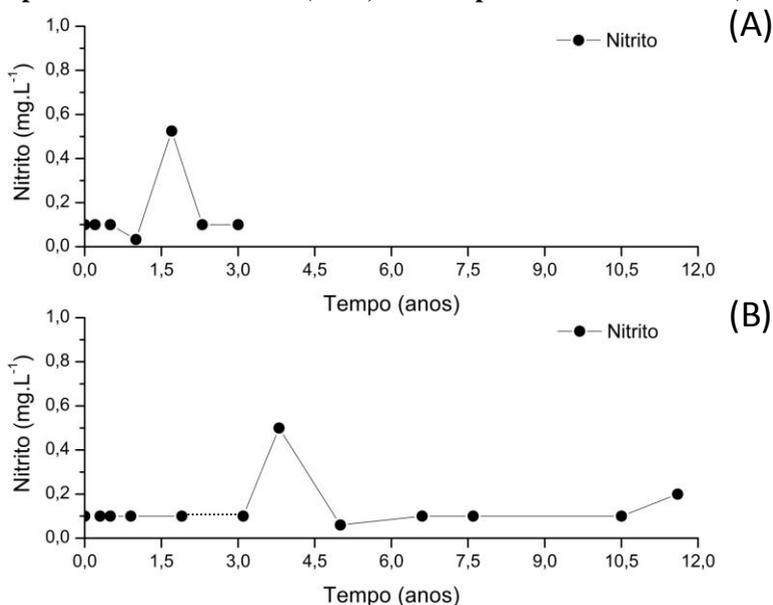
Outra maneira de determinar a influência de um processo metabólico na biodegradação dos contaminantes presentes é a partir da geração de subprodutos (WIEDEMEIER *et al.*, 1999a). As concentrações de subprodutos metabólicos ao longo do tempo para os experimentos de BIS-E10 e ANM-E24 são mostradas nas Figura 4.9-Figura 4.12. As concentrações iniciais (0,0 anos) baseiam-se nos dados de background dos compostos em cada área.

Segundo a ordem de utilização dos receptores de elétrons, abordada no item 2.3.3, após a biodegradação aeróbia dos compostos orgânicos o seguinte receptor de elétrons a ser usado é o nitrato. Conforme valores propostos por Lyngkilde e Christensen (1992) e Bjerg *et al.* (1995), valores de nitrito acima de 0,1 mg.L⁻¹ consistiram no critério para definir a ocorrência de nitrato-redução em águas subterrâneas. No experimento de BIS-E10, o aumento na concentração de nitrito coincide com o início do decaimento do etanol e dos hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno e tolueno, a partir do tempo 1 ano. A presença deste subproduto, em concentrações maiores que 0,1 mg.L⁻¹, foram registradas no tempo 1,7 anos (Figura 4.9 (A)).

Para o experimento de ANM-E24, não houve medições de nitrito no PM4 n=2, entre os tempos 1,9 e 3,1 anos. As concentrações deste subproduto foram, em geral, inferiores a 0,1 mg.L⁻¹. Isto é esperado por ser uma região onde as concentrações do receptor de elétrons nitrato são naturalmente baixas (Figura 4.7 (B)). No tempo 11,6 anos registraram-se concentrações de 0,2 mg.L⁻¹ de nitrito o que poderia estar relacionado

com o aumento da concentração de nitrato nessa área, como foi comentado no item 4.4.1.

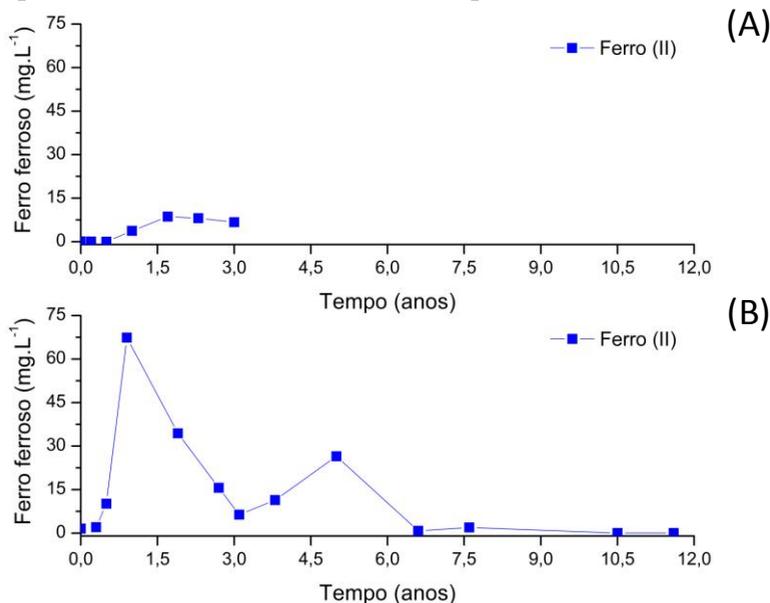
Figura 4.9 – Variação temporal da concentração de nitrito. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).



A biodegradação via redução de ferro (III) é o processo seguinte à nitrato-redução, desde o ponto de vista termodinâmico. Quando o ferro na forma de íon férrico é utilizado como receptor de elétrons gera ferro na forma de íon ferroso como subproduto. Dessa maneira, as mudanças na concentração deste subproduto metabólico podem ser usadas como indicador da biodegradação mediante redução de ferro (III). De acordo com Lyngkilde e Christensen (1992), a ocorrência do processo de ferro(III)-redução pode ser evidenciada a partir da presença do ferro na forma de íon ferroso em concentrações acima de 1,5 mg.L⁻¹. No experimento de BIS-E10, este subproduto registrou-se em concentrações de até 10 mg.L⁻¹ (Figura 4.10 (B)), sendo as maiores concentrações encontradas aos 1,7 anos após a liberação do E10. Para o experimento de ANM-E24 os valores de ferro (II) são superiores aos registrados para o experimento de BIS-E10, como pode ser visualizado na Figura 4.10

(B). A concentração máxima de subproduto obtida nesse experimento foi de $67,4 \text{ mg.L}^{-1}$, após 1 ano de monitoramento. Os altos valores de ferro (II), no experimento de ANM quando comparados com os valores correspondentes ao experimento de BIS, poderiam estar associados ao fato de não haver suficiente geração de sulfeto, por não existir altas concentrações de sulfato, e, conseqüentemente, o ferro (II) não estar precipitando como sulfeto ferroso.

Figura 4.10 – Variação temporal da concentração de Ferro (II). A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).



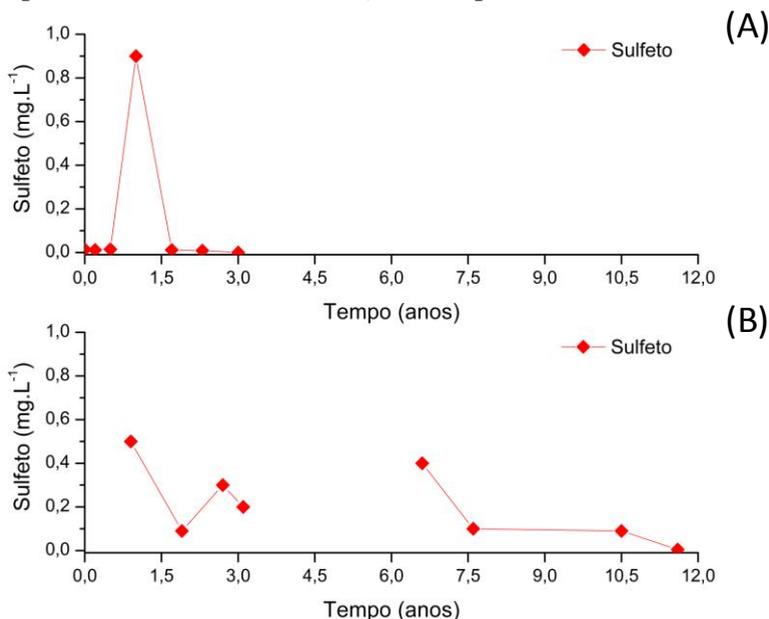
Após o processo de redução do ferro (III), a utilização de sulfato como receptor de elétrons é o processo mais favorável para as comunidades microbianas. Portanto, o aumento na concentração de sulfeto, subproduto metabólico da redução de sulfato, indica que está ocorrendo biodegradação da matéria orgânica por sulfato-redução. Para o experimento de BIS-E10, as concentrações de sulfeto dissolvido variaram entre $0,01$ e $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ao longo do período de tempo de amostragem (3 anos) (Figura 4.11 (A)). Estes valores são consistentes com estudos que descrevem a ocorrência do processo de sulfato-redução

a partir da evidência de sulfeto em águas subterrâneas em concentrações menores de 1 mg.L^{-1} (LYNGKILDE; CHRISTENSEN, 1992; BJERG *et al.*, 1995; REINHARDT *et al.*, 1997; WEINER *et al.*, 1998) e valores na faixa de 0,9 e 10 mg.L^{-1} (GIEG *et al.*, 1999). Existem também estudos sobre aquíferos contaminados com petróleo em que se assumiu a ocorrência de sulfato-redução sem ter registrado sulfeto; isto foi explicado pelos autores através das possibilidades de precipitação do sulfeto com o ferro (II) (WEINER *et al.*, 1998; ANDERSON; LOVLEY, 2000). Em todos os casos, os autores mediram valores de H_2S dissolvido muito menores que o valor teoricamente esperado, e propuseram que este subproduto, uma vez formado, reage com os sólidos do aquífero. A quantificação da sulfato-redução microbiana a partir do consumo de sulfato ou a formação de sulfeto como produto poderia ser obscurecida por transformações abióticas como dissolução, precipitação de sulfato nas formas de sulfato de cálcio (STUMM; MORGAN, 1981) ou por precipitação na forma de sulfeto ferroso (ANDERSON; LOVLEY, 2000). Assim, a ocorrência de sulfato redução poderia ser subestimada em casos de não considerar a possibilidade de o sulfeto ter precipitado.

Por outro lado, quando consideradas as medições em todos os poços de monitoramento da área E10, na fonte de contaminação registrou-se sulfeto em concentrações acima de 4 mg.L^{-1} aos 0,2 anos após a liberação do combustível. A detecção destes valores demonstrou que frente a valores de etanol e BTEX muito altos o sulfato foi utilizado e contribuiu com os processos atuantes na degradação dos compostos contaminantes.

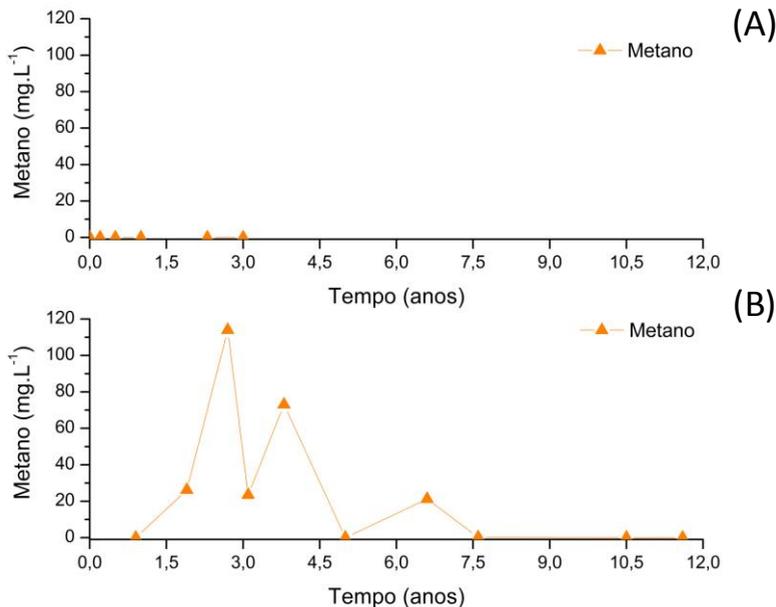
Para o experimento de ANM-E24, as medições deste subproduto não foram constantes, existindo grandes períodos de tempo sem dados específicos (Figura 4.11 (B)). As concentrações observadas do subproduto sulfeto são menores às registradas para o experimento de BIS-E10, na faixa de 0,0-0,5 mg.L^{-1} , o que é esperado por ser uma região onde as concentrações de sulfato são naturalmente baixas (Figura 4.7 (B)). Isto indicaria que os processos de nitrato- redução e sulfato-redução não atuaram de maneira predominante na biodegradação dos contaminantes na área experimental sob Atenuação Natural Monitorada. Por outro lado, a presença de ferro (II) em altas concentrações foi um indicativo da importância do processo de ferro(III)-redução na biodegradação do etanol e dos compostos aromáticos.

Figura 4.11 – Variação temporal da concentração de sulfeto. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).



A presença de metano em águas subterrâneas contaminadas revela a ocorrência da metanogênese. Após a redução de sulfato, o processo de geração de metano é o mecanismo atuante na biodegradação dos compostos orgânicos. Na Figura 4.12 estão apresentados os gráficos comparativos da concentração de metano nos dois experimentos analisados.

Figura 4.12 – Variação temporal da concentração de metano. A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).



Na área de BIS-E10 não houve detecção de metano durante o período monitorado (Figura 4.12 (A)). Isto indica que os receptores de elétrons que naturalmente encontram-se na área, nitrato e ferro na forma de íon férrico, junto com o sulfato, que vem sendo injetado semanalmente há mais de três anos, estariam suprindo os requerimentos metabólicos da degradação do combustível E10, impedindo o estabelecimento de condições metanogênicas. A existência de condições mistas de receptores de elétrons para a degradação microbiana do etanol e de hidrocarbonetos aromáticos, uma vez esgotado o oxigênio, já tem sido reportada na literatura técnica (LYNGKILDE; CHRISTENSEN, 1992; WILSON; BOUWER, 1997; MALCOM, 1998).

As concentrações de metano foram evidentes na área de ANM-E24, evidenciando-se os máximos valores deste gás no tempo 2,7 anos após a liberação do combustível, correspondentemente com as máximas concentrações de etanol. Isto sugere que a disponibilidade de nitrato, ferro (III) e sulfato no aquífero não foram suficientes para a elevada

carga orgânica representada pelo maior volume de etanol (Figura 4.5 (B)).

Na área E10, devido ao rápido esgotamento do oxigênio, evidenciado na Figura 4.7 (A), a análise das distintas variáveis geoquímicas avaliadas permitiu observar que o desaparecimento do etanol e a redução nas concentrações dos compostos aromáticos analisados ocorreram principalmente por processos de biodegradação anaeróbios via nitrato-, ferro(III)- e sulfato-redução. Esta simultaneidade no consumo dos vários receptores de elétrons disponíveis no meio tem sido descrita anteriormente em estudos de campo (EDMUNDS; MILES; COOK, 1984; CUNNINGHAM *et al.*, 2001; CHAPELLE *et al.*, 2002). Na área E24, sob ANM, os processos predominantes foram ferro(III)-redução e metanogênese. Por ter sido a metanogênese a principal via de biodegradação, houve um atraso na atenuação do etanol e dos hidrocarbonetos, sendo estes processos mais lentos, em relação ao experimento de BIS-E10, onde predominaram, em concomitância, vias catabólicas mais favoráveis energeticamente.

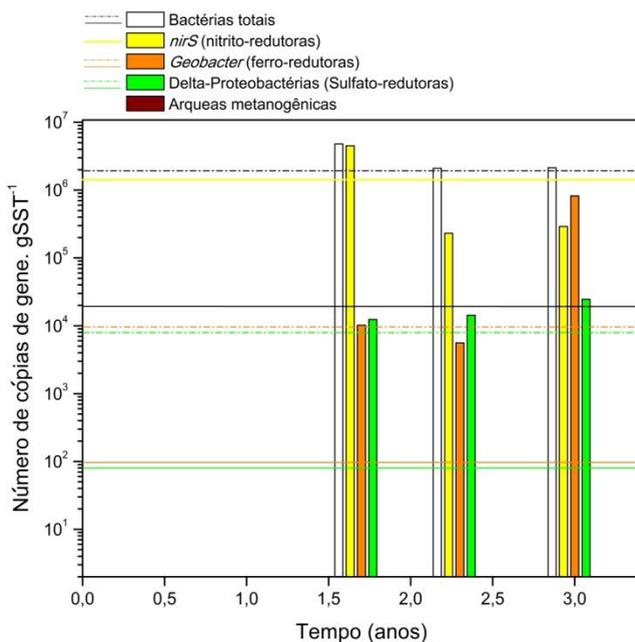
4.4.3. Comunidades microbianas associadas à biodegradação dos contaminantes

Como foi mencionado na seção 2.5.2 da revisão bibliográfica, em casos de contaminação por compostos orgânicos no meio subsuperficial, os processos anaeróbios desenvolvem um importante papel. Em vistas a estabelecer a presença relevante destes microrganismos em associação com os processos redox atuantes no local, foram quantificadas as comunidades bacterianas anaeróbias associadas à biodegradação do etanol e dos hidrocarbonetos aromáticos. Para isso, foram realizadas análises moleculares de amostras de água subterrânea correspondentes ao PM8, n=5 no tempo 1,7, 2,3 e 3 anos após o lançamento do E10 (Figura 4.13). Amostras de água subterrânea do PM36 foram utilizadas como controle negativo por pertencerem ao poço mais afastado da fonte (Figura 3.2). Em vistas de avaliar as comunidades de microrganismos existentes em situações de derramamentos subsuperficiais com misturas de gasolina e etanol, a utilização de dados de poços de monitoramento afastados da fonte de contaminação como *background* em estudos de campo já tem sido reportada (FERIS *et al.*, 2008; GUIMARÃES, 2011).

Para a análise de comunidades microbianas, assumiu-se a presença significativa destes alvos moleculares quando o número de cópias de gene das amostras provenientes da zona contaminada fosse

aproximadamente duas ordens de magnitude maior do que a área sem contaminação, cujos valores aparecem como linhas tracejadas na Figura 4.13. Estes pressupostos foram realizados com base em Burns e Valdivia (2008) que estudaram as considerações sobre a definição dos limites de detecção (LD) para a técnica de PCR.

Figura 4.13 – Variação temporal das concentrações de microrganismos presentes nas amostras de água subterrânea.



Nas três coletas analisadas, os resultados demonstraram concentrações de Bactérias totais acima de 10^6 , tendo em vista que os maiores valores foram observados no período correspondente a 1,7 anos. Isto pode estar associado com uma maior carga orgânica para os microrganismos, uma vez que tanto o etanol quanto os compostos monoaromáticos se encontravam em maiores concentrações nesse período que no tempo correspondente à quinta e sexta coleta (2,3 e 3 anos respectivamente) (Figura 4.13). Conforme os resultados dos experimentos de campo sobre a influência do etanol na degradação dos BTEX, Feris *et al.* (2008) indicaram que a presença do álcool, presente

na mistura 10 % v/v, associou-se à promoção do crescimento das populações de Bactérias totais.

O valor médio de cópias de *nirS* (bactérias nitrito-redutoras) obtido para a área sem contaminação foi o mais alto dentre todas as determinações moleculares analisadas. Este comportamento das bactérias nitrito-redutoras, inclusive em áreas sem contaminação, já tem sido descrito em um estudo onde se analisaram as comunidades bacterianas presentes nas fontes de contaminação de diversos experimentos da Fazenda Ressacada (GUIMARÃES, 2011). Por esta razão, o critério de duas ordens de grandeza acima do valor encontrado para o PM36, adotado como referência para as outras análises moleculares, não foi considerado. Desta maneira, considerou-se a presença de bactérias nitrito-redutoras quando o número de cópias de *gene.gSST*⁻¹ foi superior ao valor correspondente para o PM36 representado pela linha tracejada amarela na Figura 4.13.

De acordo com o critério, as bactérias nitrito-redutoras foram evidenciadas no tempo 1,7 anos, que corresponde com os maiores valores do subproduto nitrito para o PM8, n=5 (Figura 4.9 (A)). Como o nitrato pode ser usado como receptor de elétrons e também como nutriente, a diminuição da concentração de nitrato observada para este período (Figura 4.7 (A)) estaria mostrando uma relação com a presença e a atividade destas bactérias. Em águas subterrâneas contaminadas com BTEX, Cunningham *et al.* (2001) provaram a ação conjunta de bactérias nitrito- e sulfato-redutoras na degradação dos compostos como resultado da injeção de nitrato e sulfato. Autores como Ulrich e Edwards (2003); CORSEUIL *et al.* (2011) também demonstraram a presença significativa de bactérias nitrito-redutoras em relação ao processo de nitrato-redução.

Dentre as análises de grupos bacterianos específicos, a presença significativa de *Geobacter* foi encontrada aos 1,7 anos e 3 anos de monitoramento (Figura 4.13) em conformidade com os registros do subproduto ferro (II). A degradação de hidrocarbonetos de petróleo pela via ferro(III)-redutora associada ao aumento do número de microrganismos pertencentes ao gênero *Geobacter*, tem sido reportado em estudos de campo (PFIFFNER *et al.*, 1997; ANDERSON *et al.*, 1998; ALFREIDER; VOGT, 2007; CORSEUIL, *et al.*, 2011).

Para o caso das Delta-proteobactérias, as análises de água subterrânea para o PM8, n=5 da área E10 revelaram um aumento do número de cópias de genes para o tempo 2,3 anos. Assim como foi descrito no item 4.4.2, a partir da observação de sulfeto, a presença de bactérias da Classe Delta-proteobactéria também estaria refletindo a

ocorrência do processo de sulfato-redução, e o efeito da adição de sulfato sobre as características naturais das populações bacterianas do aquífero. A presença de bactérias sulfato-redutoras em relação à degradação de compostos BTEX tem sido confirmada previamente de acordo com resultados advindos de estudos *in situ* (CHAPELLE *et al.*, 1996; PFIFFNER *et al.*, 1997; ANDERSON; LOVLEY, 2000; CUNNINGHAM *et al.*, 2001; ALFREIDER; VOGT, 2007; CORSEUIL, *et al.*, 2011).

De acordo com Chappelle *et al.* (1996), uma vez que as comunidades microbianas estão primeiramente adaptadas para um tipo específico de respiração, precisam de um tempo para se adaptar a um receptor de elétrons alternativo. Damianovic e Foresti (2009) manifestaram a necessidade de um longo período de tempo para que os microrganismos redutores de sulfato possam ter uma alta eficiência. Assim, para este estudo, embora seja abundante a quantidade de sulfato, a presença de nitrato e de ferro na forma de íon férrico possivelmente tenha tornado menos viável a utilização deste receptor de elétrons, que, por não estar presente naturalmente no aquífero, demora mais tempo para ser utilizado pelas bactérias sulfato-redutoras. O enriquecimento das bactérias sulfato-redutoras na área BIS-E10 foi constatado anteriormente (GUIMARÃES, 2011). Nesse estudo, foram comparadas áreas com diferentes estratégias de remediação *in situ*, de águas subterrâneas contaminadas com distintos tipos de combustíveis, sendo a área de BIS-E10 a única onde foi confirmada a ocorrência de bactérias sulfato-redutoras. Neste contexto, as diferenças observadas na estrutura da comunidade bacteriana são, provavelmente, influenciadas pelas condições redox e pela presença de receptores de elétrons alternativos; nitrato, ferro (III) e sulfato ao longo da pluma, o que foi evidenciado através da produção de subprodutos (Figura 4.9 a Figura 4.11).

A ausência de produção de metano, descrita no item 4.4.2, foi confirmada pelas concentrações das Arqueas metanogênicas que ficaram abaixo do limite de detecção (Tabela D1 - APÊNDICE E). De acordo com Anderson e Lovley (2000), a injeção de receptores de elétrons num aquífero contaminado com derivados de petróleo poderia inibir a ocorrência da metanogênese. Desta maneira, para o baixo teor de matéria orgânica na área experimental E10, quando comparado com porcentagens maiores de álcool na mistura, tanto os receptores de elétrons, naturalmente presentes, quanto o sulfato, injetado semanalmente, estariam suprimindo os requerimentos das respectivas bactérias, impedindo a chegada da metanogênese.

Como considerações finais, pode-se ressaltar que a presença tanto das comunidades bacterianas específicas, *nirS* (bactérias nitrito-redutoras) e *Geobacter* (bactérias ferro(III)-redutoras) assim como as correspondentes às Delta-proteobactérias (Classe que inclui as bactérias sulfato-redutoras) relacionou-se com as concentrações dos subprodutos metabólicos nitrito, ferro (II) e sulfeto, respectivamente. Por outro lado, as Arqueas metanogênicas não foram detectadas para o poço de monitoramento estudado (PM8, n=5) confirmando, deste modo, a ausência de condições metanogênicas para a degradação dos contaminantes no período analisado. Além da menor proporção de etanol na área E10, a ocorrência de processos mais favoráveis termodinamicamente, associados com a existência de microrganismos específicos para vários receptores de elétrons estaria causando uma maior taxa de degradação dos compostos monoaromáticos.

4.4.4. Determinação qualitativa do gene *bssA*

Um importante aspecto na avaliação das técnicas de biorremediação consiste em demonstrar que a biodegradação é o principal processo de atenuação dos contaminantes. A detecção de genes que codificam enzimas catabólicas, ou biomarcadores catabólicos, é uma ferramenta útil para a confirmação da ocorrência de biodegradação como o principal mecanismo de atenuação em áreas contaminadas (BELLER *et al.*, 2002; ANDREONI; GIANFREDA, 2007). A expressão da enzima *bssA* (benzil-succinato sintase), relacionada com a degradação anaeróbia de tolueno e xileno em condições anaeróbias, pode ser determinada através da detecção do gene catabólico que a codifica, conhecido como gene *bssA* (BELLER *et al.*, 2002; SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005; CALAGHAM *et al.*, 2010). Foi analisado o poço de PM8, n=5, localizado na linha principal da área de BIS-E10. A nossa capacidade para avaliar este gene nos primeiros 120 dias é limitada pela ausência de análises moleculares na água subterrânea antes da liberação do produto E10. No entanto, assim como para as outras determinações moleculares, descritas na seção anterior, e, tendo em vista que as plumas de contaminação de etanol e BTEX totais, ao longo dos anos, não ultrapassaram os 6,5 metros (Figura 4.5 e Figura 4.6), o poço PM36, localizado a mais de 25 metros, foi utilizado como controle negativo (Figura 3.2). Considerando que as máximas concentrações de BTEX ocorreram 1 ano após a liberação do E10, a análise qualitativa (presença/ausência) do gene *bssA*

foi realizada a partir de amostras de águas coletadas após 1,7 anos do derramamento. O resultado da análise qualitativa do gene *bssA* é mostrado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Análise qualitativa do gene *bssA* e relação com as concentrações dos contaminantes analisados.

Tempo (Anos)	Poço de monitoramento	Gene <i>bssA</i>	Tolueno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)*	Xileno ($\mu\text{g.L}^{-1}$)*
1,0	PM8 n=5	N.A	21062,5	8391
	PM36 n=4	-	N.A	N.A
1,7	PM8 n=5	+	4086,3	3800,1
	PM36 n=4	-	N.A	N.A
2,3	PM8 n=5	+	3254,9	4544,7
	PM36 n=4	-	N.A	N.A
3,0	PM8 n=5	-	2657,8	5964,4
	PM36 n=4	-	N.A	N.A

Nota: *Limite de detecção = 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. §Limite de detecção para o gene *bssA*. (+) Indica a presença e (-) indica ausência. N.D = Não Detectado (abaixo do limites de detecção). N.A = Não analisado.

A biodegradação anaeróbia de tolueno e xileno nas amostras de água de PM8, n=5 foi comprovada pela presença do gene *bssA* nas amostras correspondentes a 1,7 anos e 2,3 anos. Entretanto, na última coleta, concernente ao período 3 anos, não foi detectado este biomarcador. Os iniciadores e sondas desenvolvidas para alvejar genes funcionais como *bssA* não abarcam toda a natural diversidade microbiana genética associada com a degradação do tolueno e xileno. Isto poderia estar indicando a possibilidade de que, no local, também existam microrganismos capazes de degradar, anaerobicamente, tolueno e xileno, sem o biomarcador *bssA* (BELLER *et al.*, 2002). De acordo com a análise das comunidades microbianas, a presença de bactérias nitrito-, ferro(III)- e sulfato-redutoras foi registrada para os tempos 1,7 e 2,3 anos. Em aquíferos contaminados com compostos BTEX, esta relação positiva entre a detecção de *bssA* com a ocorrência de processos metabólicos de biodegradação via nitrato-redução (BELLER; SPORMANN, 1997a), ferro(III)-redução (WINDERL *et al.*, 2008; CALAGHAM *et al.*, 2010) e sulfato-redução (BELLER; SPORMANN, 1997b; WINDERL *et al.*, 2008) tem sido mencionada.

4.4.5. Outros fatores de influencia na biodegradação de contaminantes orgânicos

Como foi apresentado no item 2.3.2, a biodegradação depende da existência de condições ambientais favoráveis para a atividade metabólica de microrganismos específicos. Além da biodisponibilidade da matéria orgânica e a presença de receptores de elétrons, discutidos anteriormente, outros fatores são importantes para o processo de biodegradação:

Nutrientes

A disponibilidade de nutrientes é outro requerimento essencial para o desenvolvimento dos microrganismos que podem atuar no processo de biodegradação dos contaminantes. O fósforo é um elemento abundante em aquíferos não contaminados, porém, o aumento no teor de carbono após um evento de contaminação por compostos orgânicos poderia limitar esse nutriente (ALEXANDER, 1994 *apud* WILLIAM, 2007). As concentrações de fosfato medidas para as áreas de BIS-E10 e ANM-E24 são apresentadas nas Tabelas C1b e C2 (APÊNDICE C) respectivamente.

Antes da liberação do combustível, as concentrações de fosfato na área BIS-E10 foram em média de $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$. Para o PM4 n=2, no experimento de Atenuação Natural Monitorada, os valores deste nutriente estiveram abaixo do limite de detecção na maioria das coletas consideradas. Embora existam reportes na literatura relacionados com a depleção de nutrientes como resultado da degradação do álcool, em situações de contaminação de ambientes aquáticos com misturas de gasolina e etanol (CORSEUIL; HUNT; SANTOS, 1998; FERNANDES, 2002; NIVEN, 2005; WILLIAM, 2007; COSTA, 2008), os baixos valores de fosfato registrados nas áreas dificultam discussões mais aprimoradas.

pH

Nas Tabelas B1 e B2 (APÊNDICE B) estão discriminados os valores de pH e de alcalinidade, medida em $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, para as áreas de BIS-E10 e ANM-E24 respectivamente. O valor médio de pH da água subterrânea na área de BIS-E10, antes da liberação do combustível, foi de 4,2. Após o derramamento, houve um leve aumento a partir do

valor inicial, com um pH máximo de 4,7 aos 2,3 anos de monitoramento. Apesar dos microrganismos presentes em águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo preferirem ambientes com pH entre 6 e 8 (CHAPELLE, 2001), algumas bactérias, como as sulfato-redutoras são conhecidas por ser perfeitamente capazes de crescer e se desenvolver em faixas de pH mais ácidas (KOSCHORRECK, 2008). Na área sob Atenuação Natural Monitorada, o valor inicial de pH correspondente ao PM4, n=2, foi de 5.6. Ao longo do experimento as medições revelaram uma tendência geral de diminuição nos valores de pH. Este resultado tem sido associado com o aumento da concentração de subprodutos metabólicos produzidos durante os processos de biodegradação do etanol e dos compostos monoaromáticos, comumente de natureza ácida (FERNANDES, 2002).

Nas águas subterrâneas, a alcalinidade indica a capacidade do sistema em resistir a mudanças de pH. No experimento de BIS-E10, a alcalinidade aumentou até os 2,3 anos. Segundo Wiedemeier *et al.* (1999a), em locais subsuperficiais contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, os processos de nitrato-, ferro(III)- e sulfato-redução tendem a aumentar a alcalinidade devido à produção de CO₂ durante a biodegradação do etanol e dos compostos aromáticos. No PM4, n=2 a alcalinidade aumentou até os 1,9 anos (Tabela B2 - APÊNDICE B) e depois dessa data começou a diminuir. Lembrando que a produção de metano foi evidenciada a partir do tempo 1,9 anos (Figura 4.12), o consumo de CO₂ como receptor de elétrons, estaria explicando esta diminuição nos valores de alcalinidade.

Temperatura

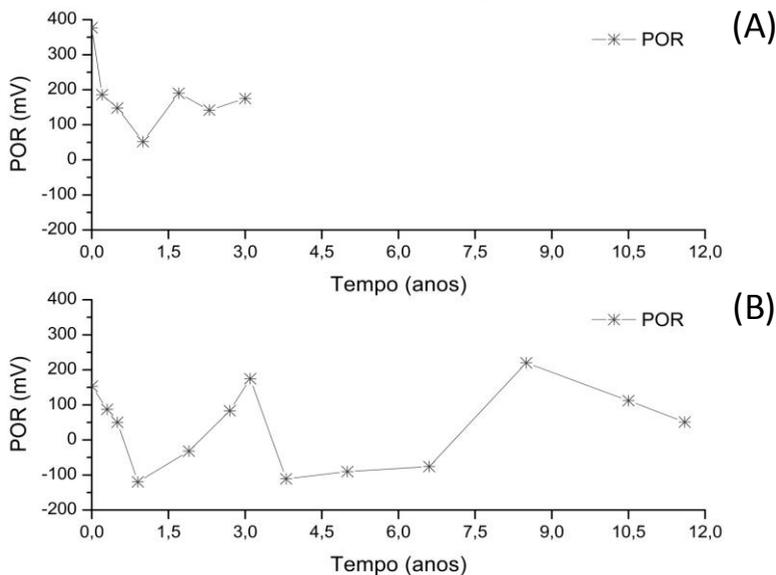
Os valores de temperatura para os experimentos de BIS-E10 e ANM-E24 são mostrados nas Tabelas C1b e C2 (APÊNDICE C) estão discriminados os valores de pH para as áreas de BIS-E10 e ANM-E24 respectivamente. Na área de BIS-E10, a temperatura teve pouca variação (entre 22 e 27°C). As maiores temperaturas se registraram na quarta coleta, realizada no verão (fevereiro de 2011). As medições no PM4 n=2, da área sob Atenuação Natural Monitorada, não apresentaram grandes variações nos valores de temperatura. Os registros mais altos, acima de 26°C, ocorreram em campanhas de amostragens realizadas nos meses de novembro e março. Esses valores estão de acordo com considerações da literatura técnica, segundo as quais as temperaturas

dos aquíferos são relativamente estáveis com apenas ligeiras variações sazonais (US EPA, 1995).

Potencial redox

O potencial redox (POR) medido ao longo dos 3 anos de monitoramento da área de BIS-E10, após a contaminação, variou entre 52-190 mV. O menor valor medido foi no tempo 1 ano, coincidindo com as máximas concentrações de etanol, benzeno e tolueno e a presença de nitrito, ferro (II) e sulfeto. Os valores de POR encontrados no experimento de BIS-E10 estão dentro da faixa correspondente aos processos de nitrato- e ferro(III)-redução, de acordo com Stumm e Morgan (1981) (Figura 4.14 (A)). Segundo esses autores, os valores de potencial redox característicos de condições sulfato-redutoras são da ordem de -220 mV, no entanto, há registros na literatura que revelam a ocorrência do processo de sulfato-redução com valores de potencial redox positivos, entre 1-100 mV (EDMUND; COOK, 1984) e -29 a 169 mV (LYNGKILDE; CHRISTENSEN, 1992).

Figura 4.14 – Variação temporal do potencial redox (POR). A) Experimento de BIS-E10 (PM8, nível de profundidade 5 metros); B) Experimento de ANM-E24 (PM4, nível de profundidade 2 metros).



Quando comparado o potencial redox, observa-se que na área de BIS-E10 os valores foram superiores que os correspondentes à área de ANM-E24 após a liberação do combustível. Isso indicaria que o meio estava em condições menos redutoras, provavelmente pela injeção de sulfato, por um lado, e a presença natural de nitrato e ferro (III) nessa área. Por outro lado, a presença de potenciais redox negativos na área de ANM-E24, Figura 4.14 (B), é um forte indicativo da ocorrência do processo de metanogênese na água subterrânea.

CAPÍTULO V

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- A degradação do etanol e dos hidrocarbonetos monoaromáticos presentes no combustível E10 ocorreu de forma simultânea através dos processos anaeróbios de nitrato-redução, ferro(III)-redução e sulfato-redução. Isto foi demonstrado pela presença concomitante dos subprodutos metabólicos nitrito, ferro (II) e sulfeto, assim como de bactérias nitrito-, ferro(III)- e sulfato-redutoras.
- A presença de sulfeto e de bactérias sulfato-redutoras evidenciou a contribuição do sulfato na biodegradação de etanol e de BTEX na área E10.
- A menor proporção de etanol no combustível E10 (10% v/v de etanol) e a presença de sulfato provocaram adiantamento de 1 ano no início da biodegradação de seus compostos BTEX e aumento em suas velocidades de atenuação de 3 vezes, quando comparado ao combustível E24 (24% v/v de etanol).
- A ausência de metano e de Arqueas metanogênicas demonstraram que o processo metanogênico não atuou na degradação do etanol e dos compostos BTEX na área de Bioestimulação com Injeção de Sulfato. Por outro lado, este processo foi predominante na degradação de etanol e de BTEX no experimento de Atenuação Natural Monitorada. O menor teor de etanol na mistura assim como a presença de sulfato, ferro (III) e nitrato evitaram o estabelecimento de condições metanogênicas na área E10.

RECOMENDAÇÕES

Com relação às conclusões deste trabalho, recomenda-se:

- A continuidade do monitoramento da área experimental E10, para acompanhar a migração e a diminuição da concentração dos compostos aromáticos até valores permitidos pela legislação vigente;
- A determinação da cinética das reações de biodegradação para todos os hidrocarbonetos monoaromáticos utilizando maior número de amostras;
- A identificação ao nível de espécie dos microrganismos envolvidos nos processos de biodegradação atuantes através de técnicas moleculares de sequenciamento;
- Análises de amostras de solo para a determinação de possíveis precipitados que poderiam estar subestimando a ocorrência de processos e também porque grande parte da comunidade microbiana se encontra aderida ao solo;
- A avaliação da influência do etanol na mistura E10 em experimento de campo, sob condições de Atenuação Natural Monitorada.
- A avaliação da influência do etanol na mistura E24 em experimento de campo, sob condições de Bioestimulação com adição de sulfato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDANUR, A. **Biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos: Estudo de Caso da Refinaria Duque de Caxias - RJ.** Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Petróleo Brasileiro - Rio de Janeiro. 156 p. 2005.

ALVAREZ, P.J.J. **The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation.** Revista Latinoamericana de Microbiología, v. 44, n. 2, p. 83–104. 2002.

ALVES, M.B.M.; BEM, R.M. de; GARCIA, T. **Procedimentos para apresentação e normalização de trabalhos acadêmicos: citação (NBR 10520:2002).** Florianópolis, 2010. 27 slides, color. Disponível para download em:
<http://www.bu.ufsc.br/design/moduloIIIatualizado.pdf>.

ALFREIDER, A.; VOGT, C. **Bacterial Diversity and Aerobic Biodegradation Potential in a BTEX-Contaminated Aquifer.** Water Air Soil Pollut, v. 183, n. 1–4, p. 415–426. 2007.

AL-ZUHAIR, S.; EL-NAAS, M.H.; AL-HASSANI, H. **Sulfate Inhibition Effect on Sulfate Reducing Bacteria.** Journal of Biochemical Technology, v. 1, n.2, p. 39–44. 2008.

AMEND, J.P. ; TESKE, A. **Expanding frontiers in deep subsurface microbiology.** Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, v. 219, n. 1–2, p. 131–155. 2005.

ANDERSON, R.T.; D.R. LOVLEY. **Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer.** Environmental Science and Technology, v. 34, n. 11, p. 2261–2266. 2000.

ANDREONI, V.; GIANFREDA, L. **Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 76, n. 2, p. 287–308. 2007.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Ministério de Minas e Energia. **Biocombustíveis**. 2010. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=33972&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1299157931446>. Último acesso em Março de 2012.

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18th Ed. 46 p. Washington, DC. 1992. Disponível para download em: <http://www.umass.edu/tei/mwwp/acrobat/sm9010-40intro.PDF>.

AQUINO, I.S. **Como escrever artigos científicos: sem “arrodeio” e sem medo da ABNT**. São Paulo, 8^a Ed, Saraiva, 126 p. 2010.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. **Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas**. Química Nova, v. 32, n. 9, p. 1–6. 2009.

ATLAS, R.M. **Stimulated Petroleum Biodegradation**. Critical Reviews in Microbiology. v. 5, n. 4, p. 371–386. 1977.

ATLAS, R.M. **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective**. Microbiological Reviews. v. 45, n. 1, p. 80–209. 1981.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: Fundamentals and Applications**. Benjamin/Cummings. 2nd Ed. 236 p. 1987.

AZAMBUJA, E.; CANCELIER, D.B.; NANNI, A.S. **Contaminação dos solos por LNAPL: discussão sobre diagnóstico e remediação**. Anais do II Simpósio de Prática de Engenharia Geotécnica da Região Sul, Porto Alegre, p.185–202. 2000.

AZADPOUR-KEELEY, A.; RUSSELL, H.H.; SEWELL, G.W. **Microbial Processes Affecting Monitored Natural Attenuation of Contaminants in the Subsurface**. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Office of Solid Waste and Emergency Response, 18 p. 1999.

BAEDECKER, M.J.; COZZARELLI, I.M.; EGANHOUSE, R.P. SIEGEL, D.I.; BENNETT, P.C. **Crude oil in a shallow sand and gravel aquifer-III. Biogeochemical reactions and mass balance modeling in anoxic groundwater.** Applied Geochemistry, v. 8, n. 6, p. 569–586. 1993.

BALDWIN, B.R.; NAKATSU, C.H.; NIES, L. **Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites.** Water Research, v. 42, n. 3, p.723–731. 2008.

BARCELONA, M.J.; HOLM, J.R. **Oxidation-Reduction capacities in Aquifer Solids.** Environmental Science and Technology, v. 25, p. 1565–1572. 1991.

BARTON, L.L. HAMILTON, W.A. **Sulphate-reducing Bacteria. Environmental and Engineered Systems.** Cambridge University Press. 2007.

BASE AÉREA FLORIANOPOLIS. Arquivos meteorológicos do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA) referentes a 2009–2011.

BEDIENT, P.B.; RIFAI, H.S.; NEWELL, C.J. **Groundwater contamination. Transport and Remediation.** Prentice Hall PTR, 542 p. 1994.

BELLER, H.R.; SPORMANN, A.M. **Anaerobic activation of toluene and o-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T.** Journal of Bacteriology, v. 179, n. 3, p. 670–676. 1997a.

BELLER, H.R.; SPORMANN, A.M. **Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1.** Applied and Environmental Microbiology, v. 63, n. 9, p. 3729–3731.1997b.

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 and Technology, v. 36, n. 18, p. 3977–3984. 2002.

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

BJERG, P.L.; RUGGE, K.; PEDERSEN, J.K.; CHRISTENSEN, T.H. **Distribution of redox sensitive groundwater quality parameters downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark).** *Environmental Science and Technology*, v. 29, n.5, p. 1387–1394. 1995.

BLOCK, J.H. BEALE, J.M. **Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry.** 11th Ed. 2004.

BMU. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Ministério Federal do Meio Ambiente, Conservação da Natureza e Segurança Nuclear). **TRANSPORTES /E10. Novo serviço de informações.** 2011. Disponível em: www.bmu.de. Último acesso em Março de 2012.

BNDES E CGEE. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável** / Organização BNDES e CGEE - Rio de Janeiro. 2008. Disponível para Download em: <http://www.cgee.org.br/publicacoes/bietanol.php>. Último acesso em Março de 2012.

BORCH, T.; KRETZSCHMAR, R.; KAPPLER, A., VAN CAPPELLEN, P.; GINDER - VOGEL, M.; VOEGELIN, A; CAMPBELL, K. **Biogeochemical Redox Processes and their Impact on Contaminant Dynamics.** *Environmental Science and Technology*, v. 44, n.1, p. 15–23. 2010.

BOUWER, E.J.; McCARTY, P.L. **Modeling of trace organics biotransformation in the subsurface Ground Water.** v. 22, n. 4, p. 433–440. 1984.

BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K.P. **Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (nirK**

and nirS) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 10, p. 3769–3775. 1998.

BRASIL. Congresso Nacional Constituinte. **Constituição Federal da República Federativa do Brasil.** Brasília, 1988.

_____. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Medida provisória n° 1.662-3, de 25 de agosto de 1998. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 1998. Disponível em:

https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/antigas/1662-3.htm. Último acesso em Julho de 2012.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n° 396**, de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2008. Disponível em:

http://www.abas.org/arquivos/res_conama396_enquadras.pdf. Último acesso em Setembro de 2012.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n° 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2009. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Último acesso em Março de 2012.

_____. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução n° 678**, de 31 de agosto de 2011. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2011a. Disponível em:

http://www.br.com.br/wps/wcm/connect/faaeb80043db071cb94dff1d71237a88/Percentual_de_alcool.pdf?MOD=AJPERES. Último acesso em Julho de 2012.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria n° 2.914**, de 12 de dezembro de 2011b. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2011b.

Disponível em:

http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Último acesso em Setembro de 2012.

BROW, C.N.; JOHNSON., R.O.; XU, M.; JOHNSON, R.L.; SIMON, H.M. **Effects of Cryogenic Preservation and Storage on the Molecular Characteristics of Microorganisms in Sediments**. Environmental Science and Technology, v. 44, n. 21, p. 8243–8247. 2010.

BRYANT, M.P.; LEON CAMPBELL, L.; REDDY, C.A. CRABILL, M.R. **Growth of Desulfovibrio in Lactate or Ethanol Media Low in Sulfate in Association with H₂-Utilizing Methanogenic Bacteria**. Applied and Environmental Microbiology, v. 33, n. 5, p. 1162–1169, 1977.

BURNS, M.; VALDIVIA, H. **Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR**. European Food Research and Technology, v. 226, n. 6, p.1513–152. 2008.

CASTAÑEDA, A.R.; BOUMAN, B.A.M.; TUONG, T.P; BUCAO, D.S. **Nitrate Contamination of Groundwater: Impact from Intensive Rice -Based Cropping Systems across Ilocos Norte**. Philippine Journal of Crop Science, v. 26, n. 1, p. 30–34. 2001.

CASTELLO, L.Z.; MOREIRA, C.A.; BRAGA, A.C.O. **Estudo Geofísico de Vazamento Controlado de Álcool Combustível em Escala Laboratorial**. Revista Brasileira de Geofísica (Impresso), v. 29, n. 2, p. 231–237. 2012.

CHAPELLE, F.H. **Ground-Water Microbiology & Geochemistry**. 2nd Ed. New York, John Wiley & Sons, INC, 477 p. 2001.

CHAPELLE, F.H.; BRADLEY, P.M.; LOVLEY, D.R.; VROBLESKY, D.A. **Measuring rates of biodegradation in a contaminated aquifer using Field and laboratory methods**. Ground Water, v. 34, n. 8, p. 691–698. 1996.

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

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

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

CHIARANDA, H.S. **Alterações biogeoquímicas em águas subterrâneas impactadas por biodiesel de soja e misturas de diesel/biodiesel (B20)**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 221 p. 2011.

CHRISTENSEN, T.H.; BJERG, P.L.; BANWART, S.A.; JAKOBSEN, R.H.; ALBRECHTSEN, G.H.J. **Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes**. *Journal of Contaminant Hydrology*, v.45, n. 3–4, p.165–241. 2000.

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

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

CORSEUIL, H.X.; FERNANDES, M. **Efeito do Etanol no Aumento da Solubilização de Compostos Aromáticos Presentes na Gasolina Brasileira**. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 4, n. 1–2, p.71–75. 1999.

CORSEUIL, H.X.; KAIPPER, B.I.A.; FERNANDES, M. **Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum**

hydrocarbons and ethanol. Water Research, v. 38, n. 6, p. 1449–1456. 2004.

COSTA, A.H.R.; CORSEUIL, H.X.; WEND, M.F. **Biorremediação com injeção de nitrato de águas subterrâneas contaminadas por vazamento de gasolina.** XIV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas. Curitiba (PA), 11 p. 2006.

COSTA, A.H.R. **Bioestimulação com injeção de nitrato de águas subterrâneas impactadas por derramamentos de gasolina com etanol.** Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 248p. 2008.

COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC. **Quality of water intended for human consumption.** Official Journal of the European Communities, 1998. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>. Último acesso em Março de 2012.

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

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

DEQ. Michigan Department of Environmental Quality Remediation and Redevelopment. **General guidance for evaluating and characterizing petroleum releases.** 62 p. Disponível para download em: http://www.michigan.gov/documents/deq/deq-std-LUSTrbca_249862_7.pdf.

DHS. Department of Human Services. Australian Government. **Annual Report 2009–2010. Appendix D – Ecologically sustainable development and environmental performance.** 2010. Disponível em:

<http://www.dhs.gov.au/publications-policies-and-plans/annual-reports/0910/appendices/appendixD.html>. Último acesso em Março de 2012.

DSF. DAVID SUZUKI FOUNDATION. **The Water We Drink. An International Comparison of Drinking Water Quality Standards and Guidelines**. 2006. Disponível para download em: <http://www.davidsuzuki.org/publications/downloads/2006/DSF-HEHC-water-web.pdf>.

DONALD, M. **Biofuels in Africa: Opportunities, Prospects, and Challenges**. The World Bank, Washington, D.C. p. 84. 2011. Disponível em: <http://africaknowledgelab.worldbank.org/akl/node/67>. Último acesso em Março de 2012.

DOMINGUEZ, R.F.; SILVA, M.L.B.; MCGUIRE, T.M.; ADAMSON, D.; NEWELL, C.J.; ALVAREZ, P.J.J. **Aerobic bioremediation of chlorobenzene source-zone soil in flow-through columns: performance assessment using quantitative PCR**. *Biodegradation*, v. 19, n. 4, p. 545–553. 2008.

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

EDMUNDS, W.M.; MILES, D.L.; COOK, J.M. **A comparative study of sequential redox processes in three British aquifers**. In Eriksson, E. (ed.) *Hydrochemical Balances of Freshwater Systems, Water interaction with soil and rock: processes and time perspectives*. IAHS Publication, n. 150, p. 55–70. 1984.

EIA. Energy Information Administration of United States. **Biofuels in the U.S. Transportation Sector**. 2007. Disponível em: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biomass.html>. Último acesso em Março de 2012.

FARHADIAN, M., VACHELARD, C., DUCHEZ, D., LARROCHE, C. **In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review**. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 13, p. 5296–5308. 2008.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Interés en todo el mundo por el combustible etanol**. Documento nº1: Perspectivas alimentarias. 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/009/j7927s/j7927s11.htm>. Último acesso em Março de 2012.

_____. **Summary Report: The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems and risk**. Rome, 2011. Disponível para download em: <http://www.fao.org/docrep/015/i1688e/i1688e00.pdf>.

FEITOSA, F. A. C.; FILHO, J.M.; FEITOSA, E. C.; DEMETRIO, J. G. A. **Hidrogeologia: Conceito e Aplicações**. 3ª Ed. revisada e Ampliada; Ed. CPRM - Serviço Geológico do Brasil, 812 p. 2008.

FERIS, K.P., MACKAY, D., DE SIEYES, N., CHAKRABORTY, I., EINARSON, M., HRISTOVA, K.R., SCOW, K. **Effect of Ethanol on Microbial Community Structure and Function during the Natural Attenuation of Benzene, Toluene and o-Xylene in a Sulfate-Reducing Aquifer**. Environmental Science and Technology, v. 42, n. 7, p. 2289–2294. 2008.

FINOTTI, A.R.; CAICEDO, N.O.L.; RODRIGUEZ, M. T. R. **Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a legislação brasileira**. Revista Brasileira de Recursos Hídricos. Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 29–46. 2001.

FREITAS, J.G.; MOCANU, M.T; ZOBY, J.L.G.; MOLSON, J.W; BARKER, J.F. **Migration and fate ethanol-enhanced gasoline in groundwater: A modelling analysis of a field experiment**. Journal of Contaminant Hydrology, v. 119, n. 1–4, p. 25–43. 2011.

FPT. Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality**. 2010. Disponível para download em: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/2010-sum_guide-res_recom/sum_guide-res_recom-eng.pdf.

GIEG, L.M.; KOLHATKAR, R.V.; MCINERNEY, M.J., TANNER, R.S.; HARRIS, S. H.; SUBLETTE, K.L.; SUFLITA, J.M. **Intrinsic**

bioremediation of petroleum hydrocarbons in a gas condensate-contaminated aquifer. *Environmental Science and Technology*, v. 33, n. 15, p. 2550–2560. 1999.

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

HEERMANN, S.E.; POWERS, S.E. **Modeling the partitioning of BTEX in water-reformulated gasoline systems containing ethanol.** *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 34, n. 4, p. 315–341. 1998.

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

HUTCHINS, S.R.; MILLER, D.E. **Combined Laboratory/Field Study on the Use of Nitrate for in Situ Bioremediation of a Fuel-Contaminated Aquifer.** *Environmental Science and Technology*, v. 32, n.12, p. 1832–1840. 1998.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico 2000: Anuário Estatístico do Brasil 2000.** Ano 2003. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/>. Último acesso em Março de 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008.** Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pns_b2008/PNSB_2008.pdf. Último acesso em Março de 2012.

IRITANI, M.A.; EZAKI, S. **As águas subterrâneas do Estado de São Paulo.** Instituto geológico, São Paulo, 104 p. 2008.

IUGS. Instituto Geológico de Noruega. **Aguas Subterráneas, ¿la solución para un planeta sediento?** 2007. Versão em espanhol.

Disponível em:

http://aiplanetatierra.igme.es/pdf_proCien/es/Aguas%20subterr%C3%A1neas-AIPT.pdf. Acessado em Março de 2012.

KALYUZHNYI, S.V.; DE LEON FRAGOSO, C.; RODRIGUEZ MARTINEZ, J. **Biological Sulfate Reduction in a UASB Reactor Fed with Ethanol as the Electron Donor**. *Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 562–567. 1997.

KAO, C.M.; CHIEN, H.Y. SURAMPALLI, R.Y. ; CHIEN, C.C.; CHEN, C.Y. **Assessing of Natural Attenuation and Intrinsic Bioremediation Rates at a Petroleum-Hydrocarbon Spill Site: Laboratory and Field Studies**. *Journal of Environmental Engineering*, v. 136, n. 1, p. 54–57. 2010.

KAZY, S.K., MONIER, A.L., ALVAREZ, P.J.J. **Assessing the correlation between anaerobic toluene degradation activity and bssA concentrations in hydrocarbon-contaminated aquifer material**. *Biodegradation*, v. 21, n. 5, p. 793–800. 2010.

KOSCHORRECK, M. **Microbial sulphate reduction at a low pH**. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 64, n. 3, p. 329–42. 2008.

KUIVILA, K.M.; MURRAY, J.W.; DEVOL, A.H.; NOVELLI, P.C. **Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington**. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v.53, n.2, p.409-416. 1989.

KULKAMP, M.S. **Atenuação natural de hidrocarbonetos de petróleo em um aquífero contaminado com derramamento simultâneo de óleo diesel e etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 176 p. 2003.

LAANBROEK, H.J.; GEERLIGS, H.J.; SIJTSMA, L.; VELDKAMP, H. **Competition for Sulfate and Ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* Species Isolated from Intertidal Sediments**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 2. 1984.

LAGE, I.C. **Avaliação de metodologias para determinação da permeabilidade em meios porosos: a área experimental da Fazenda da Ressacada, SC.** Dissertação (Mestrado em Geologia) – Departamento de Geologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 86 p. 2005.

LAWRENCE, A.; JONSSON, S.; BÖRJESSON, G. **Ethanol, BTEX and microbial community interactions in E-blend contaminated soil slurry.** International Biodeterioration and Biodegradation, v. 63, n. 6, p. 654–666. 2009.

LEAVITT, M.E.; BROWN, K.L. **Bioestimulation versus Bioaugmentation. Three case studies.** In Hydrocarbon Bioremediation. CRC Press, p. 72–79. 1994.

LEE, J.Y.; CHEON, J.Y.; LEE, K.K.; LEE, S.Y.; LEE, M.H. **Factors affecting the distribution of hydrocarbon contaminants and hydrogeochemical parameters in a shallow sand aquifer.** Journal of Contaminant Hydrology, v. 50, n. 1–2, p. 139–158. 2001.

LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N. **Real-Time PCR: Current Technology and Applications.** Applied and Functional Genomics, Health Protection Agency. Caister Academic Press. 284 p. 2009.

LOPES, S.I.C; WANG, X.; CAPELA, M.I.; LENS, P.N.L. **Effect of COD/SO₄²⁻ ratio and sulfide on thermophilic (55 °C) sulfate reduction during the acidification of sucrose at pH 6.** Water Research, v. 41, n. 11, p. 2379–2392. 2007.

LOVLEY, D.R.; RODEN, E.E.; PHILLIPS, E.J. P.; WOODWARD, J.C. **Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria.** Marine Geology, v. 113, n. 1-2, p. 41–53. 1993.

LOVLEY, D.R.; COATES, J.D.; WOODWARD, J.C; PHILLIPS, E.J.P. **Benzene oxidation coupled to sulfate reduction.** Applied And Environmental Microbiology, v. 61, n. 3, p. 953–958. 1995.

LOVLEY, D.R. **Anaerobes to the rescue.** Science, v. 293, n. 5543, p. 1444–1446. 2001.

LYNGKILDE, J.; CHRISTENSEN, T.H. **Redox zones of a landfill leachate pollution plume (Vejen, Denmark).** Journal of Contaminant Hydrology, v. 10, n.4, p. 273–289. 1992.

MACKAY, D.M.; SHIU, W.Y.; MA, K.; LEE, S.C. **Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental fate for Organic Chemicals.** 2nd. Ed. Danvers: Taylors & Francis Group, Volume I e III. 2006a.

MACKAY, D.M.; DE SIEYES, N.R.; EINARSON, M.D.; FERIS, K.P.; PAPPAS, A.A.; WOOD, I.A.; JACOBSON, L.; JUSTICE, L.G.; NOSKE, M.N.; SCOW, K.M.; WILSON, J.T. **Impact of Ethanol on the Natural Attenuation of Benzene, Toluene and o-Xylene in a Normally Sulfate-Reducing Aquifer.** Environmental Science and Technology, v. 40, n. 19, p. 6123–6130. 2006b.

MACKAY, D.M.; DE SIEYES, N.R.; EINARSON, M.D.; FERIS, K.P.; PAPPAS, A.A.; WOOD, I.A.; JACOBSON, L.; JUSTICE, L.G.; NOSKE, M.N.; WILSON, J.T.; ADAIR, C.; SCOW, K.M.; **Impact of Ethanol on the Natural Attenuation of MTBE in a Normally Sulfate-Reducing Aquifer.** Environmental Science and Technology, v. 41, n. 6, p. 2015–2021. 2007.

MALCOLM PIRNIE, Inc. **Evaluation of the Fate and Transport of Ethanol in the Environment.** Report prepared for American Methanol Institute, Washington, DC. Malcolm Pirnie, Inc., Oakland, CA. Report No. 3522–001. 1998. Disponível em: www.methanol.org/reformgas/reports/malcolm.doc. Último acesso em Março de 2012.

MALIK, S.; BEER, M; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. **The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water.** Environment International, v. 34, n. 2, p. 265–276. 2008.

MANEFIELD, M.; WHITELEY, A.S.; BAILEY, M.J. **What can stable isotope probing do for bioremediation?** International Biodeterioration and Biodegradation, v.54, n. 2–3, p. 163–166. 2004.

MARGESIN, R.; WALDER, G.; SCHINNER, F. **Bioremediation Assessment of a BTEX-Contaminated Soil**. *Acta Biotechnologica*. v. 23, n. 1, p. 29–36. 2003.

MARIANO, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese de doutorado – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas. São Paulo. 162p. 2006.

MASIERO, G.; LOPES, H. **Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia**. *Revista Brasileira de Política Internacional*, v.51, n. 2, p. 60–79. 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-73292008000200005&lng=pt&nrm=iso. Último acesso em Março de 2012.

MONTEIRO RAMOS, S. **Análise comparativa da influência do etanol em diferentes processos de remediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 112 p. 2010.

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

NAKAGAWA, T; SATO, S; FUKUI, M. **Anaerobic degradation of p-xylene in sediment-free sulfate-reducing enrichment culture**. *Biodegradation*, v.19, n. 6, p. 909–13. 2008.

NASCIMENTO, S.; RABELLO SUAREZ, E.; SILVA PINHAL, M.A. **Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica**. *Revista Brasileira de Medicina*. v. 67, 2010.

NELSON, C.H.; HICKS, R.J.; ANDREWS, S.D. **In situ Bioremediation: An Integrated System Approach**. In *Hydrocarbon Bioremediation*. CRC Press, p. 429-456.1994.

NEWELL, C.J., RIFAI, H.S.; WILSON, J.T.; CONNOR, J.A.; AZIZ, J.A.; SUAREZ, M.P. EPA Ground Water Issue: **Calculation and Use of First-Order Rate Constants for Monitored Natural Attenuation Studies**. Washington DC, 28 p. 2002.

NHMRC. National Health and Medical Research Council and National Resource Management Ministerial Council. **Australian Drinking Water Guidelines 6**, 2011. Disponível para download em: http://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/eh52_aust_drinking_water_guidelines_111130_0.pdf.

NIVEN, R.K. **Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article**. Renewable and Sustainable Energy Reviews v. 9, n.6, p. 535–555. 2005.

NRC. National Resource Council. **Alternative for Ground Water Cleanup**. 315 pp. 1994. Disponível para Download em http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=2311.

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

O'FLAHERTY, V.; MAHONY, T.; O'KENNEDY, R.; COLEERAN, E. **Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria**. Process Biochemistry, v. 33, n. 5, p.555–569. 1998.

PIFFNER, S.M; PALUMBO, A.V; GIBON, T.; RINGELBERG, D.B.; MCCARTHY, J.F. **Relating Ground Water and Sediment Chemistry to Microbial Characterization at BTEX-Contaminated Site**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 63–65, n. 1, p. 775–788. 1997.

POSTGATE, J.R. **The Sulphate-Reducing Bacteria**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. 145 p.

POWERS, S.E.; HUNT, C.S.; HEERMANN, S.E.; CORSEUIL, H.X.; RICE, D.; ALVAREZ, P.J.J. **The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol**. The Critical

Reviews in Environmental Science and Technology, v. 31, n. 1, p. 79–123. 2001.

PRODUCTIVITY COMMISSION. **Arrangements for Setting Drinking Water Standards**. International benchmarking. AusInfo, Canberra. 2000. Disponível em:
http://www.pc.gov.au/__data/assets/pdf_file/0019/9190/drinkw.pdf.
Último acesso em agosto de 2012.

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

REINHARD, M; SHANG, S.; KITANIDIS, P.K.; ORWIN, E.; HOPKINS, G.D.; LEBRON, C.A. **In situ BTEX Biotransformation under Enhanced Nitrate- and Sulfate-Reducing Conditions**. Environmental Science and Technology, v. 31, p. 28–36. 1997.

REY, G.H. **ENERGY-COLOMBIA: Harvesting Sunshine for Biofuels**. IPS (Inter Press Service) Journalism and Communication for Global Change. 2006. Disponível em
<http://ipsnews.net/news.asp?idnews=35088>. Último acesso em Março de 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova. v. 27, n. 5, p. 771–780. 2004.

RISER-ROBERTS, E. **Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites**, CRC Press, Boca Raton, FL. 496p. 1992.

ROYCHOUDHURY, A.N.; MCCORMICK, D.W. **Kinetics of sulfate reduction in a coastal aquifer contaminated with petroleum hydrocarbons**. Biogeochemistry, v. 81, n.1, p. 17–31. 2006.

ROYCHOUDHURY, A.N.; MERRETT, G.L. **Redox pathways in a petroleum contaminated shallow sandy aquifer: Iron and sulfate reductions**. Science of the Total Environment, v. 366, n. 1, p. 262–274. 2006.

RUIZ-AGUILAR, G.M.L.; FERNANDEZ-SANCHEZ, J.M.; KANE, S.R.; KIM, D.; ALVAREZ, P.J.J. **Effect of ethanol and methyl-tert-butyl ether on monoaromatic hydrocarbon biodegradation: response variability for different aquifer materials under various electron accepting conditions.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 21, n. 12, p. 2631–2639. 2002.

RUSSELL, P. J.; HERTZ, P.E.; MCMILLAN, B. **Biology: The Dynamic Science**, 2nd. Ed. Brooks Cole, 1456 p. 2011.

SAWYER, C.N.; McCARTY, P.L.; PARKIN, G.F. **Chemistry for Environmental Engineering**. 4th Ed. McGraw-Hill, Inc, 224 p. 1994.

SAX, N.I.; LEWIS R.J., Eds. **Condensed Chemical Dictionary**, 11th Ed. Van Nostrand Reinhold Co. New York. 1987.

SCHAMBECK, C.M. **Cinética de biodegradação de múltiplos substratos em águas subterrâneas impactadas por derramamentos de misturas de gasolina com etanol.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 111 p. 2012.

SCHREIBER, M.E.; BAHR, J.M. **Spatial electron acceptor variability: Implications for assessing bioremediation potential.** *Bioremediation Journal*, v. 3, n. 4, p. 363–378. 1999.

SCHROTH, M.H.; KLEIKEMPER, J.; BOLLIGER, C.; BERNASCONI, S.M, ZEYER, J. **In situ assessment of microbial sulfate reduction in a petroleum-contaminated aquifer using push-pull tests and stable sulfur isotope analyses.** *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 51, n. 3–4, p. 179–195. 2001.

SCHWARZENBACH, R.P.; GSCHWEND, P.M.; IMBODEN, D.M. **Environmental Organic Chemistry**, 2nd Ed. Wiley-Interscience, 1313 p. 2003.

SEMPLE, K.T.; DOICK, K.J.; JONES, K.C.; BURAUDEL, P.; CRAVEN, A.; HARMS, H. **Peer Reviewed: Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is**

Complicated. Environmental Science and Technology, v. 38, n. 12, p. 228A–231A. 2004.

SILVA, D.J. **Uma estrutura cognitiva para o processo de pesquisa. Introdução à pesquisa em Engenharia Ambiental.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Março-Junho de 2010. 25 f. Notas de aula. Digitado.

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

SILVA, M.L.B.; RUIZ-AGUILAR, G.M.L.; ALVAREZ, P.J.J. **Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelate ferric ion or nitrate.** Biodegradation, v.16, n. 2, p.105–114. 2005.

SILVA M.L.B.; ALVAREZ, P.J.J. **Assessment of anaerobic benzene degradation potential using 16S rRNA gene-targeted real-time PCR.** Environmental Microbiology, v. 9, n. 1, p. 72–80. 2007.

SILVA, M.L.B.; JOHNSON, R.L.; ALVAREZ, P.J.J. **Microbial Characterization of Groundwater Undergoing Treatment with a Permeable Reactive Iron Barrier.** Environmental Engineering Science, v. 24, n. 8, p. 1122-1127. 2007.

SILVA, R.L.B.; BARRA, C.M.; MONTEIRO, T.C.N.; BRILHANTE, O.M. **Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e inorgânicos e possíveis consequências para a saúde no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, v.18, n. 6, p. 1599–1607. 2002.

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

SMITH, C.J.; OSBORN, A.M. **Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology.** FEMS Microbiology Ecology, v. 67, n. 1, p. 6–20. 2009.

STUMM, W.; MORGAN, J.J. **Aquatic Chemistry. An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters.** 2nd. Ed. John Wiley & Sons. 780 p. 1981.

SUBLETTE, K.; PEACOCK, A.; WHITE, D.; DAVIS, G.; OGLES, D.; COOK, D.; KOLHATKAR, R.; BECKMANN, D.; YANG, X. **Monitoring Subsurface Microbial Ecology in a Sulfate-Amended, Gasoline-Contaminated Aquifer.** *Ground Water Monitoring and Remediation*, v. 26, n. 2, p. 70–78. 2006.

SUFLITA, J.M.; SEWELL, G.W. **Anaerobic biotransformation of contaminants in the subsurface.** EPA Environmental Research Brief EPA1600IM-901024. p. 1–9. 1991.

SURFER, version 8.0. **Contouring, Gridding, and Surface Mapping Package for Scientists and Engineers.** 2002. Disponível em: <http://goldensoftware.com>. Último Acesso em Agosto de 2012.

SUSUKI, M.T.; TAYLOR, L.T.; DELONG, E.F. **Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 59-Nuclease Assays.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 11, p. 4605–4614. 2000.

SWEED, H.G.; BEDIENT, P.B.; HUTCHINS, S.R. **Surface Application System for In Situ Ground-Water Bioremediation: Site Characterization and Modeling.** *Ground Water*, v. 34, n. 2, p. 211–222. 1996.

TAKAHATA, Y.; YUKI KASAI, Y.; HOAKI, T.; Watanabe, K. **Rapid intrinsic biodegradation of benzene, toluene, and xylenes at the boundary of a gasoline-contaminated plume under natural attenuation.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, n. 3, p. 713–722. 2006.

TORSVIK, V.; SALTE, K.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J. **Comparison of Phenotypic Diversity and DNA Heterogeneity in a Population of Soil Bacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 3, p. 776–781. 1990.

ULRICH, G.A.; SUFLITA, J. **Enhancement of Microbial Sulfate Reduction for the Remediation of Hydrocarbon Contaminated Aquifers** – A Laboratory and Field-scale Project. EPA R8279015-01-0. 2001. Disponível em http://ipec.utulsa.edu/14.d/14_FinalRev.pdf. Último acesso em Março de 2012.

ULRICH, A.C.; EDWARDS, E.A. **Physiological and Molecular Characterization of Anaerobic Benzene-Degrading Mixed Cultures**. *Environmental Microbiology*, v. 5, n.2, p. 92–102. 2003.

UNESCO. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. **Groundwater contamination inventory. A methodological guide**. Series On Groundwater N°2. 2002. Disponível em: <http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001325/132503e.pdf>. Último acesso em Março de 2012.

US EPA, United States Environmental Protection Agency . **Federal Water Pollution Control Act**. 1977. Disponível em: <http://www.epa.gov/npdes/pubs/cwatxt.txt>. Último acesso em Março de 2012.

_____. **Regulation of Fuels and Fuel Additives; Definition of Substantially Similar**. Revised Interpretive Rule, Final Action, February 11, 1991. Disponível em: <http://www.epa.gov/otaq/regs/fuels/additive/jan91.pdf>. Último acesso em Março de 2012.

_____. **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers**. 1995. In Chapter X: In-Situ Groundwater Bioremediation. Disponível em: <http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm>. Último acesso em Agosto de 2012.

_____. **Method 8015A - Aromatic Volatile Organics by Gas Chromatografia**. 1996. Disponível em: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/faq/faqs_org.htm#Purge.

_____. **Ground Water Issue Design Guidelines for Conventional Pump-and-Treat Systems**. Superfund Tecnology Support Center for

Ground Water, 1997a. Disponível em:
<http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/10002E0Q.PDF>. Último acesso em Março de 2012.

_____. **Method 300.1 - Determination of Inorganic Anions by Ion Chromatography**, Revision 1.0. 1997b. Disponível em
<http://www.epa.gov/sam/pdfs/EPA-300.1.pdf>. Último acesso em Maio de 2012.

_____. **Environmental Protection and Remedial. Oil Program Center. Understanding oil spills and oil spill response in freshwater environments**. Washington, 1999. Disponível em
[http://repositories.tdl.org/tamugir/bitstream/handle/1969.3/27471/10931Understanding%20Oil%20Spills%20and%20Oil%20Spill%20Response - Understanding%20Oil%20Spills%20in%20Freshwater%20Environment s.pdf?sequence=1](http://repositories.tdl.org/tamugir/bitstream/handle/1969.3/27471/10931Understanding%20Oil%20Spills%20and%20Oil%20Spill%20Response-Understanding%20Oil%20Spills%20in%20Freshwater%20Environment s.pdf?sequence=1). Último acesso em Março de 2012.

_____. **Composition and Behavior of Fuel Ethanol**. 2009a. Disponível em: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=P1003ZO5.PDF>. Último acesso em Março de 2012.

_____. **National Primary Drinking Water Regulations**. 2009b. Disponível em: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf>. Último acesso em Abril de 2012.

_____. **Renewable Fuels Standard (RFS2)**. 2010. Disponível em http://ethanolrfa.3cdn.net/90c1a873be0da22e02_ypm6i2c47.pdf. Último acesso em Março de 2012.

_____. **History of the Clean Air Act**. 2012a. Disponível em:
http://epa.gov/oar/caa/caa_history.html. Último acesso em Março de 2012.

_____. **Ground Water Basics**. 2012b. Disponível em:
http://www.epa.gov/region2/water/gw_basic.htm. Último acesso em Abril de 2012.

VROBLESKY, D.A.; CHAPELLE, F.H. **Temporal and spatial changes of terminal electron accepting processes in a petroleum**

hydrocarbon-contaminated aquifer and significance for contaminant biodegradation. *Water Resources Research*, v. 30, n. 5, p. 1561–1570. 1994.

VROBLESKY, D.A.; BRADLEY, P.M.; CHAPELLE, F.H. **Influence of Electron Donor on the Minimum Sulfate Concentration Required for Sulfate Reduction in a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer.** *Environmental Sciences and Technology*, v. 30, n. 4, p. 1377–1381. 1996.

WALKER, J.M.; RAPLEY, R. **Molecular Biomethods Handbook.** 2nd. Ed. Humana Press. 1124 p. 2008.

WEINER, J.M.; LAUCK, T.S.; LOVLEY, D.R. **Enhanced Anaerobic Benzene Degradation with the Addition of Sulfate.** *Bioremediation Journal*, v. 2, n. 3–4, p. 159–173. 1998.

WEISS, J.V.; COZZARELLI, I.M. **Biodegradation in Contaminated Aquifers: Incorporating Microbial/Molecular Methods.** Review Paper. *Ground Water*, v. 46, n. 2, p. 305–322. 2008.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for Drinking-water Quality. Incorporating first and second addenda to third edition.** Volume 1 Recommendations. 2006. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf. Último acesso em Junho de 2012.

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

WIEDEMEIER, T.H.; RIFAI, H.S.; NEWEL, C.J.; WILSON, J.T. **Natural Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface.** New York: John Wiley & Sons, Inc. 617 p. 1999a. Disponível para leitura online em: <http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=LVYRrozBhqC&oi=fnd&pg=PR11&dq=natural+attenuation+of+fuels+and&ots=NxtM8sYm2>

Q&sig=DWnDuNzOuDfCEuN_2su4R8xe8Is#v=onepage&q=electron&f=false. Último acesso em Março de 2012.

WIEDEMEIER, T.H.; WILSON, J.T.; KAMPBELL, D.H.; MILLER, R.N.; HANSEN, J.E. **Technical Protocol for Implementing Intrinsic Remediation with Long-term Monitoring for Natural Attenuation of Fuel Contamination Dissolved in Groundwater**. Air Force Center for Environmental Excellence. Technology Transfer Division. Brooks Air Force Base, Texas. V.1, 295p.1999b. Disponível para Download em: <http://www.afcee.af.mil/shared/media/document/AFD-071211-039.pdf>.

WILLIAMS, E.C. **Effect of Ethanol on BTEX Biodegradation in Aerobic Aquifer Systems**. Thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the thesis requirement for the degree of Master of Science in Earth Sciences. University of Waterloo, Ontário, Canadá, 105p. 2007.

WINDERL, C.; ANNESER, B.; GRIEBLER, C.; MECKENSTOCK, R.U.; LUEDERS, T. **Depth-Resolved Quantification of Anaerobic Toluene Degraders and Aquifer Microbial Community Patterns in Distinct Redox Zones of a Tar Oil Contaminant Plume**. Applied and Environmental Microbiology, v. 74, n. 3, p. 792–801. 2008.

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

YERUSHALMI, L.; MANUEL, M.F.; GUIOT, S.R. **Biodegradation of gasoline and BTEX in a microaerophilic biobarrier**. Biodegradation, v. 10, n. 5, p. 341–352.1999.

ANEXOS

Incorporam este item os seguintes documentos:

ANEXO A – CÁLCULOS DE MASSA DE SULFATO DE SÓDIO (Na_2SO_4)	171
ANEXO B – CÁLCULOS DE MASSA DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NAOH)	172
ANEXO C – CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA ANTES DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DO COMBUSTÍVEL E10	173
ANEXO D – SOLUBILIDADE DOS COMPOSTOS MONOAROMÁTICOS PRESENTES NA MISTURA DE COMBUSTÍVEIS CONSIDERANDO A LEI DE RAOULT	177
ANEXO E – REPRESENTAÇÃO EM PLANTA DA ÁREA EXPERIMENTAL DA ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA	179

ANEXO A – CÁLCULOS DE MASSA DE SULFATO DE SÓDIO (Na_2SO_4)

Para o cálculo da massa necessária para a injeção considerou-se a fonte de contaminação sob um regime baseado num reator de fluxo de pistão. Desta maneira, a carga que entra na fonte depende da geometria dessa fonte, da velocidade da água subterrânea e da concentração do composto de interesse.

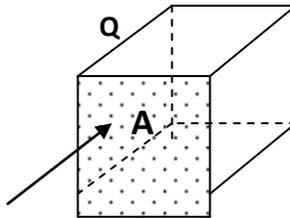
Assim,

$W(t) = QC_{\text{entra}}$, onde:

C_{entra} é a concentração (M/L^3)

$Q = \text{vazão (L}^3/\text{T)} \rightarrow Q = A \times v \rightarrow A = \text{área da secção transversal} = \text{comprimento} \times \text{altura}$

$v = \text{velocidade da água subterrânea}$



Dados de entrada:

Largura = 18 m

Altura (distância entre os níveis de monitoramento) = 5 m

$v = 6 \text{ m/ano}$

$C_{\text{entrada}} = 100 \text{ mg/L} = 0,1 \text{ g/L}$

$Q = (18 \text{ m} \times 5 \text{ m} \times 6 \text{ m/ano})$

$Q = 540 \text{ m}^3/\text{ano} = 1,5 \text{ m}^3/\text{dia} (1500 \text{ L/dia})$

Assim,

$W(t) = 250 \text{ g/dia} \rightarrow 1750 \text{ g/semana}$

$W(t) = QC_{\text{entra}} = 1500 \text{ L/dia} \times 0,1 \text{ g/L} = 150 \text{ g/dia} = 1050 \text{ g/semana}$

ANEXO B – CÁLCULOS DE MASSA DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NAOH)

Para o cálculo da massa necessária para a injeção de NaOH, levou-se em consideração os seguintes parâmetros: molaridade da solução de NaOH utilizada para titular a amostra da água subterrânea da área (M_{NaOH}), o volume de NaOH consumido para elevar o pH para o patamar desejado (V_{NaOH}), o volume da amostra da água subterrânea coletada ($V_{\text{H}_2\text{O}}$) e o volume total da área experimental ($V_{\text{área}}$) que considerou o comprimento (C), a largura (L) e a distância entre o primeiro e o último nível de monitoramento (D).

Dados de entrada:

$$M_{\text{NaOH}} = 0,0181 \text{ mol/L}$$

$$V_{\text{NaOH}} = 0,59 \text{ mL } (0,59 \times 10^{-3} \text{ L}) \rightarrow \text{ de pH } 5,77 \text{ para pH } 6,02$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = 200 \text{ mL } (0,2 \text{ L})$$

$$\text{Peso molecular do NaOH} = 40 \text{ g/mol}$$

$$C = 30,5 \text{ m}$$

$$L = 18 \text{ m}$$

$$D = 4 \text{ m}$$

Assim:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 (0,2 \text{ L} + 0,59 \times 10^{-3} \text{ L}) = 0,0181 \text{ mol/L} \times 0,59 \times 10^{-3} \text{ L}$$

$$C_1 = 5,3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$V_{\text{área}} = C \times L \times D$$

$$V_{\text{área}} = 30,5 \text{ m} \times 18 \text{ m} \times 4 \text{ m} = 2196 \text{ m}^3 \approx 2200 \text{ m}^3 = 2200000 \text{ L}$$

Uma vez que a porosidade da área é em torno de 20%, então apenas 20% do volume total corresponde à água, neste caso:

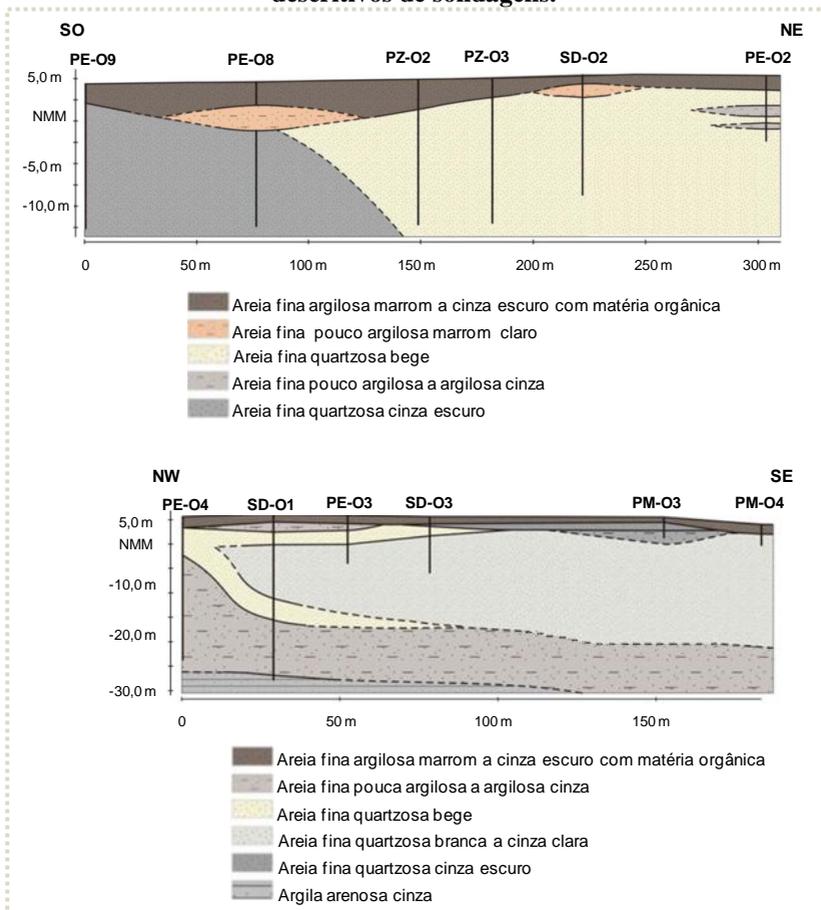
$$2200000 \text{ L} \times 0,2 = 440000 \text{ L}$$

$$C = m/V$$

$$m = C \times V = 5,3 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \times 40 \text{ g/mol} \times 440000 \text{ L} = 936,98 \text{ g de NaOH.}$$

ANEXO C – CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA ANTES DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DO COMBUSTÍVEL E10

Figura C1 – Seções geológicas interpretadas a partir de perfis descritivos de sondagens.



FONTE: Adaptado de Lage (2000).

Tabela C.1a – Valores das variáveis para a caracterização da água subterrânea por nível de profundidade (n).

VARIÁVEIS	n=2 metros	n=3 metros	n=4 metros	n=5 metros	n=6 metros	Média*
Temperatura (°C)	24,24	24,12	23,96	23,78	23,70	23,96
pH	4,08	4,05	4,13	4,33	4,39	4,20
Potencial redox (mV)	380,14	379,57	384,29	374,86	367,14	377,20
Oxigênio Dissolvido (OD) (mg.L ⁻¹)	3,72	1,46	2,83	2,13	1,41	2,31
Condutividade específica (Ms.cm ⁻¹)	85,43	79,29	46,43	38,14	38,14	57,49
Acidez (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	-
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	-
Sulfato (SO ₄ ⁻²) (mg.L ⁻¹)	2,67	3,37	3,68	4,56	4,40	3,74
Sulfeto (µg.L ⁻¹)	10,29	12,57	20,14	13,86	7,86	12,94
Nitrato (NO ₃ ⁻) (mg.L ⁻¹)	2,72	3,48	2,01	1,03	0,50	1,95
Nitrito (NO ₂ ⁻) (mg.L ⁻¹)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D.
Cloreto (Cl ⁻) (mg.L ⁻¹)	16,63	13,94	5,74	3,88	4,19	8,88
Ferro ferroso (Fe ⁺²) (mg.L ⁻¹)	0,06	0,04	0,08	0,06	0,18	0,08
Fosfato (PO ₄ ⁻³) (mg.L ⁻¹)	0,09	0,16	0,10	0,09	0,08	0,10
Acetato (CH ₃ COO ⁻) (mg.L ⁻¹)	0,18	0,26	0,23	0,17	0,19	0,21
Metano (mg.L ⁻¹)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Brometo (Br ⁻) (mg.L ⁻¹)	0,10	0,10	0,05	0,05	0,06	0,11

FONTE: Laboratório REMAS / UFSC. Projeto Ressacada (2009). Valores correspondentes a amostras de água subterrânea dos seguintes PM: P1B, P16A, P26A, P28, P30A, P4, P5B, P20A, P18 e Fonte. *Média de todos os níveis das variáveis analisadas. Nota: N.D = Não Detectado (abaixo do limites de detecção). N.A = Não analisado.

**ANEXO D – SOLUBILIDADE DOS COMPOSTOS
MONOAROMÁTICOS PRESENTES NA MISTURA DE
COMBUSTÍVEIS CONSIDERANDO A LEI DE RAOULT**

**Tabela D1 – Experimento de Bioestimulação com Injeção de Sulfato
(E10).**

Compostos	Solubilidade em água (mg.L⁻¹)	Fração molar	Solubilidade segundo a Lei de Raoult (mg.L⁻¹)
Benzeno	1780	0,01	17,3
Tolueno	515	0,03	17
Etilbenzeno	152	0,01	1,2
orto-(o)-xileno	220	0,01	3
meta-(m)-xileno	160	0,02	3,9
para-(p)-Xileno	215	0,01	2

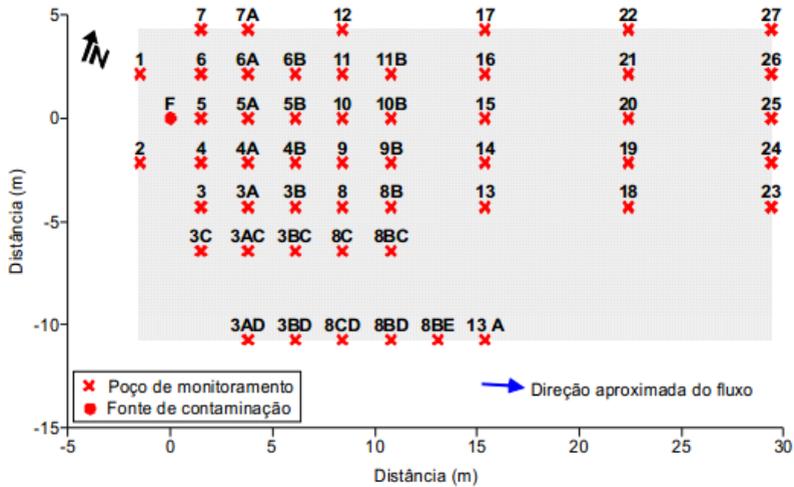
FONTE: Adaptado de Monteiro Ramos (2010).

Tabela D2 – Experimento de Atenuação Natural Monitorada (E24).

Compostos	Solubilidade em água (mg.L⁻¹)	Fração molar	Solubilidade segundo a Lei de Raoult (mg.L⁻¹)
Benzeno	1780	0,01	13,9
Tolueno	515	0,04	21,6
Etilbenzeno	152	0,01	1,7
orto-(o)-xileno	220	0,02	3,7
meta-(m)-xileno	160	0,03	5,1
para-(p)-Xileno	215	0,01	2,5

FONTE: Adaptado de Monteiro Ramos (2010).

ANEXO E – REPRESENTAÇÃO EM PLANTA DA ÁREA EXPERIMENTAL DA ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA



FONTE: Schambeck (2012).

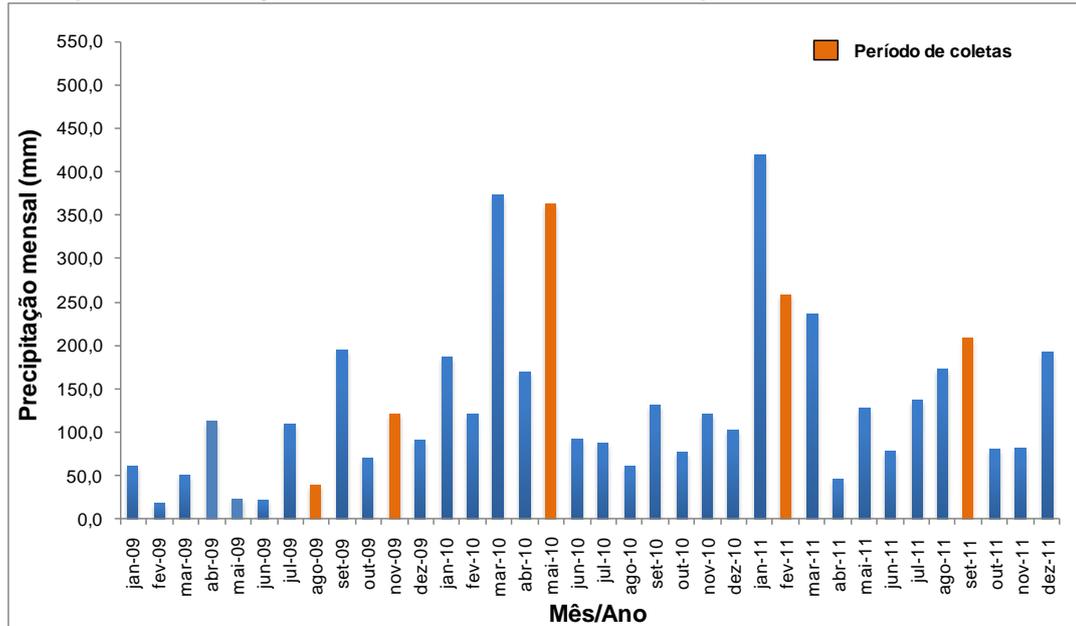
APÊNDICES

Incorporam este item os seguintes documentos:

APÊNDICE A – GRÁFICO DE PRECIPITAÇÃO APÓS A LIBERAÇÃO DO E10.....	183
APÊNDICE B – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DO ETANOL, COMPOSTOS BTEX, ACETATO E ALCALINIDADE DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS ESTUDADAS	185
APÊNDICE C – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE RECEPTORES DE ELÉTRONS, SUBPRODUTOS METABÓLICOS, POTENCIAL REDOX E PH DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS ESTUDADAS.....	187
APÊNDICE D – DADOS UTILIZADOS PARA OS CÁLCULOS DE CINÉTICA NO EXPERIMENTO COM E10.....	189
APÊNDICE E – ANÁLISES MOLECULARES PARA O COMBUSTIVEL E10	190
APÊNDICE F – MAPA CONCEITUAL ELABORADO PARA A ABORDAGEM DESTES TRABALHOS DE PESQUISA	191

APÊNDICE A – GRÁFICO DE PRECIPITAÇÃO APÓS A LIBERAÇÃO DO E10

Figura A1 – Variação da Pluviometria total diária ao longo dos anos 2009, 2010 e 2011.



FONTE: Departamento de Controle do Espaço Aéreo (DECEA).

APÊNDICE B – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DO ETANOL, COMPOSTOS BTEX, ACETATO E ALCALINIDADE DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS ESTUDADAS

Tabela B1– Experimento de Bioestimulação com Injeção de Sulfato com E10.

PM8 n=5									
Tempo (anos)	Etanol (mg.L ⁻¹)	BTEX totais (µg.L ⁻¹)	Benzeno (µg.L ⁻¹)	Tolueno (µg.L ⁻¹)	Etilbenzeno (µg.L ⁻¹)	Xileno (µg.L ⁻¹)	Acetato (mg.L ⁻¹)	pH	Alcalinidade (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)
0,0	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	0,2	4,2	N.A
0,2	N.D	12,1	12,1	N.D	N.A	N.D	0,1	4,5	1,0
0,5	172,0	1909,4	893,5	792,3	48,9	174,7	1,7	N.A	N.A
1,0	2116,9	41086,7	9333,3	21062,5	2299,9	8391	74,7	4,5	1,2
1,7	108,8	9344,6	490,9	4086,3	967,3	3800,1	0,1	4,6	2,1
2,3	36,0	9274,2	329,7	3254,9	1145	4544,7	0,1	4,7	5,3
3,0	N.D	10530,1	435,4	2657,8	1472,5	5964,4	0,1	4,6	2,1

Nota: N.D = Não Detectado (abaixo do limites de detecção). N.A = Não analisado.

Tabela B2 – Experimento de Atenuação Natural Monitorada com E24.

PM4 n=2									
Tempo (anos)	Etanol (mg.L ⁻¹)	BTEX totais (µg.L ⁻¹)	Benzeno (µg.L ⁻¹)	Tolueno (µg.L ⁻¹)	Etilbenzeno (µg.L ⁻¹)	Xileno (µg.L ⁻¹)	Acetato (mg.L ⁻¹)	pH	Alcalinidade (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)
0,0	N.A	-	N.D	N.D	N.D	N.D	N.A	5,6	6,5
0,3	N.D	27,4	4,6	10	2,7	10,1	N.A	5,1	10,8
0,5	83,1	234,1	105,4	118,4	N.D	10,3	N.A	4,5	12,8
0,9	2078	14228	5185	5976	538	2529	N.A	5,2	0,0
1,9	1027,9	41325	11411	21706	1579	6629	102	4,1	53,8
2,7	N.A	N.A	555,2	959,9	139,7	634	113,1	4,6	23,8
3,1	N.A	36306,2	5644,4	18557,9	2366,4	9737,5	55,4	4,3	18,6
3,8	329,6	27852,1	4722,1	14306,8	1743	7080,3	40,7	4,78	19,78
5,0	N.D	24149,4	382,4	9325,8	3139,3	11301,9	4,3	6,5	N.A
6,6	N.D	10666	1226	5040	786	3614	4,3	5,0	10,5
7,6	N.D	3195	126	206	481	2382	0,1	5,0	6,9
10,5	N.D	254,7	80,6	39,4	12,4	122,2	N.D	4,8	7,4
11,6	N.D	64,9	4,6	N.D	N.D	60,3	0,7	4,8	4,7

Nota: N.D = Não Detectado (abaixo do limites de detecção). N.A = Não analisado.

APÊNDICE C – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE RECEPTORES DE ELÉTRONS, SUBPRODUTOS METABÓLICOS, POTENCIAL REDOX E PH DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS ESTUDADAS

Tabela C.1b – Experimento de Bioestimulação com Injeção de Sulfato com E10.

PM8 n=5										
Tempo (anos)	Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Sulfato (mg.L ⁻¹)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	Ferro (II) (mg.L ⁻¹)	Sulfeto (mg.L ⁻¹)	Metano (mg.L ⁻¹)	Potencial redox (mV)	Fosfato (mg.L ⁻¹)	Temperatura (°C)
0,0	2,3	2,0	3,7	0,1	0,1	0,0	0,0	377,0	0,10	23,96
0,2	2,6	10,8	3,4	0,1	0,0	0,01	0,0	186,0	N.D	21,83
0,5	3,5	21,7	3,6	0,1	0,0	0,02	0,0	148,0	N.D	23,50
1,0	0,4	55,5	0,7	0,0	3,7	0,9	0,0	52,0	N.D	23,60
1,7	0,5	43,5	0,6	0,5	8,6	0,01	N.A	190,0	0,6	27,00
2,3	0,3	22,7	0,6	0,1	8,1	0,01	0,0	142,0	0,08	21,64
3,0	0,3	25,9	0,9	0,1	6,7	0,0	0,0	175,0	N.D	24,02

Nota: N.D = Não Detectado (abaixo do limites de detecção). N.A = Não analisado.

Tabela C.2 – Experimento de Atenuação Natural Monitorada com E24.

PM4 n=2										
Tempo (anos)	Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Sulfato (mg.L ⁻¹)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	Ferro (II) (mg.L ⁻¹)	Sulfeto (mg.L ⁻¹)	Metano (mg.L ⁻¹)	Potencial redox (mV)	Fosfato (mg.L ⁻¹)	Temperatura (°C)
0,0	9,6	N.D	2,3	N.D	1,6	N.A	N.A	153,1	N.D	25,02
0,3	2,2	N.D	1,5	N.D	2	N.A	N.A	87,2	N.D	27,19
0,5	4,4	N.D	0,6	N.D	10,1	N.A	N.A	50,4	N.D	23,78
0,9	2,3	N.D	1,4	N.D	67,4	0,5	N.D	-120	N.D	22,05
1,9	2,4	N.D	N.D	N.D	34,4	0,1	26,2	-32	N.D	23,48
2,7	1,1	N.D	14	N.A	15,6	0,3	114,2	83,2	23,16	22,19
3,1	1,1	N.D	0,1	N.D	6,3	0,2	23,5	174,8	N.D	26,22
3,8	0,8	0,1	0,2	0,5	11,4	N.A	73,1	-111,2	0,04	23,15
5,0	1,1	8,2	3	0,1	26,5	N.A	N.D	-90,5	N.D	24,83
6,6	0,1	0,2	0,2	N.D	0,8	0,4	21,2	-76	N.D	22,82
7,6	0,5	0	1,4	N.D	1,9	0,1	0,2	220	N.D	22,30
10,5	0,3	0,1	1	N.D	N.D	0,1	0	112	N.D	24,78
11,6	0,3	32,4	3,2	0,2	0	0	N.D	51	N.A	22,24

Nota: N.D = Não Detectado (abaixo do limites de detecção). N.A = Não analisado.

APÊNDICE D – DADOS UTILIZADOS PARA OS CÁLCULOS DE CINÉTICA NO EXPERIMENTO COM E10

PM8 n=5					
Tempo (anos)	Benzeno (mg de COT.L⁻¹)	Tolueno (mg de COT.L⁻¹)	Etilbenzeno (mg de COT.L⁻¹)	Xileno (mg de COT.L⁻¹)	BTEX totais (mg de COT.L⁻¹)
0,0	N.A	N.A	N.A	N.A	-
0,2	0,01	N.D	N.A	N.D	0,01
0,5	0,82	0,72	0,04	0,16	1,75
1,0	8,6	19,19	2,08	7,59	37,46
1,7	0,45	3,72	0,87	3,44	8,49
2,3	0,3	2,96	1,04	4,11	8,41
3,0	0,4	2,42	1,33	5,39	9,54

Nota: N.D = Não Detectado (abaixo do limites de detecção). N.A = Não analisado.

APÊNDICE E – ANÁLISES MOLECULARES PARA O COMBUSTIVEL E10

Tabela D1– Concentração de microrganismos presentes nas amostras de água subterrânea (número de cópias de gene.µL⁻¹)

PM8 n=5					
Tempo (anos)	Bactérias totais	<i>nirS</i> (Bactérias nitrito- redutoras)	<i>Geobacter</i> Bactérias ferro(III)- redutoras)	Delta- proteobactérias (Bactérias sulfato- redutoras)	Arqueas metanogênicas
0,0	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
0,2	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
0,5	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
1,0	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
1,7	4,8E+6	4,5E+6	1,0E+4	1,2E+4	N.D
2,3	2,1E+6	2,3E+5	5,6E+3	1,4E+4	N.D
3,0	2,1E+6	2,9E+5	8,2E+5	2,5E+4	N.D

Nota: N.D = Não Detectado (abaixo do limites de detecção). N.A = Não analisado.

APÊNDICE F – MAPA CONCEITUAL ELABORADO PARA A ABORDAGEM DESTES TRABALHOS DE PESQUISA

