

# Influência do biodiesel de soja na biodegradação anaeróbia do benzeno e tolueno

*Soybean biodiesel effects on anaerobic biodegradation of benzene and toluene*

Cássio Moraes Schambeck<sup>1</sup>, Débora Toledo Ramos<sup>2</sup>, Helen Simone Chiaranda<sup>2</sup>,  
Melissa Paola Mezzari<sup>3</sup>, Marilda Fernandes<sup>4</sup>, Henry Xavier Corseuil<sup>5</sup>

## RESUMO

A influência do biodiesel de soja na biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno e tolueno foi estudada sob condições anaeróbias em dois microcosmos montados com água subterrânea sintética, inóculo metanogênico, benzeno, tolueno e biodiesel. Na presença de biodiesel não foi observada biodegradação do benzeno e do tolueno. Com a biodegradação do biodiesel ocorreu a formação de acetato e metano, uso do sulfato e um aumento de 45 vezes no número de bactérias sulfato-redutoras. Esses resultados mostraram que, na mistura com benzeno e tolueno, o biodiesel foi biodegradado tanto sob condições de sulfato-redução quanto metanogênicas e que sua presença estimulou o crescimento da biomassa.

**Palavras-chave:** biocombustível; hidrocarbonetos monoaromáticos; degradação biológica anaeróbia; PCR em tempo real.

## ABSTRACT

The effects of biodiesel on the biodegradation of benzene and toluene under anaerobic conditions were assessed using two microcosms constructed using synthetic groundwater, methanogenic inoculum and amended with benzene, toluene and biodiesel. In the presence of biodiesel, benzene and toluene degradation was substantially inhibited. Biodiesel degradation was followed by a production of acetate and methane, consumption of sulfate and a 45-fold increase in sulfate-reducing concentration. These results demonstrated that, in the presence of benzene and toluene, biodiesel was biodegraded under sulfate-reduction and methanogenic conditions and also stimulated biomass growth.

**Keywords:** biofuel; monoaromatic hydrocarbons; anaerobic biological degradation; real time PCR.

## INTRODUÇÃO

As consequências ambientais negativas provocadas pelos combustíveis fósseis e a preocupação com o abastecimento mundial de petróleo incentivou a busca por combustíveis renováveis, como os biocombustíveis. Entre os biocombustíveis líquidos mais utilizados atualmente, destacam-se o etanol e o biodiesel (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). No Brasil, a introdução do biodiesel na matriz energética ocorreu em 2005 (BRASIL, 2005) e desde novembro de 2014 ficou estabelecida a adição mínima obrigatória de 7% em volume de biodiesel ao óleo diesel comercial, podendo esse valor ser reduzido para até 6% conforme interesse público (BRASIL, 2014). Dentre as diversas matérias-primas que podem ser utilizadas para produção de biodiesel, a soja representa aproximadamente

90% da produção brasileira em virtude da capacidade de cultivo, potencial de aproveitamento que representa à economia brasileira (CAVALETT & ORTEGA, 2010) e pela baixa viscosidade quando comparada às outras matérias-primas vegetais (ALPTEKIN & CANAKCI, 2008).

O biodiesel puro não contém compostos de petróleo, mas pode apresentá-los na medida em que compõe uma mistura com o óleo diesel. Desse modo, as misturas biodiesel/diesel apresentarão hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e monoaromáticos. Esses últimos compreendem o grupo dos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), os quais, uma vez em contato com o meio ambiente, podem migrar do solo para a água subterrânea e contaminar locais de abastecimento de água, devido às suas altas solubilidades relativas em

<sup>1</sup>Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>2</sup>Doutora em Engenharia Ambiental pela UFSC - Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>3</sup>Doutora em Engenharia Ambiental pela Universidade de Iowa - Iowa City (Iowa), Estados Unidos.

<sup>4</sup>Doutora em Química Analítica pela UFSC - Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>5</sup>Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade de Michigan, Estados Unidos. Professor titular do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC. Coordenador do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA) - Florianópolis (SC), Brasil.

**Endereço para correspondência:** Cássio Moraes Schambeck - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade - Caixa Postal 476 - 88040-970 - Florianópolis (SC), Brasil - E-mail: cassioschambeck@hotmail.com

**Recebido:** 16/09/11 - **Aceito:** 15/04/15 - **Reg. ABES:** 69683

água e elevadas toxicidades (TOXNET, 2013; ATSDR, 2004; BEDIENT; RIFAI; NEWLL, 1999).

Geralmente, os sistemas de distribuição e armazenamento de combustíveis, como os de misturas de diesel com biodiesel, estão localizados na subsuperfície e, em um cenário de contaminação de um aquífero, a inter-relação dos compostos do diesel com os do biodiesel é ainda pouco conhecida. Dentre os diversos processos que influenciam no destino de contaminantes, a biodegradação predomina no ambiente subsuperficial (KAO *et al.*, 2010; BATTLE-AGUILAR *et al.*, 2009; FRASER *et al.*, 2008; FERIS *et al.*, 2008). A elevada demanda bioquímica de oxigênio exercida pela presença de contaminantes orgânicos torna as condições do meio predominantemente anaeróbias (MACKAY *et al.*, 2006; FERIS *et al.*, 2008; CORSEUIL *et al.*, 2011a; CORSEUIL *et al.*, 2011b), fazendo com que processos anaeróbios assumam um papel de considerável importância para a biorremediação de diversos contaminantes (RAMOS *et al.*, 2013; KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012; FARHADIAN *et al.*, 2008; HOLLIGER *et al.*, 1997), apesar de possuírem um potencial inferior de transferência de energia em relação aos processos aeróbios (CHAPELLE, 2001).

Estudos em laboratório têm focado em como o biodiesel estimularia a biodegradação do diesel em ambiente aquático sob condições aeróbias (MARIANO *et al.*, 2008; PRINCE; HAITMANEK; LEE, 2008; DEMELLO *et al.*, 2007; PASQUALINO; MONTANÉ; SALVADÓ, 2006; ZHANG *et al.*, 1998), porém poucos são relatados em condições anaeróbias. Em um experimento em microcosmos utilizando solo não adaptado (sem histórico de contaminação), foi observado que a remoção anaeróbia de produtos intermediários de biodegradação do diesel foi inferior à do biodiesel de colza após 60 dias de experimento (LAPINSKIENÉ & MARTINKUS, 2007). Em meio aquático, o biodiesel teve um efeito negativo no processo de biodegradação dos compostos BTEX, pois os hidrocarbonetos monoaromáticos foram mais lentamente degradados na presença do biocombustível do que em sua ausência (CORSEUIL *et al.*, 2011a). Contudo, há indícios de que o aumento da biomassa degradadora é estimulado na presença de biodiesel (SCHLEICHER *et al.*, 2009; OWSIANIAK *et al.*, 2009) e, assim, os hidrocarbonetos podem ser rapidamente consumidos após a biodegradação do biodiesel.

Frente à crescente utilização de misturas de combustíveis fósseis e renováveis na matriz energética brasileira, a compreensão da influência que um determinado contaminante exerce sobre o outro nos processos de biodegradação pode auxiliar na determinação da tecnologia de remediação mais adequada para o local afetado. Logo, o objetivo deste estudo foi avaliar, em condições anaeróbias, a influência do biodiesel de soja sobre a biodegradação do benzeno e do tolueno em experimentos de microcosmos.

## METODOLOGIA

### Montagem dos microcosmos

Frascos âmbar de um litro foram utilizados como microcosmos, os quais foram preenchidos com água subterrânea sintética, inóculo metanogênico e os contaminantes benzeno e tolueno, ambos padrões analíticos Merck, e biodiesel puro de soja (cedido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná e obtido via rota metilica). A água subterrânea sintética possuía a seguinte composição: 531 mg.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, 12 mg.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 6,7 mg.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 0,002 mg.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,002 mg.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001 mg.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> e 0,0004 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (modificado de VON GUNTEN & ZOBRIST, 1993). O inóculo metanogênico utilizado foi o lodo proveniente de um reator anaeróbio tipo UASB do sistema de tratamento de efluentes de uma empresa de bebidas. O lodo possuía uma atividade metanogênica específica de 0,29 mLCH<sub>4</sub>.gSSV<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e concentração de 34,6 g.L<sup>-1</sup> de sólidos voláteis.

Foram preparados 2 microcosmos com a seguinte composição inicial: 988 mL de água sintética, 12 mL de inóculo, 5 mg de benzeno, 5 mg de tolueno e 87 mg de biodiesel. A quantidade de inóculo e dos contaminantes adicionada foi suficiente para evitar que a biomassa e/ou substrato fossem fatores limitantes da biodegradação. Um dos microcosmos foi utilizado como reator teste (biologicamente ativo), enquanto o outro foi utilizado em paralelo como controle abiótico com adição de cloreto de mercúrio (1 g.L<sup>-1</sup>) para inibição da atividade microbiológica. Para garantir a biodisponibilidade do biodiesel na fase aquosa, o biocombustível foi novamente adicionado em ambos os reatores na concentração de 44 mg.L<sup>-1</sup> no 23º dia de experimento, quando a fase livre sobrenadante não foi mais observada.

A água subterrânea sintética foi aquecida até 60°C para retirada de parte do oxigênio dissolvido. Em seguida, os microcosmos foram purgados com gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) durante 10 min, o inóculo foi inse-rido, o N<sub>2</sub> purgado por mais 10 min e os contaminantes adicionados. Os frascos foram fechados com tampa específica para experimento anaeróbio (*mininert valve*), lacrados com veda-rosca para evitar a entrada de oxigênio, incubados no escuro e mantidos em temperatura ambiente (25±2°C).

### Procedimentos analíticos

Foi retirado um volume de 6 mL de amostra de cada microcosmo para a realização de todas as análises, totalizando um volume de 96 mL ao longo de todo o período experimental. No momento em que o volume do reator chegou próximo de 920 mL, água sintética foi novamente adicionada para compensar a perda de volume, com uma alteração no valor da concentração de 8%. Para evitar a entrada de oxigênio, antes da retirada de cada amostra, um volume de 6 mL de

gás nitrogênio foi injetado, contrabalanceando a pressão negativa que se formava no interior do reator.  $N_2$  também foi direcionado para a abertura da tampa durante a retirada das amostras. Inicialmente, os reatores foram analisados duas vezes por semana. Posteriormente, essa frequência se tornou semanal devido à constância das concentrações dos hidrocarbonetos.

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

Estas análises foram realizadas em aparelho de cromatografia em fase gasosa (HP 6890) equipado com coluna capilar de sílica fundida HP 1 (19095z-123, HP, EUA), detector FID e headspace autosampler (HP 7694). O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo de  $7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Para os monoaromáticos, as temperaturas do injetor e detector foram mantidas em  $260$  e  $280^\circ\text{C}$ , e para o metano em  $190$  e  $250^\circ\text{C}$ , respectivamente. Na coluna, a temperatura para a determinação das concentrações de benzeno e tolueno, iniciou em  $70^\circ\text{C}$  e subiu até  $120^\circ\text{C}$  a uma taxa de  $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  e em seguida, até  $210$  a  $30^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Para o metano, a temperatura inicial foi de  $40^\circ\text{C}$ , a qual foi elevada até  $250^\circ\text{C}$  a uma taxa de  $30^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Esse método é uma modificação do EPA 5021A combinado com o EPA 8015D (EPA, 1996). Todos os limites de detecção foram de  $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

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

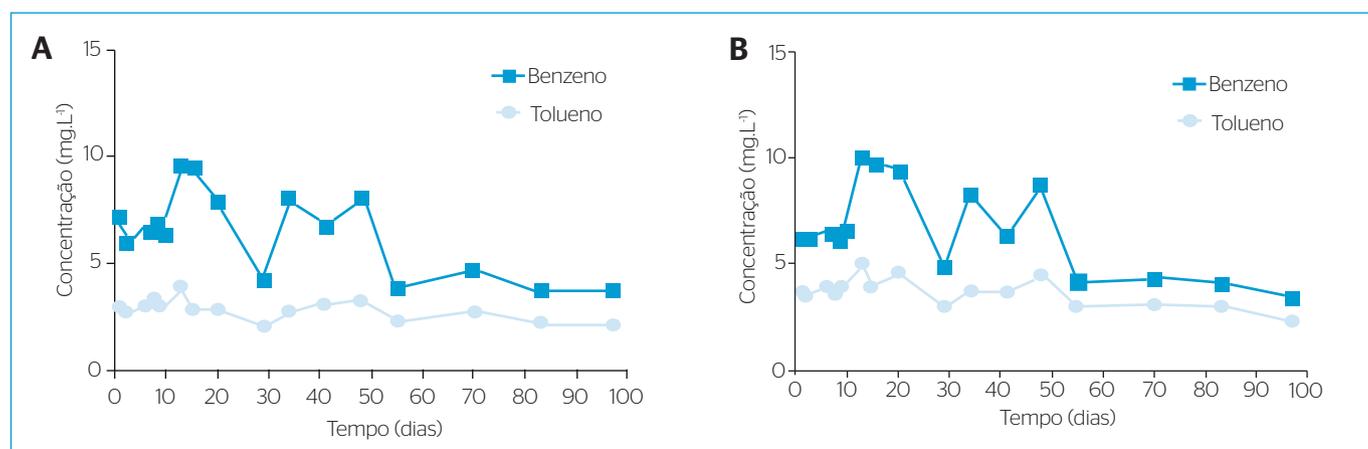
Foi utilizado um cromatógrafo de íons (Dionex, modelo ICS-1000) equipado com detector de condutividade iônica e coluna AS22. Soluções de carbonato e bicarbonato de sódio ( $4,5$  e  $1,4 \text{ mM}$ , respectivamente) foram utilizadas na fase móvel e os limites de detecção foram de  $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . O método utilizado baseou-se em EPA – Método 300.0 (EPA, 1993). A análise de sulfato e nitrato foi realizada já que os constituintes da água subterrânea sintética poderiam originar esses ânions e/ou eles poderiam estar presentes no inóculo utilizado.

### Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas pelo método quantitativo de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR, do inglês *real time quantitative polymerase chain reaction*) utilizando o termociclador *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf) e os kits *Taqman* e *Sybr-Green* (Applied Biosystem, EUA) com amostras retiradas dos reatores no primeiro e último dia de experimento. O processo de extração de DNA foi realizado de acordo com as recomendações contidas no kit *MoBio Power Soil™* kit (Carlsbad, CA). Após o processo de extração, uma solução de  $100 \mu\text{L}$  de DNA foi obtida, armazenada em frascos estéreis com capacidade para  $2 \text{ mL}$  (Eppendorf) e estocada em congelador até o momento da análise. Em todas as análises, uma amostra controle (livre de DNA) foi analisada juntamente com as demais. Os iniciadores universais BACT1369F, PROK1492R e a sonda TM1389F foram utilizados para quantificar as bactérias totais (BELLER *et al.*, 2002). As bactérias nitrato-redutoras foram quantificadas por meio dos iniciadores nirK1F e nirK5R, assim como nirS1F e nirS6R (BRAKER; FESEFELDT; WITZEL, 1998). As bactérias sulfato-redutoras foram quantificadas utilizando a sonda EUB1 com os iniciadores 361F e 685R (STULTS *et al.*, 2001). As arqueas foram analisadas com o iniciador senso ARCHMIX1369F (ARCH1-1369F e ARCH2-1369F), o iniciador anti-senso ME2R e a sonda TM1369F (SUZUKI; TAYLOR; DELONG, 2000). O número de células foi estimado conforme já descrito anteriormente (DA SILVA & ALVAREZ, 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presença de biodiesel, não foi observada biodegradação de benzeno e tolueno durante os 97 dias de duração do experimento. A variação na concentração dos hidrocarbonetos (Figuras 1A e 1B) pode ser atribuída à solubilização dos compostos puros (fase livre) que eventualmente possam ter sido injetados e permanecido aderidos no inóculo ou na



**Figura 1** - Variação temporal da concentração de benzeno e tolueno ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) no reator teste (A) que continha biodiesel, benzeno e tolueno, e controle (B), que continha biodiesel, benzeno, tolueno e  $\text{HgCl}_2$ .

parede do frasco. No reator teste, as variações das concentrações de benzeno e tolueno foram semelhantes às do controle abiótico, fato que evidencia que não foi observada a biodegradação dos monoaromáticos na presença de biodiesel. Desse modo, percebe-se que o biodiesel não exerceu efeitos sinérgicos positivos, ou seja, os microrganismos não utilizaram os compostos do biodiesel para promover a degradação do benzeno e do tolueno, assim como observado em experimentos com misturas de diesel e biodiesel (MARIANO *et al.*, 2008).

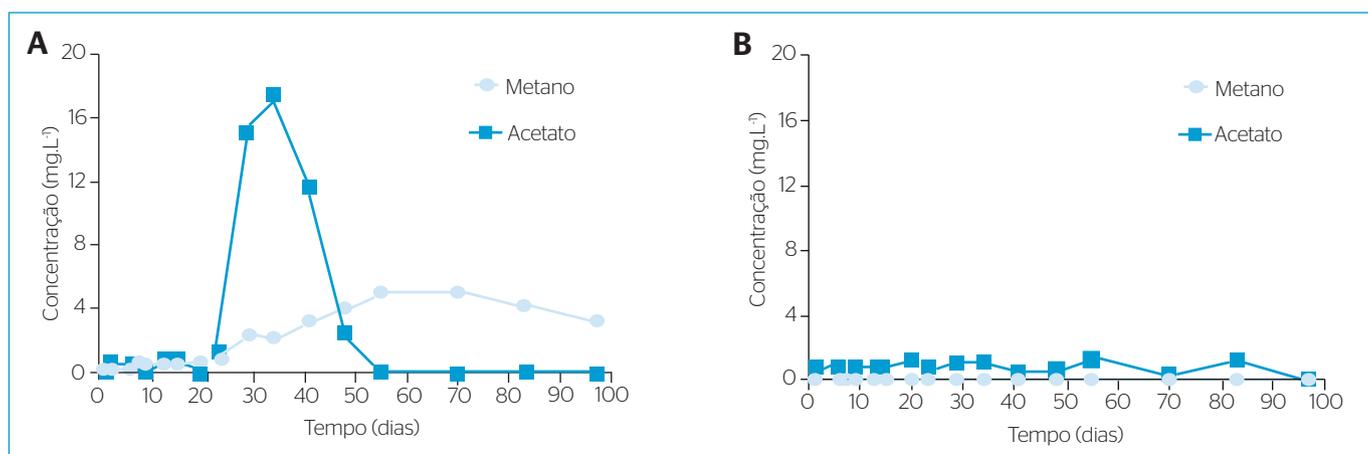
A presença de acetato e metano no reator teste (concentrações máximas de 17,4 e 5,1 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente) foi um indicativo de que esses subprodutos metabólicos foram provenientes da biodegradação do biodiesel (Figura 2A). Apesar do inóculo poder ser uma fonte adicional de matéria orgânica, esse fato não produziria alterações relevantes, já que ela seria prontamente convertida em acetato e metano pela biomassa previamente adaptada. Logo, como não foi observada biodegradação do benzeno e tolueno, a formação do acetato e metano foi atribuída à biodegradação do biodiesel. No controle abiótico a concentração de acetato foi muito baixa (em torno de 0,7 mg.L<sup>-1</sup>) e metano não foi detectado (Figura 2B), portanto não foi observada biodegradação. Essa produção de acetato pela biodegradação do biodiesel pode ser comparada àquela observada em cenários de biodegradação de misturas de gasolina e etanol, onde a quantidade de acetato é gerada predominantemente pelo consumo do biocombustível (COSTA; NUNES; CORSEUIL, 2009; NUNES & CORSEUIL, 2007).

O biodiesel é considerado um composto de fácil biodegradabilidade (PASQUALINO; MONTANÉ; SALVADÓ, 2006; ZHANG *et al.*, 1998), possivelmente pelo fato de ser constituído por ésteres alquílicos, compostos constantemente sintetizados na natureza e, assim, muitos microrganismos podem biodegradá-los (LAPINSKIENÉ & MARTINKUS, 2007). Dessa forma, os resultados indicam que a biodegradação preferencial do biodiesel dificultou a degradação dos compostos aromáticos benzeno e tolueno em condições anaeróbicas durante o período experimental. As condições anaeróbicas podem ter contribuído para esse cenário, visto

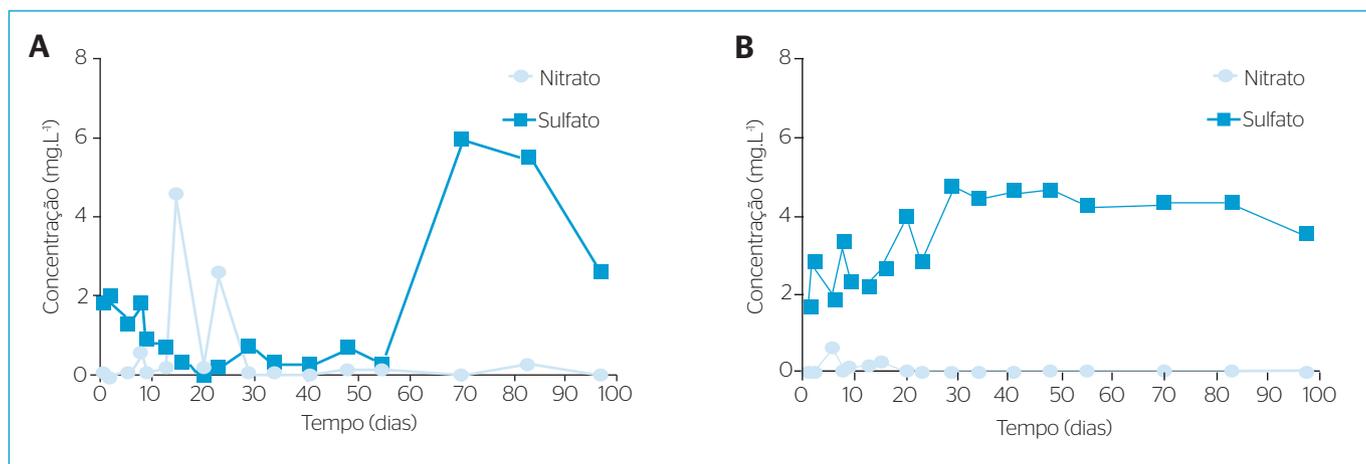
que já foi reportado que misturas de diesel com biodiesel em experimentos com culturas bacterianas em meio líquido apresentaram uma estagnação na biodegradação à medida que as condições do meio se tornaram mais redutoras (CYPLIK *et al.*, 2011). Esse efeito negativo exercido pela presença do biodiesel foi semelhante aos resultados de estudos com misturas de etanol e BTEX, onde a presença do biocombustível também causou efeitos adversos na biodegradação dos compostos monoaromáticos (SCHAEFER *et al.*, 2010; MACKAY *et al.*, 2006; DA SILVA *et al.*, 2005).

As baixas concentrações de sulfato disponíveis no meio sintético (entre 4 e 5 mg.L<sup>-1</sup>) também foram utilizadas na biodegradação do biodiesel, já que houve um decréscimo até o 55º dia (Figura 3A). As maiores concentrações de sulfato a partir do 55º dia coincidem com o período sem produção de acetato, enquanto que as menores concentrações foram observadas na presença de acetato, fatos que indicam a biodegradação do acetato via sulfato-redução. O consumo do sulfato proporcionou um aumento da população de sulfato-redutoras em 45 vezes do início até o final do experimento (de 1,2x10<sup>5</sup> para 5,3x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>). Da mesma forma, Sousa *et al.* (2009) demonstraram que a biodegradação dos ácidos graxos de cadeia longa (produzidos via reação de hidrólise do biodiesel) também foram consumidos por microrganismos sulfato-redutores. Desse modo, o biodiesel atuou como uma fonte de carbono facilmente assimilável que estimulou o crescimento microbiano. Um comportamento semelhante já havia sido constatado por Owsianiak *et al.* (2009), os quais verificaram uma relação linear entre produção de biomassa e quantidade de biodiesel presente em uma mistura com diesel. Não houve biodegradação via nitrato-redução nos reatores devido às baixas concentrações desse ânion no (Figura 3A e 3B) meio e, conseqüentemente, não foi observada a presença de microrganismos ligados a essa via de biodegradação. A quantidade total de bactérias não variou ao longo do experimento ( $\approx 10^{12}$  células.mL<sup>-1</sup>). A mesma constância de concentração foi observada para as arqueas ( $\approx 10^{11}$  células.mL<sup>-1</sup>).

O processo de biodegradação da mistura de biodiesel, benzeno e tolueno observado ao longo do período experimental foi semelhante



**Figura 2** - Variação temporal da concentração de acetato e metano (mg.L<sup>-1</sup>) no reator teste (A) que continha biodiesel, benzeno e tolueno, e controle (B), que continha biodiesel, benzeno, tolueno e HgCl<sub>2</sub>.



**Figura 3 -** Variação temporal da concentração de nitrato e sulfato (mg.L<sup>-1</sup>) no reator teste (A) que continha biodiesel, benzeno e tolueno, e controle (B), que continha biodiesel, benzeno, tolueno e HgCl<sub>2</sub>.

àquele frequentemente observado em misturas de etanol e hidrocarbonetos, ou seja, o biocombustível foi preferencialmente biodegradado. Uma significativa degradação aquosa dos compostos aromáticos geralmente irá ocorrer somente após a degradação dos biocombustíveis. Estudos com etanol indicaram que esse é um substrato preferencial para biodegradação pelos microrganismos. Desse modo, uma remoção biológica efetiva dos hidrocarbonetos monoaromáticos ocorre somente após a redução da concentração do etanol e seus subprodutos metabólicos (como acetato) no meio (MA; RIXEY; ALVAREZ, 2013; CORSEUIL *et al.*, 2011b; COSTA; NUNES; CORSEUIL, 2009; CHEN; BARKER; GUI, 2008; NUNES & CORSEUIL, 2007; DA SILVA *et al.*, 2005; ALVAREZ & HUNT, 2002), embora também haja evidências de que baixas concentrações de etanol podem não alterar a taxa de biodegradação dos BTEX (DE FREITAS *et al.*, 2011).

## CONCLUSÕES

Os experimentos em microcosmos revelaram que na presença de biodiesel não houve biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno e tolueno. O biodiesel foi preferencialmente biodegradado gerando acetato como um importante subproduto metabólico. Além disso, o biodiesel favoreceu o desenvolvimento da biomassa local. Levando-se em conta o incremento populacional de sulfato-redutoras e o consumo de sulfato, a sulfato-redução foi uma via metabólica na biodegradação do biodiesel. Além disso, a presença de metano indicou que processos metanogênicos também foram estabelecidos e contribuíram para biodegradar o biocombustível. Portanto, o biodiesel influenciou na biodegradação do benzeno e do tolueno por ser preferencialmente biodegradado em condições sulfato-redutoras e metanogênicas.

## REFERÊNCIAS

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

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

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. (2004). *Interaction profile for: benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX)*. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

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

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

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

- BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K-P. (1998) 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.
- BRASIL. (2005) Lei nº11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF: Imprensa Oficial.
- BRASIL. (2014). Lei nº13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF: Imprensa Oficial. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm)>. Acesso em: 26 set. 2014.
- CAVALETT, O. & ORTEGA, E. (2010) Integrated environmental assessment of biodiesel production from soybean in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, v. 18, n. 1, p. 55-70.
- CHAPELLE, F.H. (2001) Ground-water microbiology and geochemistry. 2a ed. Nova York: John Wiley & Sons. 477 p.
- CHEN, Y.D.; BARKER, J.F.; GUI, L. (2008) 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.
- CORSEUIL, H.X.; MONIER, A.L.; GOMES, A.P.N.; CHIARANDA, H.S.; DO ROSÁRIO, M.; ALVAREZ, P.J.J. (2011a) Biodegradation of soybean and castor oil biodiesel: implications on the natural attenuation of monoaromatic hydrocarbons in groundwater. *Groundwater Monitoring and Remediation*, v. 31, n. 3, p. 111-118.
- CORSEUIL, H.X.; MONIER, A.L.; FERNANDES, M.; SCHNEIDER, M.R.; NUNES, C.C.; DO ROSÁRIO, M.; ALVAREZ, P.J.J. (2011b) BTEX plume dynamics following an ethanol blend release: geochemical footprint and thermodynamic constraints on natural attenuation. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 8, p. 3422-3429.
- COSTA, A.H.R.; NUNES, C.C.; CORSEUIL, H.X. (2009) Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 14, n. 2, p. 265-274.
- CYPLIK, P.; SCHMIDT, M.; SZULC, A.; MARECIK, R.; LISIECKI, P.; HEIPIEPER, H.J.; OWSIANIAK, M.; VAINSHTEIN, M.; CHZANOWSKI, L. (2011) Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 6, p. 4347-4352.
- DA SILVA, M.L. & ALVAREZ, P.J. (2004) 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.
- DA SILVA, M.L.; RUIZ-AGUILAR, G.M.; ALVAREZ, P.J. (2005) Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate. *Biodegradation*, v. 16, n. 2, p. 105-114.
- DE FREITAS, J.G.; MOCANU, M.T.; ZOBY, J.L.; MOLSON, J.W.; BARKER, J.F. (2011) Migration and fate of ethanol-enhanced gasoline in groundwater: a modelling analysis of a field experiment. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 199, n. 1-4, p. 25-43.
- DEMELLO, J.A.; CARMICHAEL, C.A.; PEACOCK, E.E.; NELSON, R.K.; SAMUEL AREY, J.; REDDY, C.M. (2007) Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, n. 7, p. 894-904.
- EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (1993) *Method 300.0: determination of inorganic anions by ion chromatography*. Cincinnati: EPA.
- EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (1996) *Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods*. SW-846. Office of Solid Waste and the National Technical Information Service (NTIS). CD-ROM.
- FARHADIAN, M.; VECHELARD, C.; DUCHEZ, D.; LARROCHE, C. (2008) In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 13, p. 5296-5308.
- FERIS, K.; MACKAY, D.; SIEYES, N.; CHAKRABORTY, I.; EINARSON, M.; HRISTOVA, K.; SCOW, K. (2008) Effect of ethanol on microbial community structure and function during natural attenuation of benzene, toluene, and o-xylene in a sulfate-reducing aquifer. *Environmental Science and Technology*, v. 42, n. 7, p. 2289-2294.
- FRASER, M.; BARKER, J.F.; BUTLER, B.; BLAINE, F.; JOSEPH, S.; COOK, C. (2008) Natural attenuation of a plume from an emplaced coal tar creosote source over 14 years. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 100, n. 3-4, p. 101-115.
- HOLLIGER, C.; GASPARD, S.; GLOD, G.; HEIJMAN, C.; SCHUMACHER, W.; SCHWARZENBACH, R.P.; VAZQUEZ, F. (1997) Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 20, n. 3-4, p. 517-523.
- KAO, C.M.; CHIEN, H.Y.; SURAMPALLI, R.Y.; CHIEN, C.C.; CHEN, C.Y. (2010) Assessing of natural attenuation and intrinsic bioremediation rates at a petroleum-hydrocarbon spill site: laboratory and field studies. *Journal of Environmental Engineering*, v. 136, n. 1, p. 54-67.
- KLEINSTEUBER, S.; SCHLEINITZ, K.M.; VOGT, C. (2012) Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 94, n. 4, p. 851-873.
- LAPINSKIENĖ, A. & MARTINKUS, P. (2007) Research on anaerobic biodegradation of fats, biodiesel fuel and diesel fuel in soil medium. *Environmental Research, Engineering and Management*, v. 1, n. 39, p. 30-37.
- MA, J.; RIXEY, W.G.; ALVAREZ, P.J. (2013) Microbial processes influencing the transport, fate and groundwater impacts of fuel ethanol releases. *Current Opinion in Technology*, v. 24, n. 3, p. 457-466.
- 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. (2006) Impact of ethanol on the natural attenuation of benzene, toluene, and o-xylene in a normally sulfate-reducing aquifer. *Environmental Science & Technology*, v. 40, n. 19, p. 6123-6130.

- MARIANO, A.P.; TOMASELLA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; CONTIERO, J.; DE ANGELIS, D.F. (2008) Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 9, p. 1323-1328.
- NUNES, C.C. & CORSEUIL, H.X. (2007) Importância do etanol na atenuação natural de águas subterrâneas impactadas por gasolina. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 3, p. 259-265.
- OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.K.; HEIPIEPER, H.J. (2009) Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 3, p. 1497-1500.
- PASQUALINO, J.C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. (2006) Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and Bioenergy*, v. 30, n. 10, p.874-879.
- PRINCE, R.C.; HAITMANEK, C.; LEE, C.C. (2008) The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere*, v. 71, n. 8, p. 1446-1451.
- RAMOS, D.T.; DA SILVA, M.L.; CHIARANDA, H.S.; ALVAREZ, P.J.; CORSEUIL, H.X. (2013) Biostimulation of anaerobic BTEX biodegradation under fermentative methanogenic conditions at source-zone groundwater contaminated with a biodiesel blend (B20). *Biodegradation*, v. 24, n. 3, p. 333-341.
- SCHAEFER, C.E.; YANG, X.; PELZ, O.; TSAO, D.T.; STREGER, S.H.; STEFFAN, R.J. (2010) Anaerobic biodegradation of iso-butanol and ethanol and their relative effects on BTEX biodegradation in aquifer materials. *Chemosphere*, v. 81, n. 9, p. 1111-1117.
- SCHLEICHER, T.; WERKMEISTER, R.; RUSS, W.; MEYER-PITTRUFF, R. (2009) Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 2, p. 724-730.
- SOUSA, D.Z.; ALVES, J.I.; ALVES, M.M.; SMIDT, H.; STAMS, A.J. (2009) Effect of sulfate on methanogenic communities that degrade unsaturated and saturated long chain fatty acids (LCFA). *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 68-80.
- STULTS, J.R.; SNOEYENBOS-WEST, O.; METHE, B.; LOVLEY, D.R.; CHANDLER, D.P. (2001) Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 6, p. 2781-2789.
- SUZUKI, M.T.; TAYLOR, L.T.; DELONG, E.F. (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 11, p. 4605-4614.
- TOXNET - Toxicology Data Network. (2013) *Hazardous Substances Data Bank* (HSDB). Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>>. Acesso em: 14 jun. 2013.
- VON GUNTEN, U. & ZOBRIST, J. (1993) Biogeochemical changes in groundwater-infiltration systems: column studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 57, n. 16, p. 3895-3906.
- WORLDWATCH INSTITUTE. (2007) *Biofuels for transport: global potential and implications for sustainable energy and agriculture*. 1 ed. Londres: Ed. Earthscan. 452 p.
- ZHANG, X.; PETERSON, C.L.; REECE, D.; MÖLLER, G.; HAWS, R. (1998) Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Transactions of the ASAE*, v. 41, n. 5, p. 1423-1430.