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

Juliana Braun Müller

BIOESTIMULAÇÃO COMBINADA DE FERRO E SULFATORREDUÇÃO UTILIZANDO ÓXIDOS DE FERRO RECUPERADOS DO TRATAMENTO DA DRENAGEM ÁCIDA DE MINA E ACETATO DE AMÔNIO EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS IMPACTADAS COM DIESEL B20

Florianópolis (SC)
2017

Juliana Braun Müller

BIOESTIMULAÇÃO COMBINADA DE FERRO E SULFATORREDUÇÃO UTILIZANDO ÓXIDOS DE FERRO RECUPERADOS DO TRATAMENTO DA DRENAGEM ÁCIDA DE MINA E ACETATO DE AMÔNIO EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS IMPACTADAS COM DIESEL B20

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil
Coorientador: Prof. Dr. Timothy M. Vogel

Florianópolis (SC)
2017

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

Müller, Juliana Braun
Bioestimulação combinada de ferro e sulfatorredução utilizando óxidos de ferro recuperados da drenagem ácida de mina e acetato de amônio em águas subterrâneas impactadas com diesel B20 / Juliana Braun Müller ; orientador, Henry Xavier Corseuil ; coorientador, Timothy M. Vogel. - Florianópolis, SC, 2017.
205 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Contaminação de águas subterrâneas. 3. Mistura de diesel/biodiesel. 4. Tratamento de águas subterrâneas. 5. Ferrorredução e sulfatorredução. I. Corseuil, Henry Xavier. II. Vogel, Timothy M.. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

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

PPGEA

TERMO DE APROVAÇÃO

"Bioestimulação Combinada de Ferro e Sulfatorredução Utilizando Óxidos de Ferro Recuperados do Tratamento da Drenagem Ácida de Mina e Acetato de Amônio em Águas Subterrâneas Impactadas com Diesel B20"

Juliana Braun Müller

A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOUTORA EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Aprovado por:

Prof. Henry Xavier Corseuil, Dr.
(Orientador)

Prof. Timothy M. Vogel, Dr.
(Coorientador)

Prof. Paulo Belli Filho, Dr.

Prof. William Gerson Matias, Dr.

Prof.ª Fátima Menezes Bento, Dr.ª

Prof.ª Maria de Lourdes F. dos Santos, Dr.ª

Prof. Willibaldo Schmidell Netto, Dr.

Prof.ª Maria Eliza Nagel Hassemer, Dr.ª
(Coordenadora)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
FEVEREIRO 2017

Com muito amor, dedico esta tese à minha mãe, Vâni Margarida Müller, que com amor incondicional está sempre me apoiando e tornando as minhas escolhas possíveis.

AGRADECIMENTOS

Com carinho, meus sinceros agradecimentos:

À minha mãe, Vâni Margarida Müller, e ao meu irmão, Augusto Braun Müller, por existirem na minha vida. Pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado me apoiando e tornando os obstáculos da minha vida mais simples;

Ao meu pai, Pedro Raimundo Müller (*in memorian*), pelo exemplo de vida;

Ao meu amor, Tiago D. Fontana, pelo amor, companheirismo, compreensão e paciência nos meus momentos de ansiedade, pelos conselhos e por estar sempre ao meu lado me apoiando e encorajando em todas as minhas decisões;

Às minhas amigas do peito, Franciele Fedrizzi e Débora T. Ramos, pela amizade, cumplicidade e companheirismo. Pelas risadas, conversas, brigas, alegrias, apoio nas horas de angústia, enfim, por sempre estarem ao meu lado;

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Karina Joussef, Lorena Guimarães, Franciele Fedrizzi, Débora T. Ramos, Isabela Bonatto, Cássio Schambeck, Guilherme Zanguelini, Edivan Cherubini, Wanderli Leite, Jamile Wagner, Tiago Vítor Akaboci, Tiago Belli, Pilar Serbent, Ana Letícia Rossetto, Caroline Rodrigues, Hugo Rohden e Jorge Tavares pela parceria e pelos diversos momentos de alegria que vivemos juntos;

Ao Prof. Dr. Henry X. Corseuil, meu orientador, pela oportunidade, pelo conhecimento, orientação e confiança depositada em mim na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Timothy M. Vogel, meu coorientador, por me receber em seu grupo de pesquisa, pela paciência, orientação e entusiasmadas discussões sobre a pesquisa. Agradeço também a ele e a Cath, pelo carinho que me receberam em Lyon;

À equipe do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA) pela colaboração e amizade durante a realização da pesquisa. Em especial à Marilda Fernandes e a equipe do laboratório pelo trabalho e dedicação nos períodos de coleta; à Bruna Vargas, pela competência em resolver as questões burocráticas, sempre com prontidão; à Karina Joussef, por estar sempre disponível para ajudar em qualquer questão relacionada a computadores e programas computacionais, com muita paciência; e à Ana Liedke, pelo apoio e dedicação no laboratório de microbiologia;

Aos meus queridos bolsistas, Lenise Câmara, Carolina Ferreira e Bruno Rosa pela dedicação e esforço na realização dos trabalhos. Em especial à Lenise, que ficou responsável pelas atividades da pesquisa no Brasil enquanto estive na França, e as realizou com muita responsabilidade, dedicação e competência;

À minha amiga e colega, Débora T. Ramos, pelas inúmeras discussões, orientações, por seu grau de exigência, enfim, por toda a contribuição a este trabalho;

À minha amiga e super companheira de doutorado, Franciele Fedrizzi, pela amizade, apoio sempre (no campo, no laboratório, em discussões teóricas, na França), por estar sempre do meu lado dividindo as nossas frustações e conquistas ao longo de todo doutorado;

À minha querida amiga Karina Joussef, pela amizade e grande apoio nos momentos finais da tese e defesa;

À equipe do Environmental Microbial Genomics Group pela colaboração e ensinamentos no laboratório de microbiologia. Em especial à Catherine Larose pelos ensinamentos sobre microbiologia e discussões sobre a pesquisa; à Sandrine Demanèche pelo apoio no laboratório, principalmente na realização das análises de sequenciamento genômico; e à Edith, Elisa, Sébastien, Thibaut e Kwan pela amizade e carinho com que me receberam;

Às minhas queridas amigas em Lyon, Franciele, Naiara, Lívia, Rayssa e Deizi pela parceria sempre, pelos ombros amigos, risadas e preciosa ajuda no Francês, principalmente nas questões burocráticas, que não foram poucas;

Ao Guilherme de Toledo pela sua valiosa ajuda com a bioinformática;

À equipe do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pelo apoio na realização das análises de qPCR;

Aos membros da banca, Prof^{a} Dr^{a}. Fátima M. Bento, Prof^{a} Dr^{a}. Lourdinha Florencio, Prof. Dr. Willibaldo Schmidell, Prof. Dr. William Gerson Matias e Prof. Dr. Paulo Belli Filho pela disponibilidade e pelas contribuições na melhoria deste trabalho;

À Petrobrás, empresa patrocinadora da pesquisa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de pesquisa;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Eng. Ambiental (PPGEA).

RESUMO

O aumento da demanda mundial de energia, associada à preocupação com aspectos ambientais e à finitude das reservas de petróleo, resultou na introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, por meio de sua adição ao diesel. Porém, a crescente obrigatoriedade de adição de biodiesel ao diesel comercial brasileiro pode acarretar na contaminação de águas subterrâneas em virtude de derramamentos acidentais durante a produção, transporte e utilização deste biocombustível. Assim, torna-se necessário o conhecimento de formas adequadas de tratamento de aquíferos contaminados por essas misturas. Neste contexto, um experimento em campo foi conduzido para avaliar o potencial da bioestimulação combinada dos processos de ferro e sulfatorredução na aceleração da degradação do biodiesel e dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel, presentes na mistura diesel B20 (20% de biodiesel e 80% de diesel v/v). Para tanto, 100L de diesel B20 foram liberados diretamente no lençol freático e foram adicionados 100 kg de óxidos de ferro recuperados do tratamento da drenagem ácida de mina (DAM) e 2 kg de acetato de amônio, com o intuito de estimular o crescimento de micro-organismos sob condições ferro e sulfatorredutoras, uma vez que o produto recuperado do tratamento da DAM contém também sulfato em sua composição. A fim de avaliar os benefícios desta tecnologia de bioestimulação ativa, os resultados obtidos foram comparados com um experimento adjacente com diesel B20, em condições de atenuação natural monitorada (ANM). Os resultados demonstraram que a presença dos óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM e acetato de amônio acelerou a biodegradação do diesel B20, resultando em baixas concentrações dissolvidas de BTEX e HPA's ao longo de 18 meses de monitoramento do experimento, quando comparada à ANM. A rápida degradação do diesel B20 e a manutenção de baixas concentrações dissolvidas de hidrocarbonetos aromáticos foi atribuída ao crescimento de micro-organismos específicos capazes de utilizar acetato, biodiesel e os hidrocarbonetos aromáticos como substratos em condições ferro e sulfatorredutoras. Os micro-organismos da família *Peptococcaceae* (gêneros: *Desulfosporosinus* spp., *Desulfotomaculum* spp. e *Desulfurispora* spp.) e as bactérias do gênero *Geobacter* e *Gouta19* foram os principais micro-organismos envolvidos na biodegradação do diesel B20. A rápida biodegradação dos contaminantes aromáticos do diesel B20 demonstrou que a aplicação de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM e acetato de amônio, com o intuito de promover a bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução, é

uma interessante abordagem de tratamento para remediação de águas subterrâneas contaminadas com diesel B20.

Palavras-chave: Água subterrânea, misturas de diesel/biodiesel, BTEX, HPAs, óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM, acetato de amônio, ferrorredução, sulfatorredução.

ABSTRACT

The increasing worldwide demand for energy and the environmental concerns associated with transportation fuels have encouraged the introduction of biodiesel into the Brazilian energy matrix, by adding it to diesel formulations. Biodiesel growing mandatory blending percentage in Brazilian commercial diesel increase the likelihood of contaminating groundwater due to accidental spills during the production, transportation and use of diesel/biodiesel blends. Therefore, the study of the appropriate treatments for aquifers contaminated by diesel/biodiesel blends is needed. A field experiment with B20 (20 % biodiesel and 80 % diesel, v/v) was conducted to assess the potential for the combined biostimulation of iron and sulfate reducing bacteria to enhance BTEX and PAH biodegradation in a diesel/biodiesel blend-contaminated groundwater. 100L of B20 were released directly into the water table and 100Kg of iron oxides recovered from acid mine drainage (AMD) treatment and 2Kg of ammonium acetate were used to stimulate iron and sulfate-reducing conditions, since the product recovered from AMD also contains sulfate. In order to evaluate the benefits of the biostimulation technology, a B20 field experiment under monitored natural attenuation (MNA) was used as a baseline control. The application of iron oxides recovered from AMD treatment and ammonium acetate accelerated B20 biodegradation and maintained low dissolved concentrations of BTEX and polycyclic aromatic hydrocarbons over along 18 months of monitoring the experiment, as compared to the baseline control experiment under MNA. The observed low aromatic compound dissolved concentrations were attributed to the growth of specific micro-organisms capable of degrading acetate, biodiesel and aromatic hydrocarbons under iron and sulfate reduction conditions. The key players responsible for the rapid B20 attenuation were bacteria of the *Peptococcaceae* family (*Desulfosporosinus* spp., *Desulfotomaculum* spp. e *Desulfurispora* spp.) and bacteria of the *Geobacter* and *Gouta19* genus. The rapid B20 biodegradation and the use of a low cost and sustainable product suggest that the application of iron oxides recovered from AMD treatment and ammonium acetate, in order to promote combined iron and sulfate reduction, is an interesting approach to treat groundwater contaminated with B20.

Keywords: Groundwater, diesel/biodiesel blends, BTEX, PAH, iron oxides recovered from AMD treatment, ammonium acetate, iron reduction, sulfate reduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Esquema da reação de transesterificação para a formação do biodiesel 33

Figura 3.2: Ordem de utilização de receptores de elétrons segundo a hierarquia termodinâmica..... 43

Figura 3.3: Especiação química do sulfeto na água doce em função do pH..... 52

Figura 3.4: Ilustração da degradação de um ácido graxo via β-oxidação 57

Figura 3.5: Mecanismos de degradação anaeróbia do tolueno, etilbenzeno e benzeno produzindo o metabólito benzoil-COA. 59

Figura 3.6: Rota bioquímica de degradação do benzoil-CoA 59

Figura 3.7: Mecanismos de ativação do benzeno..... 61

Figura 3.8: Mecanismos de degradação anaeróbia do naftaleno formando o metabólito ácido 2-naftoil-CoA 63

Figura 3.9: Mecanismos de degradação anaeróbia do fluoreno e fenantreno..... 64

Figura 3.10: Mecanismos de degradação anaeróbia do tolueno com destaque para o gene *bssA,* envolvido na reação inicial de biodegradação anaeróbia via adição de fumarato..... 65

Figura 4.1: Diferentes etapas metodológicas..... 70

Figura 4.2: Localização da área experimental..... 72

Figura 4.3: Configuração da área experimental 73

Figura 4.4: Localização da área experimental (em amarelo) e dos piezômetros no entorno da área (em verde) 74

Figura 4.5: Esquema das análises realizadas para a caracterização da área experimental 75

Figura 4.6: Preparação do diesel B20 79

Figura 4.7: Área escavada para liberação do contaminante e adição dos produtos de remediação 80

Figura 4.8: Liberação controlada do diesel B20 80

Figura 4.9: Adição dos produtos de remediação (produto recuperado do tratamento da DAM e acetato de amônio) 81

Figura 4.10: Esquema das análises realizadas durante o monitoramento do experimento..... 86

Figura 5.1 Variação pluviométrica diária nos anos de 2014 (A) e 2015 (B) 99

Figura 5.2 Perfil estratigráfico da área experimental 100

Figura 5.3: Identificação dos principais micro-organismos nativos do solo (em % de abundância relativa do gene 16S rRNA)..... 107

Figura 5.4: Localização dos poços de monitoramento discutidos neste trabalho (em vermelho)..... 109

Figura 5.5 Variações da temperatura (A), pH (B), concentrações de oxigênio dissolvido (OD) (C) e potencial de oxidação-redução (POR) (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo 111

Figura 5.6 Variações das concentrações de BTEX (A), acetato (B), naftaleno (C) e HPA totais (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo..... 113

Figura 5.7 Variações das concentrações de benzeno (A), tolueno (B), etilbenzeno (C) e xilenos (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo..... 114

Figura 5.8 Concentrações de bactérias totais (A) e do gene *bssA* (B) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo.... 116

Figura 5.9 Variações das concentrações de nitrato (A), nitrito (B), sulfato (C) e sulfeto (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo..... 120

Figura 5.10 Variações das concentrações de ferro total suspenso (A), Fe (III) (B), Fe (II) (C) e metano (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo..... 121

Figura 5.11 Concentrações de *Geobacteraceae* (A), bactérias sulfatorredutoras (BSR) (B) e arqueas (C) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo. 124

Figura 5.12 Localização dos experimentos de ANM (em vermelho) e de bioestimulação ativa (em amarelo)..... 129

Figura 5.13 Variações das concentrações de naftaleno (A), Fe(II) (B), sulfato (C) e metano (D) nos experimentos de bioestimulação e atenuação natural monitorada (ANM) ao longo do tempo..... 130

Figura 5.14 Variações das concentrações de benzeno (A), tolueno (B), etilbenzeno (C) e xilenos (D) nos experimentos de bioestimulação e atenuação natural monitorada (ANM) ao longo do tempo..... 132

Figura 5.15 Concentrações de bactérias totais, *Geobacteraceae*, bactérias sulfatorredutoras (BSR) e gene *bssA* nos experimentos de atenuação natural monitorada e bioestimuação ao longo do tempo 134

Figura 5.16 Variações das comunidades microbianas (em nível de gênero) no poço fonte ao longo do tempo..... 142

Figura 5.17 Variações das comunidades microbianas (em nível de gênero) no poço localizado a 1,5m da fonte ao longo do tempo..... 147

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Composição dos biodieseis de soja e palma 34

Tabela 3.2: Principais propriedades físico-químicas dos principais ésteres constituintes dos biodieseis de soja e palma 36

Tabela 3.3: Caracterização do óleo diesel 37

Tabela 3.4: Valores Máximos Permitidos dos compostos BTEX e HPA segundo os usos preponderantes da água subterrânea 38

Tabela 3.5: Principais propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos constituintes do diesel 40

Tabela 3.6: Reações de oxidação-redução de hidrocarbonetos utilizando o Fe(III) como receptor de elétrons 47

Tabela 3.7: Reações de oxidação-redução de hidrocarbonetos aromáticos utilizando o sulfato como receptor de elétrons 53

Tabela 4.1. Composição do produto recuperado do tratamento da DAM 82

Tabela 4.2: Cálculo da quantidade teórica de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM (OF DAM) necessária para a completa degradação do diesel B20 via ferrorredução 84

Tabela 4.3: Detalhamento sobre a coleta e conservação das amostras .. 87

Tabela 4.4: Programação de Temperatura do Forno para Análises de BTEX, metano e HPAs 90

Tabela 4.5: Sequências dos iniciadores e sonda usados para cada análise de qPCR e sequências dos iniciadores com adaptadores usadas no sequenciamento do gene 16S rRNA 95

Tabela 5.1: Resultados do ensaio de granulometria para as diferentes camadas de solo 101

Tabela 5.2: Resultados da determinação da matéria orgânica e macronutrientes nas camadas do solo 103

Tabela 5.3: Resultados da determinação dos micronutrientes nas diferentes camadas do solo 104

Tabela 5.4: Resultados das análises dos parâmetros físico-químicos da água subterrânea (*background*) 105

Tabela 5.5: Resultados dos parâmetros microbiológicos da água subterrânea (*background*), baseados nas análises de qPCR 107

Tabela 5.6: Período das campanhas de monitoramento 108

Tabela 5.7: Consumo de H^+ na degradação do benzeno via ferro e sulfatorredução 110

Tabela 5.8: Concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos, BTEX, naftaleno e HPA totais, em amostras de solo da região da fonte de contaminação, nos experimentos de atenuação natural monitorada (ANM) e de bioestimulação 136

Tabela 5.9: Características metabólicas associadas aos gêneros de micro-organismos identificados na água subterrânea 137

Tabela A.1: Meias-reações de formação de células (Rc), receptores de elétrons (Rr) e doadores de elétrons (Rd) 195

Tabela A.2: Características genômicas dos micro-organismos padrão utilizados na construção das curvas de calibração 202

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AGCL – Ácido graxo de cadeia longa

ANM – Atenuação natural monitorada

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

APHA – *American Public Health Association*

ASR – Arqueas sulfatorredutoras

ASTM – *American Society for Testing Materials*

ATP – Adenosina trifosfato

B5 – Mistura binária de diesel/biodiesel contendo 5% de biodiesel em volume/volume

B20 – Mistura binária de diesel/biodiesel contendo 20% de biodiesel em volume/volume

B100 – Biodiesel puro

BSR – Bactérias sulfatorredutoras

BTEX – Hidrocarbonetos monoaromáticos: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos (orto, meta e para-xileno)

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CIDASC – Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina

C.O. – Carbono Orgânico

CoA – Co-enzima A

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

CT - *Cycle threshold* (Ciclo umbral)

DAM – Drenagem ácida de mina

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRX – Difração de Raios X

EHC – *Environmental Health Criteria*

EMAG - Ésteres metílicos de ácidos graxos

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPA - *Environmental Protection Agency*

FAMEs - *Fatty acid methyl esters* (Metil ésteres de ácidos graxos)

FID – *Flame ionization detector* (Detector de ionização de chama)

Gene *bssA* - gene codificador da enzima α-benzilsuccinato sintase

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LCFA - *Long-chain fatty acids* (ácidos graxos de cadeia longa)

LNAPLs – *Light non-aqueous phase liquids* (Líquido leve de fase não aquosa)

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

M.O. – Matéria orgânica

MPOC - *Malaysian Palm Oil Council*

MSR – Micro-organismos sulfatorredutores

NAPL – *Non-aqueous phase liquids* (Líquido de fase não aquosa)

NBR – Norma Brasileira

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NO – Noroeste

NTA – *Nitrilotriacetic Acid* **(**Ácido Nitrilotriacético)

OD – Oxigênio dissolvido

OF DAM – Óxidos de ferro provenientes do tratamento da drenagem ácida de mina

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pH – Potencial hidrogeniônico

PM – Poço de monitoramento

PMF – Poço de monitoramento fonte de contaminação

POR – Potencial de oxidação-redução

PVC – Policloreto de Vinila

QIIME - *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

REMA – Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente

RNA - *Ribonucleic acid* (Árico ribonucleico)

q-PCR – *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase, quantitativo e em tempo real)

SBCS – CQFS - Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Comissão Química de Fertilidade do Solo.

SE – Sudeste

sp. – Nomenclatura para designar uma espécie (singular)

spp. – Nomenclatura para designar várias espécies (plural)

SST - Sólidos suspensos totais

TGSC – *The Good Scent Company*

TOXNET – *Toxicology Data Network*

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

USDE – *United States Department of Energy*

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

VMP – Valor máximo permitido

V/V – Relação Volume/Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS 25

1.1 HIPÓTESE 29

2. OBJETIVOS 31

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 33

3.1 COMBUSTÍVEIS 33
3.1.1 Biodiesel 33
3.1.2 Diesel 37
3.2 BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA 40
3.2.1 Ferrorredução 44
3.2.2 Sufatorredução 51
3.2.3 Drenagem ácida de mina 55
3.2.4 Mecanismos de biodegradação anaeróbia do biodiesel 56
3.2.5 Mecanismos de biodegradação anaeróbia dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel 58
3.2.6 Gene bssA 64
3.3 INFLUÊNCIA DO BIODIESEL SOBRE A DEGRADAÇÃO DO DIESEL ... 65

4. MATERIAIS E MÉTODOS 69

4.1 ÁREA EXPERIMENTAL 71
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL 75
4.2.1 Caracterização hidrogeológica da área experimental 75
4.2.2 Caracterizações hidrogeoquímica e microbiológica da área experimental 78
4.3 LIBERAÇÃO CONTROLADA DO COMBUSTÍVEL E SISTEMA DE BIOESTIMULAÇÃO ANAERÓBIA 79
4.4 MONITORAMENTO DO EXPERIMENTO 85
4.4.1 Amostragens e análises físico-químicas 86
4.4.2 Amostragens e análises de reação em cadeia da polimerase em tempo real 90
4.4.3 Análise do sequenciamento do DNA 92
4.4.4 Amostragens e análises do solo na região da fonte de contaminação 96

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 97

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ORIGINAIS DA ÁREA EXPERIMENTAL (*BACKGROUND*) 97
5.1.1 Caracterização Hidrogeológica 97
5.1.2 Caracterização hidrogeoquímica 102
5.1.3 Caracterização microbiológica 106
5.2 MONITORAMENTO DO EXPERIMENTO DE CAMPO 108
5.2.1 Alterações geoquímicas e microbiológicas da água subterrânea 109
5.3 COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE BIOESTIMULAÇÃO CONJUNTA DE FERRO E SULFATORREDUÇÃO E ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA 129
5.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA 136

6. CONCLUSÕES 151

7. RECOMENDAÇÕES 153

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 155

APÊNDICE A - MODELO ENERGÉTICO DE BIODEGRADAÇÃO 193

APÊNDICE B - CÁLCULOS ELABORADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO E NAS AMOSTRAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA 201

ANEXO A - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PRODUTO RECUPERADO DO TRATAMENTO DA DRENAGEM ÁCIDA DE MINA 203

ANEXO B - LAUDO DA ANÁLISE DE SULFATO DO PRODUTO RECUPERADO DO TRATAMENTO DA DRENAGEM ÁCIDA DE MINA 204

ANEXO C - CARACTERIZAÇÃO DO BIODIESEL 205

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

O aumento da demanda mundial de energia, associado à crescente preocupação com aspectos ambientais e à finitude das reservas de petróleo, resultou na geração de combustíveis alternativos aos combustíveis fósseis, diversificando e ampliando a matriz energética. Neste contexto, surgiram os combustíveis derivados de biomassa renovável, denominados biocombustíveis (BRASIL, 2005), nos quais o biodiesel recebe destaque. O biodiesel é uma mistura de metil/etil ésteres de ácidos graxos obtidos através da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais renováveis, que pode substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil (BRASIL, 2005; KNOTHE et al., 2006). Assim, o biodiesel tem sido adicionado na matriz energética mundial na forma de misturas binárias de diesel/biodiesel (BRASIL, 2005). No Brasil, atualmente, há a obrigatoriedade de adição de 8% de biodiesel ao diesel comercial, com o planejamento de aumento deste percentual para 15% no ano de 2020 (BRASIL, 2016).

Para suprir a crescente demanda nacional de biodiesel exigida pela obrigatoriedade da adição deste biocombustível ao diesel comercial, a produção de biodiesel no Brasil aumentou em 50 vezes, desde o ano de 2006 (ANP, 2015). O aumento do uso de misturas de diesel/biodiesel pode acarretar na contaminação de águas subterrâneas em virtude de derramamentos acidentais durante a produção, transporte e utilização deste biocombustível. Embora o biodiesel seja um composto biodegradável (MARIANO et al., 2008; PASQUALINO; MONTANÉ; SALVADÓ, 2006; SENDZIKIENE et al., 2007) as misturas de diesel/biodiesel contêm BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), que são compostos recalcitrantes e carcinogênicos (USEPA, 1998) sendo, portanto, os constituintes que apresentam maior preocupação ambiental no caso de uma contaminação com estes biocombustíveis. Adicionalmente, em misturas de diesel/biodiesel, os ésteres metílicos do biodiesel podem ser preferencialmente degradados em relação aos compostos aromáticos do diesel (CHIARANDA, 2011; OWSIANIAK et al., 2009; RAMOS et al., 2016), causando um retardo na biodegradação dos BTEX e HPAs (BORGES; DIAS; DANKO, 2014; CORSEUIL et al., 2011; YASSINE et al., 2013). Assim, torna-se importante o conhecimento de formas adequadas de tratamento de águas subterrâneas contaminadas por misturas de diesel/biodiesel.

Dentre as diversas formas de tratamento de ambientes subsuperficiais contaminados com combustíveis, a biorremediação, que se trata do uso intencional do processo de biodegradação para eliminação dos contaminantes, apresenta-se como uma interessante alternativa para o tratamento de poluentes ambientais encontrados nas águas e solos subsuperficiais, pois emprega um sistema biológico natural e de baixo custo que permite a remoção permanente de compostos perigosos (ALVAREZ; PÉREZ, 2003). Caso haja disponibilidade suficiente de nutrientes e receptores de elétrons, a utilização da técnica de biorremediação passiva pode ser considerada como uma alternativa viável (WIEDEMEIER et al., 1999). No entanto, em locais onde a disponibilidade desses compostos é limitada ou a taxa de atenuação natural é muito baixa, as condições ambientais podem ser manipuladas por meio do estímulo da atividade microbiana. Nesse sentido, tecnologias de remediação ativa, como bioestimulação aeróbia ou anaeróbia, podem superar as limitações existentes na área impactada, por meio da introdução de receptores de elétrons e/ou nutrientes.

No caso de uma contaminação de águas subterrâneas por misturas de diesel/biodiesel, a alta demanda bioquímica de oxigênio exercida por este biocombustível resulta no rápido consumo do oxigênio dissolvido do meio, tornando o ambiente predominantemente anaeróbio (CORSEUIL et al., 2011; RAMOS et al., 2013; SØRENSEN et al., 2011), o que favorece a aplicação de estratégias de remediação anaeróbias no tratamento de aquíferos contaminados por misturas desses combustíveis. A bioestimulação anaeróbia pode ser realizada por meio da introdução de receptores de elétrons alternativos, como nitrato, Fe(III) e sulfato (ALVAREZ; PÉREZ, 2003; WIEDEMEIER et al., 1999) ou pela adição de fontes de carbono mais prontamente assimiláveis que acelerem o estabelecimento de condições metanogênicas (RAMOS et al., 2013). Os receptores de elétrons que fornecerem maior rendimento de energia livre para o metabolismo microbiano serão preferencialmente utilizados, de acordo com a hierarquia termodinâmica (LOVLEY, 2003). Portanto, os receptores de elétrons anaeróbios serão consumidos na seguinte ordem de preferência: nitrato, Fe(III), sulfato e dióxido de carbono, caracterizando os processos de nitratorredução, ferrorredução, sulfatorredução e metanogênese.

Estratégias de bioestimulação anaeróbia são frequentemente aplicadas na remediação de aquíferos contaminados por combustíveis (ANDERSON et al., 1998; DORER et al., 2016; REINHARD et al., 1997; ZHANG et al., 2012). No caso de misturas de diesel/biodiesel,

experimentos em campo demonstraram que a bioestimulação de condições metanogênicas acelerou a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, quando comparada com a atenuação natural monitorada (RAMOS et al., 2013). Porém, processos metanogênicos são energeticamente menos favoráveis e atuam em baixas velocidades de biodegradação quando comparados a outras abordagens anaeróbias, como a ferro e sulfatorredução (LOVLEY, 2003; WIEDEMEIER et al., 1998). No processo de ferrorredução, micro-organismos utilizam ferro férrico (Fe(III)) como receptor de elétrons para conduzir a oxidação da matéria orgânica, produzindo ferro ferroso (Fe(II)) como subproduto metabólico; enquanto no processo de sulfatorredução os micro-organismos obtêm energia para a degradação dos compostos orgânicos por meio da respiração com sulfato, reduzindo-o a sulfetos.

A eficiência da biodegradação de hidrocarbonetos mono (BTEX) e policíclicos aromáticos via ferrorredução (BOTTON et al., 2007; DORER et al., 2016; KLEEMANN; MECKENSTOCK, 2011; LI et al., 2014; LOVLEY et al., 1989) e sulfatorredução (BOZINOVSKI et al., 2014; HUANG; KAO, 2016; MECKENSTOCK et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002; REINHARD et al., 1997; SAFINOWSKI; MECKENSTOCK, 2006) tem sido amplamente demonstrada; contudo, pouco se sabe sobre a aplicação desses processos para a biodegradação do biodiesel e misturas de diesel/biodiesel. Estudos de laboratório demonstraram que os ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel (do inglês: *fatty acid methyl esters* (FAMEs)) são eficientemente biodegradados via sulfatorredução (AKTAS et al., 2010; WU et al., 2016) e metanogênese (WU et al., 2015). Além disso, os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (do inglês: *long-chain fatty acids* (LCFA)), compostos hidrolisados do biodiesel, são eficientemente oxidados por micro-organismos sulfatorredutores (RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; SOUSA et al., 2010) e por uma comunidade específica de bactérias ferrorredutoras (*Desulfuromonas palmitatis*) (COATES et al., 1995). Ainda, um estudo em microcosmos indicou que micro-organismos nitratorredutores, sulfatorredutores e metanogênicos estão envolvidos na biodegradação de misturas de diesel/biodiesel (SØRENSEN et al., 2011). Embora micro-organismos ferro e sulfatorredutores demonstrem potencial para metabolizar os hidrocarbonetos aromáticos do diesel e o biodiesel, a aplicação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução na remediação de águas subterrâneas contaminadas por combustíveis ainda não foi estudada.

A escassez de estudos de bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução pode ser justificada pela dificuldade em

utilizar um composto que resulte no estabelecimento de ambas as condições redox no aquífero. Nesse sentido, este estudo avalia a utilização de um produto contendo óxidos de ferro recuperados no tratamento da drenagem ácida de mina (DAM) para a bioestimulação de ambos os processos de ferro e sulfatorredução, uma vez que este produto contém altas concentrações de óxidos de ferro e sulfato em sua composição (ANDERSEN et al., 2012). A DAM é uma solução aquosa formada pela oxidação de minerais sulfetados provenientes da atividade de mineração, que se apresenta como um importante contribuinte para a poluição das águas superficiais, devido à liberação de ácido sulfúrico e metais dissolvidos (CHENG et al., 2011). Assim, o uso de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM como produto de remediação pode representar uma solução sustentável para um composto potencialmente contaminante. Além disso, este composto apresenta-se como um produto de baixo custo, cuja utilização possibilita a agregação de valor a um resíduo produzido em larga escala pelas indústrias carboníferas.

Como os constituintes do diesel e do biodiesel são compostos orgânicos complexos e de difícil degradação, a velocidade inicial de crescimento microbiano para a oxidação destes compostos costuma ser lenta. A introdução de uma carga pulso de acetato de amônio, que atua como uma fonte de carbono prontamente assimilável pelos micro-organismos, pode ser uma alternativa para acelerar e intensificar o crescimento microbiano. Adicionalmente, estudos que avaliaram a injeção de acetato como estratégia para bioestimular o crescimento da comunidade microbiana em ambientes subsuperficiais, demonstraram que a utilização deste substrato é capaz de eficientemente estimular o crescimento de micro-organismos específicos associados aos processos de ferro e sulfatorredução, como, por exemplo, gêneros microbianos pertecentes à família *Geobacteraceae* (LIVERMORE et al., 2013; RAMOS et al., 2014).

Dentro deste contexto, este estudo avalia a remediação de uma área contaminada por diesel B20 (80% diesel/20% biodiesel de palma v/v) por meio da adição de óxidos de ferro recuperados no tratamento da DAM e acetato de amônio, com o intuito de estimular os processos de ferro e sulfatorredução, além de acelerar e intensificar o crescimento de comunidades microbianas associadas a estes processos. Sabendo-se que, em misturas de diesel/biodiesel, os constituintes do biodiesel são preferencialmente degradados em relação aos hidrocarbonetos aromáticos do diesel (CHIARANDA, 2011; OWSIANIAK et al., 2009; RAMOS et al., 2016), esta estratégia de remediação irá primeiramente

remover os compostos do biodiesel e, subsequentemente, acelerar a biodegradação dos BTEX e HPA's, compostos de maior preocupação ambiental no caso de derramamentos com diesel B20.

1.1 Hipótese

Considerando o crescente aumento do volume obrigatório de adição de biodiesel ao diesel comercial brasileiro, a insuficiência de informações sobre as formas mais adequadas de tratamento de águas subterrâneas contaminadas por misturas de diesel/biodiesel e o potencial da bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução na remediação de águas subterrâneas contaminadas por esses biocombustíveis, a seguinte hipótese foi formulada:

A bioestimulação conjunta de processos de ferro e sulfatorredução, promovida a partir da introdução de óxidos de ferro recuperados do tratamento da drenagem ácida de mina e acetato de amônio, itensificará o crescimento inicial de micro-organismos ferro e sulfatorredutores, culminando na rápida biodegradação dos ésteres metílicos do biodiesel e, consequentemente, na aceleração da degradação dos compostos mono e policíclico aromáticos do diesel na água subterrânea.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a aplicação da bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução na remediação de águas subterrâneas impactadas por misturas de diesel/biodiesel (diesel B20).

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Avaliar a aplicabilidade do produto recuperado do tratamento da DAM e do acetato de amônio na biostimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução;
- Avaliar se a estratégia de bioestimulação aplicada neste estudo beneficiou a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel, quando comparada à atenuação natural monitorada do diesel B20;
- Investigar as comunidades microbianas estimuladas pela introdução de óxidos de ferro recuperados da DAM e acetato de amônio em águas subterrâneas impactadas com diesel B20, por meio de análises de sequenciamento genômico do gene 16S ribosomal RNA (rRNA) em plataforma de nova geração (*Illumina Genome Analyser - MiSeq*).

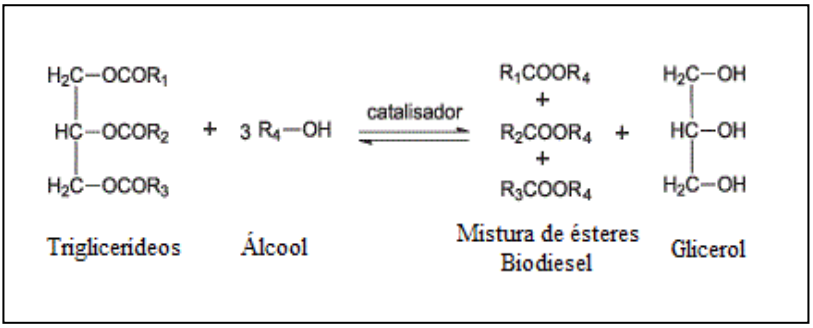
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Combustíveis

3.1.1 Biodiesel

O biodiesel é uma mistura de metil/etil ésteres de ácidos graxos obtidos através da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal. A transesterificação é um processo de conversão de triglicerídeos a ésteres de ácidos graxos e glicerina, por meio da reação com um álcool (metanol ou etanol), normalmente catalisada por um ácido ou base forte, dando origem ao álquil éster correspondente (ésteres metílicos ou etílicos), (KNOTHE et al., 2006). A Figura 3.1 apresenta a reação de transesterificação, onde R_1, R_2 e R_3 são cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados e R_4 são grupos alquilas.

Figura 3.1: Esquema da reação de transesterificação para a formação do biodiesel



Fonte: Adaptado de (LEUNG; KOO; GUO, 2006)

O biodiesel pode ser produzido a partir de uma grande variedade de matérias-primas, podendo ser originado de gordura animal (usualmente sebo), óleos vegetais (óleos de soja, caroço de algodão, palma, mamona, canola, girassol, coco) ou ainda óleos de descarte (óleos de descarte de frituras), sendo a escolha da matéria-prima determinada, principalmente, por fatores geográficos e econômicos (KNOTHE et al., 2006). Dentre as principais matérias-primas utilizadas no Brasil, o soja recebe destaque por representar aproximadamente 78% do biodiesel produzido no país no ano de 2015 (ANP, 2016). Porém, o soja representa também uma das maiores fontes de alimentação do

mundo. Assim, a crescente demanda de biodiesel impulsiona a diversificação de matérias-primas para a produção deste biocombustível. Neste contexto, quando comparado a outras oleaginosas, o óleo de palma se apresenta como uma alternativa vantajosa devido à baixa necessidade energética para sua produção (MPOC, 2016), possuindo uma produtividade de óleo até 10 vezes superior à produtividade do óleo de soja (ROCHA, 2007), justificando a sua utilização para a produção de biodiesel. Além disso, as políticas brasileiras de desenvolvimento do biodiesel visam aumentar a participação da região norte no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel e na geração de receita e desenvolvimento social sustentável incentivando, desta forma, o cultivo de oleaginosas por pequenos produtores e a produção de biodiesel de palma (DeCARVALHO, 2015).

Os ésteres de ácidos graxos que irão fazer parte da composição do biocombustível serão definidos pela matéria-prima utilizada. O biodiesel pode ser composto, principalmente, pelos seguintes ésteres metil/etil esterificados: caproato, caprilato, caprato, laurato, miristato, palmitato, oleato, palmitato, estearato, araquidato, linoleato, ricinoleato, linolenato e eicosanoato (MOSER, 2009). A composição destes ácidos graxos influencia nas características do combustível, visto que diferentes ácidos graxos possuem propriedades físico-químicas distintas (KNOTHE, 2005; RAMOS, 2013). A Tabela 3.1 apresenta as composições dos biodieseis de soja e palma.

Tabela 3.1: Composição dos biodieseis de soja e palma

Éster	Óleo de Soja (%)[a]	Óleo de Palma (%)[b]
Metil Laurato	----	0,4
Metil Miristato	----	1,1
Metil Palmitato	12,2	43,8
Metil Palmitoleato	----	0,2
Metil Estearato	4,4	4,4
Metil Oleato	28,1	39,9
Metil Linoleato	42,0	9,6
Metil Linolenato	13,3	0,2
Metil Araquidato	----	0,4

Fonte: (CORSEUIL et al., 2011[a]; DARNOKO; CHERYAN, 2000[b])

O biodiesel é miscível com o diesel em qualquer proporção (KOETHE et al., 2006) e, em muitos países, ele tem sido acrescentado à matriz energética na forma de misturas binárias de diesel/biodiesel. Para a identificação das misturas dos combustíveis é adotada a nomenclatura

BX, onde X refere-se à porcentagem em volume do biodiesel presente no combustível. Por exemplo, os combustíveis B5, B20, B100, referem-se a misturas de diesel/biodiesel, contendo respectivamente 5%, 20%, e 100% de biodiesel, em volume.

A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira deu-se pela lei n° 11.097 de 13 de janeiro de 2005, a qual estabeleceu a adição do percentual mínimo de 2%, em volume, de biodiesel ao óleo diesel comercializado (BRASIL, 2005). Com o passar dos anos, o percentual mínimo de adição de biodiesel ao diesel foi aumentando, conforme a disponibilidade de produção do biocombustível no País. Atualmente, vigora a lei n° 13.263, de 23 de março de 2016, que determina o percentual mínimo de adição de 8% de biodiesel (em volume) ao diesel comercial brasileiro, com planejamento de aumento para 15% no ano de 2020 (BRASIL, 2016). No cenário internacional, observa-se um percentual maior de biodiesel adicionado ao diesel. Na Alemanha, atualmente, é utilizada a mistura B10 (biodiesel 10% / diesel 90% v/v), enquanto na Polônia o diesel comercial contém 20% (v/v) de biodiesel (HAMJE et al., 2014). Nos Estados Unidos, misturas contendo até 20% (em volume) de biodiesel têm sido encontradas nos postos de combustíveis, sendo a mistura B20 (biodiesel 20% / diesel 80% v/v) mais comumente utilizada devido ao bom equilíbrio entre custo, emissões e desempenho do motor (USDE, 2016). Portanto, o uso do biodiesel na forma de misturas binárias e seu percentual adicionado ao diesel tende a aumentar progressivamente, conforme disponibilidade da produção nacional.

O uso do biodiesel apresenta vantagens ambientais em relação ao óleo diesel, por ser um combustível de fonte renovável, mais biodegradável (DEMELLO et al., 2007; PETERSON; MULLER, 2006) e menos tóxico do que combustíveis fósseis (HOLLEBONE et al., 2008; KHAN; WARITH; LUK, 2007; MÜLLER, 2011), podendo ser usado em motores diesel sem nenhuma modificação (KOETHE et al, 2006). Porém, as principais desvantagens do uso deste biocombustível referem-se ao elevado custo de produção, a diminuição do rendimento do motor (podendo ser até 10% inferior ao óleo diesel quando utilizado o biocombustível B100) e as elevadas emissões de óxidos nitrosos (NO_x) (KOETHE et al, 2006; McCORMICK; ALLEMAN, 2006).

Quando ocorre um derramamento de um combustível no meio ambiente, este composto sofre inúmeros processos de partição ambiental que irão definir os possíveis impactos ambientais causados. As propriedades físico-químicas dos ésteres metílicos de ácidos graxos que compõem o biodiesel irão determinar o seu comportamento e destino no

ambiente. De modo geral, os ésteres metílicos de ácidos graxos possuem baixa polaridade, longas cadeias carbônicas, alta massa molecular, baixa solubilidade em água e densidade inferior à da água. Assim, no caso de uma contaminação em águas subterrâneas, as densidades inferiores às da água fazem com que esses compostos tendam a flotar no topo da franja capilar do lençol freático (WIEDEMEIER et al, 1999). Como estes compostos são praticamente insolúveis em água, comportam-se como LNAPLs (*light non-aqueous phase liquids*) no aquífero (ALVAREZ; PÉREZ, 2003). Quanto à solubilidade, acrescenta-se que, entre os diversos metil ésteres existentes, quanto maior forem as suas cadeias de carbono, menor será a sua solubilidade em água. Ainda, devido às suas elevadas massas moleculares, os ésteres metílicos apresentam baixa tendência à volatilização. A Tabela 3.2 apresenta algumas propriedades físico-químicas dos principais ésteres constituintes dos biodieseis de soja e palma.

Tabela 3.2: Principais propriedades físico-químicas dos principais ésteres constituintes dos biodieseis de soja e palma

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular ($g.mol^{-1}$)	Densidade ($g.cm^{-3}$)	Solubilidade a 25°C ($mg.L^{-1}$)
Metil Laurato	$C_{13}H_{26}O_2$	214,34	0,870	$0,8841^{(3)}$
Metil Miristato	$C_{15}H_{30}O_2$	242,41	0,867	$0,08744^{(3)}$
Metil Palmitoleato	$C_{17}H_{32}O_2$	268,44	0,875	$0,01836^{(3)}$
Metil Palmitato	$C_{17}H_{34}O_2$	270,45	$0,852^{(2)}$	$0,00905^{(3)}$
Metil Estearato	$C_{19}H_{38}O_2$	298,5	0,850	$0,00093^{(3)}$
Metil Oleato	$C_{19}H_{36}O_2$	296,5	0,874	$0,0056^{(3)}$
Metil Linoleato	$C_{19}H_{34}O_2$	294,5	0,889	$0,0198^{(3)}$
Metil Linolenato	$C_{19}H_{32}O_2$	292,45	$0,895^{(2)}$	$0,058^{(3)}$
Metil Arquidato	$C_{21}H_{42}O_2$	326,56	0,870	$9,78.10^{-0,05(3)}$

Fonte: (TOXNET, 2013; SIGMA-ALDRICH, 2013[(2)]; TGSC, 2013[(3)])

3.1.2 Diesel

O óleo diesel é um combustível formado na primeira destilação do petróleo que pode ser definido como uma complexa mistura de hidrocarbonetos que variam de C_9 a C_{30}, contendo compostos aromáticos, alifáticos (n-alcanos, isoalcanos e cicloalcanos), enxofre, nitrogênio e compostos oxigenados (EHC 171, 1996). A composição dos combustíveis de petróleo costuma ser bastante variável, uma vez que estes são provenientes de diferentes fontes de óleo cru e distintos processos de otimização dos produtos. A Tabela 3.3 apresenta a caracterização de uma amostra de óleo diesel comercial brasileiro realizada por Kaipper (2003). O resultado dessa caracterização demonstra que 75,2% do diesel é composto por hidrocarbonetos alifáticos, enquanto os 24,8% restantes correspondem a hidrocarbonetos aromáticos. Os principais constituintes da fração aromática do diesel são os compostos monoaromáticos (17,7%), sendo o restante (7,1%) representado pelos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Dentre os HPAs, há uma predominância de naftaleno (79%) na composição do diesel (KAIPPER, 2003).

Tabela 3.3: Caracterização do óleo diesel

Hidrocarbonetos	**(% em Massa)**
Saturados	74,8
Olefinas	0,4
Alifáticos totais	75,2
Monoaromáticos	17,7
Diaromáticos	5,0
Poliaromáticos	2,1
Aromáticos totais	24,8

Fonte: (KAIPPER, 2003)

Dentre os diversos hidrocarbonetos presentes no diesel, os hidrocarbonetos monoaromáticos – benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) – e os HPAs são os que apresentam maior preocupação ambiental por serem compostos recalcitrantes, possuírem potencial carcinogênico (USEPA, 1998) e elevada toxicidade aos organismos aquáticos (ANDERSON et al., 1974; RODRIGUES et al., 2010; SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008), além de apresentarem solubilidade em água superior aos demais compostos presentes neste combustível, principalmente no caso dos BTEX (ALVAREZ; PÉREZ,

2003; CHAPELLE, 2001; WIEDEMEIER et al, 1999). Em meio aos diversos HPAs existentes, a *United States Environment Protection Agency* (USEPA), agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América, estabeleceu 16 hidrocarbonetos poliaromáticos prioritários para o monitoramento ambiental de poluentes orgânicos, devido aos seus elevados potenciais de toxicidade e carcinogenicidade, sendo estes: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo-[a]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno (USEPA, 1986). A importância do monitoramento dos hidrocarbonetos aromáticos na água subterrânea é afirmada pela Resolução CONAMA nº 396 (BRASIL, 2008), que legisla sobre os Valores Máximos Permitidos (VMP) para diversos desses compostos segundo os usos preponderantes da água subterrânea. A Tabela 3.4 apresenta os VMP para os BTEX e HPA's apresentados na Resolução citada. Os itens em branco significam que não há VMP para determinadas atividades.

Tabela 3.4: Valores Máximos Permitidos dos compostos BTEX e HPA segundo os usos preponderantes da água subterrânea

Parâmetros	Usos Preponderantes			
	$\mu g.L^{-1}$			
	Consumo Humano	Dessedentação de animais	Irrigação	Recreação
Benzeno	5			10
Tolueno	170	24		
Etilbenzeno	200			
Xileno Total	300			
Benzo[a]antraceno	0,05			
Benzo[b]fluoranteno	0,05			
Benzo[k]fluoranteno	0,05			
Benzo-[a]pireno	0,05			0,01
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,05			

Fonte: (BRASIL, 2008)

Assim como para os ésteres metílicos de ácidos graxos, o conhecimento das propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos do diesel é igualmente fundamental, uma vez que irá determinar o comportamento e destino desses compostos no ambiente. A Tabela 3.5 apresenta as principais propriedades físico-químicas dos

hidrocarbonetos constituintes do diesel que possuem maior interesse ambiental (BTEX e HPAs prioritários). De um modo geral, quanto maior o número de carbonos de um hidrocarboneto, maior será seu peso molecular, maior a densidade relativa, menor a solubilidade em água e menor a sua pressão de vapor (ASTM, 1995; CHIARANDA, 2011). Assim, no caso de um derramamento de diesel em água subterrânea, os BTEX apresentam maior solubilidade em água e, consequentemente, maior capacidade de migração que os HPAs. Dentre os hidrocarbonetos monoaromáticos, o benzeno recebe destaque, devido a sua maior solubilidade, quando comparada aos outros hidrocarbonetos aromáticos presentes no diesel, e ao seu elevado potencial carcinogênico (COATES; CHAKRABORTY; MCINERNEY, 2002; VOGT; KLEINSTEUBER; RICHNOW, 2011). Já os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são compostos de maior massa molecular, praticamente insolúveis em água, possuindo, desta forma, capacidade limitada de migração. Do mesmo modo como o biodiesel, os hidrocarbonetos possuem densidades relativas inferiores às da água, comportando-se também como LNAPLs no aquífero (WIEDMEIER et al, 1999). Os NAPLs (*non-aqueous phase liquids)*, também chamados de fase livre ou produto livre, comportam-se como uma fonte fixa e contínua de contaminação que culmina em uma lenta transferência dos constituintes solúveis para a fase aquosa, formando uma pluma de contaminação na zona saturada (ALVAREZ; PÉREZ, 2003; WIEDMEIER et al, 1999).

Tabela 3.5: Principais propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos constituintes do diesel

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular ($g.mol^{-1}$)	Densidade ($g.cm^{-3}$)	Solubilidade a 25°C ($mg.L^{-1}$)
Benzeno	C_6H_6	78,1	0,877[2]	1780[2]
Tolueno	C_7H_8	92,1	0,867[2]	515[2]
Etil-benzeno	C_8H_{10}	106,2	0,867[2]	152[2]
(m)Xileno	C_8H_{10}	106,2	0,884[5]	178[5]
(o)Xileno	C_8H_{10}	106,2	0,880[2]	175[2]
(p)Xileno	C_8H_{10}	106,2	0,861[5]	162[5]
Naftaleno	$C_{10}H_8$	128,2	1,030[2]	33[2]
Acenaftileno	$C_{12}H_8$	152,2	0,890[5]	3,93[1]
Acenafteno	$C_{12}H_{10}$	154,2	1,190[4]	3,4
Fluoreno	$C_{13}H_{10}$	166,2	1,202[4]	1,9[1]
Antraceno	$C_{14}H_{10}$	178,2	1,283[5]	0,073[1]
Fenantreno	$C_{14}H_{10}$	178,2	1,030[4]	1,29[1]
Fluoranteno	$C_{16}H_{10}$	202,2	1,252[4]	0,26[1]
Pireno	$C_{16}H_{10}$	202,2	1,271[4]	0,13[1]
Benzo(a)antraceno	$C_{18}H_{12}$	228,3	1,254[4]	0,014[1]
Criseno	$C_{18}H_{12}$	228,3	1,274[4]	0,002[5]
Benzo(k)fluoranteno	$C_{20}H_{12}$	252,3	----	0,000076[1]
Benzo(a)pireno	$C_{20}H_{12}$	252,3	1,351 [4]	0,00005[2]
Benzo(k)fluoranteno	$C_{20}H_{12}$	252,3	----	0,0008[1]
Benzo(g,h,i)perileno	$C_{22}H_{12}$	276,3	----	0,0003[1]
Indenol(1,2,3,cd)pireno	$C_{22}H_{12}$	276,3	----	0,062[5]
Dibenzo(a,h)antraceno	$C_{22}H_{14}$	278,3	1,280[4]	0,0005[3]

Fonte: (MACKAY; SHIU, 1977[1]; SCHNOOR, 1996[2]; MANOLI; SAMARA, 1999[3]; CHIARANDA, 2011[4]; TOXNET, 2013[5])

3.2 Biodegradação Anaeróbia

A biodegradação consiste na aplicação de processos biológicos que podem ser utilizados para o tratamento de águas subterrâneas e solos contaminados com produtos perigosos, sendo um dos mecanismos mais importantes envolvidos no controle da migração de contaminantes

orgânicos dissolvidos no aquífero. No processo de biodegradação, o composto orgânico (contaminante) é convertido em compostos mais simples (CO_2 e H_2O) ou em subprodutos de menor toxicidade, por meio de reações de óxidação-redução mediadas por micro-organismos (ALVAREZ; PÉREZ, 2003; WIEDEMEIER et al., 1999). Através das reações de oxidação e redução os micro-organismos obtêm energia para seu crescimento e manutenção de suas atividades fisiológicas. Neste processo ocorre a transferência de elétrons do doador (em muitos casos, o contaminante) para os receptores de elétrons, havendo liberação de energia (WIEDMEIER et al., 1999). As reações de oxidação e redução ocorrem em etapas sequenciais, com os subprodutos de um processo metabólico atuando como substrato para o próximo, até que se atinja a completa mineralização do composto orgânico (CHIARANDA, 2011).

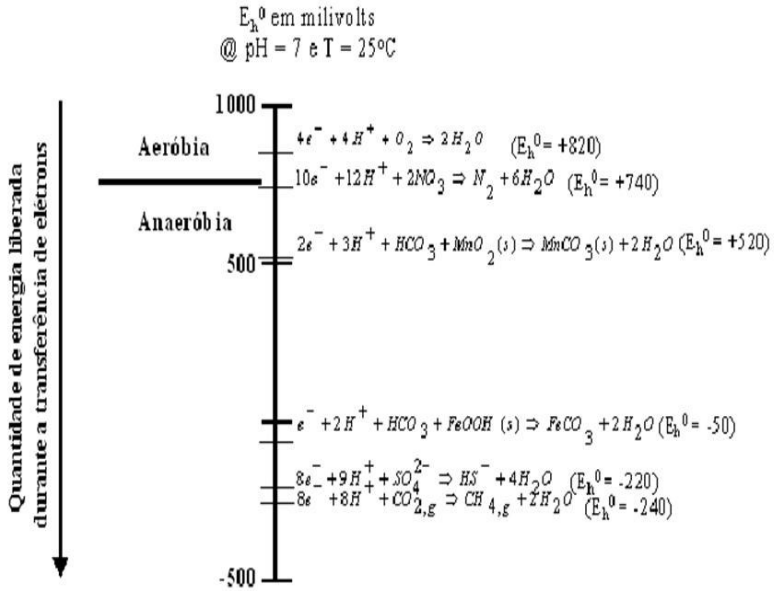
Para que os processos de biodegradação ocorram é necessário que as condições ambientais sejam adequadas. Primeiramente, é necessária a presença de micro-organismos que produzam enzimas capazes de atuar na degradação do contaminante. Para que isto ocorra satisfatoriamente, os micro-organismos necessitam de energia para o processo, a qual é obtida através do processo redox, que requer a presença de matéria orgânica (doador de elétrons) e de receptores de elétrons. Fatores como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes também interferem diretamente no bom desempenho dos processos de degradação. A faixa de pH ideal para o crescimento dos micro-organismos encontra-se entre 4 e 9 (CHAPELLE, 2001). Porém a condição ideal de pH irá depender da composição da água subterrânea e das características de especiação da matéria orgânica (SCHERER et al., 2000). A temperatura é um fator que influencia a atividade microbiana porque é responsável pela seleção das espécies microbianas que irão participar da degradação. Além disso, de uma maneira geral, quanto maior a temperatura do sistema, mais intensa será a atividade enzimática. Grande parte dos micro-organismos presentes nas águas subsuperficiais cresce e se desenvolve em uma faixa de temperatura entre 20°C a 40°C (mesófilos), sendo esta a faixa de temperatura mais favorável à atividade enzimática (BRADLEY; CHAPELLE, 1995). A disponibilidade de nutrientes é fundamental para a manutenção do crescimento celular dos micro-organismos. Neste sentido, os processos de biodegradação requerem quantidades significativas dos nutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P), que podem estar disponíveis em quantidades suficientes no aquífero ou podem ser adicionados por intervenções de engenharia. Além disso, para que os processos de biodegradação se sustentem satisfatoriamente, são necessárias as

seguintes condições ambientais: ausência de toxicidade para os micro-organismos e ausência de micro-organismos competitivos ou predadores (ALVAREZ; PÉREZ, 2003).

A remoção de contaminantes pela ação microbiana normalmente ocorre de maneira natural no aquífero, sem necessidade de intervenção humana, denominando-se atenuação natural. Se a velocidade da atenuação natural for muito baixa, as condições ambientais podem ser manipuladas por meio do estímulo da atividade microbiana. As estratégias de remediação mais utilizadas incluem: adição de doadores ou receptores de elétrons que possam estimular o crescimento dos micro-organismos envolvidos nos processos de interesse e adição dos nutrientes limitantes ao crescimento e atividade microbiana (LOVLEY, 2003).

Os receptores de elétrons são elementos ou compostos que se apresentam em estado oxidado, podendo, desta forma, receber elétrons do composto orgânico que será oxidado. São esses: oxigênio dissolvido, nitrato, óxido ou óxi-hidróxido de ferro(III), sulfato e dióxido de carbono. Os receptores de elétrons que fornecerem maior rendimento de energia livre para o metabolismo microbiano serão preferencialmente utilizados, de acordo com a hierarquia termodinâmica que pode ser observada na Figura 3.2. Além disso, o elemento utilizado define o metabolismo envolvido no processo de degradação (aeróbio ou anaeróbio).

Figura 3.2: Ordem de utilização de receptores de elétrons segundo a hierarquia termodinâmica



Fonte: (STUMM; MORGAN, 1981)

Embora as reações de oxidação dos compostos orgânicos em condições aeróbias sejam energeticamente mais favoráveis aos micro-organismos, o rápido consumo de oxigênio, resultante da elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) exercida pelos combustíveis, faz com que o ambiente se torne predominantemente anaeróbio (LOVLEY, 2003; VOGT; KLEINSTEUBER; RICHNOW, 2011). No caso de contaminações com biodiesel, a elevada DBO exercida por este biocombustível irá favorecer ainda mais o estabelecimento de condições anaeróbias (CORSEUIL et al., 2011; SØRENSEN et al., 2011) uma vez que a demanda teórica de oxigênio necessária para a degradação do biodiesel é duas vezes maior do que a requerida para degradar o etanol e oito vezes maior do que a exigida para degradar os compostos BTEX presentes na composição da gasolina (10% v/v) (GOMES, 2008).

A biodegradação anaeróbia de compostos orgânicos pode ocorrer via processos respirativos, onde receptores de elétrons externos e inorgânicos são utilizados, ou por meio da fermentação, na qual a oxidação da matéria orgânica ocorre com o uso de receptores de elétrons

internos (endógenos). Os receptores de elétrons externos inorgânicos utilizados são: nitrato, óxido ou hidróxido de ferro e sulfato, caracterizando os processos como nitratorredução, ferrorredução e sulfatorredução, respectivamente. Depois que esses forem exauridos, os receptores de elétrons disponíveis serão bicarbonato e prótons, caracterizando o ambiente como metanogênico (STAMS et al., 2006; WIEDMEIER et al., 1999).

Em condições metanogênicas, os processos metabólicos de degradação de um composto orgânico ocorrem por: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na etapa de hidrólise os compostos orgânicos complexos são convertidos em moléculas mais simples, por meio da ação de enzimas extracelulares excretadas por micro-organismos, a fim de tornar os substratos complexos acessíveis aos micro-organismos (GUJER; ZEHNDER, 1983; FENCHEL et al, 1998). Portanto, nesta etapa, carboidratos são convertidos em açúcares solúveis, proteínas em aminoácidos e lipídeos em ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e glicerol (LOVLEY, 1997). Os substratos formados após a etapa de hidrólise são convertidos dentro da célula microbiana, portanto sem a presença de receptores de elétrons externos, em um processo denominado acidogênese. Neste momento ocorre a formação de ácidos orgânicos voláteis como acetato, propionato, butirato, entre outros compostos. A próxima etapa é denominada acetogênese e é caracterizada pela produção de acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, sendo conduzida pela ação de bactérias acetogênicas sintróficas. Por fim, ocorre a metanogênese, onde os compostos produzidos nas etapas anteriores atuam como substratos que são convertidos a metano e dióxido de carbono, pela ação das arqueas metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas (GUJER; ZEHNDER, 1983; FENCHEL et al, 1998).

3.2.1 Ferrorredução

A ferrorredução é o processo no qual o ferro férrico (Fe(III)) é reduzido a ferro ferroso (Fe(II)) via reações de óxido-redução mediadas por micro-organismos. A matéria orgânica encontrada em ambientes subterrâneos é um dos principais agentes redutores desse processo, incluindo: ácidos graxos, etanol, aminoácidos, açúcares, compostos aromáticos e hidrogênio (COATES et al., 1998; HOLMES et al., 2011; LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009; LOVLEY, 1997; ZHANG et al., 2012). O ferro férrico utilizado como receptor de elétrons se encontra na

forma de óxidos/oxihidróxidos de Fe(III), os quais se caracterizam por serem praticamente insolúveis em água e podem ser encontrados naturalmente nos ambientes subterrâneos ou podem ser adicionados no aquífero por intervenção de engenharia. As formas mais recorrentes desses óxidos/oxihidróxidos de Fe(III) são: a ferridrita ($Fe(OH)_3$), que é a forma mais hidratada de óxido de ferro e apresenta estrutura amorfa, a goetita (FeOOH), que é um oxihidróxido de ferro cristalino, hematita (α-Fe_2O_3), um anidro de ferro cristalino e a magnetita (Fe_3O_4), que apresenta-se como um óxido de ferro de valência mista e cristalino. (BOSCH et al., 2010[a]; LOVLEY, 2013; RODEN; ZACHARA, 1996). A completa mineralização de compostos orgânicos via ferrorredução resulta na produção de dióxido de carbono (CO_2) e ferro II solúvel (Fe(II)). A Tabela 3.6 apresenta as reações de oxirredução para os hidrocarbonetos monoaromáticos, naftaleno e palmitato, utilizando o Fe(III) como receptor de elétrons, com as respectivas energias livres de Gibbs ($\Delta G°_r$).

Os compostos óxidos/oxihidróxidos de Fe (III) utilizados na ferrorredução podem apresentar-se na fase amorfa ou cristalina. A estrutura do composto férrico usado no processo afeta diretamente na sua taxa de redução. LIU et al. (2001) afirmam que, na biorredução com óxido de ferro cristalino, somente uma fração limitada do sólido pode ser reduzida mesmo quando há excesso de doador de elétrons. Portanto, compostos de Fe(III) pobremente cristalinos são os que apresentam as maiores taxas de redução, assim, a cinética de redução dos compostos férricos na oxidação de compostos orgânicos segue a seguinte ordem decrescente: ferridrita > goetia > hematita > magnetita (BONNEVILLE; BEHRENDS; VAN CAPPELLEN, 2009; BOSCH et al., 2010a; LIU et al., 2001; LOVLEY, 1997). Porém, mesmo um único composto de Fe(III) pode apresentar diferentes cristalinidades, tamanho de partícula, área superficial e solubilidade. Estas variações nas propriedades minerais resultam em uma diferente reatividade para o mesmo composto (BONNEVILLE; BEHRENDS; VAN CAPPELLEN, 2009). Assim, fatores como área superficial e tamanho da partícula afetam a biodisponibilidade do Fe(III), controlando sua taxa de redução, independentemente da estrutura apresentada pelo composto. Roden; Zachara (1996) mostraram que a taxa de redução do Fe(III) aumentou linearmente com a área superficial do óxido de Fe(III). De fato, compostos férricos amorfos, apresentam uma maior área superficial e, consequentemente, maiores velocidades de redução (JOZWIAK et al., 2007). Com relação ao tamanho da partícula, a diminuição do tamanho da partícula aumenta a solubilidade dos compostos, o que por sua vez,

aumenta a velocidade de redução microbiana (BOSCH et al., 2010a; BRAUNSCHWEIG; BOSCH; MECKENSTOCK, 2013; GILBERT; BANFIELD, 2005). Desta forma, o uso de materiais que possuem ao menos uma dimensão na escala de 1 a 100 nanômetros (nanomateriais) mostra-se interessante uma vez que possuem pequenos tamanhos de partículas e maiores áreas superficiais, quando comparadas aos compostos equivalentes na micro e macroescala, apresentando assim uma maior reatividade. Estudos que comparam as taxas de redução do Fe(III) em compostos na nano, micro e macroescala, demonstraram que óxido/hidróxidos de Fe(III) utilizados na nanoescala são mais eficientes para o processo de ferrorredução (BOSCH et al., 2010a, 2010b; PÉDROT et al., 2011), podendo haver diferenças de duas ordens de grandeza na taxa de redução do Fe(III) (BOSCH et al., 2010a, 2010b).

O processo de ferrorredução ocorre por meio de reações de óxido-redução sequenciais, formando compostos de Fe(III) secundários que podem ser mais solúveis do que os receptores inicialmente disponíveis, atuando novamente como receptores de elétrons para o processo, contribuindo dessa forma para o aumento das velocidades de ferrorredução (LOVLEY, 2013; VODYANITSKII, 2011). Entretanto, tanto em experimentos em microcosmos como em escala real, óxidos de ferro sólidos, pouco reativos para o processo de ferrorredução, podem ser formados como produtos secundários, pemanecendo persistentes no solo (LOVLEY, 2013; LOVLEY; PHILLIPS, 1988). Os principais produtos secundários formados são siderita e magnetita (ATEKWANA; AAL, 2015; FREDRICKSON et al., 1998; LIU et al., 2001; RODEN; LOVLEY, 1993). Além disso, ligantes orgânicos, como carbonatos e fosfatos, podem se complexar com o Fe(II) biogênico, formando precipitados de óxidos ferrosos alternativos (FREDRICKSON et al., 1998), como exemplo da vivianita ($Fe_3(PO_4)_2.8H_2O$) formada na presença de fosfato (ATEKWANA; AAL, 2015; VODYANITSKII, 2011), os quais também permanecem persistentes no solo.

Tabela 3.6: Reações de oxidação-redução de hidrocarbonetos utilizando o Fe(III) como receptor de elétrons

Composto	Reação de oxirredução	$\Delta G°_r$ ($kJ.mol^{-1}$)
Benzeno	$C_6H_6 + 30Fe(OH)_3 + 60H^+ \rightarrow 6CO_2 + 30Fe^{2+} + 78H_2O$	-2343
Tolueno	$C_7H_8 + 36Fe(OH)_3 + 72H^+ \rightarrow 7CO_2 + 36Fe^{2+} + 94H_2O$	-2792
Etilbenzeno	$C_8H_{10} + 42Fe(OH)_3 + 84H^+ \rightarrow 8CO_2 + 42Fe^{2+} + 110H_2O$	-3257
m-Xileno	$C_8H_{10} + 42Fe(OH)_3 + 84H^+ \rightarrow 8CO_2 + 42Fe^{2+} + 110H_2O$	-3245
Naftaleno	$C_{10}H_8 + 48Fe(OH)_3 + 96H^+ \rightarrow 10CO_2 + 48Fe^{2+} + 124H_2O$	-3902
Palmitato	$C_{16}H_{32}O_2 + 92Fe^{3+} + 30H_2O \rightarrow 16CO_2 + 92Fe^{2+} + 92H^{+}$ (a)	-5695(b)

Fonte: (WIEDEMEIER et al., 1998; COATES et al., 1995(a))

Legenda: (b) calculado, segundo a equação $\Delta G°_r = \Sigma\Delta G_{f,produtos} - \Sigma\Delta G_{f,reagentes.}$ Dados de ΔG de formação obtidos de Wiedemeier et al. (1998) e Lalman (2000). Condições padrão: pH = 7 e T = 25°C.

Uma limitação comum da biodegradação se refere à falta de contato adequado entre os contaminantes ou receptores de elétrons e os micro-organismos (biodisponibilidade e bioacessibilidade) (ALVAREZ; PÉREZ, 2003). A maioria dos processos de biorremediação anaeróbia utiliza receptores de elétrons solúveis. Nestes casos, a transferência de elétrons ocorre via contato direto dos micro-organismos com o receptor de elétrons. Caso os doadores ou receptores de elétrons tenham baixa solubilidade, desfavorecendo o contato direto entre estes e os micro-organismos, são necessários mecanismos alternativos de transporte dos elétrons. Na ferrorredução, os elétrons do contaminante podem ser transferidos para os óxidos de Fe(III) pelos seguintes mecanismos:

- Transferência indireta de elétrons através do auxílio de transportadores de elétrons orgânicos secretados pelos micro-organismos, como por exemplo, as flavinas e fenazinos (BRUTINEL; GRALNICK, 2012; HERNANDEZ; KAPPLER; NEWMAN, 2004; MARSILI et al., 2008);
- Transferência de elétrons indireta através do uso de transportadores de elétrons externos como quinonas e substâncias húmicas (ANSCHUTZ; PENN, 2005; LI et al., 2014; RODEN et al., 2010; VOORDECKERS et al., 2010; WOLF et al., 2009).
- Transferência de elétrons direta pelo auxílio de nanofios bacterianos produzidos por determinados micro-organismos. As espécies *Geobacter e Shewanella*, predominantes nos ambientes ferrorredutores, necessitam de contato direto para processar a ferrorredução. Assim, com intuito de auxiliar no contato com os óxidos de Fe(III) pouco solúveis, essas bactérias passaram a produzir um pili monolateral condutor, que pode servir como nanofios biológicos, transferindo elétrons da superfície do óxido de ferro para a célula microbiana (GORBY et al., 2006; LOVLEY, 2011; REGUERA et al., 2005, 2007);
- Formação de complexos de Fe(III)-quelantes que contribuem para a dissolução dos compostos férricos, consequentemente aumentando sua biodisponibilidade para os micro-organismos. Os agentes quelantes sintéticos mais utilizados no processo de ferrorredução são o ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: *ethylenediamine tetraacetic acid – EDTA*) e o ácido nitrilotriacético (do inglês: *nitrilotriacetic acid – NTA*) (AZAM; FINNERAN, 2013; COATES et al., 1998; KELLY; MACHESKY, 1997; LOVLEY; WOODWARD, 1996;

RODEN; LOVLEY, 1993). Além desses, o composto sintético pirofosfato férrico, uma mistura que contêm Fe(III), fosfato, ácido nitrilotriacético e citrato, é comumente usado em culturas de redução microbiana de ferro(III) (CACCAVO et al., 1996). Com relação aos quelantes naturais, os mais encontrados são os ácidos húmicos (COATES et al., 1998; LUTHER et al., 1992; RODEN et al., 2010). Esses são capazes de formar complexos Fe(III)-ácido húmico que possuem um alto potencial redox, tornando a ferrorredução termodinamicamente mais favorável (THAMDRUP, 2000).

Ainda com relação à biodisponibilidade do Fe(III), muitos estudos utilizaram o composto sintético citrato de Fe(III) (AZAM; FINNERAN, 2013; COATES et al., 1996, 1998; FREDRICKSON et al., 1998; LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009; RODEN; LOVLEY, 1993; TOBLER; HOFSTETTER; SCHWARZENBACH, 2008), que é solúvel em água e, portanto, prontamente disponível para o processo. No entanto, este composto pode apresentar toxicidade para alguns micro-organismos ferrorredutores (RODEN; LOVLEY, 1993), limitando sua aplicação em ambientes variados.

Uma grande diversidade filogenética de micro-organismos é capaz de atuar no processo de ferrorredução (LOVLEY, 2013). A caracterização desses micro-organismos em culturas puras, utilizando o Fe(III) como o único receptor de elétrons, indicou que é possível a completa oxidação da matéria orgânica a dióxido de carbono (LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009), sendo o micro-organismo *Geobacter metallireducens* a primeira espécie a demonstrar esta capacidade (LOVLEY; PHILLIPS, 1988). Posteriormente, foi caracterizada uma variedade de micro-organismos com capacidade enzimática de reduzir o ferro férrico juntamente com a oxidação da matéria orgânica (COATES et al., 1998). Os dois gêneros mais estudados são *Geobacter* e *Shewanella*, os quais pertencem às classes δ e g-Proteobactéria, respectivamente (LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009; LOVLEY, 1997; ZHANG et al., 2012).

Os hidrocarbonetos aromáticos podem ser oxidados pelos micro-organismos ferrorredutores dos gêneros *Geobacter* spp. (BOTTON et al., 2007; COATES et al., 1999; DORER et al., 2016; LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009; LOVLEY, 1997; ROONEY-VARGA et al., 1999; ZHANG et al., 2012) e *Geothrix* spp. (LOVLEY, 1997). Além disso, em condições ferrorredutoras, o benzeno pode ser degradado pela arquea *Ferroglobus placidus* (HOLMES et al., 2011), o

tolueno pelas bactérias *Desulfuromonas* spp. (KIM et al., 2014), *Georgfuchsia toluolica* (DORER et al., 2016) e *Desulfitobacterium aromaticivorans* (KUNAPULI et al., 2010) e o etilbenzeno pela bactéria *Georgfuchsia toluolica* (DORER et al., 2016).

A oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) comumente ocorre em duas etapas. Primeiramente, os AGCL são oxidados a acetato e H_2, os quais são convertidos a CO_2 ou metano. O acúmulo de acetato e H_2 no meio pode acarretar em limitação termodinâmica ao sistema, prejudicando assim a degradação dos AGCL; portanto, a oxidação dos AGCL requer cooperações sintróficas entre micro-organismos, a fim de evitar a presença de elevadas concentrações de metabólitos intermediários na água subterrânea. Na ausência de receptores de elétrons anaeróbios mais termodinamicamente favoráveis como o Fe(III) e o sulfato, micro-organismos pertencentes às famílias *Syntrophomonadacea* e *Syntrophaceae* atuam em sintrofia com arqueas metanogênicas para degradação dos AGCL (SOUSA et al., 2009). No entanto, quando há a presença de sulfato, membros do gênero *Desulforegula* (tipicamente sulfatorredutores) podem atuar em relações sintróficas com micro-organismos nitratorredutores (*Comamonadaceae*), ferrorredutores (*Geobacteraceae*) ou arqueas metanogênicas (GIHRING et al., 2011). Embora a oxidação dos AGCL seja comumente mais observada através de relações sintróficas entre micro-organismos, Coates et al. (1995) constatou que os micro-organismos ferrorredutores da espécie *Desulfuromonas Palmitatis* sp. nov. (COATES et al., 1995) foram capazes de degradar os AGCL.

O acetato, que é um importante subproduto dos processos de oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa e dos compostos aromáticos, pode ser oxidado por diversos gêneros ferrorredutores, tais como: *Geobacter* spp., *Geothrix* spp., *Shewanella* spp., *Desulfuromonas* spp. (COATES et al., 1999; LOVLEY, 1997). Além dos micro-oganismos ferrorredutores, diversos gêneros sulfatorredutores apresentam também a capacidade de reduzir enzimaticamente o Fe(III). Entretanto, apesar da habilidade em reduzir o Fe(III), nenhum desses micro-organismos sulfatorredutores demonstrou capacidade de crescimento quando o ferro férrico foi o único receptor de elétrons (GARCÍA-BALBOA et al., 2009; LOVLEY, 2013).

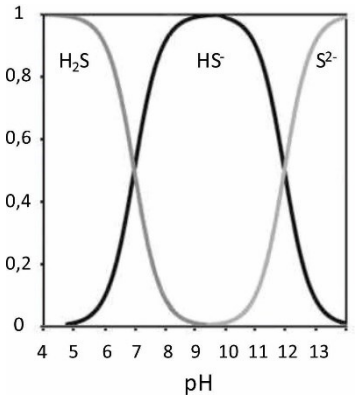
Apesar de inúmeros micro-organismos possuírem habilidade para oxidar a matéria orgânica utilizando Fe(III) como receptor de elétrons, os micro-organismos da família *Geobacteraceae* são dominantes em ambientes subsuperficiais sob condições ferrorredutoras (BOTTON et al., 2007; LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009;

ROONEY-VARGA et al., 1999). Lovley; Holmes; Nevin (2004) afirmam que todos os membros da família *Geobacteraceae* são capazes de reduzir o ferro férrico. A predominância da *Geobacteraceae* é explicada pela capacidade de rendimento máximo de manutenção da atividade microbiana mesmo em condições de baixas velocidades de crescimento, como as costumamente observadas em experimentos *in situ*. Isto ocorre pela baixa necessidade energética de manutenção das suas funções celulares e flexibilidade na utilização de receptores de elétrons. Os micro-organismos pertencentes à família *Geobacteraceae* são capazes de utilizar óxidos de ferro férrico alternativos simultaneamente, capacitando-os para atuar em diferentes condições redox, possibilitando a utilização dos receptores de elétrons que permitam um maior rendimento por elétron transferido (LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009).

3.2.2 Sufatorredução

A sulfatorredução se refere a um processo metabólico no qual o sulfato é reduzido a sulfetos (H_2S, HS^-, S^{2-}) juntamente com a oxidação da matéria orgânica ou hidrogênio, mediante a ação de micro-organismos. O pH e a temperatura são fatores que interferem na especiação química do sulfeto presente no aquífero (AL-ZUHAIR; EL-NAAS; AL-HASSANI, 2008; SAWYER; MCCARTY; PARKIN, 1994), sendo o pH o principal fator que exerce influência na forma predominante de sulfeto em água (SAWYER; MCCARTY; PARKIN, 1994; SHARMA; BISWAS, 2010). A Figura 3.3 apresenta a especiação química do sulfeto em água doce em função do pH.

Figura 3.3: Especiação química do sulfeto na água doce em função do pH



Fonte: Adaptado de (SAWYER; MCCARTY; PARKIN, 1994)

Diversas fontes de matéria orgânica podem atuar como doadores de elétrons na sulfatorredução, tais como: formato, metanol, etanol, melaço, lactato, acetato, butirato, propionato, açúcares, hidrocarbonetos, resíduos orgânicos, além do hidrogênio (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007). Apesar do processo de sulfatorredução ser comumente mais relatado para compostos orgânicos simples, diversos estudos demonstraram a eficiência deste processo para a degradação de hidrocarbonetos aromáticos (ABU LABAN et al., 2009; BELLER et al., 1996; BOMBACH et al., 2010; BOZINOVSKI et al., 2014; EDWARDS et al., 1992; HIGASHIOKA; KOJIMA; FUKUI, 2012; HUANG; KAO, 2016; KNIEMEYER et al., 2003; KÜMMEL et al., 2015; MECKENSTOCK et al., 2000; MORRIS et al., 2014; NAKAGAWA et al., 2002; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; REINHARD et al., 1997; THIERRIN et al., 1993). A Tabela 3.7 apresenta as reações de oxidação-redução para os hidrocarbonetos monoaromáticos e naftaleno, utilizando o sulfato (SO_4^{2-}) como receptor de elétrons, com as respectivas energias livres de Gibbs ($\Delta G°_r$).

Tabela 3.7: Reações de oxidação-redução de hidrocarbonetos aromáticos utilizando o sulfato como receptor de elétrons

Composto	Reação de óxirredução	$\Delta G°_r$ (kJ.mol^{-1})
Benzeno	$C_6H_6 + 3{,}75SO_4^{2-} + 7{,}5H^+ \rightarrow 6CO_2 + 3{,}75H_2S + 3H_2O$	-514,3
Tolueno	$C_7H_8 + 4{,}5SO_4^{2-} + 9H^+ \rightarrow 7CO_2 + 4{,}5H_2S + 4H_2O$	-597,7
Etilbenzeno	$C_8H_{10} + 5{,}25SO_4^{2-} + 10{,}5H^+ \rightarrow 8CO_2 + 5{,}25H_2S + 5H_2O$	-697,7
m-Xileno	$C_8H_{10} + 5{,}25SO_4^{2-} + 10{,}5H^+ \rightarrow 8CO_2 + 5{,}25H_2S + 5H_2O$	-685,6
Naftaleno	$C_{10}H_8 + 6SO_4^{2-} + 12H^+ \rightarrow 10CO_2 + 6H_2S + 4H_2O$	-824,2

Fonte: (WIEDEMEIER et al., 1998). Dados de ΔG para pH = 7 e T = 25°C.

O processo de sulfatorredução é mediado por um grupo de micro-organismos conhecido como sulfatorredutores (MSR), que são compostos por bactérias sulfatorredutoras (BSR) e arqueas sulfatorredutoras (ASR) (BARTON; FAUQUE, 2009; MUYZER; STAMS, 2008). As BSR são diferenciadas em dois grupos: autotróficas, que utilizam CO_2 como fonte de carbono e obtêm elétrons da oxidação do H_2 e heterotróficas, que utilizam compostos orgânicos como substrato (LENS; KUENEN, 2001). A oxidação de compostos orgânicos pode ser incompleta, na qual fontes de carbono mais complexas produzem acetato, ou oxidação completa, onde os compostos são oxidados a CO_2 e água. MSR são estritamente anaeróbios, apesar de certas espécies tolerarem e reduzirem oxigênio por um curto período de tempo (RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006).

As BSR podem ser divididas em três grandes grupos de linhagens filogenéticas: i) as *Deltaproteobactérias*, com mais de 25 gêneros, incluindo bactérias das famílias *Desulfoarculaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae, Desulfohalobiaceae, Desulfomicrobiaceae, Desulfonatronumaceae, Desulfovibrionaceae, Syntrophaceae, Syntrophobacteraceae e Syntrophorhabdaceae*; ii) as bactérias Gram-positivas, incluindo os gêneros *Desulfotomaculum, Desulfosporomusa, Desulfosporosinus* e iii) bactérias sulfatorredutoras termofílicas, grupo formado por bactérias das famílias *Nitrospirae* (gênero *Thermodesulfovibrio)*, *Thermodesulfobacteria* (gênero *Thermodesulfobacterium*) e *Thermodesulfobiaceae* (gênero *Thermodesulfobium)* (BARTON; FAUQUE, 2009; MUYZER; STAMS, 2008; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; SHERRY et al., 2013). Já as ASR possuem três gêneros identificados: *Archaeoglobus*, *Thermocladium* and *Caldivirga* (BARTON; FAUQUE, 2009; MUYZER; STAMS, 2008; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; SHERRY et al., 2013).

A capacidade de diversos micro-organismos sulfatorredutores em degradar hidrocarbonetos aromáticos já foi previamente documentada. Micro-organismos com 95% de similaridade com o gênero *Pelotomaculum* foram identificados como degradadores de benzeno (ABU LABAN et al., 2009). O tolueno pôde ser oxidado pelas bactérias *Desulfobulbaceae toluolica* (RABUS et al., 1993) e sulfatorredutoras PRTOL1 (BELLER et al., 1996), além de bactérias com 99% de similaridade com o gênero *Desulfocapsa* (BOMBACH et al., 2010). Adicionalmente, Kuppardt et al. (2014) identificaram os micro-organismos pertencentes a família *Desulfobulbaceae* e ao gênero *Desulfosporosinus* como organismos-chave na degradação do tolueno em condições sulfatorredutoras. A deltaproteobactéria EbS7 foi documentada como degradadora do etilbenzeno no processo de sulfatorredução (KNIEMEYER et al., 2003). Micro-organismos sulfatorredutores com alta similaridade com *Desulfobacterium cetonicum* (HARMS et al., 1999) e com o gênero *Desulforsacina* (HARMS et al., 1999; HIGASHIOKA; KOJIMA; FUKUI, 2012) foram passíveis de oxidar os isômeros do xileno. Assim como para os xilenos, as bactérias da família *Desulfobacteaceae* são responsáveis pela degradação do naftaleno na presença de sulfato (KÜMMEL et al., 2015).

Aktas et al. (2010) afirmam que comunidades de MSR possuem a capacidade de degradar os metil/etil ésteres de ácido graxo. Já os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) podem ser oxidados por micro-organismos dos filos *Deltaproteobactéria*, *Firmicutes* (RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; SOUSA et al., 2010) e micro-organimos sulfatorredutores Gram-positivos (RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006). Além disso, cooperações sintróficas são comumente requeridas na degradação de AGCL, conforme previamente explicado no ítem 3.2.1 deste trabalho. Nesse sentido, micro-organimos sulfatorreduras podem atuar em relações sintróficas com micro-organismos nitratorredutores (*Comamonadaceae*), ferrorredutores (*Geobacteraceae*) (GIHRING et al., 2011) ou arqueas metanogênicas (GIHRING et al., 2011; SOUSA et al., 2009; STAMS; PLUGGE, 2009) na degradação de AGCL.

O uso do sulfato apresenta vantagens dentre os demais receptores de elétrons devido a sua alta solubilidade (100–250 $mg.L^{-1}$) comparada ao oxigênio (7-10 $mg.L^{-1}$), nitrato (80–100 $mg.L^{-1}$) e óxidos de ferro; a capacidade dos MSR em crescer em uma ampla faixa de pH; o baixo custo e mínima manutenção do sistema quando comparado aos demais receptores de elétrons anaeróbios (HUANG; KAO, 2016). Dentre as desvantagens do processo destaca-se a formação de altas

concentrações de sulfetos, os quais podem apresentar toxicidade e inibir a atividade microbiana (DA SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005; HUANG; KAO, 2016; KALYUZHNYI; DE LEON FRAGOSO; RODRIGUEZ MARTINEZ, 1997; LOPES et al., 2007; O'FLAHERTY et al., 1998). No entanto, quando há a presença de Fe (II) no ambiente, diferentes minerais sulfetados podem ser formados, tais como: pirita (FeS_2), greigita (Fe_3S_4) e sulfeto ferroso (FeS) (ATEKWANA; AAL, 2015; HUANG; KAO, 2016; MADIGAN et al., 2010; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006), os quais precipitam no meio e podem reduzir os efeitos inibitórios dos sulfetos. Nesse sentido, Liu et al. (2015) avaliaram os efeitos da adição de Fe(III) sobre a taxa de redução de sulfato em um reator anaeróbio. Os autores constataram que a presença do Fe(III) resultou no processo de ferrorredução, com geração de Fe(II). A produção de Fe(II) aliviou os efeitos inibitórios do H_2S sobre os micro-organimos por meio da precipitação de sulfeto ferroso, acarretanto em um aumento da taxa de sulfatorredução. As equações 3.1 e 3.2 apresentam as reações de formação do sulfeto ferroso.

$$Fe^{2+} + H_2S \rightarrow FeS_{(S)} + 2H^+ \text{ (Equação 3.1)}$$

$$Fe^{2+} + HS^- \rightarrow FeS_{(S)} + H^+ \text{ (Equação 3.2)}$$

3.2.3 Drenagem ácida de mina

A Drenagem Ácida de Mina (DAM) é uma solução aquosa formada pela oxidação de minerais sulfetados provenientes da atividade de mineração. A reação de oxidação ocorre quando os minerais sulfetados, especialmente a pirita, entram em contato com águas que contenham oxigênio (BILGIN et al, 2005), sendo um importante contribuinte para a poluição das águas superficiais devido à liberação de ácido sulfúrico e metais dissolvidos (CHENG et al, 2011). As águas residuárias da DAM contêm altas concentrações de ácidos, Fe(II) dissolvido, sulfato e uma variedade de metais dissolvidos (tais como ferro, alumínio, manganês, zinco, cobre, níquel, cálcio, magnésio, e cromo) (CHENG et al, 2011), caracterizando-se pela elevada presença de acidez e, consequentemente, baixo pH (ANDERSEN et al, 2012).

O tratamento da DAM pode ser realizado por meio de sistemas passivos de tratamento de efluentes ou processos ativos. Os processos ativos são mais comumente utilizados e envolvem o rápido aumento do

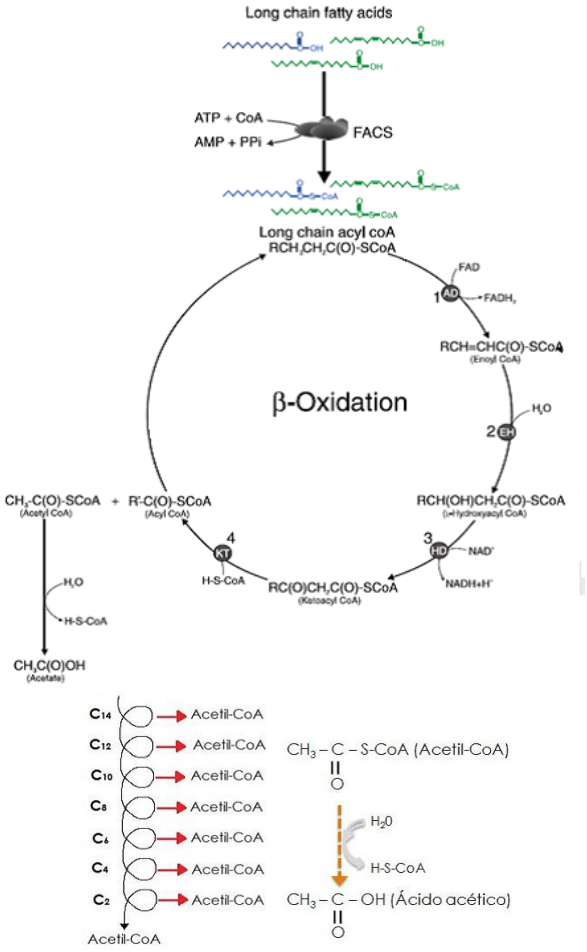
pH pelo uso de reagentes alcalinos e posterior precipitação dos metais dissolvidos utilizando agitação. Os tratamentos aplicados podem resultar na recuperação de compostos como óxidos de ferro (KIRBY et al, 1999; KAIRIES et al, 2005; WEI e VIADERO, 2007; ANDERSEN et al, 2012; FLORES, 2012), os quais podem apresentar-se como matéria-prima de baixo custo (FLORES, 2012). As características do produto obtido são importantes para a definição dos possíveis usos e eficiência dos mesmos. Os produtos recuperados a partir do tratamento da DAM apresentam óxidos de ferro e sulfato em sua composição (ANDERSEN et al, 2012), portanto, podem ser utilizados como receptores de elétrons na bioestimulação combinada dos processos de ferro e sulfatorredução.

3.2.4 Mecanismos de biodegradação anaeróbia do biodiesel

A biodegradação anaeróbia do biodiesel inicia-se com a hidrólise do éster (via estearases) a ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e álcool (usualmente metanol). Em seguida, os ácidos graxos de cadeia longa são oxidados via β-oxidação, processo no qual os AGCL são clivados até a produção de Acetil-CoA. A Figura 3.4 ilustra o processo de β-oxidação.

O primeiro passo desse processo trata-se da conversão do AGCL para o éster-Coenzima A (CoA), pela ação da proteína acil-CoA sintetase, em uma reação que requer energia na forma de ATP (Adenosina Trifosfato) (CHAPELLE, 2001; SOUSA et al., 2009). O éster-CoA é então oxidado na posição beta originando moléculas de Acetil-CoA (fragmentos de dois carbonos), restando assim moléculas de ácido graxo de cadeia longa com dois átomos de carbonos a menos, que são sequencialmente oxidados até a completa conversão dos carbonos a acetil-CoA. Por fim, a molécula de acetil-CoA é convertida em acetato, que, por sua vez, é degradado em CO_2, H_2 ou metano (CHAPELLE, 2001).

Figura 3.4: Ilustração da degradação de um ácido graxo via β-oxidação



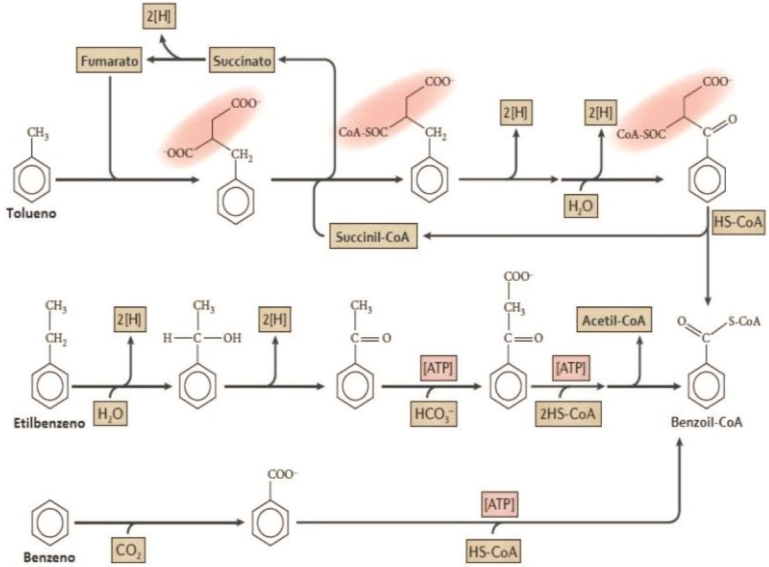
Fonte: Adaptado de (LEHNINGER et al., 1993; RAMOS, 2013; SOUSA et al., 2009)

3.2.5 Mecanismos de biodegradação anaeróbia dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel

Os hidrocarbonetos aromáticos são constituídos de anéis benzênicos, os quais são termodinamicamente estáveis devido ao sistema simétrico de π elétons do anel aromático (VOGT; KLEINSTEUBER; RICHNOW, 2011). Esta estabilidade torna custosa a degradação desses compostos, pois os micro-organismos apresentam dificuldade em efetuar a quebra do anel para utilizar o carbono como fonte de energia. Na biodegradação aeróbia, o oxigênio molecular funciona como um cossubstrato reativo que ativa o núcleo aromático, facilitando a degradação. A falta de um desestabilizador em potencial ou de um cossubstrato reativo dificulta a degradação anaeróbia desses compostos. Diversos mecanismos de ativação do anel aromático em condições anaeróbias vêm sendo estudados desde o final da década de 1980 e serão apresentados a seguir.

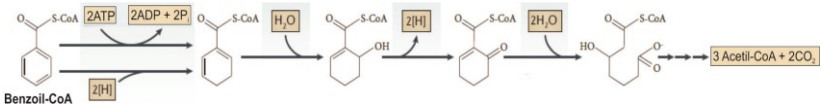
O mecanismo geral de degradação anaeróbia dos compostos aromáticos ocorre pela transformação desses em compostos intermediários centrais envolvendo reações de oxidação e redução, para posterior clivagem e redução do anel (COATES; CHAKRABORTY; MCINERNEY, 2002). De um modo geral, os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) são convertidos ao intermediário benzoil-CoA. O anel aromático do benzoil-CoA é reduzido pela benzoil-CoA redutase e, posteriormente, clivado a 3-hidroxipimelil-CoA, que é beta-oxidado a 3 moléculas de acetil-CoA e 1 molécula de CO_2. Então, as moléculas de acetil-CoA são quebradas por meio de enzimas, produzindo energia na forma e ATP que será utilizado pelos micro-organismos, resultando na liberação de acetato (COATES; CHAKRABORTY; MCINERNEY, 2002; FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; HEIDER, 2007; HEIDER; FUCHS, 1997; VOGT; KLEINSTEUBER; RICHNOW, 2011). O acetato é então degradado a CO_2 ou metano. As Figuras 3.5 e 3.6 apresentam a degradação anaeróbia dos hidrocarbonetos monoaromáticos convergindo na produção do metabólito benzoil-COA e a conversão do benzoil-CoA a acetil-CoA, respectivamente.

Figura 3.5: Mecanismos de degradação anaeróbia do tolueno, etilbenzeno e benzeno produzindo o metabólito benzoil-COA.



Fonte: Adaptado de (FUCHS et al., 2011)

Figura 3.6: Rota bioquímica de degradação do benzoil-CoA

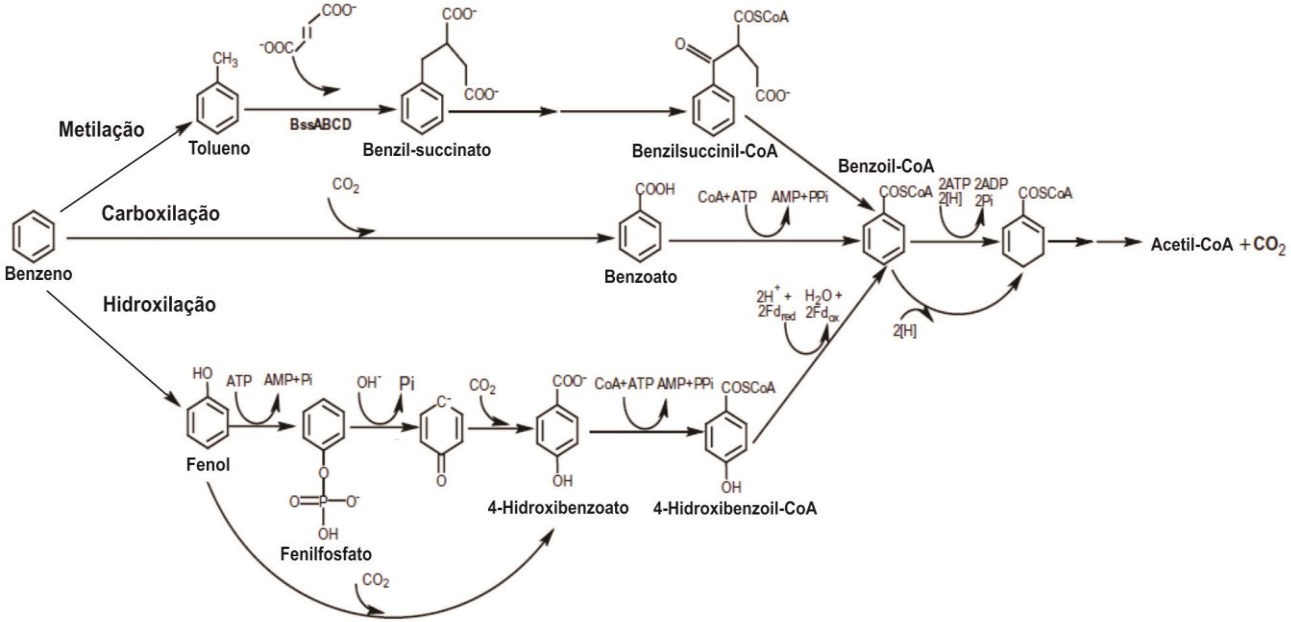


Fonte: Adaptado de (FUCHS et al., 2011)

Os mecanismos de ativação dos compostos aromáticos e suas transformações a benzoil-CoA podem variar. A trasformação inicial do benzeno pode ocorrer por meio de três rotas bioquímicas distintas: hidroxilação a fenol e posterior conversão a benzoil-CoA (ABU LABAN et al., 2010; GRBIĆ-GALIĆ; VOGEL, 1987), carboxilação direta a benzoato (ABU LABAN et al., 2010; KUNAPULI et al., 2008) ou metilação a tolueno (ABU LABAN et al., 2010; ULRICH; BELLER; EDWARDS, 2005). A conversão do tolueno e dos isômeros do xileno a benzoil-COA é iniciada pelo mecanismo de adição de fumarato, no qual uma molécula de fumarato é adicionada no grupo metil dos compostos

formando o benzilsuccinato por ação da enzima benzilsuccinato sintetase (BSS) (CALLAGHAN et al., 2010; CARMONA et al., 2009; KIM et al., 2014; KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012) e, então, o benzilsuccinato é posteriormente transformado a benzoil-CoA. A adição de fumarato é a reação mais investigada e conhecida dentre as transformações anaeróbias dos hidrocarbonetos (HEIDER, 2007; KIM et al., 2014; KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012). Por fim, o etilbenzeno é inicialmente desidrogenado para formar uma molécula de 1-feniletanol, a qual será desidrogenada a acetofenona. A acetofenona sofre carboxilação a 3-fenil-3-oxopropionato que é convertido a benzoil-CoA (RABUS et al., 1993; RABUS; WIDDEL, 1995). A Figura 3.7 apresenta os diferentes mecanismos de ativação do benzeno.

Figura 3.7: Mecanismos de ativação do benzeno

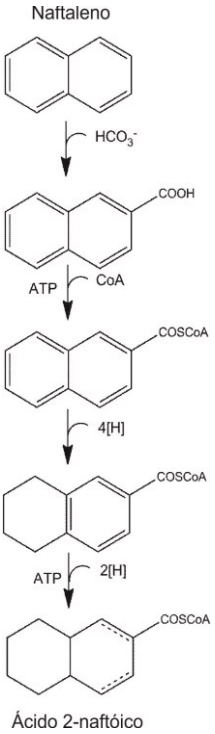


Fonte: Adaptado de (LABAN et al., 2010)

Assim como para os hidrocarbonetos monoaromáticos, diferentes rotas bioquímicas de degradação são apresentadas para os HPA's de baixo peso molecular, porém os procedimentos de degradação desses compostos ainda não foram completamente elucidados e pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação HPA's de alto peso molecular.

O naftaleno e o 2-metilnaftaleno possuem como metabólito central de suas rotas bioquímicas de degradação o ácido 2-naftóico (ANNWEILER; MICHAELIS; MECKENSTOCK, 2002; EBERLEIN et al., 2013; FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; MORRIS et al., 2014; SAFINOWSKI; MECKENSTOCK, 2006; ZHANG; YOUNG, 1997). Uma vez formado o ácido 2-naftóico, este requer a sua ativação na forma de 2-naftoil-CoA. O 2-naftoil-CoA é então convertido a 5,6,7,8-tetraidro-2-naftoil-CoA pela enzima 2-naftoil-CoA redutase (MORRIS et al., 2014) e posteriormente transformado a hexaidro-2-naftoil-CoA pela enzima arilcarboxil-CoA redutase (EBERLEIN et al., 2013). As tranformações iniciais do 2-metilnaftaleno e do tolueno são análogas (SAFINOWSKI; MECKENSTOCK, 2006), portanto o mecanismo de ativação da degradação do 2-metilnaftaleno se dá pela adição de fumarato (ANNWEILER; MICHAELIS; MECKENSTOCK, 2002; SAFINOWSKI; MECKENSTOCK, 2006). Já os mecanismos de transformação inicial do naftaleno podem ocorrer por carboxilação (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; ZHANG; YOUNG, 1997) ou metilação, onde o naftaleno é convertido a 2-metilnaftaleno (SAFINOWSKI; MECKENSTOCK, 2006). A Figura 3.8 apresenta a rota biquímica de transformação do naftaleno ao ácido 2-naftóico.

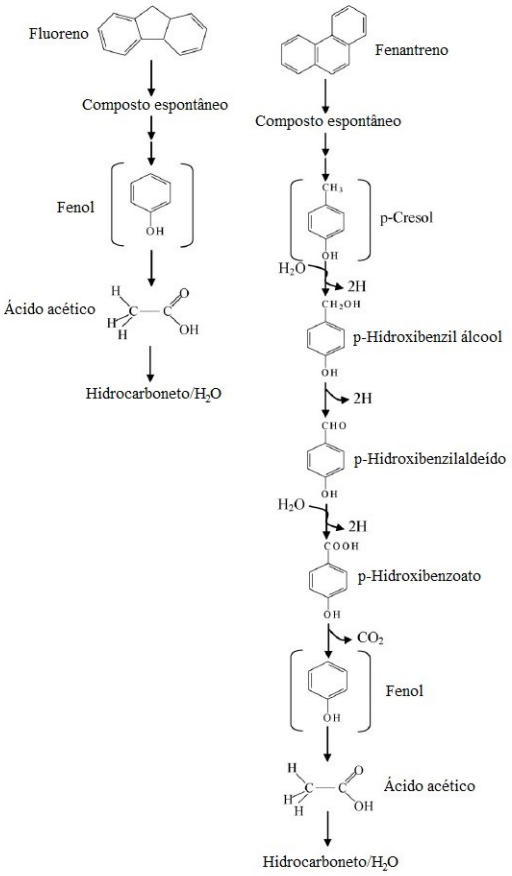
Figura 3.8: Mecanismos de degradação anaeróbia do naftaleno formando o metabólito ácido 2-naftoil-CoA



Fonte: Adaptado de **(**MORRIS et al., 2014)

Além do naftaleno e 2-metilnaftaleno, Tsai; Kumar; Lin, (2009) apresentaram uma rota bioquímica de degradação para o fluoreno e fenantreno. Esses compostos foram biotransformados através de uma sequência de reações de hidratação e hidrólise, seguida de descarboxilação, com a formação do intermediário fenol, que foi posteriormente convertido a ácido acético. O ácido acético é então utilizado pelos micro-organismos e transformado em CO_2 ou metano. A Figura 3.9 apresenta a rota bioquímica de transformação do fluoreno e fenantreno, mostrando os diferentes metabólicos formados.

Figura 3.9: Mecanismos de degradação anaeróbia do fluoreno e fenantreno



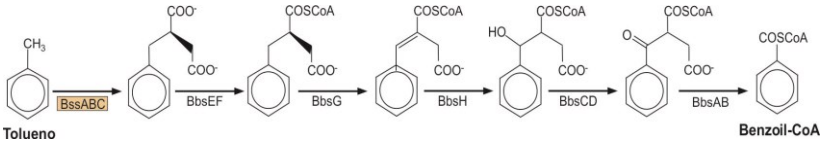
Fonte: Adaptado de (TSAI; KUMAR; LIN, 2009)

3.2.6 Gene bssA

O gene codificador da enzima α-benzilsuccinato sintase (*bssA*) é frequentemente empregado para detecção e quantificação de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos cuja reação de biodegradação anaeróbia é iniciada pela adição de fumarato (ex. tolueno, xilenos e 2-metilnaftaleno) (BELLER et al., 2002; CALLAGHAN et al., 2010; CARMONA et al., 2009; KIM et al., 2014; KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012; SUN; SUN;

CUPPLES, 2014b; WINDERL; SCHAEFER; LUEDERS, 2007). Sabendo que a adição de fumarato se caracteriza como a principal reação de ativação envolvida na degradação de hidrocarbonetos monoaromáticos (KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012) e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como naftaleno e 2-metilnaftaleno (SAFINOWSKI; MECKENSTOCK, 2006), a quantificação do gene *bssA* pode inferir sobre a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Nesse sentido, Winderl; Schaefer; Lueders (2007) afirmam que o gene *bssA* pode ser utilizado como um marcador "universal" para a degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos. A Figura 3.10 apresenta a rota bioquímica de degradação do tolueno com destaque para o gene *bssA*, envolvido na reação inicial de biodegradação anaeróbia, via adição de fumarato.

Figura 3.10: Mecanismos de degradação anaeróbia do tolueno com destaque para o gene *bssA*, envolvido na reação inicial de biodegradação anaeróbia via adição de fumarato



Fonte: Adaptado de (KIM et al, 2014)

O mecanismo de adição de fumarato ocorre em micro-organismos de diversos grupos funcionais, tais como nitrato, ferro e sulfatorredutores, bem como micro-organismos fermentativos (KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012). O gene *bssA* foi detectado em todos micro-organismos que apresentam capacidade de degradar os hidrocarbonetos aromáticos cuja reação inicial de ativação seja através da adição de fumarato (WINDERL; SCHAEFER; LUEDERS, 2007), o que reforça a ampla aplicabilidade deste gene como marcador catabólico da degradação anaeróbia dos BTEX e HPAs.

3.3 Influência do biodiesel sobre a degradação do diesel

A crescente utilização de misturas de diesel/biodiesel torna fundamental o conhecimento de possíveis influências que estes combustíveis possam exercer um sobre o outro, no caso de contaminação de águas subterrâneas. O biodiesel é mais facilmente

metabolizado do que o diesel, pois é composto basicamente por ácidos graxos de cadeia longa com 2 átomos de oxigênio no final da cadeia, os quais são biológicamente ativos, fazendo com que sejam mais suscetíveis ao ataque enzimático de micro-organismos (ZHANG et al., 1998).

Estudos demonstram que o biodiesel pode exercer efeitos sinergéticos positivos sobre a degradação dos n-alcanos do diesel, acelerando a degradação destes compostos através dos processos de cometabolismo (ZHANG et al., 1998; PASQUALINO et al., 2006; NG et al., 2015) ou cossolvência (YASSINE et al., 2012; YASSINE et al., 2013; NG et al., 2015). No processo de cometabolismo micro-organismos utilizam um segundo substrato, mais facilmente degradado, como fonte de carbono para oxidar um primeiro substrato, de difícil degradação (PASQUALINO et al., 2006). Assim, o biodiesel atua como uma fonte de carbono mais prontamente assimilável aos micro-organismos, favorecendo a degradação do diesel (NG et al., 2015). Já o processo de cossolvência é definido como a capacidade de um determinado solvente em aumentar a solubilidade de um soluto em outro solvente. Neste caso, o carácter anfifílico dos AGCL, compostos hidrolisados do biodiesel, aumentou a estabilidade coloidal do óleo, resultando em uma maior área de contato entre óleo e água, aumentando, desta forma, a dissolução dos n-alcanos na água subterrânea (YASSINE et al., 2012; NG et al., 2015). No entanto, estes efeitos sinergéticos foram observados somente quando concentrações significativas de biodiesel estavam presentes na mistura. DeMello et al. (2007) e Mariano et al. (2008) conduziram experimentos laboratoriais com misturas de diesel e biodiesel e não observaram influência do biodiesel em misturas com frações inferiores a 20% (em volume) deste composto. Já Sorensen et al. (2011), observaram uma mudança significativa na comunidade microbiana de misturas de diesel/biodiesel que continham uma fração mínima de 10% (em volume) de biodiesel. Portanto, para que o biodiesel possa excercer efeitos positivos sobre a degradação dos n-alcanos, seriam necessárias frações mínimas de 10-20% de biodiesel nas misturas.

Embora o biodiesel possa exercer efeitos positivos sobre a degradação dos n-alcanos, a presença deste biocombustível pode inibir a degradação do benzeno (BORGES ET AL, 2014; CORSEUIL ET AL, 2011), tolueno (CORSEUIL ET AL, 2011) e hidrocarbonetos aromáticos de um modo geral (YASSINE ET AL, 2013), quando na forma de misturas com diesel. Chiaranda (2011) realizou experimento em campo avaliando a atenuação natural do B20 e observou que, mesmo

após 29 meses de experimento, altas concentrações dos hidrocarbonetos mono e policíclico aromáticos foram detectadas no aquífero, mostrando que a presença do biodiesel dificultou a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos. No mesmo período experimental, foram observadas altas concentrações de metano e baixas concentrações de acetato (metabólito da biodegradação do biodiesel), sugerindo que o biodiesel foi preferencialmente degradado pelos micro-organismos (CHIARANDA, 2011). Nesse sentido, Owsianiak et al. (2009) realizaram experimentos em bancada e observaram que, em uma amostra contendo 10% (em volume) de biodiesel (B10), os ésteres de ácido graxo foram preferencialmente biodegradados, diminuindo a taxa de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo quando comparada a uma amostra contendo diesel puro.

Recentemente, RAMOS et al. (2016) apresentaram um estudo comparativo do comportamento dos hidrocarbonetos monoaromáticos quando misturados com um biocombustível altamente solúvel (etanol) e com um biocombustível pouco solúvel, que se comporta como um NAPL (biodiesel). Os autores demonstraram que, quando o diesel é misturado ao biodiesel, os hidrocarbonetos monoaromáticos formam uma pluma de contaminação de pequena extensão, porém com altas concentrações dissolvidas residuais de BTEX perto da zona da fonte, quando comparadas as misturas de etanol e gasolina. Isto de deve a menor mobilidade e a menor solubilidade do biodiesel em comparação ao etanol, que resulta em uma taxa de degradação mais lenta na zona da fonte, devido às menores taxas de dissolução do biodiesel na água. A persistência do biodiesel na zona da fonte e a sua degradação preferencial em relação aos BTEX resulta em efeitos negativos de longo tempo sobre a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos, contribuindo para a sua persistência na zona da fonte de contaminação (RAMOS et al., 2016). Adicionalmente, Wu et al. (2015) observaram que, em misturas de diesel/biodiesel, a presença do diesel teve um efeito negativo sobre a dissolução do biodiesel, diminuindo as concentrações dissolvidas dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), compostos hidrolisados do biodiesel. Complementarmente, Yassine; Suidan; Venosa (2013) demontraram que, quanto maior a concentração dissolvida de um composto NAPL, maior será sua biodisponibilidade para a comunidade microbiana e consequenemente maior será a sua taxa de biodegradação. Assim, em misturas de diesel/biodiesel, a presença do petrodiesel reduz o particionamento dos AGCL para a água, afetando negativamente a biodegradação deste combustível devido à redução da biodisponibilidade dos AGCL na fase dissolvida (WU et al., 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para dar início ao experimento de campo, foi realizada a liberação controlada, diretamente no aquífero, de 100 L do combustível diesel B20 (80% de diesel e 20% de biodiesel de palma, v/v). Atualmente, no Brasil, a adição obrigatória de biodiesel ao diesel é de 8%, porém a escolha por conduzir o experimento com diesel B20 se deve ao fato de, na última década, ter sido observado um aumento gradativo da proporção de biodiesel ao diesel comercial nacional. Como a mistura B20 têm sido adotada em países como a Polônia e EUA, devido ao seu bom equilíbrio entre custo, emissões e desempenho do motor (USDE, 2016), acredita-se que esta será a tendência de percentagem exigida no Brasil em um futuro próximo. Além disso, DeMello et al. (2007) observaram que, em misturas com proporções de biodiesel inferiores a 20% do volume do combustível, não é possível observar influências significativas dos ésteres do biodiesel sobre os compostos do diesel. Adicionalmente, outros experimentos em campo foram realizados no Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA) com combustíveis nesta mesma proporção (CHIARANDA, 2011; RAMOS, 2013), possibilitando, desta forma, a comparação entre os processos de remediação utilizados.

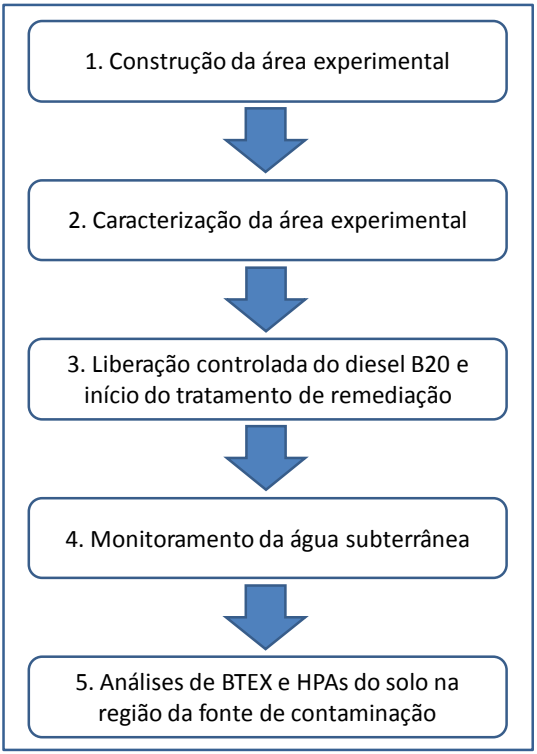
Para o estabelecimento da tecnologia de remediação, foram adicionados, no aquífero, óxidos de ferro recuperados a partir do tratamento da drenagem ácida de mina (DAM) e acetato de amônio (CH_3COONH_4), a fim de estimular os processos de ferro e sulfatorredução no ambiente subsuperficial, bem como incentivar o rápido crescimento inicial de micro-organismos específicos envolvidos nestes processos (ex. bactérias da família *Geobacteraceae*). O tratamento de remediação proposto tem como finalidade aumentar a taxa global de biodegradação do diesel B20, acelerando a biodegradação do biodiesel, o que resultará na rápida remoção dos hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos do diesel.

Para avaliar se os objetivos deste estudo foram atingidos, foi efetuado o monitoramento de variáveis físico-químicas (temperatura, pH, potencial de oxirredução (*ORP*), oxigênio dissolvido, ânions (acetato (CH_3COO^-), cloreto (Cl^-), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), brometo (Br^-), sulfato (SO_4^{2-}) e fosfato (PO_4^{3-})), acidez, alcalinidade, Fe(II), sulfeto, Fe(III), ferro total suspenso, BTEX, HPAs e metano) e da concentração de bactérias totais, arqueas e micro-organismos específicos envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos e

nos processos de ferro e sulfatorredução, em amostras de água subterrânea. Além disso, ao final do período de monitoramento, foram realizadas análises de BTEX e HPAs em amostras de solo, na zona da fonte de contaminação, a fim de observar os efeitos da tecnologia de remediação na fase livre (NAPL). Um experimento adjacente, realizado em condições semelhantes a este e com 100L de diesel B20, no qual foi aplicada a tecnologia de atenuação natural monitorada, foi utilizado como controle comparativo, a fim de avaliar se a estratégia de bioestimulação aplicada neste estudo acelerou a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel. Ainda, para a investigação das comunidades microbianas atuantes nos processos de degradação do diesel B20 e de seus subprodutos metabólicos, foram realizadas análises de sequenciamento genômico.

Assim, a elaboração deste trabalho pode ser dividida em 5 etapas metodológicas, as quais estão descritas na Figura 4.1.

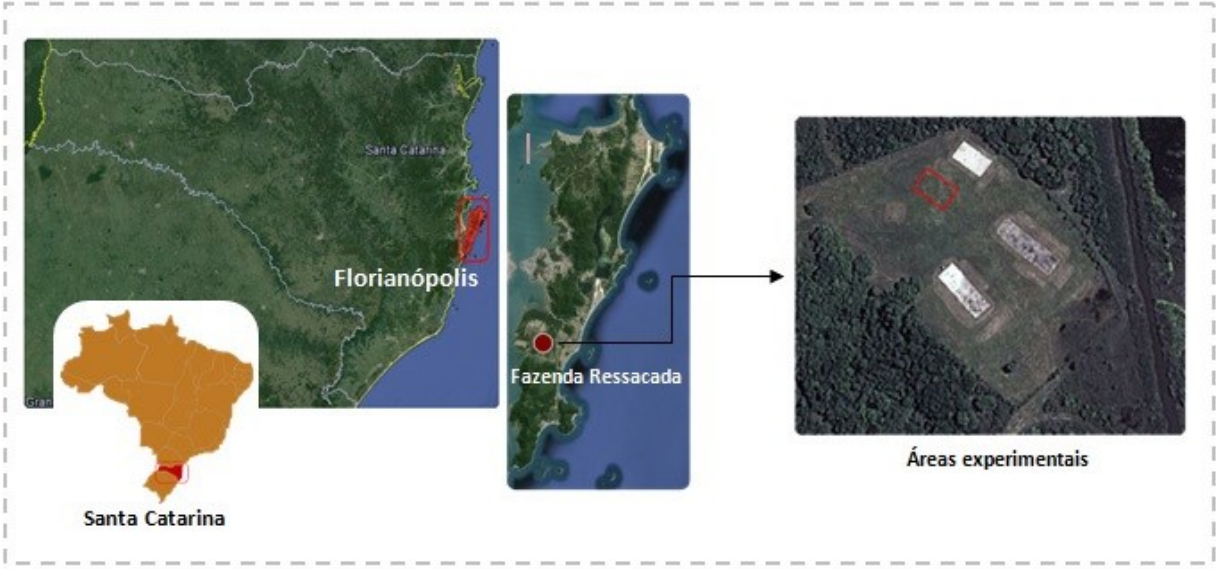
Figura 4.1: Diferentes etapas metodológicas realizadas para o desenvolvimento deste trabalho



4.1 Área experimental

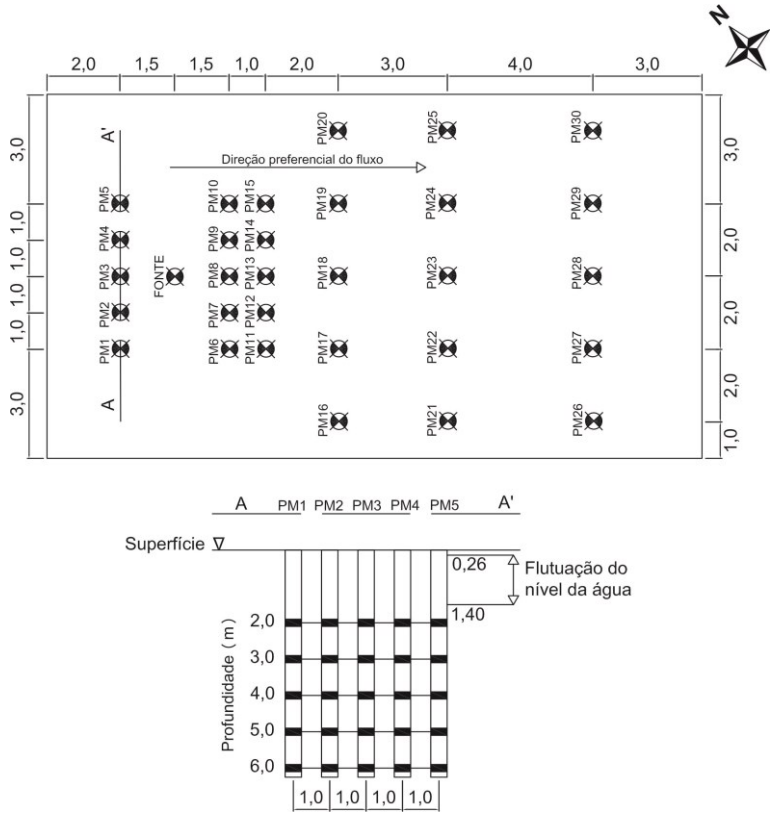
O experimento de campo foi realizado na Fazenda Experimental da Ressacada, propriedade da Universidade Federal de Santa Catarina, cuja área é de 10.026 m². A Fazenda da Ressacada está localizada no município de Florianópolis, bairro da Tapera, próxima ao Aeroporto Hercílio Luz, no sul da ilha de Florianópolis/SC. A Figura 4.2 apresenta a localização da área experimental.

Figura 4.2: Localização da área experimental



O presente estudo foi conduzido em uma área de 180 m^2 (18 m de comprimento x 10 m de largura), onde foram instalados 30 poços de monitoramento, cada qual com 5 níveis de profundidade (localizados a 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 metros de profundidade em relação ao nível do terreno). A área experimental é relativamente plana, apresentando declividades entre 0 a 3%. A Figura 4.3 apresenta a configuração da área experimental construída.

Figura 4.3: Configuração da área experimental



Para a definição da alocação da área experimental foi analisada a direção preferencial do fluxo da água subterrânea, a qual foi determinada a partir do monitoramento das flutuações dos níveis de 17 poços piezométricos (PE1, PE2, PE3, PE4, PE6, PE7, PM1, PM2, PM5,

PM6, PZ1, PZ2, PZ3, PZ5, PZ6, PZ7, PZ8), localizados ao redor da área experimental, conforme demonstrado na Figura 4.4. Com base nesses dados, foi realizado o cálculo da carga potenciométrica dos poços e a direção preferencial do fluxo foi determinada via interpolação da carga potenciométrica do local, pelo método de Krigagem, aplicado ao *software Surfer 8.0.*

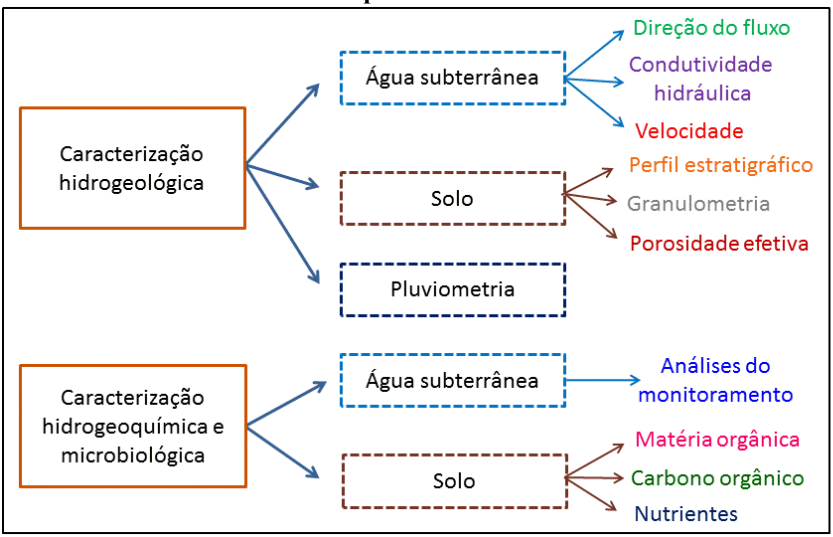
Figura 4.4: Localização da área experimental (em amarelo) e dos piezômetros no entorno da área (em verde)

Os poços de monitoramento foram instalados no sentido da direção do fluxo da água subterrânea. A perfuração destes foi realizada pelo método de jatos d'água, devido à característica litológica do local, que apresenta predominância de areia fina. Para a confecção dos poços foram utilizados canos de PVC de 6 m de comprimento e 20 mm de diâmetro externo, os quais contêm mangueiras de polietileno em seu interior, que são utilizadas para a coleta da água subterrânea. Na extremidade inferior das mangueiras foi acoplado um filtro de aço inoxidável com intuito de evitar a passagem de material particulado. Foram utilizadas 5 mangueiras, uma para cada nível de profundidade, diferenciadas por cores.

4.2. Caracterização da área experimental

A caracterização da área experimental foi realizada por meio de caracterizações hidrogeológica, hidrogeoquímica e microbiológica do aquífero. A Figura 4.5 apresenta um esquema resumido das análises realizadas.

Figura 4.5: Esquema das análises realizadas para a caracterização da área experimental



4.2.1 Caracterização hidrogeológica da área experimental

A caracterização hidrogeológica permitiu avaliar a dinâmica dos contaminantes dissolvidos na água subterrânea por meio da determinação da direção preferencial do fluxo, velocidade e condutividade hidráulica da água subterrânea. Além disso, dados de pluviometria e características físicas do solo como: granulometria, porosidade efetiva e perfil estratigráfico, também apresentam importância na definição do destino e transporte dos contaminantes. Como a Fazenda Experimental da Ressacada, local onde foi instalada a área experimental do presente trabalho, apresenta outros experimentos em campo, algumas características hidrogeológicas foram avaliadas previamente a este estudo, conforme descrito a seguir.

A porosidade efetiva (η_e), que representa a água que irá drenar sob a influência da gravidade, foi analisada seguindo o método da *Mesa de Tensão* (LEAMER e SHAW, 1941) e as análises foram realizadas no Laboratório de Irrigação e Drenagem da UFSC. Para a realização destes ensaios, foram coletadas amostras indeformadas de solo, em triplicata, que foram pesadas, saturadas e colocadas sobre a mesa de tensão, onde permaneceram por 24 horas sob aplicação de uma tensão correspondente a uma coluna da água de 60 cm, objetivando a extração da água contida nos macroporos. Posteriormente, os anéis foram pesados, mantidos em uma estufa a 105° C por 24 horas e submetidos à pesagem novamente, a fim de se obter o peso seco das amostras. A determinação da porosidade efetiva foi realizada pela diferença da porosidade total (Equação 4.1) e da umidade relativa (Equação 4.2).

$$\eta_t = \frac{(a-b)}{a} \times 100 \qquad \text{Equação 4.1}$$

$$W_t = \frac{(m_d - m_s)}{m_s} \times 100 \qquad \text{Equação 4.2}$$

Onde:
η_t = porosidade total (%);
a = densidade da partícula (g/cm^3);
b = densidade aparente (g/cm^3);
W_r = umidade retida (%);
m_d = massa de solo drenada (g);
m_s = massa de solo seca (g).

Assim como para a definição da direção preferencial do fluxo, para a determinação da velocidade e condutividade hidráulica foram analisados os 17 poços piezométricos demonstrados na Figura 4.3. A condutividade hidráulica, que trata-se de uma medida da habilidade do aquífero transmitir água (FETTER, 1994), foi determinada por Lage (2005) utilizando o teste de *slug* realizado em campo e interpretado pelo *Método de Hvorslev* (1951). Então, de posse dos dados de carga potenciométrica medidos em campo, condutividade hidráulica na porção saturada e porosidade efetiva, com o auxílio do *software AutoCad 2007,* foi determinada a velocidade instersisticial da área. Para o cálculo, os dados foram aplicados à Equação 4.3 que descreve a Lei de Darcy.

$$v = \frac{K_{sat}}{\eta_e} \times \frac{dH}{dL} \qquad \text{Equação 4.3}$$

Onde:
v = velocidade intersticial (cm/s);
K_{sat} = condutividade hidráulica saturada (cm/s);
$\frac{dH}{dL}$ = gradiente hidráulico (m/m);
η_e = porosidade específica (adimensional).

O conhecimento do perfil litológico é de fundamental importância no estudo do comportamento hidrodinâmico do aquífero (FEITOSA et al., 2008). Assim, para a determinação do perfil estratigráfico foram realizadas sondagens até 6 metros de profundidade, em relação ao nível do terreno, nos poços PMF, PM13 e PM28 (Figura 4.3). As sondagens foram realizadas com o auxílio do *"Prospecting Kit for Soil"* da *Mastrad Ltd* (conjunto de equipamentos para exploração e amostragem de solos). Após a coleta, o material foi removido do amostrador e a geologia da amostra foi determinada visualmente. Posteriormente, uma amostra de cada camada de solo foi enviada para laboratório, onde foram realizados ensaios complementares, tais como granulometria e porosidade efetiva, além do levantamento de características hidrogeoquímicas.

As análises granulométricas foram realizadas segundo os preceitos da NBR 7181 (ABNT, 1984), pelo laboratório físico-químico da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC). A NBR 7181 (ABNT, 1984) é baseada nos métodos de sedimentação e peneiramento e, através dela, foi possível caracterizar o diâmetro dos grãos e as proporções relativas em que estes se encontram distribuídos no solo. Por fim, os dados pluviométricos referentes ao período de monitoramento do experimento foram fornecidos pelo Departamento de Controle do Espaço Aéreo (DECEA), responsável pelo Ajardinado Meteorológico do Aeroporto Internacional Hercílio Luz da cidade de Florianópolis.

4.2.2 Caracterizações hidrogeoquímica e microbiológica da área experimental

Previamente à liberação controlada do combustível na área experimental se fez necessária a determinação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de referência do local (*background*). Para tanto, foi efetuada a caracterização hidrogeoquímica e microbiológica da da água subterrânea, bem como análises da matéria orgânica, carbono orgânico e nutrientes do solo da área experimental.

As análises geoquímicas do solo foram realizadas pelo laboratório físico-químico e biológico da CIDASC. O teor de matéria orgânica do solo foi determinado pelo método colorimétrico. De posse deste dado, foi obtido o teor de carbono orgânico dividindo-se o percentual de matéria orgânica por 1,72 (JARAMILLO, 1996). Os nutrientes analisados foram: nitrogênio total, ferro, enxofre, zinco, manganês, boro, cobre, fósforo, potássio, alumínio, cálcio e sódio. Suas concentrações foram obtidas pelo método de espectrofotometria por absorção atômica. O conhecimento do teor de carbono orgânico é importante, pois este influencia fatores como a sorção[1] e retardo[2], enquanto a disponibilidade de nutrientes é um fator determinante para assegurar as condições de crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos.

Para a caracterização da água subterrânea foram coletadas amostras de diversos poços de monitoramento, em diferentes níveis. Assim, os poços avaliados foram: PMF, PM04, PM06, PM13, PM23, PM30 (Figura 4.3). Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: temperatura, pH, potencial de oxidação-redução (*POR*), oxigênio dissolvido, ânions (acetato (CH_3COO^-), cloreto (Cl^-), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), brometo (Br^-), sulfato (SO_4^{2-}), sulfeto e fosfato (PO_4^{3-})), acidez, alcalinidade, ferro (II), ferro (III), ferro total suspenso. Além disso, foram analisadas as seguintes variáveis microbiológicas: bactérias totais, ferrorredutoras, sulfatorredutoras, degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos (gene *bssA*) e arqueas. Informações sobre as coletas de água subterrânea e descrição dos métodos de análises estão detalhadamente disponíveis nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

---

[1]Sorção se refere à combinação dos processos de absorção e adsorção, sendo assim, é o fenômeno decorrente da interação do contaminante com as partículas do solo.

[2]Retardo se refere ao deslocamento mais lento do contaminante na água subterrânea

4.3 Liberação controlada do combustível e sistema de bioestimulação anaeróbia

No dia 25 de fevereiro de 2014 foi realizada, diretamente no aquífero, a liberação controlada do combustível diesel B20 e a adição dos produtos de remediação. As condições climáticas estavam boas, com céu predominantemente ensolarado. O diesel B20 foi preparado previamente à liberação controlada, por meio da mistura contendo 80L de diesel puro e 20L de biodiesel de palma, cuja produção foi realizada por transesterificação por rota metílica. A Figura 4.6 apresenta o preparo da mistura diesel B20. O anexo C apresenta o laudo com as características do biodiesel utilizado.

Figura 4.6: Preparação do diesel B20

Dentre as diversas fontes de oleaginosas que podem ser usadas como matéria prima para a produção de biodiesel, o óleo de palma apresenta vantagem às demais, devido à baixa necessidade energética para sua produção (MPOC, 2016). Além disso, políticas de desenvolvimento do biodiesel no Brasil, que visam aumentar a participação da região norte do país no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, bem como a geração de receita e desenvolvimento social sustentável, têm estimulado a produção do biodiesel por meio do uso da palma (DeCARVALHO, 2015). Assim, volumes significativos de biodiesel de palma serão produzidos, transportados e utilizados no país, tornando-se importante o conhecimento das formas mais adequadas de tratamento, em caso de contaminação de águas subterrâneas com misturas binárias de diesel/biodiesel de palma.

Para a liberação controlada do diesel B20 e adição dos produtos de remediação o solo foi escavado na região denominada de fonte de contaminação, em uma área de 2,0 m de comprimento x 1,5 m de

largura e 1,8 m de profundidade (nível de afloramento do lençol freático) (Figura 4.7). Primeiramente, foram liberados 3 Kg da substância conservativa brometo de potássio (KBr), previamente dissolvidos em água subterrânea proveniente de uma área não contaminada, o qual teve a finalidade de atuar como traçador do fluxo advectivo. Em seguida, foram liberados 100 L de diesel B20 (Figura 4.8), seguido da introdução dos produtos de biorremediação: 100 Kg de óxidos de ferro recuperados a partir da drenagem ácida de mina e 2 Kg de acetato de amônio, previamente dissolvidos em água subterrânea (Figura 4.9). Por fim, a área experimental foi coberta com o solo original, lona e britas, com o intuito de minimizar a volatilização dos compostos e reduzir a influência da infiltração da água da chuva no experimento.

Figura 4.7: Área escavada para liberação do contaminante e adição dos produtos de remediação

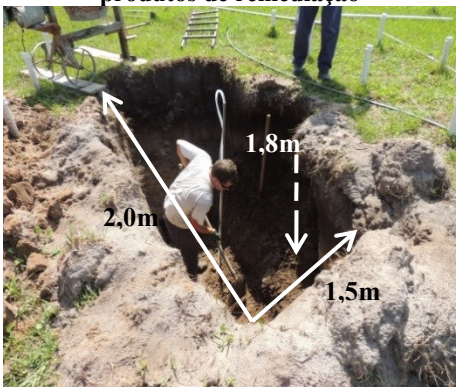


Figura 4.8: Liberação controlada do diesel B20

Figura 4.9: Adição dos produtos de remediação (produto recuperado do tratamento da DAM e acetato de amônio)

Os óxidos de ferro recuperados da DAM foram produzidos pelo método de precipitação sequencial, a partir do lodo químico do tratamento da DAM da carbonífera Criciúma S.A., localizada na cidade de Criciúma, estado de Santa Catarina, Brasil (ANDERSEN et al., 2012; FLORES et al., 2012). O tratamento iniciou-se pela precipitação do sulfato de cálcio, hidróxido de alumínio e pequenas quantidades de hidróxido de ferro(II). Para tal, foi adicionada a solução de hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) para ajuste do pH à 4,3. O sobrenadante foi neutralizado a pH 7,0 pela adição de hidróxido de sódio, formando um lodo verde ($Fe(OH)_2$) que foi precipitado, separado por decantação e posteriormente oxidado para a completa conversão do Fe^{2+} a Fe^{3+}. Por fim, o lodo obtido foi lavado inúmeras vezes para a completa remoção dos sais incorporados, em seguida permaneceu secando a 110°C durante 24 horas, foi moído e peneirado para obtenção do tamanho de partícula desejada (ANDERSEN et al, 2012; FLORES, 2012).

Considerando o laudo da composição química do produto recuperado da DAM e a análise da quantidade de sulfatos apresentados nos anexos B e C e, sabendo que aproximadamente 10% das perdas por ignição apresentadas na análise de fluorescência de raios X é referente à goethita (ANDERSEN et al, 2012), calcula-se que este produto contém 88,3% de óxidos de ferro na forma de goethita e 1,7% de sulfato. A Tabela 4.1 apresenta a composição do produto recuperado do tratamento da DAM. A goethita (Fe(III)) e o sulfato contidos no produto recuperado da DAM foram adicionados como uma fonte suplementar de ferro (III) e sulfato, para que possam atuar como receptores de elétrons para os processos de biodegradação dos compostos orgânicos via condições ferro e sulfatorredutoras na água subterrânea. Com relação à

morfologia, os óxidos de ferro presentes no produto da DAM apresentaram-se somente na fase cristalina, com partículas na forma acicular, homogêneas e aglomeradas, com a distribuição de tamanho de 66,7 x 427,5 nm e área superficial de 67 $m^2.g^{-1}$ (ANDERSEN et al, 2012).

Tabela 4.1. Composição do produto recuperado do tratamento da DAM

Elementos	Teor (%)
Sulfato total	1,73
Óxido de ferro (Goethita)	88,30
Óxido de alumínio	0,69
Dióxido de silício	0,97
Óxido de manganês	0,10
Óxido de magnésio	0,11
Óxido de cálcio	3,64
Óxido de sódio	0,34
Óxido de bário	0,25
Óxido de zinco	0,31
Hidróxidos[a]	3,56

[a] Perda por ignição durante análise termogravimétrica.

Para a determinação da quantidade de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM adicionada foram utilizadas equações estequiométricas de biodegradação obtidas por meio do modelo energético de biodegradação de McCarty (MCCARTY, 1969). Este modelo considera que o crescimento bacteriano envolve duas reações básicas: i) produção de energia para o crescimento e manutenção dos micro-organismos e; ii) síntese celular, sendo o mesmo doador de elétrons para ambas as reações (RITTMANN; MCCARTY, 2001). As equações estequiométricas obtidas estão apresentadas no Apêndice A e foram estimadas simulando uma situação na qual o Fe (III) seria o único receptor de elétrons responsável pela biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel e ésteres do biodiesel. O cálculo da massa de substrato passível de biodegradação foi realizado para os compostos: benzeno, naftaleno e palmitato, como representantes dos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX), poliaromáticos (HPAs) e ésteres do biodiesel, respectivamente. Optou-se pela utilização desses uma vez que são os compostos mais solúveis, portanto, capazes de exercer maior influência sobre o sistema, concebendo uma condição mais conservadora. Além disso, o palmitato é o principal éster

encontrado na composição do biodiesel de palma. A Tabela 4.2 apresenta a massa teórica inicial de benzeno, naftaleno e palmitato na fonte de contaminação, a relação estequiométrica de consumo dos compostos por meio da redução do Fe(III) e a massa teórica de óxidos de ferro recuperados da DAM necessária para a completa mineralização do diesel B20 via ferrorredução.

Tabela 4.2: Cálculo da quantidade teórica de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM (OF DAM) necessária para a completa degradação do diesel B20 via ferrorredução

Composto	% massa no combustível[3]	Densidade ($Kg.L^{-1}$)	Massa inicial (Kg)	Relação estequiométrica em mol[4]	Relação estequiométrica em massa	Massa teórica de Fe (III) (Kg)	Massa Teórica de OF DAM (Kg)[5]
Benzeno	14,16	0,84[1]	11,89	1:13,03	1:9,33	110,93	199,4
Naftaleno	5,68	0,84[1]	4,77	1:20	1:8,73	41,64	32,4
Palmitato	20	0,88[2]	17,6	1:38,18	1:8,36	147,14	264,5
Acetato			1,53	1:3,36	1:3,18	4,86	8,7
						Total	**505**

Fonte: [1]Kaipper (2003)

Notas: [2]Segundo laudo fornecido pela empresa produtora do biodiesel, apresentado do Anexo C

[3]Sabendo que o combustível é composto por 80% de diesel e 20% de biodiesel e considerando a composição do diesel apresentada na Tabela 3.3 deste trabalho

[4]Segundo equações estequiométricas desenvolvidas no Apêndice A

[5]Considerando a percentagem de goethita presente nos óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM (OF DAM) de 88,3% e a percentagem de Fe(III) na goethita de 63% (goethita é composta de 90% de Fe_2O_3 e 10% de H_20)

Para a completa degradação do biodiesel e dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel via ferrorredução são necessários 505 Kg de óxidos de ferro recuperados da DAM. Porém, a tecnologia de remediação empregada visa estimular a biodegradação combinada dos processos de ferro e sulfatorredução. Portanto, considerando que haverá também a contribuição do sulfato como receptor de elétrons optou-se em utilizar um quinto da massa necessária, quando considerado somente o processo de ferrorredução. Assim, foi adicionado 100 Kg de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM.

O acetato de amônio foi utilizado com o intuito de estimular o crescimento inicial de micro-organismos específicos envolvidos nos processos de ferro e sulfatorredução (ex. bactérias da família *Geobacteraceae*) (LIVERMORE et al., 2013; RAMOS et al., 2014). Além disso, o acetato de amônio pode contribuir para o fornecimento de nutrientes, na forma de nitrogênio amoniacal, o qual pode ser prontamente assimilado no metabolismo microbiano (LIEBEG; CUTRIGHT, 1999). A massa de acetato de amônio adicionada foi de 2,0 Kg, a fim de obter uma concentração de 300 $mg.L^{-1}$, pois esta concentração se mostrou suficiente para estimular o crescimento de micro-organismos específicos capazes de atuar no processo de ferrorredução (RAMOS, 2013). Para a determinação da massa a ser introduzida no aquífero, assumiu-se uma área de influência da região da fonte de contaminação de 2 m de largura x 4 m comprimento e profundidade de 3 m. Assim, o volume de solo, acrescido do volume de água na região de influência foi determinado em 24 m^3. Sabendo que a porosidade do solo é de 28,3 %, obtêm-se um volume de 6,792 m^3 (6.792 L). Portanto, para alcançar a concentração de 300 $mg.L^{-1}$ seria necessária a massa de 2 kg de acetato de amônio ($C = m \div V$; $m = C \times V$; $m = \frac{300mg}{L} \times 6792L = 2.037.600\,mg \cong 2{,}0\,Kg$).

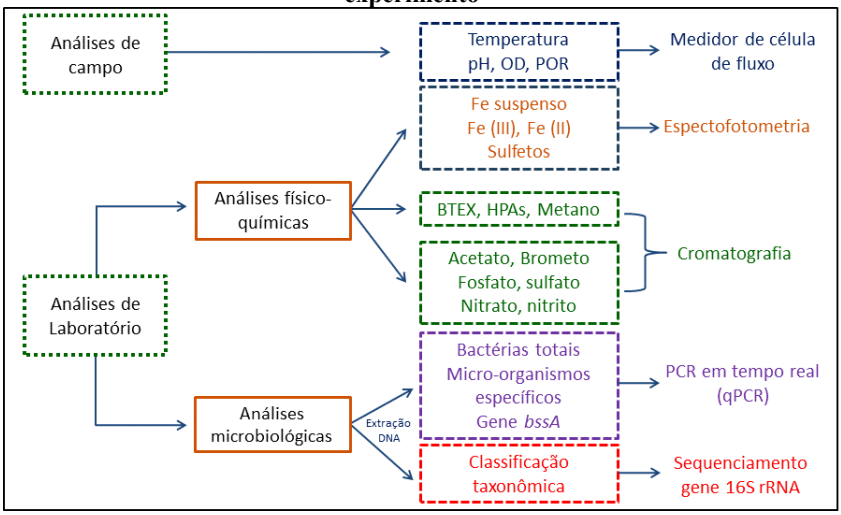
4.4 Monitoramento do experimento

O acompanhamento das transformações ocorridas no ambiente subterrâneo foi realizado por campanhas de monitoramento que incluiram coletas e análises (em campo e em laboratório) da água subterrânea. Foram realizadas 4 campanhas de monitoramento, após transcorridos 3, 7,4, 13 e 17,8 meses da liberação controlada do combustível e início do tratamento de remediação proposto, além da campanha realizada previamente à liberação do B20 (*background*). O

tempo de duração de cada campanha de monitoramento variou de 10 a 21 dias, conforme a quantidade de poços analisados.

A Figura 4.10 apresenta um esquema das análises realizadas durante as campanhas de monitoramento.

Figura 4.10: Esquema das análises realizadas durante o monitoramento do experimento



Legenda: OD - Oxigênio Dissolvido; POR - Potencial de Oxidação-Redução; BSR - Bactérias Sulfatorredutoras; bssA - Benzilsuccinato Sintase; PCR - reação em cadeia da polimerase.

4.4.1 Amostragens e análises físico-químicas

As coletas de amostras de água subterrânea foram realizadas com o auxílio de uma bomba peristáltica marca *Millipore,* modelo *Easy-Load*. Para cada poço de monitoramento foi utilizada uma mangueira *Masterflex® Tygon* (material inerte), evitando assim contaminações entre os poços amostrados. As análises de temperatura, pH, condutividade, potencial de oxirredução (*POR*) e oxigênio dissolvido foram realizadas em campo utilizando um medidor de célula de fluxo (*Micropurge Flow Cell*), modelo MP20-1380. Os demais ensaios foram realizados no laboratório do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA), exceto as análises de Fe(III) e ferro total suspenso, as quais foram realizadas pelo laboratório Biológico. A Tabela 4.3 apresenta detalhes da coleta e conservação das amostras para cada

análise realizada. As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar com tampa de plástico e tampulho plástico recoberto com teflon, exceto para as análises de BTEX e metano, para as quais foram usados frascos de vidro de 40 mL com tampa plástica e septo teflon. As amostras coletadas foram mantidas sob refrigeração (aprox. 4°C) até o momento da análise.

Tabela 4.3: Detalhamento sobre a coleta e conservação das amostras

Análises	Volume coletado	Conservante
Ânions	30 mL	------
Fe(II), sulfeto, acidez e alcalinidade	250 mL	------
Fe(III) e ferro total suspenso	100 mL	Ácido Clorídrico (HCl)
BTEX e metano	40 mL	Ácido Clorídrico (HCl)
HPAs	100 mL	Tiossulfato de Sódio ($Na_2S_2O_3$) (0,008%)

A determinação da acidez e da alcalinidade foi realizada por titulometria, de acordo com os métodos 2310B e 2320B do Standard Methods (APHA, 1998), respectivamente. Para tanto, foram utilizadas soluções padronizadas de hidróxido de sódio 0,02 M e ácido sulfúrico 0,01 M. O ponto de viragem foi obtido pelo monitoramento do pH da amostra durante a titulação, utilizando-se uma bureta digital (*Brinkmann*) e um pH-metro marca *ORION*, modelo – 9107BN. Para a determinação da acidez carbônica o ponto de viragem foi em pH 8,3, enquanto para a determinação da alcalinidade, foi em pH 4,3. Os resultados foram expressos em mg $CaCO_3.L^{-1}$.

As análises de Fe(II) e sulfeto foram realizadas por espectrofotometria (espectofotômetro da marca *Hach*, modelo DR/2500), segundo orientações do método 3500 – Fe D – método 1,10 fenantrolina para o Fe(II), e do método colorimétrico 4500 - S^{2-} D - azul de metileno para sulfetos totais, de acordo com o *Standard Methods* (APHA, 1998). Para o Fe(II) foram utilizados os reagentes 1,10 - fenantrolina e bicarbonato de sódio. Já para o sulfeto, foram usados o reagente 1, composto de ácido sulfúrico e oxalato de N,N dimetil-p-fenilenodiamina e o reagente 2, que trata-se de uma solução de azul de metileno. O limite de detecção para Fe(II) e sulfetos é de 8 $\mu g.L^{-1}$ e 2 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente.

As análises de Fe(III) e ferro total suspenso foram realizadas pelo laboratório Biológico e foram baseadas no método 3500 – Fe B – Método Fenantrolina, da 22ª edição do *Standard Methods.* Para tanto, primeiramente foram quantificadas as concentrações de ferro total e ferro total dissolvido das amostras. De posse dos dados de ferro total, ferro total dissolvido e ferro ferroso (Fe(II)) foi possível determinar o ferro suspenso e o ferro férrico (Fe(III)) por meio das equações 4.4 e 4.5 (APHA, 2012).

Ferro total suspenso = ferro total – ferro total dissolvido Equação 4.4

Fe(III) = ferro total – Fe(II) Equação 4.5

Os ânions acetato, brometo, nitrito, fosfato, nitrato e sulfato foram analisados em um cromatógrafo da marca Dionex (modelo ICS-1000) equipado com detector de condutividade iônica, conforme o método 4110 B "*Ion Chromatography with Chemical Suppression of Eluent Conductivity"* (APHA, 1998). A coluna utilizada foi a AS22 e como fase móvel foram usadas as soluções de carbonato de sódio (4,5mM) e bicarbonato de sódio (1,4mM). O limite de detecção foi de 8 $\mu g.L^{-1}$ para o ânion brometo e de 1 $\mu g.L^{-1}$ para os demais.

As amostras de BTEX e metano foram analisadas em um cromatógrafo a gás HP, modelo 6890 – série II, com *headspace autosampler* HP – estático, modelo 7694, equipado com detector de ionização de chama (FID), conectado a um computador com o software *ChemStation A.10.02*. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida HP 1 (metil siloxano) com 0,53 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 2,65 μm de espessura. O gás de arraste empregado foi hélio, com fluxo de 7,0 $mL.min^{-1}$. As temperaturas do injetor e detector para análise de BTEX foram de 260ºC e 280ºC, enquanto, para a análise de metano, as temperaturas do injetor e detector foram de 160ºC e 250ºC. Detalhes sobre a programação de temperatura para estes analitos podem ser observados na Tabela 4.4. O método empregado para as análises foi o EPA/5021A combinado com EPA/8015D (USEPA, 1996). As soluções-padrão para BTEX foram preparadas segundo orientações do método EPA/8015A (USEPA, 1996). A solução padrão para o metano foi preparada a partir de gás metano com 99,5% de pureza da empresa *White Martins*. O gás metano foi borbulhado dentro de um recipiente com água ultrapura até a obtenção do equilíbrio entre as fases gasosa e aquosa. Então foi calculada a concentração de metano na fase aquosa, com base na Lei de Henry (STUMM; MORGAN, 1981). O

limite de detecção para cada um dos compostos BTEX e para metano foi de 1 $\mu g.L^{-1}$ e 10 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente.

Devido à baixa solubilidade aquosa dos compostos HPAs, é necessário um processo inicial de extração para sua quantificação. O processo de extração foi realizado de acordo com o método de extração em fase sólida da EPA 525.2 - *Solid Phase Extraction*. Assim, foram utilizados cartuchos de SPE (Spe-ed^{TM}, 0,2 g / 3 mL da marca *Applied Separations*) de Octadecil (C18/18%C), acoplado a um sistema de vácuo tipo "*manifold*". Inicialmente, foi realizada a ativação da fase sólida do cartucho utilizando 3 mL de metanol, seguido de 3 mL de água. Em seguida, as amostras foram percoladas através do cartucho em um fluxo de aproximadamente 10 $mL.min^{-1}$, sendo a eluição conduzida com o solvente diclorometano. Por fim, por meio de secagem com gás nitrogênio, as amostras foram concentradas em 1 mL. Os extratos foram analisados em um cromatógrafo a gás HP, modelo 6890 – série II, equipado com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada coluna capilar HP–5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) com 0,32 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 0,25 mm de espessura. O gás de arraste empregado foi o hélio, com fluxo de 3,0 $mL.min^{-1}$. As temperaturas do injetor e detector foram de 260ºC e 320ºC. Detalhes sobre a programação de temperatura do forno podem ser observados na Tabela 4.4. A quantificação dos HPAs foi realizada segundo o método EPA 8015. A curva de calibração foi preparada com o padrão certificado da empresa Dr. Ehrenstorfer mbH (PAH – Mix 9). Os HPAs analisados e seus respectivos limites de detecção foram: naftaleno (7 $\mu g.L^{-1}$), metil-naftaleno (5 $\mu g.L^{-1}$), dimetil-naftaleno (7 $\mu g.L^{-1}$), acenafetileno (8 $\mu g.L^{-1}$), acenafteno (8 $\mu g.L^{-1}$), fluoreno (8 $\mu g.L^{-1}$), fenantreno (9 $\mu g.L^{-1}$), antraceno (9 $\mu g.L^{-1}$), fluoranteno (10 $\mu g.L^{-1}$), pireno (9 $\mu g.L^{-1}$), benzo(a)antraceno (9 $\mu g.L^{-1}$), criseno (10 $\mu g.L^{-1}$), dibenzo(a,h)antraceno (12 $\mu g.L^{-1}$), benzo(b)fluoranteno (12 $\mu g.L^{-1}$), benzo(k)fluoranteno (31 $\mu g.L^{-1}$), benzo(a)pireno (36 $\mu g.L^{-1}$), indeno(1,2,3-cd)pireno (28 $\mu g.L^{-1}$), benzo(g,h,i)pireno (11 $\mu g.L^{-1}$).

Tabela 4.4: Programação de Temperatura do Forno para Análises de BTEX, metano e HPAs

Analito	Velocidade de aquecimento (°C.min^{-1})	Temperatura (°C)	Tempo de permanência na temperatura (min)
BTEX	----	70	2
	5	120	0
	30	210	0
Metano	----	40	3
	30	250	2
HPAs	----	40	3
	8	80	0
	12	300	2

4.4.2 Amostragens e análises de reação em cadeia da polimerase em tempo real

As análises de biologia molecular foram realizadas por meio do método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR – *quantitative real-time polymerase chain reaction)* utilizado para amplificar e quantificar uma molécula de DNA alvo, através do uso de marcadores fluorescentes (SALEH-LAKHA et al., 2005). A qPCR foi conduzida com o intuito de detectar e quantificar bactérias totais, ferroredutoras (gêneros *Geobacter e Pelobacter* – família *Geobacteraceae)*, sulfatorredutoras (*Desulfovibrio, Desulfomicrobium, Desulfuromusa e Desulfuromonas*), arqueas (*Crenarchaeota* e *Euriarchaeota*) e o gene catabólico benzil succinato sintase (*bssA*), um biomarcador usado para avaliar a presença de micro-organismos associados à biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos (KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012; SUN; SUN; CUPPLES, 2014b; WINDERL; SCHAEFER; LUEDERS, 2007).

Para a coleta das amostras microbiológicas, foram utilizados frascos de 1L de vidro âmbar com tampa de plástico e tampulho de plástico recoberto com teflon, devidamente esterilizados. Previamente à realização da qPCR, as amostras de água subterrânea foram filtradas a fim de concentrar os sólidos suspensos, uma vez que a maior parte dos micro-organismos se encontra adsorvida na superfície desses sólidos (LEHMAN et al., 2001), O volume de 1 L de água subterrânea foi filtrado, utilizando-se kitassato, bomba a vácuo e filtros *Millipore* 0,22

μm. Os filtros *Millipore* foram pesados antes e após a filtração das amostras para possibilitar o cálculo da massa de sólidos retida, os quais foram usados nos cálculos para expressar a concentração da comunidade microbiana em cópias de gene por gramas de sólidos suspensos totais (Apêndice A). Posteriormente, foi realizada a extração do DNA do material retido utilizando o kit *DNA MoBio Power Soil™ kit* (Carlsbad, CA), seguindo as orientações do fabricante. O DNA extraído foi armazenado em freezer a uma temperatura de aproximadamente -20°C, até o momento da análise. As análises de bactérias ferrorredutoras (*Geobacteraceae*), bactérias sulfatorredutoras e arqueas foram realizadas nos laboratórios do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA) e Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), da UFSC. Já as análises de bactérias totais e do gene *bssA* foram realizadas no *Laboratoire Ampère*, da *École Centrale de Lyon*, França.

Para as reações em cadeia da polimerase foram preparadas placas contendo o DNA alvo e a solução *MasterMix*, composta por: iniciadores senso e anti-senso (*primers forward*/*reverse)*, SYBR® Green ou Taqman Universal PCR MasterMix® (dependendo da análise) e água esterilizada livre de DNA, as quais foram posteriormente analisadas no termociclador. As sequências dos iniciadores usados para cada análise estão detalhadas na Tabela 4.5. Para a quantificação das bactérias totais e do gene *bssA* foi utilizado o termociclador Rotor-Gene® Q (QIAGEN). Para estas análises, foram preparadas misturas contendo 18 μL de *Mastermix* (10 μL de 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix, 400 nM de cada iniciador, 6,4 μL de água esterilizada livre de DNA) e 2 μL de DNA da amostra, resultando em um volume final de 20 μL. Para a quantificação dos micro-organismos ferro e sulfatorredutores e arqueas foi utilizado o termociclador da *Eppendorf*, modelo *Mastercycler*® ep *realplex Thermal Cyclers*, CA, USA. As misturas de reação de PCR continham 23 μL de *MasterMix* (12,5 μL de 1 x SYBR GREEN (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 500 nM de cada iniciador e água esterilizada livre de DNA) e 2 μL de DNA da amostra, resultando em um volume final de reação de 25 μL. Por fim, para as análises de arqueas foi usado 23 μL de *MasterMix* (12,5 μL de 1 x Taqman Universal PCR MasterMix, 500 nM de cada iniciador, 250 nM de sonda e água esterilizada livre de DNA) e 2 μL de DNA alvo.

A programação de temperatura do termociclador para a análise de bactérias totais seguiu a orientação do manual do kit sensiFAST SYBR No-ROX, sendo esta: 95°C por 2 min e 30 ciclos a 95°C por 5 s, 60°C por 10s e 72°C por 15 s. Por fim, foi construída uma curva de

fusão de 50°C a 99°C, com leituras a cada 1°C por 5 s. A curva de fusão é construída com o objetivo de avaliar a presença de amplificações inespecíficas ou de dímeros de *primers*. Se apenas os produtos específicos de PCR foram amplificados, um único pico será visualizado no gráfico de fusão (ALMEIDA; SADDI, 2007). Para o gene *bssA* foi utilizada a seguinte programação: 95°C por 15 min, 40 ciclos a 95°C por 15 s, 55°C por 20 s e 72°C por 15 s e 72°C por 2 min. Foi construída uma curva de fusão de 55°C a 95°C, com leituras a cada 0,6°C por 2 s (SUN; SUN; CUPPLES, 2014b). A condição de temperatura utilizada para as análises de bactérias ferro e sulfatorredutoras e arqueas foi: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos (95 °C por 15 s e 58 °C por 1 min). Para as análises de ferro e sulffatorredutoras foi acrescentada a seguinte curva de fusão: 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s e 95 °C por 15 s.

Foram preparadas curvas de calibração com diluições seriadas contendo DNA proveniente dos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* (10^1–10^7 cópias de gene, $r^2 = 0.97$) para a quantificação de bactérias totais, *Geobacter metallireducens* (10^1–10^7 cópias de gene, $r^2 = 0.99$), para a quantificação do gene *bssA*, bactérias ferrorredutoras (*Geobacteracea*) e bactérias sulfatorredutoras (BSR) e *Methanococcus maripaludis* (10^1–10^6 cópias de gene, $r^2 = 0.99$) para a quantificação de arqueas. A concentração das comunidades microbianas analisadas foi determinada de acordo com a equação desenvolvida por DaSilva e Alvarez (2004) (Apêndice B). Os resultados foram expressos em número de cópias de gene por grama de sólidos suspensos totais e o limite de detecção para estes ensaios foi de aproximadamente 10^2 cópias de gene g^{-1}.

4.4.3 Análise do sequenciamento do DNA

Com o intuito de obter informações mais detalhadas a respeito das comunidades microbianas que podem estar atuando nos processos de degradação e discernir sobre os micro-organismos chave envolvidos na biodegradação do diesel B20 via bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução, foi realizada análise de sequenciamento genômico do gene 16S ribosomal RNA (rRNA). O sequenciamento foi conduzido em um sequenciador de segunda geração: *Illumina Genome Analyser - MiSeq*. Esta tecnologia promove o sequenciamento do DNA em uma plataforma capaz de gerar informações sobre milhões de bases em uma única análise, sendo assim denominada como uma tecnologia de sequenciamento de nova geração

(do inglês: *Next Generation Sequencing*). O sequenciamento no *Illumina Genome Analyser* é realizado por síntese usando a enzima DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. As análises de sequenciamento genômico foram realizadas no *Laboratoire Ampère*, da *École Centrale de Lyon*, França.

A primeira etapa desta análise se refere à amplificação das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA (*rrs*) (KLINDWORTH et al., 2013) por meio de ensaios de PCR. Para tanto, foi utilizado o termociclador *Biometra® Tpersonal* e as misturas de reação de PCR continham 22,5 µL de *MasterMix* (2,5 µL de solução tampão 10x, 0,5 µL Titanium Taq50x, 0,5 µL dNTP 10 mM, 10 µM de cada iniciador, 18 µLde água ultra pura livre de DNA) e 2,5 de DNA alvo. As sequências dos iniciadores estão apresentadas na Tabela 4.5. A programação de temperatura utilizada foi: 95°C por 3 min, 25 ciclos a 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s e 72°C por 5 min. O produto da PCR de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 X TAE 1,5%, purificado com illustraTM GFXTM ADN de PCR e o kit de purificação de banda (GE), eluído em 20 µL de Tris-Cl 10 mM pH 8,5 e a concentração de DNA foi determinada através do fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após, foi realizada a PCR de indexação utilizando-se adaptadores de sequenciamento Illumina. Para a PCR de indexação foi utilizado o kit Nextera XT Index e a programação de temperatura utilizada foi: 95°C por 3 min, 8 ciclos a 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s e 72°C por 5 min. Por fim, o produto da PCR foi novamente purificado e então, sequenciado na plataforma *Illumina MiSeq*. Os amplicons contendo a sequência alvo e o seu iniciador de síntese correspondente foram compilados no formato de arquivos fastq.

Ferramentas computacionais foram utilizadas para conduzir o tratamento das sequências de DNA e posterior comparação com uma base de dados de 16S rRNA conhecida para identificação dos micro-organismos. Primeiramente, foram cortados os 20 primeiros nucleotídeos dos aquivos fastq, referentes aos iniciadores e adaptadores, utilizando o FastX-Toolkit. Então, foi realizada a verificação da qualidade das sequências através da construção de gráficos de qualidade com uma nota *Phred* de 20, utilizando o software QIIME - *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (v1.9.0, http://qiime.org/index.html). A nota *Phred* indica a probabilidade de encontrar uma base errada no sequenciamento e a nota *Phred* 20 implica em uma base errada em cada 100. Após verificar que todas as sequências estavam de acordo com a

qualidade exigida, os pares de sequenciamento do Illumina (senso e anti-senso) foram montados através do PANDAseq (MASELLA et al., 2012), utilizando os índices de qualidade padrão do programa. Então, as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (*Otus*) e comparadas, com uma similaridade de 97%, com a versão mais recente do banco de dados *Greengenes* (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi), utilizando os comandos pick_otus.py script e uclust do QIIME (CAPORASO et al., 2010).

Tabela 4.5: Sequências dos iniciadores e sonda usados para cada análise de qPCR e sequências dos iniciadores com adaptadores usadas no sequenciamento do gene 16S rRNA

Alvo	Iniciador Senso	Iniciador Anti-senso	Sonda	Referência
Bactérias totais	(341f) 5'CTACGGGAGGCAGCAG3'	(534r) 5'ATTACCGCGGCTGCTGGCA3'	-----	(MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993)
Gene *bssA*	(7772f) 5'GACATGACCGACGCSATYCT3'	(8546r) 5'TCGTCGTCRTTGCCCCAYTT3'	-----	(WINDERL; SCHAEFER; LUEDERS, 2007)
Ferrorredutoras *(Geobacteraceae)*	(561f) 5'GCGTGTAGGCGGTTTCTTAA3'	(825r) 5'TACCCGCRACACCTAGTTCT3'	-----	(STULTS et al., 2001)
Sulfatorredutoras (BSR)	(361f) 5'AAGCCTGACGCASCAA3'	(685r) 5'ATCTACGGATTTCACTCCTACA3'	-----	(STULTS et al., 2001)
Arqueas	(ARCH1-1369f) 5'CGGTGAATACGTCCCTGC3' (ARCH2-1369f) 5'CGGTGAATATGCCCCTGC3'	(PROK1541r) 5'AAGGAGGTGATCCTGCCGCA3'	(TM1389F) FAM-5'CTTGTACACACCGCCCGTC3'-BHQ-1	(SILVA; ALVAREZ, 2004)
Sequenciamento do gene 16S rRNA	5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC	-----	(KLINDWORTH et al., 2013)

4.4.4 Amostragens e análises do solo na região da fonte de contaminação

Ao final do monitoramento das alterações geoquímicas e microbiológicas da água subterrânea, foram realizadas análises de BTEX e HPAs em amostras de solo da região da fonte de contaminação, provenientes dos experimentos de bioestimulação ativa com óxidos de ferro recuperados da DAM e acetato de amônio e de atenuação natural monitorada (ANM), a fim de avaliar a remoção dos contaminantes na fase *LNAPL* (do inglês: *Light Non-Aqueous Phase Liquid* - líquido leve de fase não aquosa) (fase livre) em relação às diferentes estratégias de remediação aplicadas. O experimento de ANM iniciou em junho de 2008 e foi desenvolvido em uma área adjacente à deste experimento, em condições semelhantes a este.

Para tanto, após transcorridos 2,6 anos da liberação controlada do diesel B20 e início do tratamento de bioestimulação ativa, foram coletadas amostras de solo na região da fonte de contaminação (a 50 cm do poço de monitoramento fonte, no sentido do fluxo da água subterrânea - Figura 4.3). A profundidade perfurada foi de 1,8 m, considerando a profundidade na qual foi realizada a liberação do diesel B20 (1,8 m). Já para o experimento de ANM, a coleta foi realizada após 8,3 anos da liberação controlada do diesel B20 e a amostragem de solo foi conduzida na região da fonte de contaminação, em uma localidade correspondente ao experimento de bioestimulação ativa (a 50 cm do poço de monitoramento fonte, no sentido do fluxo da água subterrânea). A profundidade perfurada foi de 1,5 m, considerando a profundidade na qual foi realizada a liberação do diesel B20 (1,5 m).

As análises de BTEX e HPAs foram realizadas pelo laboratório Acquaplant Química do Brasil Ltda., através dos métodos EPA 8260 C:2006 e EPA 8270 C/D, respectivamente. Os limites de deteção para benzeno, tolueno, etilbenzeno foi de 0,008 $mg.Kg^{-1}$, xilenos foi de 0,024 $mg.Kg^{-1}$, cada hidrocarboneto policíclico aromático foi de 0,00001 $mg.Kg^{-1}$ e HPAs totais foi de 0,00018 $mg.Kg^{-1}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho apresentam as condições originais da área experimental, as alterações geoquímicas e microbiológicas ocorridas na água subterrânea após a liberação controlada do diesel B20 e a bioestimulação ativa anaeróbia, a avaliação dos micro-organismos chave envolvidos na degradação do diesel B20 e análises do solo na região da fonte de contaminação. Além disso, a fim de avaliar a influência do processo de bioestimulação empregado neste estudo na aceleração da degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, foi apresentada uma comparação entre os resultados obtidos neste estudo e o experimento de atenuação natural monitorada com diesel B20, previamente realizado no Núcleo REMA.

5.1 Caracterização das condições originais da área experimental (*background*)

5.1.1 Caracterização Hidrogeológica

A caracterização hidrogeológica da área experimental foi realizada por meio das análises de direção preferencial do fluxo, velocidade e condutividade hidráulica da água subterrânea, pluviometria, granulometria, porosidade efetiva e perfil estratigráfico do solo.

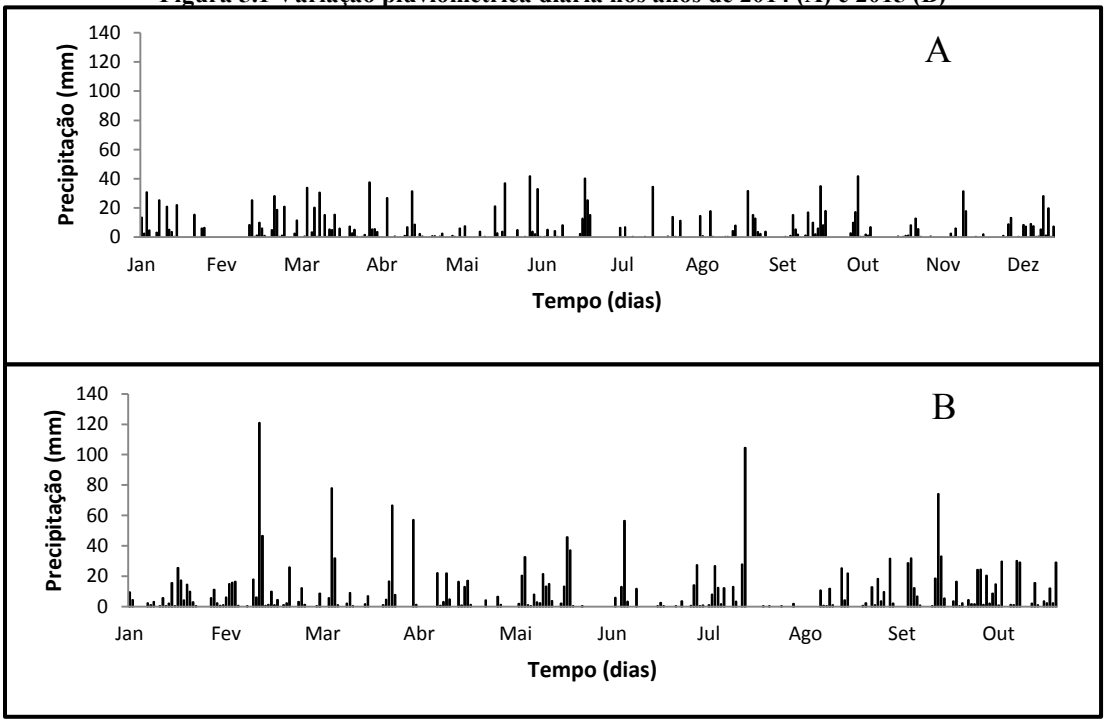
Primeiramente, foi realizada a determinação da direção preferencial do fluxo da água subterrânea, a fim de definir a alocação da área experimental deste estudo. A análise da direção preferencial do fluxo demonstrou que a água subterrânea move-se preferencialmente de noroeste (NO) para sudeste (SE).

A variação do nível do lençol freático no poço PE3 (poço mais próximo da área experimental) (Figura 4.3) durante o período de monitoramento do experimento (Fev/2014 à Set/2015) foi de 0,46 a 2,00 m. O nível médio do lençol freático neste período foi de 1,23 m. A precipitação média no período experimental foi de 165,62 $mm.mês^{-1}$. A variação pluviométrica diária para os anos de 2014 e 2015 pode ser observada na Figura 5.1.

A análise de condutividade hidráulica na porção saturada do aquífero realizada por Lage (2005) indicou uma condutividade de $4{,}45 \times 10^{-4}$ $cm.s^{-1}$ para o poço PE3 (poço mais próximo da área experimental) (Figura 4.3). Sabendo a carga potenciométrica da região

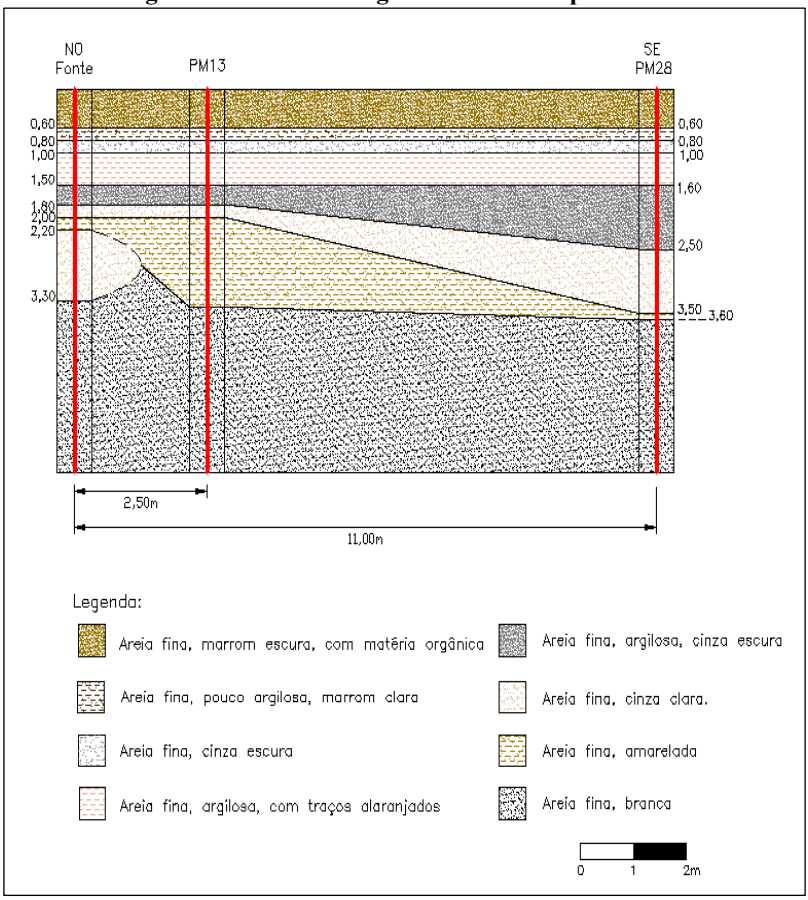
experimental e o valor de condutividade hidráulica, calculou-se a velocidade intersticial da água subterrânea. A velocidade intersticial média da água subterrânea no período inicial do experimento foi de 6,9 $m.ano^{-1}$. A velocidade calculada se assemelha a relatada por Kulkamp (2003) (6,6 $m.ano^{-1}$), Chiaranda (2011) (6,5 $m.ano^{-1}$) e Costa (2008) (6,2 $m.ano^{-1}$) em experimentos realizados na Fazenda Experimental da Ressacada, próximos à área experimental deste estudo.

Figura 5.1 Variação pluviométrica diária nos anos de 2014 (A) e 2015 (B)



Segundo Fetter (1994), o valor de condutividade hidráulica obtido é característico de areias siltosas a finas. Neste sentido, a análise do perfil estratigráfico realizada demonstrou que a área experimental é constituída, em sua maior parte, por areia fina, com destaque para a presença de lentes e camadas com comportamento argiloso, conforme pode ser observado na Figura 5.2.

Figura 5.2 Perfil estratigráfico da área experimental



Os resultados dos ensaios granulométricos realizados nas diferentes camadas de solo corroboraram com a caracterização obtida pelas sondagens do solo que resultaram no perfil estratigráfico do mesmo, revelando uma predominância de areia fina, com a existência de

um teor considerável de argila em algumas camadas. A primeira camada argilosa é encontrada a 0,60 m de profundidade e possui a espessura de 0,20 m, enquanto a segunda camada é observada a 1,0 m de profundidade e sua espessura varia entre 0,60 (na região da fonte) e 1,50 metros (no PM 28) (Figura 5.2). Apesar da existência de lentes e camadas argilosas, o teor máximo de argila observado no teste de granulometria foi de 15,70% e, de acordo com Oliveira (2001), as argilas podem exercer influência significativa na hidrodinâmica dos fluidos somente quando presentes em percentagens acima de 40%. A Tabela 5.1 apresenta os resultados dos ensaios granulométricos para as diferentes camadas que compõem o solo da área experimental.

Tabela 5.1: Resultados do ensaio de granulometria para as diferentes camadas de solo

Camadas	**Quantidade de grãos (%)**			
	Argila	Silte	Areia Fina	Areia Grossa
Areia fina, marrom escura, com matéria orgânica	4,40	3,00	82,70	9,90
Areia fina, pouco argilosa, marrom clara	9,10	2,50	79,30	9,10
Areia fina, cinza escura	4,00	1,20	86,60	8,20
Areia fina, argilosa, com traços alaranjados	15,70	3,60	73,20	7,50
Areia fina, argilosa, cinza escura	10,60	2,70	81,10	5,60
Areia fina, cinza clara	6,00	1,00	90,00	3,00
Areia fina, amarelada	4,75	0,75	92,20	2,30
Areia fina, branca	5,50	2,40	90,00	2,10

Os resultados dos ensaios utilizando a Mesa de Tensão indicaram que a porosidade efetiva média para a área experimental é de 27,6%, valor característico de solos arenosos (FETTER, 1994), o que corrobora com as características do solo obtidas pelo levantamento do perfil estratigráfico e pelas análises granulométricas.

5.1.2 Caracterização hidrogeoquímica

A caracterização hidrogeoquímica da área experimental foi realizada por meio de análises físico-químicas da água subterrânea e análises da matéria orgânica, carbono orgânico e nutrientes do solo. A variação do teor de matéria orgânica e carbono orgânico nas diferentes camadas do solo foi de 0,10 a 0,40% e 0,06 e 0,22%, respectivamente; exceto para uma fina camada na parte superior do solo que continha um teor de matéria orgânica de 3,05% (Tabela 5.2). O baixo teor de matéria orgânica observado é condizente com as características de solos arenosos, que, segundo Sparks (2003), costumam apresentar um teor de carbono orgânico inferior a 1%.

Os resultados das análises geoquímicas demonstraram que o solo apresenta baixas concentrações de macro e micronutrientes. De acordo com os valores estabelecidos para interpretação da fertilidade do solo (SBCS – CQFS, 2004), os valores de micronutrientes medidos foram classificados como baixos, exceto para o boro, cuja classificação foi média. As concentrações de macronutrientes foram classificadas como muito baixa a média. Apesar da baixa concentração de nutrientes apresentada, estes valores foram muito semelhantes aos observados nos demais experimentos realizados na Fazenda Experimental da Ressacada e demonstraram ser suficientes para assegurar o crescimento das comunidades microbianas responsáveis pela biodegradação dos contaminantes (CHIARANDA, 2011; COSTA, 2008; FERNANDES, 2002; RAMOS, 2013). As Tabelas 5.2 e 5.3 apresentam o teor de matéria orgânica e carbono orgânico e as concentrações de macro e micro nutrientes nas diferentes camadas do solo, respectivamente.

Tabela 5.2: Resultados da determinação da matéria orgânica e macronutrientes nas camadas do solo

Camada	M.O. (%)	C.O. (%)	Macronutrientes ($mg.Kg^{-1}$)					
			N	P	K	Ca	Mg	S
Areia fina, marrom escura, com matéria orgânica	3,05	1,71	800	3,70	15,00	100	24	5,0
Areia fina, pouco argilosa, marrom clara	0,40	0,22	100	0,60	6,0	80	12	3,0
Areia fina, cinza escura	0,30	0,17	ND	1,30	5,0	80	12	3,0
Areia fina, argilosa, com traços alaranjados	0,35	0,20	200	0,85	8,0	90	12	3,0
Areia fina, argilosa, cinza escura	0,35	0,20	ND	1,70	12,0	100	24	7,0
Areia fina, cinza clara	0,10	0,06	100	7,20	14,0	100	24	13,0
Areia fina, amarelada	0,10	0,06	100	3,20	14,0	80	12	20,0
Areia fina, branca	0,10	0,06	ND	6,40	20,0	80	12	13,0

Legenda: M.O. refere-se à matéria orgânica e C.O. refere-se à carbono orgânico.

Tabela 5.3: Resultados da determinação dos micronutrientes nas diferentes camadas do solo

Camada	%(Fe)	Micronutrientes (mg.Kg^{-1})					
	Fe	Zn	Mn	Al	Na	B	Cu
Areia fina, marrom escura, com matéria orgânica	21,52	0,19	0,44	112,5	5,0	0,17	0,06
Areia fina, pouco argilosa, marrom clara	37,37	0,10	0,42	126	3,0	0,21	0,05
Areia fina, cinza escura	27,87	0,18	0,34	63	3,0	0,13	0,03
Areia fina, argilosa, com traços alaranjados	33,73	0,13	0,36	220,5	3,0	0,22	0,09
Areia fina, argilosa, cinza escura	20,63	0,17	0,32	180	7,0	0,11	0,08
Areia fina, cinza clara	15,21	0,11	0,38	117	13,0	0,10	0,10
Areia fina, amarelada	22,10	0,09	0,39	27	20,0	0,09	0,08
Areia fina, branca	3,97	0,05	0,33	90	13,0	0,11	0,11

A caracterização físico-química da água subterrânea foi realizada em agosto de 2013, previamente à liberação controlada do combustível. Os resultados foram expressos pela mediana de todos os pontos analisados (todos os poços e níveis). Os valores não detectados foram substituídos pela metade do limite de detecção (GILBERT, 1987). As análises realizadas foram: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, potencial de oxidação e redução (POR), salinidade, condutividade, ferro II, sulfeto, acidez, alcalinidade, acetato, cloreto, nitrito, brometo, nitrato, fosfato e sulfato.

Os resultados obtidos demonstram que o aquífero possui baixas concentrações das espécies reduzidas ferro II, sulfeto e nitrito, além de baixas concentrações de acetato e brometo, valores esperados para aquíferos não contaminados, o que também justifica os valores positivos de potencial de oxidação-redução (POR). Adicionalmente, foi observada uma baixa disponibilidade dos receptores de elétrons oxigênio, nitrato, Fe(III) e sulfato. Com relação ao oxigênio dissolvido (OD), vale ressaltar que seus valores foram bastante distintos nos diferentes níveis de profundidade analisados. Este comportamento se deve em virtude de a concentração de oxigênio dissolvido tender a diminuir com a profundidade do aquífero diante da impossibilidade de troca de oxigênio com a superfície. Assim, nos níveis de profundidade superiores (2 e 3 m) foram observados valores de OD em torno de 2,69 mg.L^{-1}, enquanto

após o nível de profundidade 4 m, o maior valor de OD observado foi de 0,6 $mg.L^{-1}$.

Estes resultados demonstram que a temperatura do aquífero (20,13 °C) é favorável à ocorrência de processos biológicos e o pH é levemente ácido (4,84). Segundo Bradley e Chapelle (1995), a temperatura ótima para a atividade microbiana em águas subterrâneas normalmente se encontra na faixa de 20 a 40 °C . Com relação ao pH, apesar da faixa de pH entre 6 e 8 ser mais favorável ao crescimento de comunidades microbianas (WINDERL; SCHAEFER; LUEDERS, 2007), sabe-se que as bactérias ferrorredutoras, sulfatorredutoras, assim como arqueas, são capazes de se desenvolver em faixas de pH mais ácidas, como as observadas (CHAPELLE, 2001; RAMOS, 2013). Ainda, a água subterrânea apresentou elevada acidez, baixa alcalinidade e baixa concentração de fosfato, conforme também observado em outras áreas experimentais da Fazenda da Ressacada (CHIARANDA, 2011; COSTA, 2008; RAMOS, 2013). A Tabela 5.4 apresenta o resultado da caracterização físico-química da água subterrânea. Os resultados estão expressos pela mediana de todos os pontos analisados.

Tabela 5.4: Resultado da caracterização físico-química da água subterrânea antes da liberação controlada do diesel B20 (*background*)

Parâmetros	Valores
Temperatura (°C)	20,13
pH	4,84
POR (mV)	252
Fe(III) ($mg.L^{-1}$)	1,81
Fe(II) ($mg.L^{-1}$)	0,005*
Sulfeto ($mg.L^{-1}$)	0,01
Acidez (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	138,80
Alcalinidade (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	1,41
Acetato ($mg.L^{-1}$)	1,30
Cloreto ($mg.L^{-1}$)	7,32
Nitrito ($\mu g.L^{-1}$)	0,05*
Brometo ($mg.L^{-1}$)	0,01
Nitrato ($mg.L^{-1}$)	1,45
Fosfato ($mg.L^{-1}$)	0,02
Sulfato ($mg.L^{-1}$)	2,15

Legenda: * Refere-se à metade do limite de detecção

5.1.3 Caracterização microbiológica

A caracterização microbiológica foi realizada por meio da quantificação de bactérias totais, arqueas e micro-organismos específicos da família *Geobacteraceae,* bactérias sulfatorredutoras (BSR) e do gene catabólico *bssA*, usado para avaliar a presença de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos (WINDERL; SCHAEFER; LUEDERS, 2007). Além disso, foi realizado sequenciamento genômico a fim de identificar os gêneros microbianos nativos predominantes no aquífero.

As análises de sequenciamento genômico revelaram uma microbiota nativa composta majoritariamente por micro-organismos aeróbios (*Fimbriimonas* spp., *Planctomyces* spp., *Salinispora* spp.) (BAULD; STALEY, 1976; IM et al., 2012; MALDONADO et al., 2005), facultativos aeróbios (*Rhodoplanes* spp., *Staphylococcus* spp., *Cupriavidus* spp., *Pseudomonas* spp.) (BRUCE et al., 2010; HIRAISHI; UEDA, 1994; KLOOS, 1980; LIMA; PARKER; MEYER, 2012; SATO et al., 2006; SHIM et al., 2005; SRINIVAS; SASIKALA; RAMANA, 2014) e nitrato/nitritorredutores (*Candidatus koribacter* spp., *Alicyclobacillus* spp., *Candidatus solibacter* spp., *Planctomyces* spp.) (BAULD; STALEY, 1976; IMPERIO; VITI; MARRI, 2008; MIETTINEN et al., 2015; SCHEUNER et al., 2014; WARD et al., 2009) (Figura 5.3), o que é consistente com a condição microaerofílica da água subterrânea observada previamente ao início do experimento. Além desses micro-organismos, bactérias tipicamente conhecidas como ferrorredutoras (*Geobacter* spp. e *Desulfosporosinus* spp.) (LOVLEY et al., 1993; PESTER et al., 2012) e sufatorredutoras (*Desulfosporosinus* spp.) (PESTER et al., 2012; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; RAMAMOORTHY et al., 2006a) foram identificadas, porém em percentagens de abundância relativas baixas (0,6 e 0,8% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA, respectivamente).

Os resultados quantitativos, baseados nas análises de qPCR, obtidos para bactérias totais foi de $6{,}2 \times 10^6$ cópias de gene.g^{-1}, os quais foram semelhantes às concentrações de bactérias totais observados em outras áreas experimentais livres de contaminação da Fazenda da Ressacada (GUIMARÃES, 2011; RAMOS, 2013). Já as arqueas e bactérias sulfatorredutoras (BSR) não foram detectadas nas amostras livres de contaminação, enquanto as bactérias ferrorredutores (*Geobacteraceae*) foram identificadas, porém em baixas concentrações ($2{,}2 \times 10^3$ cópias de gene.g^{-1}). A análise da presença de micro-organismos

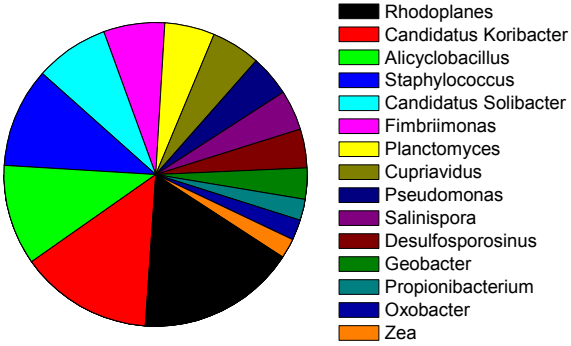
degradadores de hidrocarbonetos aromáticos (gene *bssA*) identificou a presença de bactérias que possuem o gene *bssA* em uma concentração de $3{,}3x10^{4}$ cópias de gene.g^{-1}. A quantificação destes micro-organismos nas amostras de *background* pode ser explicada devido a presença de bactérias dos gêneros *Geobacter* (KANE et al., 2002; KOLUKIRIK et al., 2011; WINDERL; SCHAEFER; LUEDERS, 2007) e *Desulfosporosinus* (ABU LABAN et al., 2015; SUN; SUN; CUPPLES, 2014a), as quais possuem o gene *bssA*.

Tabela 5.5: Resultados das variáveis microbiológicas da água subterrânea (*background*), baseados nas análises de qPCR

Variáveis	**Valores** (cópias de gene.g^{-1})
Bactérias totais	$6{,}2x10^{6}$
Arqueas	$5x10^{1*}$
Geobactereaceae	$2{,}2x10^{3}$
Bactérias sulfatorredutoras	$5x10^{1*}$
Gene *bssA*	$3{,}3x10^{4}$

Legenda: * Refere-se à metade do limite de detecção

Figura 5.3: Identificação dos principais micro-organismos nativos do solo (em % de abundância relativa do gene 16S rRNA)



5.2 Monitoramento do experimento de campo

O acompanhamento das alterações ocorridas no ambiente subsuperficial foi realizado por meio de 5 campanhas de monitoramento, conforme descrito na Tabela 5.6.

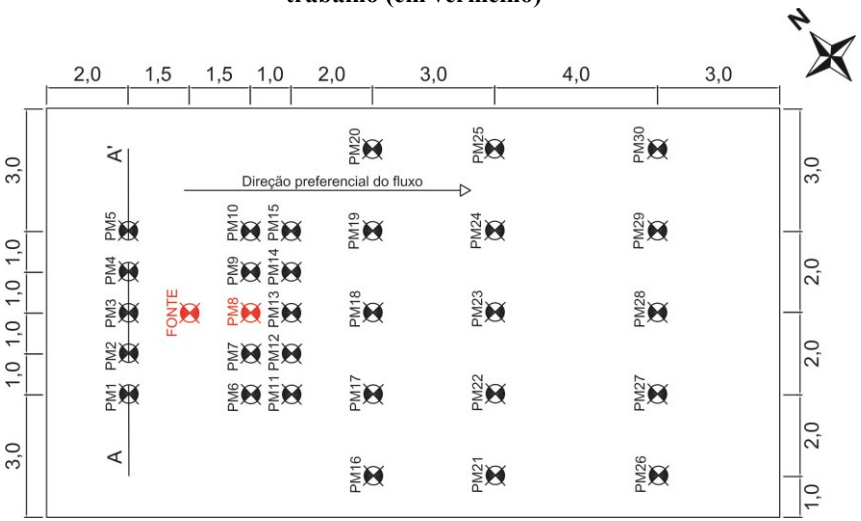
Tabela 5.6: Período das campanhas de monitoramento

Campanhas de monitoramento	Período (mês/ano)	Tempo após início do experimento (meses)
Background	Agosto/2013	0
Início do experimento	Fevereiro/2014	0
Monitoramento 1	Maio/2014	3
Monitoramento 2	Outubro/2014	7,4
Monitoramento 3	Março /2015	13
Monitoramento 4	Setembro/2015	17,8

Para a discussão dos resultados foram selecionados os poços de monitoramento (PM) PMF nível de profundidade 2m (fonte) e PM8 nível de profundidade 3m (1,5m da fonte) (Figura 5.4), pois estes apresentaram as maiores concentrações de contaminantes, receptores de elétrons e subprodutos metabólicos quando comparados aos demais poços de monitoramento, sendo, portanto, os pontos mais representativos para o processo de biodegradação. Estas observações podem ser justificadas pelo fato de o biodiesel possuir baixa solubilidade e lenta dissolução de seus constituintes na água subterrânea, comportando-se como uma fonte fixa e persistente de contaminação que exerce efeitos em uma pequena região de influência (CORSEUIL et al., 2011). Ainda, no caso de misturas de diesel/biodiesel, a forte atração óleo-óleo aumenta a segregação do agregado de óleo da água, diminuindo a velocidade de dissolução dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), compostos hidrolisados do biodiesel (WU et al., 2015), fazendo com que eles permaneçam por mais tempo na fase NAPL e, por consequinte, por um longo tempo em altas concentrações dissolvidas na zona da fonte. A permanência do biodiesel na zona da fonte e a sua degradação preferencial em relação aos BTEX resulta em efeitos negativos de longo tempo sobre a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos, contribuindo para persistência dos BTEX e HPAs na zona da fonte (RAMOS et al., 2016). Portanto, em misturas de

diesel/biodiesel, os hidrocarbonetos aromáticos formam uma pluma de contaminação de pequena extensão que se concentra na região da fonte de contaminação (RAMOS et al., 2016). Os pontos escolhidos localizam-se na região da fonte de contaminação e representam a direção da linha central da pluma. A Figura 5.4 destaca a localização dos poços de monitoramento discutidos neste trabalho.

Figura 5.4: Localização dos poços de monitoramento discutidos neste trabalho (em vermelho)



5.2.1 Alterações geoquímicas e microbiológicas da água subterrânea

A avaliação das alterações geoquímicas ocorridas na água subterrânea após a liberação controlada do diesel B20 e o início da bioestimulação foi realizada por meio do monitoramento das concentrações dos receptores de elétrons e de seus subprodutos (oxigênio dissolvido, nitrato, nitrito, Fe(III), ferro total suspenso, Fe(II), sulfato, sulfeto, metano), dos principais substratos orgânicos disponíveis (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos, BTEX, naftaleno, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e acetato) e das variáveis físico-químicas: potencial de oxirredução (POR), temperatura e pH. Enquanto o monitoramento das variações microbiológicas foi realizado por meio da quantificação de bactérias totais, arqueas e dos micro-organismos específicos *Geobacteraceae,* bactérias sulfato

redutoras (BSR) e do gene catabólico *bssA,* baseados em análises de qPCR. Além disso, foram efetuadas análises de sequenciamento genômico das amostras ambientais, cujos resultados estão expressos no ítem 5.4 deste trabalho.

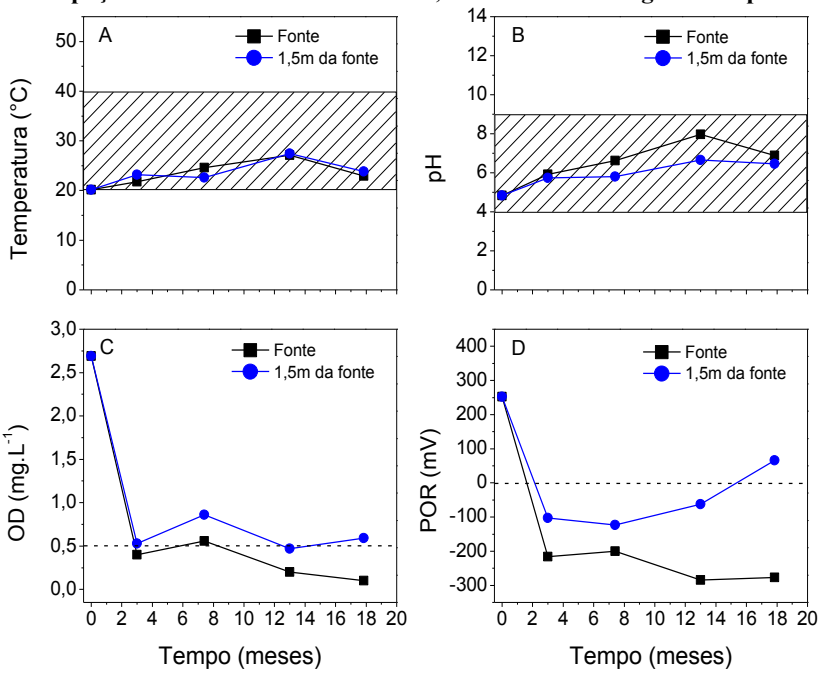
A temperatura e o pH da água subterrânea mantiveram-se em uma faixa favorável à ocorrência de processos biológicos (entre 20,13 e 27,46°C e entre 4,84 e 7,97, respectivamente) ao longo de todo monitoramento do experimento (Figura 5.5). Baseado na temperatura de crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos, três categorias distintas são definidas: psicófrilos (0-15°C), mesófilos (20-40°C) e termófilos (acima de 45°C). Os micro-organismos mesófilos são os mais frequentemente detectados em aquíferos, sendo a faixa entre 20 e 40°C considerada a faixa de temperatura ótima para ambientes subterrâneos (BRADLEY; CHAPELLE, 1995; SUTHERSAN et al, 1999). O pH interfere na capacidade dos micro-organismos em realizar funções celulares, no transporte através da membrana celular e no equilíbrio de reações catalisadas (SUTHERSAN et al, 1999), sendo a faixa de pH de 4 a 9 considerada a ideal para o crescimento microbiano (CHAPELLE, 2001). O pH da área experimental apresentou variações de 4,84 a 7,97 no poço fonte e 4,84 a 6,65 no poço a 1,5m da fonte (Figura 5.5), estando, portanto, de acordo com a faixa ideal para o crescimento dos micro-organimos. O aumento do pH observado pode ser justificado pelo consumo do íon H^+ do meio, ocorrido nas reações de oxidação-redução dos processos de biodegradação objetivados (ferro e sulfatorredução). A Tabela 5.7 apresenta as reações de oxidação-redução envolvidas na degradação do benzeno via ferro e sulfatorredução, demonstrando o consumo do íon H^+.

Tabela 5.7: Consumo de H^+ na degradação do benzeno via ferro e sulfatorredução

Processo de degradação	Reação de oxidação-redução
Ferrorredução	$C_6H_6 + 30Fe(OH)_3 + 60\mathbf{H}^+ \rightarrow 6CO_2 + 30Fe^{2+} + 78H_2O$
Sulfatorredução	$C_6H_6 + 3{,}75SO_4^{2-} + 7{,}5\mathbf{H}^+ \rightarrow 6CO_2 + 3{,}75H_2S + 3H_2O$

Fonte: WIEDMEIER et al., 1999.

Figura 5.5 Variações da temperatura (A), pH (B), concentrações de oxigênio dissolvido (OD) (C) e potencial de oxidação-redução (POR) (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo

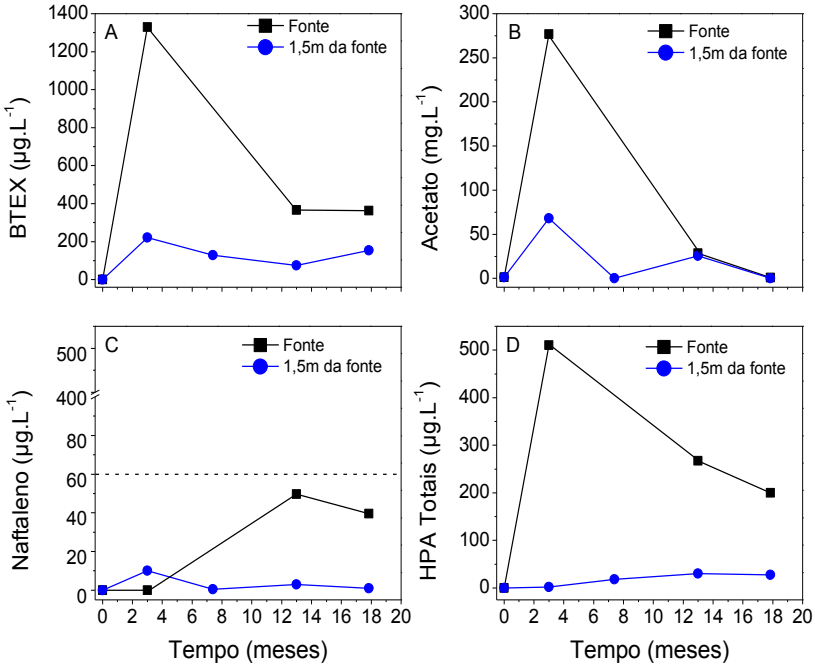


Legenda: As faixas rachuradas referem-se às condições ótimas de crescimento dos micro-organimos (A e B). As linhas tracejadas referem-se à concentração limite para o estabelecimento de condições anaeróbias (C) e ao limiar para condições de POR negativos (D).

No caso de contaminação de águas subterrâneas com misturas de diesel/biodiesel, os hidrocarbonetos aromáticos (BTEX e HPA's) são os compostos de maior interesse ambiental, pois são recalcitrantes, carcinogênicos (USEPA, 1998) e apresentam elevada toxicidade aos organismos aquáticos (ANDERSON et al., 1974; MÜLLER, 2011; RODRIGUES et al., 2010; SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). Assim, a tecnologia de remediação de aquíferos contaminados com esses biocombustíveis precisa ser eficiente na remoção dos hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos e, portanto, é necessário o monitoramento contínuo das concentrações destes contaminantes na água subterrânea. Nesse sentido, a aplicação do processo de biorremediação proposto resultou em baixas concentrações

de hidrocarbonetos monoaromáticos na água subterrânea ao longo de todo o período experimental. As máximas concentrações de BTEX obtidas para os poços fonte e 1,5m da fonte foram de 1329,2 $\mu g.L^{-1}$ e 221,71 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente (Figura 5.6). Comparativamente, experimentos *in situ* realizados com diesel B20, em condições semelhantes a este, obtiveram concentrações dissolvidas de BTEX de 4 a 34 vezes mais elevadas às obtidas neste estudo (CHIARANDA, 2011; RAMOS, 2013). Chiaranda (2011) avaliou a atenuação natural dos ésteres de ácidos graxos e hidrocarbonetos aromáticos e observou, após 29 meses de experimento, concentrações dissolvidas de BTEX de 9661,5 e 7611,8 $\mu g.L^{-1}$ para os poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente. Uma discussão detalhada comparando os experimentos de atenuação natural monitorada (ANM) e o presente estudo é apresentada no item 5.3. Da mesma forma, Ramos (2013) avaliou a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos na mistura B20 sob condições metanogênicas e obteve concentrações máximas dissolvidas de BTEX de 5371,1 e 4076,7 $\mu g.L^{-1}$, para os poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente. Apesar das elevadas concentrações iniciais de BTEX observadas por Ramos (2013), a bioestimulação em condições metanogênicas resultou na aceleração da degradação dos hidrocarbonetos aromáticos quando comparada à ANM. Porém, mesmo após 19,4 meses de experimento, foram observadas concentrações dissolvidas de BTEX mais elevadas que as deste trabalho (1951,4 e 916,5 $\mu g.L^{-1}$ para os poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente) (RAMOS, 2013). Portanto, baseando-se nas concentrações de BTEX, a comparação entre os três experimentos *in situ* com o diesel B20 sugere que a bioestimulação com produto recuperado da DAM e acetato de amônio pode ser a abordagem mais adequada para a remediação de águas subterrâneas contaminadas com diesel B20.

Figura 5.6 Variações das concentrações de BTEX (A), acetato (B), naftaleno (C) e HPA totais (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo

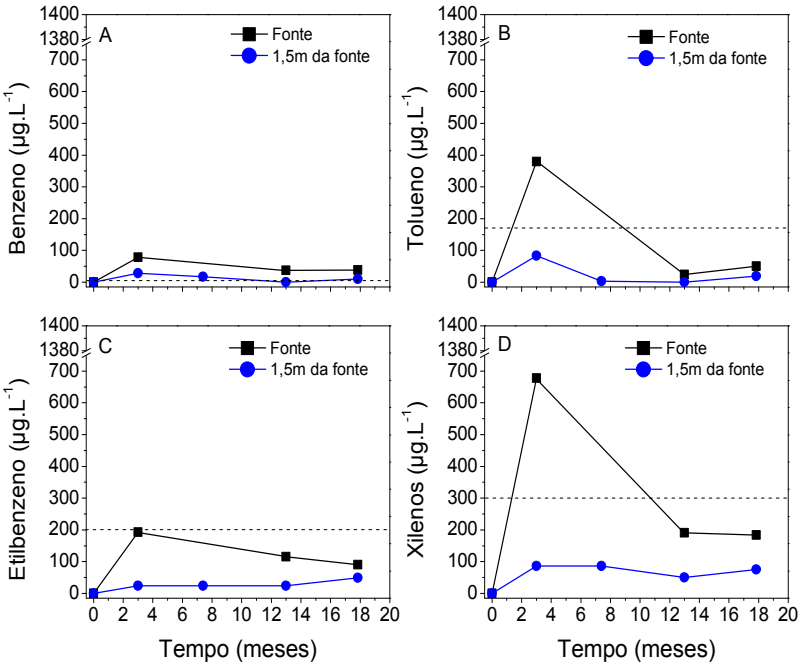


Legenda: A linha tracejada refere-se ao VMP de naftaleno para águas subterrâneas (CETESB, 2014).

A fim de determinar se os compostos BTEX estavam de acordo com as concentrações máximas exigidas pela legislação, foi realizada uma avaliação individual de cada hidrocarboneto monoaromático. No Brasil, a resolução CONAMA 396/2008 legisla sobre os Valores Máximos Permitidos (VMP) para diversos compostos orgânicos e inorgânicos, segundo os usos preponderantes da água subterrânea. Os VMP para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano (uso mais restritivo) são de 5, 170, 200 e 300 µg.L^{-1}, respectivamente (BRASIL, 2008). O tolueno e os xilenos mantiveram suas concentrações de acordo com o VMP pela legislação no poço localizado a 1,5m da fonte, ao longo de todo período experimental. Enquanto no poço fonte, os VMP para o tolueno e os xilenos foram atingidos decorridos 13 meses de experimento (23,82 e 190,92 µg.L^{-1}, respectivamente) (Figura 5.7). O etilbenzeno manteve-se

de acordo com o preconizado pela legislação ao longo de todo experimento, em ambos os poços de monitoramento (Figura 5.7). Por fim, apesar de baixas, as concentrações de benzeno não alcançaram o VMP pela legislação (38,63 e 9,83 $\mu g.L^{-1}$ nos poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente) (Figura 5.7). Em resumo, com exceção do benzeno, a avaliação individual dos hidrocarbonetos monoaromáticos demonstrou que, decorridos 13 meses de experimento, as concentrações dos TEX estavam de acordo com as exigências ambientais, em ambos poços de monitoramento.

Figura 5.7 Variações das concentrações de benzeno (A), tolueno (B), etilbenzeno (C) e xilenos (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo



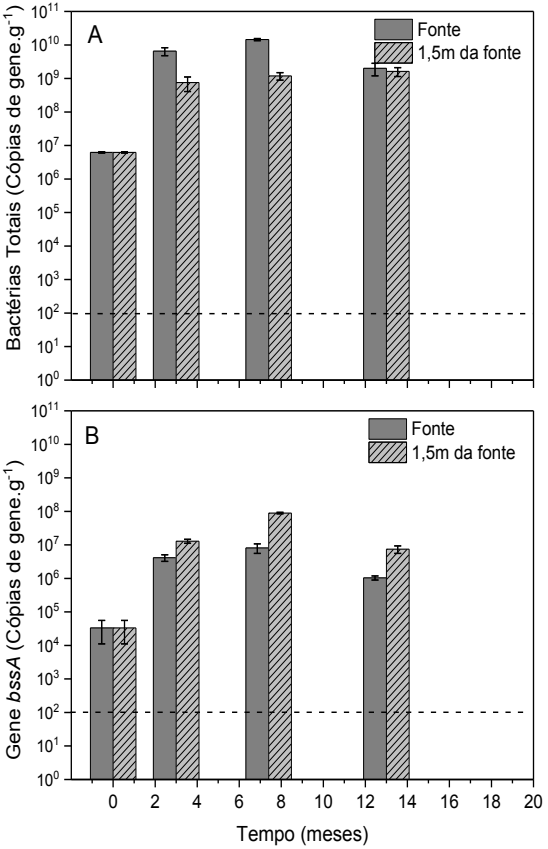
Legenda: As linhas tracejadas referem-se aos VMP para águas subterrâneas destinadas ao consumo humano (BRASIL, 2008).

Assim como para os hidrocarbonetos monoaromáticos, baixas concentrações dissolvidas de HPA totais foram observadas ao longo de todo experimento (Figura 5.6). Dentre os HPAs, o naftaleno recebe destaque por representar 79% da composição dos hidrocarbonetos

policíclicos aromáticos (KAIPPER, 2003) e pela sua maior solubilidade em água quando comparada aos demais hidrocarbonetos policíclicos aromáticos do diesel (SCHNOOR, 1996; WIEDMEIER et al, 1999), o que lhe confere uma maior mobilidade no aquífero. Apesar da resolução CONAMA 396/2008 não estabelecer um VMP para o naftaleno, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) determina a concentração máxima de naftaleno de 60 $\mu g.L^{-1}$ em águas subterrâneas (CETESB, 2014). Nesse contexto, as concentrações de naftaleno mantiveram-se de acordo com o VMP preconizado pela agência ambiental CETESB em ambos os poços de monitoramento, ao longo de todo período experimental (Figura 5.6).

As baixas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos obtidas coincidem com o aumento da biomassa (bactérias totais) e o crescimento de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos (gene *bssA*). Já nos primeiros meses de experimento as concentrações de bactérias totais aumentaram em três e duas ordens de grandezas em relação ao *background* nos poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente, e a biomassa manteve-se estimulada ao longo de todo o período de monitoramento (de $6,2x10^6$ para $6,5x10^9$ e $7,6x10^8$ cópias de gene.g^{-1} nos poços fonte e 1,5 m da fonte, respectivamente) (Figura 5.8). Da mesma forma, as concentrações do gene *bssA* aumentaram em duas e três ordens de grandezas nos primeiros meses de experimento com relação ao *background* nos poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente (de $3,3x10^4$ para $4,1x10^6$ e $1,4x10^7$ cópias de gene.g^{-1} nos poços fonte e 1,5 m da fonte, respectivamente) (Figura 5.8). Portanto, a estratégia de remediação utilizada resultou no aumento da biomassa, estimulando micro-organismos específicos envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos, os quais foram responsáveis pelas baixas concentrações dos compostos aromáticos observadas. Assim, pode-se dizer que, dentre os múltiplos mecanismos que podem potencialmente influenciar as concentrações dos hidrocarbonetos aromáticos na água subterrânea, a biodegradação aparentemente prevaleceu sobre os processos abióticos, tais como dissolução, dispersão, sorção, diluição, entre outros.

Figura 5.8 Concentrações de bactérias totais (A) e do gene *bssA* (B) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo



Legenda: A linha tracejada representa o limite de detecção das análises

Apesar dos hidrocarbonetos aromáticos serem os compostos de maior interesse ambiental em derramamentos de diesel B20, estudos demonstram que, em misturas de diesel e biodiesel, o biodiesel é preferencialmente degradado em relação aos hidrocarbonetos aromáticos do diesel (CHIARANDA, 2011; OWSIANIAK et al., 2009; RAMOS et al., 2016), causando um retardo na biodiegradação dos BTEX e HPAs (BORGES; DIAS; DANKO, 2014; CORSEUIL et al., 2011; YASSINE et al., 2013; RAMOS et al., 2016). Portanto, em derramamentos com misturas de diesel/biodiesel, as estratégias de remediação devem priorizar a degradação do biocombustível (RAMOS et al., 2016), a fim

de impedir que exerça seus efeitos duradouros na zona da fonte de contaminação e retarde a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel, que são os compostos de maior interesse ambiental. Neste contexto, as baixas concentrações dissolvidas de hidrocarbonetos aromáticos observadas ao longo de todo monitoramento, associada ao aumento da biomassa e de micro-organismos específicos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos, sugerem que a fração solúvel disponível do biodiesel foi passível de ser degradada pela microbiota estimulada pela presença do diesel B20 e dos produtos de remediação, visto que os ésteres metílicos de ácido graxo são biodegradados prioritariamente e mais rapidamente do que os compostos aromáticos do diesel (DEMELLO et al., 2007; OWSIANIAK et al., 2009; RAMOS et al., 2016).

A fim de definir os principais processos de oxidação-redução ocorridos no aquífero e responsáveis pela degradação do diesel B20, foi realizada uma avaliação detalhada dos receptores de elétrons e de seus principais metabólitos. A liberação controlada do diesel B20 e a adição de acetato de amônio como um dos produtos de remediação exerceram uma elevada demanda bioquímica de oxigênio, o que resultou no seu rápido consumo, alcançando concentrações próximas a 0,5 $mg.L^{-1}$ no aquífero em apenas 3 meses de experimento (Figura 5.5), sendo estas concentrações de oxigênio dissolvido comumente observadas em ambientes anaeróbios (SCHREIBER; BAHR, 2002; WIEDMEIER et al, 1999). Simultaneamente ao consumo de oxigênio dissolvido houve a diminuição do potencial de oxidação-redução (POR) do meio, que revelou valores negativos a partir de 3 meses após a liberação controlada do diesel B20 e início do tratamento (Figura 5.5), o que suporta o estabelecimento de condição de anaerobiose neste período experimental.

O POR é uma medida que indica a tendência de um ambiente em aceitar ou receber elétrons. Como alguns processos biológicos ocorrem dentro de uma faixa de POR pré-estabelecida, o conhecimento do potencial redox pode auxiliar na determinação dos processos de oxidação-redução prevalecentes (WIEDMEIER et al, 1999). Valores de POR acima de +300 mV seriam característicos de ambientes aeróbios, valores na faixa de +300 a +100 mV caracterizam ambientes nitratorredutores, valores entre +100 e -50 mV seriam condizentes com ambientes ferrorredutores, valores entre -50 e -220 mV, seriam tipicos de ambientes sulfatorredutores e, por fim, valores abaixo de -240 mV seriam característicos de condições metanogênicas (EDMUNDS et al., 1984; SUTHERSAN et al, 1999; WIEDMEIER et al, 1999). Porém, deve-se ter cautela ao avaliar os processos de oxidação-redução

considerando somente a variável POR, uma vez que essas faixas de potencial redox foram estipuladas para condições de pH 7 e temperatura de 25°C, sendo diferentes das condições geoquímicas deste experimento. Além disso, micro-organismos ferrorredutores são capazes de explorar metabolicamente o potencial redox favorável ao composto de Fe (III) utilizado (citrato de ferro, goethita, hematita, magnetita, entre outros) (WEBER; ACHENBACH; COATES, 2006). Por exemplo, no caso dos diferentes óxidos de ferro a faixa de POR varia de +100 a -314 mV, dependendo do composto utilizado (STRAUB; BENZ; SCHINK, 2001). Portanto, a variável POR deve ser utilizada como ferramenta auxiliar para a definição dos processos de oxidação-redução ocorridos, juntamente com uma avaliação detalhada dos receptores de elétrons e subprodutos produzidos na água subterrânea.

O potencial de oxidação-redução variou de +252 a -216 mV e +252 a -103 mV, nos poços fonte e 1,5m da fonte, nos primeiros 3 meses de experimento e mantiveram-se negativos ao longo de todo período experimental (Figura 5.5). Wiedmeier et al. (1999) destaca que, quando condições anaeróbias são estabelecidas no ambiente subsuperficial, o POR pode ser usado para fornecer uma informação da localização da pluma de contaminação. De fato, no poço localizado a 2,5m da fonte (PM13 - Figura 5.4), que é o próximo poço de monitoramento seguindo a direção da linha central da possível pluma de contaminação, baixíssimas concentrações de compostos orgânicos foram observadas (por exemplo, concentrações máximas de benzeno igual a 2,89 $\mu g.L^{-1}$; naftaleno igual a 9,72 $\mu g.L^{-1}$ e acetato igual a 1,61 $mg.L^{-1}$), o que resultou em um potencial redox positivo e com pouca variação durante todo o monitoramento.

Uma vez que condições anaeróbias foram estabelecidas na água subterrânea, os receptores de elétrons alternativos tendem a ser utilizados conforme a hierarquia termodinâmica anteriormente explicada no item 3.2. Assim, de acordo com os receptores de elétrons disponíveis, a degradação dos contaminantes irá ocorrer por meio dos processos de nitratorredução, ferrorredução, sulfatorredução e metanogênese (LOVLEY, 2003; WIEDMEIER et al., 1999). Análises realizadas previamente à liberação controlada do combustível mostraram que o aquífero é pobre em receptores de elétrons, com concentrações de 1,45 $mg.L^{-1}$, 1,81 $mg.L^{-1}$, e 2,15 $mg.L^{-1}$ de nitrato, Fe(III) e sulfato, respectivamente (Tabela 5.4).

A adição de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM resultou em um aumento na disponibilidade de Fe(III) e sulfato, conforme objetivado. O incremento na quantidade de receptores de

elétrons pode ser constatado pelo aumento das concentrações de Fe(III) e sulfato em relação ao *background*. As concentrações de Fe(III) aumentaram de 1,81 $mg.L^{-1}$ para 32,38 e 218,50 $mg.L^{-1}$ para os poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente (Figura 5.10); enquanto as concentrações de sulfato aumentaram de 2,15 $mg.L^{-1}$ para 730,60 e 38,86 $mg.L^{-1}$ para os poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente (Figura 5.9). Após a verificação do primeiro pico de concentração desses receptores de elétrons, foi observado o decaimento das concentrações de Fe(III) e sulfato (Figuras 5.10 e 5.11), simultaneamente ao aumento das concentrações de Fe(II) (Figura 5.10), indicando a ocorrência dos processos de ferro e sulfatorredução. Embora sulfetos sejam produzidos durante o processo de sulfatorredução, as concentrações de sulfeto se mantiveram próximas à zero ao longo de todo experimento (Figura 5.9). A ausência de sulfeto mensurável pode ser atribuída à precipitação na forma de sulfeto ferroso (ATEKWANA; AAL, 2015; HUANG; KAO, 2016; RODEN; LOVLEY, 1993), a qual é consistente com a diminuição das concentrações de Fe(II) no poço localizado à 1,5m da fonte decorridos 13 meses de experimento e com as baixas concentrações de Fe(II) no poço fonte ao longo de todo experimento (Figura 5.10). A precipitação na forma de sulfeto ferroso foi anteriormente observada por diversos autores que estudaram a atenuação natural de contaminantes orgânicos em ambientes que continham Fe(III) e sulfato ou a degradação de compostos orgânicos via ferro ou sulfatorredução (ATEKWANA; AAL, 2015; HUANG; KAO, 2016; MADIGAN et al., 2010; MUCCI et al., 2000; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; RODEN; LOVLEY, 1993). Nesse sentido, a redução na concentração de sulfato fornece indícios da ocorrência da biodegradação dos contaminantes via sulfatorredução, havendo a necessidade de utilizar evidências microbiológicas para comprovar a existência desse processo. Além disso, sabendo que elevadas concentrações de sulfetos dissolvidos podem inibir a atividade microbiana (DA SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005; HUANG; KAO, 2016; KALYUZHNYI; DE LEON FRAGOSO; RODRIGUEZ MARTINEZ, 1997; LOPES et al., 2007), o uso combinado dos processos de ferro e sulfatorredução é interessante, uma vez que podem reduzir os efeitos inibitórios exercidos pelos sulfetos por meio da formação do precipitado sulfeto ferroso ($FeS_{(S)}$).

Figura 5.9 Variações das concentrações de nitrato (A), nitrito (B), sulfato (C) e sulfeto (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo

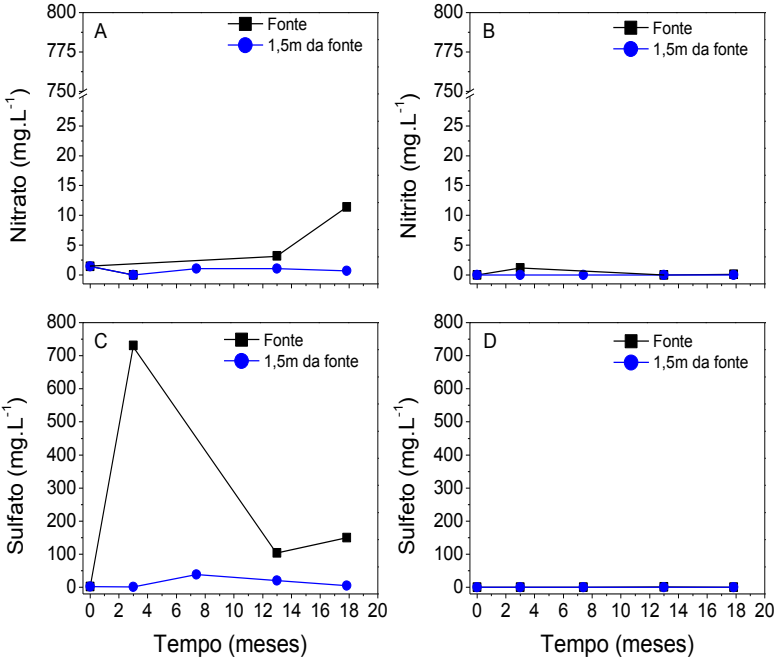
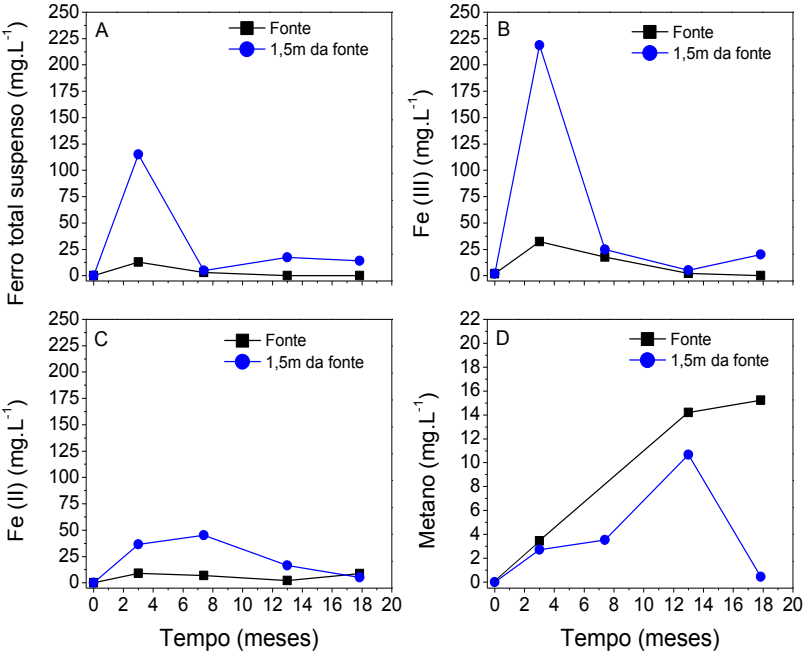


Figura 5.10 Variações das concentrações de ferro total suspenso (A), Fe (III) (B), Fe (II) (C) e metano (D) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo



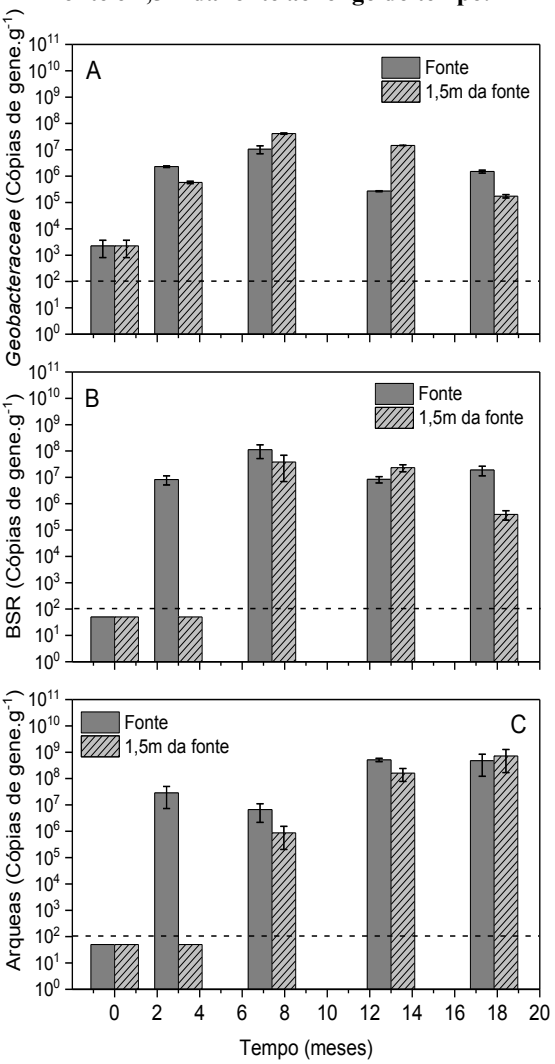
Como os processos de biodegradação da matéria orgânica são mediados por micro-organismos específicos que utilizam diferentes receptores de elétrons para conduzir a oxidação do contaminante, a presença de determinados micro-organismos na água subterrânea pode auxiliar na determinação do processo de oxidação-redução predominante. Nesse sentido, membros da família *Geobacteraceae*, composta pelos gêneros (*Pelobacter, Geobacter*, *Desulfuromonas* e *Desulfuromusa*), costumam ser predominantes em ambientes subsuperficiais sob condições ferrorredutoras (BOTTON et al., 2007; LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009; ROONEY-VARGA et al., 1999). Portanto, a presença desta comunidade específica pode fornecer indícios da ocorrência do processo de ferrorredução. Da mesma forma, a presença de comunidades específicas de bactérias sulfatorredutoras (BSR) e arqueas pode auxiliar na verificação da ocorrência dos processos de sulfatorredução e metanogênese. Os micro-organismos da família *Geobacteraceae* são capazes de degradar, conjuntamente com a

redução do Fe(III), diversos substratros como os hidrocarbonetos monoaromáticos (BOTTON et al., 2007; DORER et al., 2016; LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009; LOVLEY, 1997; ROONEY-VARGA et al., 1999; ZHANG et al., 2012) e o acetato (COATES et al., 1999; LOVLEY, 1997). Além disso, quando em sintrofia com bactérias sulfatorredutoras, as *Geobacteraceae* spp. são capazes de degradar os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (GIHRING et al., 2011), metabólito hidrolisado do biodiesel. Neste caso, as bactérias sulfatorredutoras do gênero *Desulforegula* atuam na conversão dos AGCL a acetato, o qual é posteriormente degradado pelos micro-organismos da família *Geobacteraceae* (GIHRING et al., 2011). As bactérias sulfatorredutoras (BSR) também são capazes de degradar os hidrocarbonetos aromáticos (ABU LABAN et al., 2009; BELLER; SPORMANN, 1997; BOMBACH et al., 2010; HARMS et al., 1999; HIGASHIOKA; KOJIMA; FUKUI, 2012; KNIEMEYER et al., 2003; KUPPARDT et al., 2014; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006), bem como os ésteres metílicos de ácidos graxos (AKTAS et al., 2010) e os ácidos graxos de cadeia longa (RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; SOUSA et al., 2010).

Concomitantemente às mudanças geoquímicas que indicam o estabelecimento de condições ferro e sulfatorredutoras no aquífero, foi observado o aumento na concentração de micro-organismos específicos envolvidos nestes processos de oxidação-redução. No poço fonte, 3 meses após o início do experimento, as concentrações de *Geobacteraceae* e bactérias sulfatorredutoras (BSR) haviam aumentado de 2,2 $x10^3$ para 2,3$x10^6$ cópias de gene.g^{-1} e de 5$x10^1$ para 8,3$x10^6$ cópias de gene.g^{-1}, respectivamente (Figura 5.11). A constante disponibilidade de sulfato obtida pela adição do produto recuperado da DAM ao longo dos 17,8 meses de monitoramento foi responsável pela manutenção do metabolismo de BSR durante todo o período experimental (Figura 5.11). Da mesma forma, as concentrações de *Geobacteraceae* se mantiveram relativamente estáveis ao longo de todo monitoramento (Figura 5.11), apesar da redução da concentração de Fe(III) após 13 meses de experimento (2,13 mg.L^{-1}) (Figura 5.10). A sustentação do metabolismo dos micro-organismos pertencentes à família *Geobacteraceae* no ambiente com baixa disponibilidade de Fe(III) pode ser justificada pela sua capacidade de utilizar receptores de elétrons alternativos simultaneamente, tais como fumarato (CACCAVO et al., 1994; LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009), nitrato (CORD-RUWISCH; LOVLEY; SCHINK, 1999) e enxofre elementar (BARLLET et al., 2012; CACCAVO et al., 1994; LOVLEY et al.,

2011), podendo assim atuar em diferentes condições redox, garantindo a manutenção das atividades celulares destes micro-organismos, mesmo após a diminuição das concentrações de Fe(III). Assim, em ambientes que contenham Fe(III), sulfato e BSR, pode haver a formação de enxofre elementar através da redução abiótica do Fe(III) por sulfetos (BARLLET et al., 2012; LOHMAYER et al., 2014; LOVLEY et al., 2011), o qual pode ser utilizado como receptor de elétrons alternativo para os micro-organismos da família *Geobacteraceae*.

Figura 5.11 Concentrações de *Geobacteraceae* (A), bactérias sulfatorredutoras (BSR) (B) e arqueas (C) nos poços de monitoramento fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo.



Legenda: A linha tracejada representa o limite de detecção das análises.

O incremento na concentração de micro-organismos específicos envolvidos nos processos de ferro e sulfatorredução também foi observado no poço localizado a 1,5m da fonte. Após 3 meses de

monitoramento, foi observado um aumento das bactérias *Geobacteraceae* (de 2,2 $x10^3$ para $5,8x10^5$ cópias de gene.g^{-1}), o qual é condizente com as mudanças geoquímicas que indicam o estabelecimento de condições ferrorredutoras no ambiente (aumento da disponibilidade de Fe(III) em relação ao *background* de 1,81 para 218,5 mg.L^{-1} e aumento da concentração de Fe(II) de 0 para 36,5 mg.L^{-1}). Este ambiente ferrorredutor favoreceu a estimulação de micro-organismos da família *Geobacteraceae*, obtendo o seu pico de concentração após transcorridos 7,4 meses ($4,1x10^7$ cópias de gene.g^{-1}) (Figura 5.10). Já a estimulação do crescimento das BSR (de $5x10^1$ para $3,8x10^7$ cópias de gene.g^{-1}) foi registrada após 7,4 meses de experimento, concomitantemente ao aumento da disponibilidade de sulfato em relação ao *background* (de 2,1 para 38,9 mg.L^{-1}) (Figura 5.9). Portanto, o aumento das concentrações das *Geobacteraceae* spp. e dos micro-organimos sulfatorredutores, juntamente ao aumento do Fe(III) e sulfato disponíveis para os micro-organimos e a posterior diminuição das suas concentrações e aumento das concentrações de Fe(II) comprovam a existência de ambos processos de oxidação-redução.

Apesar da combinação dos processos de ferro e sulfatorredução ter sido observada em ambos os poços de monitoramento, uma análise mais detalhada das mudanças geoquímicas ocorridas no meio indicam, após 3 meses de experimento, uma atuação mais intensa do processo de ferrorredução no poço localizado a 1,5m da fonte em comparação ao poço fonte, o que pode ser resultado do tempo de migração dos receptores de elétrons até este poço de monitoramento, aliado a hierarquia termodinâmica para a utilização dos receptores de elétrons. As análises de Fe(III) e Fe(II) no poço fonte, 3 meses após a liberação do diesel B20 e do início do tratamento de remediação, indicam a ocorrência deste processo de óxidacão-redução (32,38 e 9,12 mg.L^{-1}, respectivamente), porém os resultados das concentrações de Fe(III) e Fe(II) são substancialmente mais elevados para o poço localizado a 1,5m da fonte, no mesmo período de monitoramento (218,50 e 36,50 mg.L^{-1}, respectivamente) (Figura 5.10). Apesar disso, elevadas concentrações de micro-organismos ferrorredutores foram observadas em ambos os poços de monitoramento (concentração de *Geobacteraceae* de $2,3x10^6$ e $5,8x10^5$ cópias de gene.g^{-1}, nos poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente). Sabendo que a ocorrência do processo de ferrorredução é mais favorável termodinamicamente ao processo de sulfatorredução (LOVLEY, 2003) e considerando o tempo de migração dos substratos orgânicos e dos receptores de elétrons até o poço localizado a 1,5m da fonte, esses resultados sugerem que o

processo de ferrorredução pode ter ocorrido de forma mais intensa no poço fonte em um período anterior a primeira campanha de monitoramento do experimento (3 meses).

Com relação ao processo de ferrorredução, a ausência de contato direto entre os óxidos/oxihidróxidos de ferro e os micro-organismos pode representar uma limitação ao processo. Porém, mecanismos alternativos de transporte de elétrons por meio de transportadores de elétrons externos como quinonas e substâncias húmicas, formação de complexos Fe(III)-quelantes (sintéticos ou naturais - ácidos húmicos) e formação de nanofios bacterianos produzidos por alguns micro-organismos podem auxiliar na transferência de elétrons na biodegradação via ferrorredução (ANSCHUTZ; PENN, 2005; COATES et al., 1998; LI et al., 2014; REGUERA et al., 2005, 2007; RODEN et al., 2010; VOORDECKERS et al., 2010; WOLF et al., 2009), conforme descrito anteriormente no item 3.2.1 deste trabalho. A introdução do oxihidróxido de ferro, recuperado do tratamento da DAM (goethita), resultou no aumento da concentração de ferro total suspenso e da disponibilidade de Fe(III) na água subterrânea (Figura 5.10). As concentrações mais elevadas de Fe(III) em relação ao ferro total suspenso demonstram que parte da quantidade de ferro férrico disponível está na forma dissolvida. O aumento do Fe(III) dissolvido pode ser atribuído à eventual presença de substâncias húmicas no solo que podem ter auxiliado na transferência de elétrons por meio da formação de complexos Fe(III)-ácidos húmicos que contribuem para a dissolução do Fe(III) na água subterrânea (LUTHER et al, 1992; LOVLEY et al, 1996; COATES et al, 1998; THAMDRUP, 2000; RODEN et al, 2010). Em contrapartida, o comportamento semelhante do ferro total suspenso e do Fe(III) sugere que grande parte do ferro suspenso encontra-se na forma de Fe(III). Porém, independentemente da forma em que o Fe(III) se encontrava no aquífero, o monitoramento do experimento mostrou que praticamente todo o ferro férrico disponível foi utilizado pelos micro-organismos, pois houve uma drástica redução nas concentrações de Fe(III) e ferro total suspenso (Figura 5.10). Adicionalmente, foi observado o aumento da concentração de micro-organismos específicos da família *Geobacteraceae* em ambos os poços de monitoramento (Figura 5.11). Sabendo que as espécies do gênero *Geobacter* são consideradas o grupo mais importante para a condução do processo de ferrorredução (SNOEYENBOS-WEST et al., 2000) e que estas necessitam de contato direto com o receptor de elétrons e o contaminante (REGUERA et al., 2005), estes resultados sugerem que, além do complexo Fe(III)-

quelante, o transporte de elétrons pode também ter sido realizado por meio da formação de nanofios produzidos pelas bactérias ferrorredutoras estimuladas na área experimental (LOVLEY, 2011; REGUERA et al., 2005, 2007).

Além dos processos de ferro e sulfatorredução, condições metanogênicas foram estabelecidas na água subterrânea. Na metanogênese, os substratos orgânicos são convertidos a metano e dióxido de carbono, pela ação das arqueas metanogênicas acetoclásticas, hidrogenotróficas e metilotróficas[3] (FENCHEL et al, 1998; GUJER; ZEHNDER, 1983), sendo esta a última etapa dos processos de oxidação-redução (LOVLEY, 2003; WIEDMEIER et al, 1999). Condições metanogênicas são comumentes observadas em aquíferos impactados por contaminantes orgânicos (RAMOS et al., 2013; REINHARD et al., 2005; TAMAMURA et al., 2012; WEINER; LOVLEY, 1998) e, estudos fornecem evidências da degradação de hidrocarbonetos aromáticos do diesel (CHANG; UM; HOLOMAN, 2006; GRBIĆ-GALIĆ; VOGEL, 1987; JONES et al., 2008; REINHARD et al., 2005; WEINER; LOVLEY, 1998), biodiesel (WU et al., 2015) e misturas de diesel/biodiesel (RAMOS et al., 2013; WU et al., 2015), via metanogênese. Uma produção significativa de metano foi observada a partir do 13° mês de experimento (concentrações de metano de 14,21 e 10,68 $mg.L^{-1}$, nos poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente) (Figura 5.10). A produção de metano foi condizente com o aumento das concentrações de arqueas de $5x10^{1}$ para $2,87x10^{7}$ cópias de $gene.g^{-1}$ no poço fonte, após 3 meses; e de $5x10^{1}$ para $8,7x10^{5}$ cópias de $gene.g^{-1}$ no poço 1,5m da fonte, após 7,4 meses a partir do início do experimento.

[3]As arqueas metilotróficas são responsáveis pela conversão de compostos de metil (como metanol e metilamonas) a metanos. A metanogênese metilotrófrica não é relevante para os processos de degradação dos compostos estudados neste trabalho.

Apesar das elevadas concentrações de metano observadas na água subterrânea, concentrações significativas de Fe(III) e sulfato (Figuras 5.9 e 5.10) e de micro-organismos específicos envolvidos nos processos de ferro e sulfatorredução (Figura 5.11) são mantidas, mesmo após a metanogênse se tornar um dos processos predominantes na degradação dos compostos orgânicos, o que indica que os processos estão ocorrendo conjuntamente. A ocorrência simultânea dos processos de ferrorredução ou sulfatorredução e metanogênese é frequentemente observada em aquíferos impactados por contaminantes orgânicos (ex. BTEX) (AÜLLO et al., 2013; BEEMAN; BLECKMANN, 2002; BEEMAN; SUFLITA, 1990; BERTRAND et al., 2016; HEIDRICH; WEISS; KASCHL, 2004; SUN; SUN; CUPPLES, 2014a).

A avaliação dos processos de oxidação-redução predominantes demonstrou que a ferro e sulfatorredução foram os principais processos ocorridos no ambiente subsuperficial e responsáveis pela rápida degradação do diesel B20. As elevadas concentrações de Fe(III) e sulfato observadas na primeira campanha de monitoramento (3 meses) em relação ao *background*, aliadas à constatação do desenvolvimento dos processos de ferro e sulfatorredução no meio, indicam que os óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM são uma eficiente fonte alternativa de óxido-hidróxido de ferro e sulfato. Além disso, a adição de acetato de amônio como um substrato prontamente assimilável pelos micro-organimos, estimulou o rápido crescimento de micro-organimos ferro e sulfatorredutores (como por exemplo, as bactérias da família *Geobacteraceae)*, conforme esperado. Após 13 meses de experimento, a metanogênese passou a ser também um importante processo na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos. A maior disponibilidade dos receptores de elétrons anaeróbios obtida pela adição do produto recuperado da DAM, conjuntamente com a adição de acetato de amônio e a liberação controlada do diesel B20, estimulou o crescimento de micro-organismos específicos capazes de oxidar os metil ésteres de ácidos graxos e os hidrocarbonetos aromáticos do diesel, resultando em baixas concentrações de BTEX e HPA's na água subterrânea ao longo de todo período experimental.

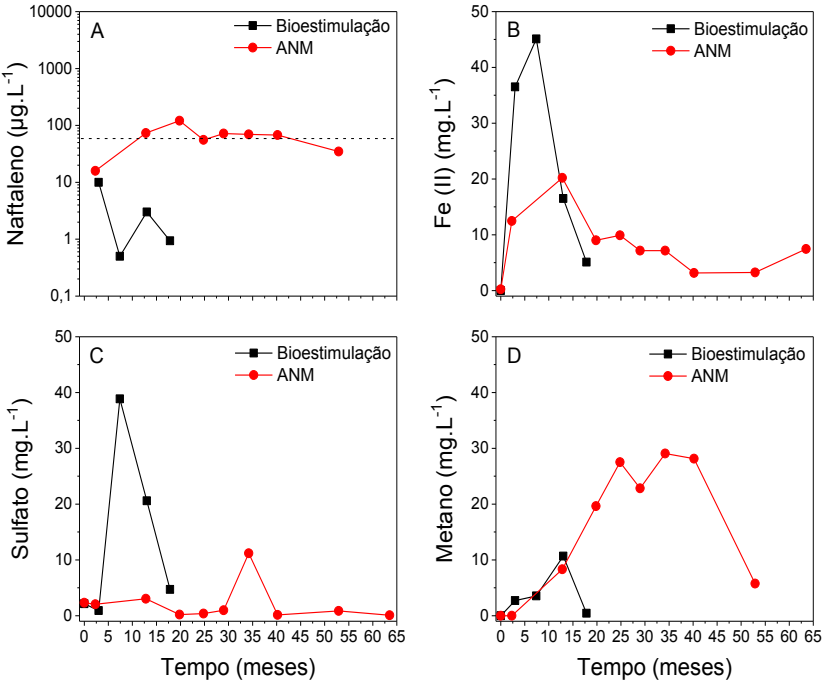
5.3 Comparação dos experimentos de bioestimulação conjunta de ferro e sulfatorredução e atenuação natural monitorada

A bioestimulação com acetato de amônio e óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM foi aplicada com o objetivo de acelerar a degradação do diesel B20 por meio da bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução. Assim, com o intuito de avaliar a contribuição da adição dos produtos de remediação na biodegradação dos éstereres metílicos de ácidos graxos e hidrocarbonetos aromáticos do diesel, foi realizada uma comparação entre este experimento e os dados obtidos em um experimento adjacente a este, desenvolvido em condições semelhantes a este, no qual foi estudada a degradação natural do diesel B20 (experimento de atenuação natural monitorada - ANM).

Ambas as áreas experimentais eram compostas predominantemente por areia fina, com algumas lentes de argila (com aprox. 15% de teor de argila), continham baixo teor de matéria orgânica, baixas concentrações de micro e macronutrientes, baixas concentrações de receptores de elétrons na fase saturada e velocidades intersticiais média da água subterrânea semelhantes (6,5 e 6,9 $m.ano^{-1}$ para os experimentos de ANM e bioestimualação ativa, respectivamente). A Figura 5.12 apresenta a localização de cada área experimental. Detalhes referentes ao experimento de ANM podem ser encontrados em Chiaranda (2011). O experimento de ANM iniciou em junho de 2008 e foram realizados 10 monitoramentos até a presente data. Para a análise comparativa foram utilizados os dados dos poços localizados a 1,5m da fonte, em ambos os experimentos.

Figura 5.12 Localização dos experimentos de ANM (em vermelho) e de bioestimulação ativa (em amarelo)

Figura 5.13 Variações das concentrações de naftaleno (A), Fe(II) (B), sulfato (C) e metano (D) nos experimentos de bioestimulação e atenuação natural monitorada (ANM) ao longo do tempo



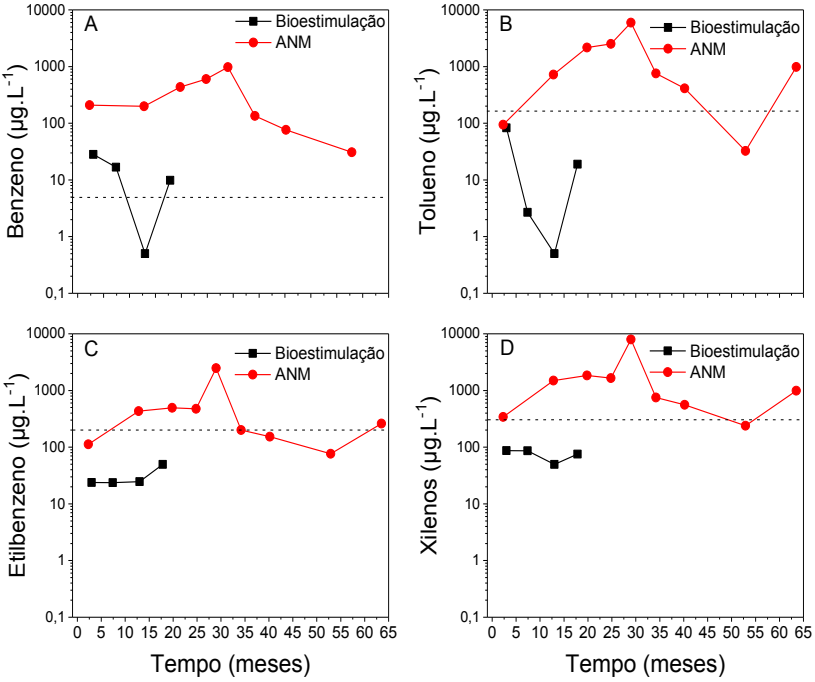
Legenda: A linha tracejada refere-se ao VMP de naftaleno para águas subterrâneas (CETESB, 2014).

A adição do acetato de amônio e de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM resultou no estabelecimento de condições ferro e sulfatorredutoras na água subterrânea após 3 meses, conforme indicado pelo rápido aumento nas concentrações de Fe(II) -metabólito da redução do Fe(III)- (de 0 para 36,5 $mg.L^{-1}$), seguido da diminuição da concentração de sulfato (de 38,8 para 20,6 $mg.L^{-1}$) após 7,4 meses de experimento. Comparativamente, no experimento de ANM, foram observadas concentrações menores de Fe(II) e sulfato (concentrações médias de 8,0 $mg.L^{-1}$ e 2,1 $mg.L^{-1}$, respectivamente (Figura 5.13). Mesmo sendo obtidas concentrações mais elevadas de Fe(II) no experimento de bioestimulação quando comparado à ANM, a

importância do processo de ferrorredução pode estar sendo subestimada no experimento de bioremediação ativa, devido a precipitação do Fe(II) na forma de sulfeto ferroso (ATEKWANA; AAL, 2015; HUANG; KAO, 2016; MADIGAN et al., 2010; MUCCI et al., 2000; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; RODEN; LOVLEY, 1993), uma vez que condições sulfatorredutoras também foram estabelecidas no aquífero.

O fornecimento de receptores de elétrons pela adição de fontes suplementares de Fe(III) e sulfato, além de substrato orgânico prontamente assimilável (acetato de amônio), resultaram em baixas concentrações dissolvidas de hidrocarbonetos aromáticos, quando comparado à ANM. Na ANM as concentrações dissolvidas de hidrocarbonetos aromáticos se mantiveram relativamente elevadas durante os 5,3 anos de monitoramento (máximas concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos e naftaleno foram 974,7; 5966,0; 2474,6; 7947,6 e 121,3 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente), enquanto no experimento de bioestimulação essas concentrações se mantiveram consideravelmente inferiores durante todo o período experimental (máximas concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos e naftaleno foram 28,15; 83,0; 49,6; 86,8 e 10,0 $g.L^{-1}$, respectivamente) (Figuras 5.13 e 5.14). Ainda, no experimento de biorremediação ativa, com exceção do benzeno, os demais hidrocarbonetos aromáticos mantiveram suas concentrações de acordo com as exigências dos órgãos ambientais ao longo de todo monitoramento (BRASIL, 2008; CETESB, 2014), enquanto na ANM, as exigências legais não foram alcançadas mesmo após 5,3 anos, exceto para o naftaleno (Figuras 5.13 e 5.14).

Figura 5.14 Variações das concentrações de benzeno (A), tolueno (B), etilbenzeno (C) e xilenos (D) nos experimentos de bioestimulação e atenuação natural monitorada (ANM) ao longo do tempo



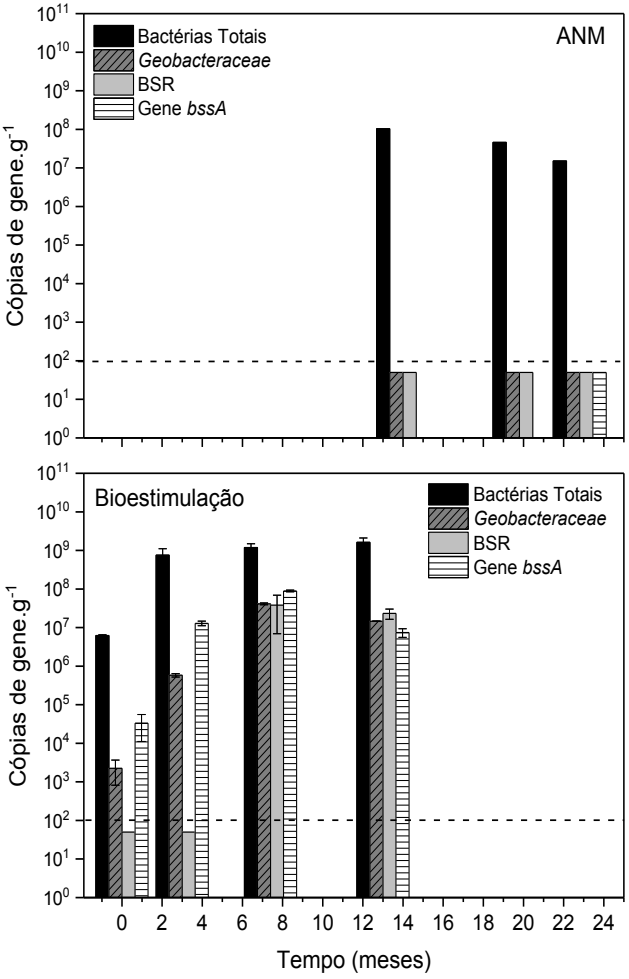
Legenda: As linhas tracejadas referem-se aos VMP para águas subterrâneas destinadas ao consumo humano (BRASIL, 2008).

Em misturas de diesel e biodiesel, o biodiesel pode inibir a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel (BORGES; DIAS; DANKO, 2014; CORSEUIL et al., 2011; YASSINE et al., 2013), o que pode ser explicado pela degradação preferencial do biodiesel em relação aos compostos aromáticos (CHIARANDA, 2011; OWSIANIAK et al., 2009; RAMOS et al., 2016). Portanto, quando ocorre um derramamento de diesel B20 em águas subterrâneas, elevadas concentrações dos compostos aromáticos permanecerão no aquífero até que o volume de biodiesel se esgote (CHIARANDA, 2011). Deste modo, a persistência de elevadas concentrações dissolvidas de hidrocarbonetos aromáticos no experimento de ANM indica que o biodiesel ainda não foi completamente removido do aquífero e, pode estar sendo biodegradado preferencialmente em relação aos hidrocarbonetos aromáticos. Em

contrapartida, as baixas concentrações dissolvidas de hidrocarbonetos aromáticos observadas no experimento de biostimulação quando comparado à ANM, sugerem que houve uma rápida degradação da fração solúvel disponível do biodiesel, possibilitando a remoção dos compostos aromáticos pelos micro-organismos.

A manutenção de baixas concentrações dissolvidas de hidrocarbonetos aromáticos observadas no experimento de bioestimulação coincide com o aumento da biomassa, o crescimento de micro-organismos ferro e sulfatorredutores (*Geobacteraceae* e BSR) e o incremento da concentração do gene catabólico *bssA*, associado à degradação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos (Figura 5.15). Já no experimento de ANM, apesar do aumento da biomassa, esses micro-organismos específicos não foram detectados, mesmo após 23 meses de experimento (Figura 5.15). Portanto, pode-se concluir que, no experimento de biorremediação ativa com acetato de amônio e óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM, o possível retardo da biodegradação dos hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos decorrentes da biodegradação preferencial do biodiesel foi superado devido à estimulação do crescimento de micro-organismos específicos envolvidos na biodegradação de compostos orgânicos via ferro e sulfatorredução, os quais foram responsáveis pela aceleração da degradação do diesel B20, consumindo rapidamente os ésteres metílicos do biodiesel e permitindo a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos do diesel.

Figura 5.15 Concentrações de bactérias totais, *Geobacteraceae*, bactérias sulfatorredutoras (BSR) e gene *bssA* nos experimentos de atenuação natural monitorada e bioestimuação ao longo do tempo



Legenda: A linha tracejada representa o limite de detecção das análises

Com a diminuição da disponibilidade de receptores de elétrons alternativos no experimento de biorremediação ativa, após 13 meses de experimento, a metanogênese passou a ser um processo importante na degradação dos compostos do diesel B20 (concentração de metano igual a 10,68 $mg.L^{-1}$) (Figura 5.13). Da mesma forma, no experimento de

ANM, após transcorridos 12,8 meses, elevadas concentrações de metano foram obtidas na água subterrânea (8,33 $mg.L^{-1}$) (Figura 5.13). Apesar do estabelecimento de condições metanogênicas ter ocorrido no mesmo período experimental em ambos os experimentos, o fornecimento de elétrons alternativos (Fe(III) e sulfato) e de substrato orgânico mais prontamente assimilável (acetato de amônio) estimulou o crescimento de micro-organismos específicos que consumiram rapidamente o biodiesel e portanto, a metanogênese, na biorremediação ativa, está também envolvida na manutenção de baixas concentrações de BTEX e HPA's na água subterrânea. Já na ANM, a permanência de elevadas concentrações dissolvidas de hidrocarbonetos aromáticos ao longo de todo período experimental sugere que a metanogênse está envolvida na degradação de metabólitos secundários da degradação do biodiesel. Porém, após a completa degradação do biodiesel, os micro-organismos estimulados nas condições metanogênicas estabelecidas poderão atuar na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos.

Além do monitoramento das alterações geoquímicas e microbiológicas da água subterrânea, o qual distinguiu os benefícios entre a aplicação do tratamento de bioestimulação e de ANM na zona saturada do aquífero, foram realizadas análises quantitativas de BTEX e HPAs no solo, a fim de avaliar a contribuição do sistema de bioestimulação empregado na remoção dos hidrocarbonetos na fase *LNAPL* (fase livre).

Nesse sentido, assim como para os hidrocarbonetos aromáticos solúveis, a adição de óxidos de ferro recuperados da DAM e acetato de amônio resultou na rápida degradação dos BTEX e HPAs presentes na fase livre, quando comparado à ANM. No experimento de ANM, após 8,3 anos da liberação controlada do diesel B20, foram observadas concentrações de BTEX e HPA totais de 2,46 $mg.kg^{-1}$ e 14,77 $mg.kg^{-1}$, respectivamente; enquanto no experimento de bioestimulação as concentrações de BTEX e HPA totais observadas foram consideravelmente inferiores (0,72 $mg.kg^{-1}$ e 7,25 $mg.kg^{-1}$, respectivamente) transcorridos apenas 2,6 anos do início do experimento. A Tabela 5.8 apresenta as concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos, BTEX, naftaleno e HPA totais, em amostras de solo da região da fonte de contaminação, nos experimentos de atenuação natural monitorada (ANM) e de bioestimulação conjunta de ferro e sulfatorredução. Esses resultados reforçam a afirmação de que as baixas concentrações de BTEX e HPAs dissolvidos observadas no experimento de bioestimulação conjunta de ferro e sulfatorredução se referem à rápida biodegradação dos compostos do diesel B20 e não a

possíveis implicações sobre a dissolução destes compostos na água subterrânea. Além disso, as baixas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos observadas nas amostras de solo no experimento de bioestimulação, quando comparadas ao experimento de ANM, sugerem que os micro-organismos específicos ferro e sulfatorredutores, estimulados pela presença dos produtos de remediação, podem ter degradado também a fase livre do combustível. Portanto, o sistema de bioestimulação empregado se mostrou eficiente tanto para a biodegradação da fase solúvel dos contaminantes presentes na zona saturada, quanto para a fase NAPL, sendo assim, a tecnologia de remediação proposta apresenta-se como uma interessante abordagem de tratamento para ambientes que contenham combustível residual ou para as áreas denominadas zonas de fonte de contaminação.

Tabela 5.8: Concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos, BTEX, naftaleno e HPA totais, em amostras de solo da região da fonte de contaminação, nos experimentos de atenuação natural monitorada (ANM) e de bioestimulação

Variável ($mg.Kg^{-1}$)	Bioestimulação (2,6 anos)	ANM (8,3 anos)
Benzeno	0,004*	0,04
Tolueno	0,29	0,72
Etilbenzeno	0,02	0,02
Xilenos	0,41	1,68
BTEX	0,72	2,46
Naftaleno	0,04	0,38
HPA totais	7,25	14,77

* Refere-se à metade do limite de detecção.

5.4 Sequenciamento do DNA

Com o intuito de obter informações mais detalhadas a respeito da composição e estrutura das comunidades microbianas que podem estar atuando nos processos de oxidação-redução e contribuindo para a rápida biodegradação do diesel B20, foram realizadas análises de sequenciamento genômico das amostras de água subterrânea, ao longo de todo monitoramento do experimento. A Tabela 5.9 apresenta os gêneros dos micro-organismos identificados no sequenciamento genômico e suas características metabólicas associadas.

Tabela 5.9: Características metabólicas associadas aos gêneros de micro-organismos identificados na água subterrânea

Gênero	Filo	Respiração	Substratos	Referências
Rhodoplanes	*Proteobacteria*	Facultativa	Ácidos orgânicos	(HIRAISHI; UEDA, 1994; SRINIVAS; SASIKALA; RAMANA, 2014)
Candidatus koribacter	*Acidobacteria*	Nitrato- e nitritorredução	Açúcares, aminoácidos, álcoois, ácidos orgânicos, quitina, celulose	(WARD et al., 2009)
Alicyclobacillus	*Firmicutes*	Nitrato-, ferro-, tiossulfato e sulfitorredução	Açúcares, álcoois	(IMPERIO; VITI; MARRI, 2008; MIETTINEN et al., 2015)
Staphylococcus	*Firmicutes*	Facultativa	Açúcares	(KLOOS, 1980)
Candidatus solibacter	*Acidobacteria*	Nitrato- e nitritorredução	Açúcares, aminoácidos, álcoois, ácidos orgânicos, quitina, celulose	(WARD et al., 2009)
Fimbriimonas	*Armatimonadetes*	Aeróbia	Peptona, extratos de levedura	(IM et al., 2012)
Planctomyces	*Planctomycetes*	Aeróbia e nitratorredução	Ácidos orgânicos, açúcares	(BAULD; STALEY, 1976; SCHEUNER et al., 2014)
Cupriavidus	*Proteobacteria*	Facultativa aeróbia	Aminoácidos, compostos aromáticos	(LYKIDIS et al., 2010; PÉREZ-PANTOJA et al., 2008; SATO et al., 2006; VANDAMME; COENYE, 2004)

Gênero	Filo	Respiração	Substratos	Referências
Desulfosporosinus	*Firmicutes*	Nitrato-, ferro-, sulfato-tiossulfato- e sulfitorrredução, fermentativa	Açúcares, álcoois, compostos aromáticos	(PESTER et al., 2012; RAMAMOORTHY et al., 2006a; ROBERTSON; FRANZMANN; MEE, 2000)
Pseudomonas	*Proteobacteria*	Facultativa aeróbia	Compostos aromáticos, alcanos, pesticidas orgânicos	(BRUCE et al., 2010; LIMA; PARKER; MEYER, 2012; MA; RIXEY; ALVAREZ, 2013; PESTER et al., 2012; SHIM et al., 2005; ZUO et al., 2015)
Salinispora	*Actinobacteria*	Aeróbia	Açúcares, compostos aromáticos	(KUMAR; KHANNA, 2014; MALDONADO et al., 2005; YERGEAU et al., 2012)
Geobacter	*Proteobacteria*	Ferrorredução	Hidrogênio, ácidos orgânicos, compostos aromáticos, álcoois	(CACCAVO et al., 1994; DORER et al., 2016; LOVLEY et al., 1993; MAHADEVAN et al., 2006)
Propionibacterium	*Actinobacteria*	Fermentativa	Ácidos orgânicos, álcoois, aminoácidos	(EMDE; SCHINK, [s.d.]; LANGSRUD; SORHAUG; VEGARUD, 1995; THIERRY et al., 2011)
Oxobacter	*Firmicutes*	Anaeróbia acetogênica	Ácidos orgânicos, álcoois	(BENGELSDORF et al., 2015)

Gênero	Filo	Respiração	Substratos	Referências
Pelotomaculum	*Firmicutes*	Fermentativa, sulfatorredução	Ácidos graxos, álcoois, compostos monoaromáticos	(ABU LABAN et al., 2009; DE BOK et al., 2005; IMACHI et al., 2002; KLEINSTEUBER et al., 2008; KOSAKA et al., 2008; VOGT; KLEINSTEUBER; RICHNOW, 2011)
Gouta19	*Nitrospirae*	Sulfatorredução	Organoclorados	(ALFREIDER; VOGT; BABEL, 2002)
Candidatus Methanoregula	*Euryarchaeota*	Metanogênica hidrogenotrófica	Hidrogênio, formato	(BRÄUER et al., 2011; YASHIRO et al., 2011)
Desulfotomaculum	*Firmicutes (Clostridia)*	Ferro-, manganês-, sulfato-, tiossulfato-, sulfitorredução, fermentativa	Ácidos orgânicos, alcanos, açúcares, compostos aromáticos, ácidos graxos de cadeia longa	(AÜLLO et al., 2013; IRIANNI-RENNO et al., 2016; KNIEMEYER et al., 2007; MORASCH et al., 2004; PARSHINA et al., 2005; RIOS-HERNANDEZ; GIEG; SUFLITA, 2003; TEBO; OBRAZTSOVA, 1998)
Clostridium	*Firmicutes (Clostridia)*	Fermentativa	Aminoácidos, organoclorados, açúcares, ácidos graxos	(BURRELL et al., 2004; FONKNECHTEN et al., 2010; MACRAE; RAGHU; BAUTISTA, 1969; STIEB; SCHINK, 1985)

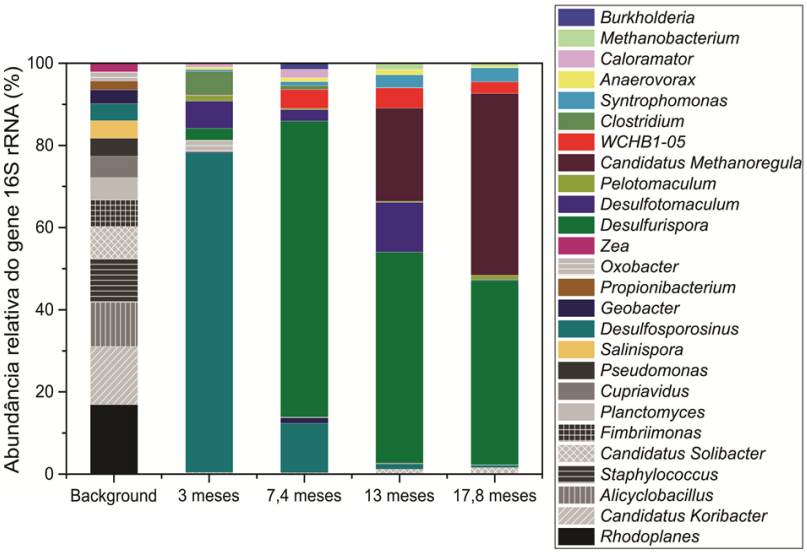
Gênero	Filo	Respiração	Substratos	Referências
Syntrophomonas	*Firmicutes (Clostridia)*	Anaeróbia acetogênica	Ácidos graxos	(MCINERNEY et al., 1981; NARIHIRO et al., 2016; SALVADOR et al., 2015; WU; LIU; DONG, 2006)
Anaerovorax	*Firmicutes (Clostridia)*	Fermentativas	Compostos nitrogenados, aminoácidos	(MATTHIES et al., 2000; VOS et al., 2011)
Caloramator	*Firmicutes*	Ferro-, manganês-, sulforredução, fermentativas	Ácidos orgânicos, aminoácidos, álcoois, açúcares	(CHRISOSTOMOS et al., 1996; OGG; PATEL, 2009; TARLERA et al., 1997)
Methanobacterium	*Euryarchaeota*	Metanogênica hidrogenotrófica	Hidrogênio e formato	(KERN; LINGE; ROTHER, 2015; LUO et al., 2001; WASSERFALLEN et al., 2000; ZEIKUS; WOLFE, 1972)
Burkholderia	*Proteobacteria*	Aeróbia, Nitrato- e nitritorredução	Ácidos orgânicos, compostos aromáticos, alcanos, metil ésteres de ácidos graxos	(AMIN et al., 2010; CHAUHAN; SAMANTA; JAIN, 2000; HAMLIN; BLOODWORTH; CARDONA, 2009; JOHNSON; OLSEN, 1997; KIM et al., 2003)
Desulfurispora	*Firmitutes (Clostridia)*	sulfato- tiossulfato- e sulfitorrredução	Hidrogênio, álcoois, ácidos graxos e açúcares	(KAKSONEN et al., 2007)

As análises das amostras do *background,* realizadas previamente à liberação controlada do diesel B20*,* revelaram uma maior diversidade de comunidades microbianas, quando comparadas às amostras após a liberação do diesel B20 e início do tratamento de bioestimulação ativa, contendo principalmente micro-organismos aeróbios (*Fimbriimonas* spp., *Planctomyces* spp., *Salinispora* spp.) (BAULD; STALEY, 1976; IM et al., 2012; MALDONADO et al., 2005), facultativos aeróbios (*Rhodoplanes* spp., *Staphylococcus* spp., *Cupriavidus* spp., *Pseudomonas* spp.) (BRUCE et al., 2010; HIRAISHI; UEDA, 1994; KLOOS, 1980; LIMA; PARKER; MEYER, 2012; SATO et al., 2006; SHIM et al., 2005; SRINIVAS; SASIKALA; RAMANA, 2014) e nitrato/nitritorredutores (*Candidatus koribacter* spp., *Alicyclobacillus* spp., *Candidatus solibacter* spp., *Planctomyces* spp.) (BAULD; STALEY, 1976; IMPERIO; VITI; MARRI, 2008; MIETTINEN et al., 2015; SCHEUNER et al., 2014; WARD et al., 2009). Após a liberação do B20 e introdução dos produtos de remediação, foi observado um aumento substancial da abundância relativa de alguns micro-organismos nesses períodos amostrais, demonstrando que as presenças dos contaminantes e dos produtos de remediação exerceram uma pressão seletiva sobre a comunidade microbiana, estimulando o crescimento de gêneros específicos que estiveram envolvidos na degradação dos compostos orgânicos (Figuras 5.16 e 5.17). Essa redução da diversidade microbiana e predominância de gêneros específicos já foi observada em outros aquíferos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos (FAHY et al., 2005; ROONEY-VARGA et al., 1999) e misturas de diesel/biodiesel (RAMOS et al., 2014).

Diversos fatores influenciam a heterogeneidade espacial e temporal das comunidades microbianas em aquíferos impactados com contaminantes orgânicos, tais como características físico-químicas, geológicas e climáticas (ALLEN et al., 2007). Dentre este conjunto de fatores, a disponibilidade de receptores de elétrons é um fator crítico na determinação dos micro-organismos dominantes (KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012; PILLONI et al., 2011). Desta forma, as diferentes disponibilidades de receptores de elétrons observadas nos poços de monitoramento ao longo do tempo, resultaram em relações de dominância distintas na composição das comunidades microbianas dos poços fonte e 1,5m da fonte. Além disso, houve uma variação das concentrações dos receptores de elétrons ao longo do tempo. Portanto, para a compreensão da sucessão ecológica ocorrida na área experimental

devido à presença do diesel B20 e dos produtos de remediação, foi realizada a análise dos gêneros microbianos predominantes nos poços fonte e 1,5m da fonte ao longo do tempo e os processos metabólicos aos quais estão associados foram relacionados com as condições geoquímicas prevalescentes no aquífero. As Figuras 5.16 e 5.17 apresentam as variações das comunidades microbianas (em nível de gênero) ao longo do tempo para os poços fonte e 1,5m da fonte, respectivamente. Para a elaboração das figuras foram considerados os micro-organismos com abundância relativa maior ou igual a 1%.

Figura 5.16 Variações das comunidades microbianas (em nível de gênero) no poço fonte ao longo do tempo



No poço fonte, em 3 meses de monitoramento, foi observado o aumento da abundância relativa das bactérias pertencentes à família *Peptococcaceae* (de 1,5 para 73,4% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA), as quais mantiveram-se predominantes nos eventos amostrais subsequentes (abundância relativa de 62,0% e 55,7% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA em 7,4 e 13 meses, respectivamente) (Figura 5.16). As bactérias da família *Peptococcaceae* são sulfatorredutoras, gram-positivas, estritamente anaeróbias e pertencentes ao filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*. Apesar de serem

tipicamente sulfatorredutoras, essas bactérias possuem a capacidade de operar diversas rotas bioquímicas, como fermentação (AÜLLO et al., 2016; IRIANNI-RENNO et al., 2016; KUPPARDT et al., 2014), nitrato (KUPPARDT et al., 2014) e ferrorredução ((KUNAPULI et al., 2010; KUPPARDT et al., 2014) e podem atuar em associações sintróficas com outras bactérias ou arqueas metanogênicas (KLEINSTEUBER et al., 2008; KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012; KUPPARDT et al., 2014; LYKIDIS et al., 2011). Diversos estudos demonstraram o envolvimento dos membros da família *Peptococcaceae* na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (AÜLLO et al., 2016; IRIANNI-RENNO et al., 2016; KLEINSTEUBER et al., 2008; KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012; KUPPARDT et al., 2014; PILLONI et al., 2011).

Embora as bactérias da família *Peptococcaceae* tenham sido predominantes durante todo o período experimental, foi observada uma variação da abundância relativa dos membros desta família presentes no aquífero (*Desulfosporosinus* spp., *Desulfotomaculum* spp. e *Desulfurispora* spp.) ao longo do tempo. Na primeira campanha de monitoramento (3 meses), houve o aumento das espécies do gênero *Desulfosporosinus* (de 0,8 para 55,0% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA), as quais representavam 75% do total de bactérias da família *Peptococcaceae.* As espécies do gênero *Desulfosporosinus* podem utilizar sulfato, sulfito, tiossulfato e Fe(III) como receptores de elétrons (ROBERTSON; FRANZMANN; MEE, 2000) e um amplo espectro de substratos, desde ácidos orgânicos simples até hidrocarbonetos aromáticos (ABU LABAN et al., 2015; PESTER et al., 2012; RAMAMOORTHY et al., 2006b; SUN; SUN; CUPPLES, 2014a). Além disso, esse gênero é comumente encontrado em aquíferos contaminados com petróleo e seus combustíveis derivados (ALLEN et al., 2007b; ROBERTSON; FRANZMANN; MEE, 2000), em águas impactadas com resíduos da atividade de mineração (drenagem ácida de mina) (KÜSEL et al., 2001; PESTER et al., 2012) e em ambientes com baixo pH (PESTER et al., 2012), fatores que justificam sua abundância na fase inicial deste experimento (Figura 5.5).

Concomitantemente ao aumento da abundância relativa das espécies do gênero *Desufosporosinus*, foram observadas mudanças geoquímicas e resultados de análises de qPCR que indicaram a ocorrência dos processos de ferro e sulfatorredução, conforme explicado no ítem 5.2 (Figuras 5.9, 5.10 e 5.11), bem como baixas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos (Figuras 5.6 e 5.7). Estes resultados sugerem que *Desufosporosinus* spp. podem ter sido organismos chave

na degradação do diesel B20 e na manutenção das baixas concentrações de BTEX e HPAs e que diferentes espécies podem ter utilizado tanto o Fe(III) (KUNAPULI et al., 2010; PESTER et al., 2012) como o sulfato (ALLEN et al., 2007b; PESTER et al., 2012; RAMAMOORTHY et al., 2006b; SUN; SUN; CUPPLES, 2014a) como receptores de elétrons para conduzir as reações de biodegradação.

Passados 7,4 meses da liberação controlada do diesel B20 e do início do tratamento de bioestimulação anaeróbia foi observada a diminuição da abundância relativa das *Desufosporosinus* spp. (de 55,0 para 8,5% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA) e o aumento da abundância relativa das bactérias do gênero *Desulfurispora* (de 2,1 para 50,7% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA), as quais representavam 82% do total de micro-organismos da família *Peptococcaceae.* As espécies do gênero *Desulfurispora* são conhecidas como sulfatorredutoras, termofílicas, gram-positivas, formadoras de espóros (KAKSONEN et al., 2007) e sua presença já foi observada em aquífero contaminado com hidrocarbonetos (TISCHER et al., 2013). A predominância do gênero *Desulfurispora,* coincide com a diminuição da concentração de sulfato, sugerindo que estes micro-organismos podem estar fortemente associados a manutenção das baixas concentrações de hidrocarbonetos mono e policíclico aromáticos via sulfatorredução.

Após 13 meses de experimento, os membros da família *Peptococcaceae* (*Desulfosporosinus*, *Desulfotomaculum* e *Desulfurispora*) se mantiveram predominantes (55,7% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA). Neste mesmo período, foi observado o crescimento das arqueas no experimento, sendo o gênero *Methanoregula* o mais abundante neste período (19,3% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA), indicando a ocorrência do processo de metanogênese no aquífero, o que coincide com as mudanças geoquímicas e análises de qPCR que indicam a predominância dos processos de sulfatorredução e metanogênese neste período. A coexistência de bactérias sulfatorredutoras e arqueas metanogênicas em ambientes subterrâneos contaminados por hidrocarbonetos já foi anteriormente observada em outros estudos (AÜLLO et al., 2016; FOWLER et al., 2012, 2014; FOWLER; TOTH; GIEG, 2016) que sugerem a possibilidade de cooperações sintróficas entre estes micro-organismos.

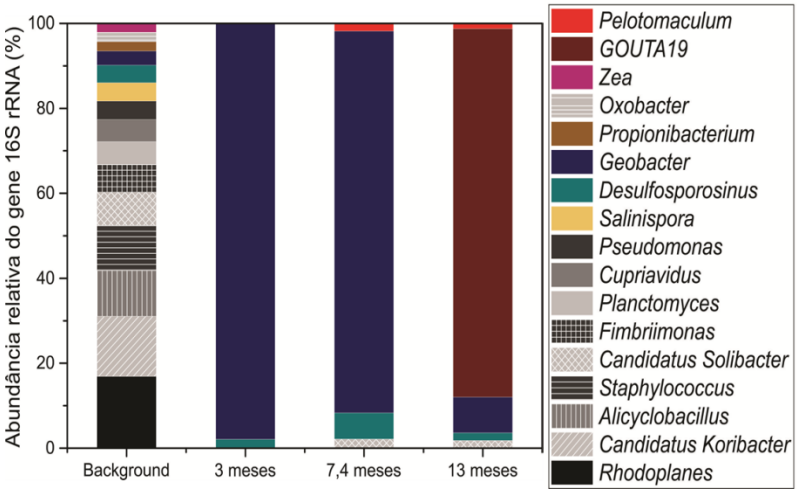
As espécies do gênero *Methanoregula* pertencem à família *Methanoregulaceae*, classe *Methanomicrobia*, filo *Euryarchaeota*. Os membros deste gênero são estritamente anaeróbios, mesofílicos, obrigatóriamente hidrogenotróficos (BRÄUER et al., 2011; YASHIRO

et al., 2011), porém podem também utilizar o formato como substrato para a metanogênese (OREN, 2014) e, são frequentemente encontrados em aquíferos contaminados com compostos aromáticos (DOJKA et al., 1998; FOWLER; TOTH; GIEG, 2016; MACBETH et al., 2004; WATANABE; KODAMA; KAKU, 2002). Seu crescimento pode ser inibido por concentrações significativamente baixas de sulfetos (BRÄUER et al., 2011), assim a estimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução que ocorreram anteriormente ao estabelecimento de condições metanogênicas, pode ter favorecido o crescimento destes micro-organismos, uma vez que evitou a presença de sulfetos no meio por meio da formação do precipitado sulfeto ferroso. Ainda, sabendo que altas concentrações de hidrogênio podem causar inibições termodinânicas ao sistema (DOLFING et al., 2009; KATO; WATANABE, 2010; RAKOCZY et al., 2011), a presença destes micro-organismos hidrogenotróficos pode ter favorecido a completa mineralização dos compostos orgânicos (RAMOS et al., 2014).

Assim como no período de 13 meses após a liberação e início do tratamento de remediação, após transcorridos 17,8 meses de experimento, as mudanças geoquímicas e análises de qPCR indicaram a predominância de micro-organismos sulfatorredutores e de arqueas. Da mesma forma, as análises de sequenciamento revelaram a predominância de micro-organismos tipicamente sulfatorredutores (bactérias pertencentes a família *Peptococcaceae*) e de arqueas metanogênicas (arqueas do gênero *Methanoregula*, representando 93% do total de arqueas). Porém, neste período experimental a metanogênese passou a ser um processo mais significativo, uma vez que foi observada uma redução na abundância relativa de bactérias (de 78,5 para 59,7% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA), sendo que 66.5% do total de bactérias eram pertencentes a família *Peptococcaceae,* e um aumento da abundância relativa de arqueas (de 21,3 para 39,9% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA). Concomitantemente foi observada uma concentração de metano de 15,22 $mg.L^{-1}$ e uma diminuição das BSR em relação aos 13 meses de experimento (de $2{,}33x10^{7}$ para $3{,}9x10^{5}$ cópias de $gene.g^{-1}$), apesar destes micro-organismos terem seu crescimento sustentado (ainda que em concentração inferior aos 17,8 meses) durante todo o experimento. Já a concentração de arqueas manteve-se igualmente estimulada do 13° para o 17,8° mês de experimento (de $1{,}6\ x10^{8}$ para $7{,}22x10^{8}$ cópias de $gene.g^{-1}$), demonstrando a ocorrência de metanogênese nesta etapa do experimento.

Outros micro-organismos com papel importante na rápida degradação do diesel B20 e manutenção de baixas concentrações de BTEX e HPAs no poço fonte foram as bactérias dos gêneros *Desulfotomaculum* (pertencente à família *Peptococcaceae*) e *WCHB1-05*. *Desulfotomaculum* spp. são bactérias anaeróbias, gram-positivas, pertencentes ao filo *Firmicutes*, classe *Clostridia* e família *Peptococcaceae*, que são conhecidas pela sua versatilidade metabólica demonstrada pela capacidade de respirar em condições sulfato, sulfito e ferrorredutoras (AÜLLO et al., 2016), fermentativas (IRIANNI-RENNO et al., 2016) e estabelecer associações sintróficas com outras bactérias ou arqueas metanogênicas (TAN et al., 2015). Membros do gênero *Desulfotomaculum* apresentam a capacidade de degradar ácidos orgânicos de cadeia longa (AGCL) (AÜLLO et al., 2013) e hidrocarbonetos aromáticos(ABU LABAN et al., 2015; AÜLLO et al., 2016; KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012; MORASCH et al., 2004; PARSHINA et al., 2005; WASHER; EDWARDS, 2007). Já em 3 meses de experimento foi observado um aumento na abundância relativa das *Desulfotomaculum* spp. (de 0 para 4,6% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA), a qual pode estar relacionada com a degradação dos AGCL ou hidrocarbonetos aromáticos via ferro ou sulfatorredução. Após 7,4 meses, a abundância relativa destas bactérias diminuiu para 2,0% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA e, passados 13 meses de experimento, aumentou para 10,3% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA. Sabendo que as espécies do gênero *Desulfotomaculum* apresentam a capacidade de atuar em associações sintróficas com arqueas metanogênicas (TAN et al., 2015) e considerando o crescimento das arqueas do gênero *Methanoregula* neste mesmo período amostral, estes resultados sugerem que estes micro-organimos podem estar atuando cooperações sintróficas na biodegradação dos contaminantes. Por fim, as bactérias do gênero *WCHB1-05*, pertencentes ao filo *Cloroflexi,* classe *Anaerolineae*, família *Anaerolinaceae*, são micro-organismos que já foram encontrados em aquíferos contaminados por hidrocarbonetos (ALLEN et al., 2007a; DOJKA et al., 1998) e em áreas de cultivo de arroz contaminados com DAM (SUN et al., 2015). A presença destes micro-organismos em ambientes com elevadas concentrações de sulfato sugere que estes podem atuar em condições sulfatorredutoras.

Figura 5.17 Variações das comunidades microbianas (em nível de gênero) no poço localizado a 1,5m da fonte ao longo do tempo



A realização das análises de sequenciamento de DNA possui como pré-requisito a utilização de amostras que contenham concentrações significativas de DNA (RAMOS, 2013). Como a amostra do poço 1,5m, na coleta 4 (referente a 17,8 meses de monitoramento), não continha uma quantidade suficiente de DNA, o que pode ter ocorrido devido a desnaturação do DNA durante o transporte ao laboratório na França, não foi possível realizar o sequenciamento genômico para este período amostral.

No poço localizado a 1,5m da fonte, em 3 meses de monitoramento, foi observado o elevado aumento da abundância relativa das bactérias do gênero *Geobacter* (de 0,6 para 90,6% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA) (Figura 5.17). Os membros do gênero *Geobacter* são bactérias anaeróbias, ferrorredutoras, pertencentes ao filo *Proteobacteria*, classe *Deltaproteobacteria* e família *Geobacteraceae*. Espécies do gênero *Geobacter* foram anteriormente descritas como predominantes em ambientes subsuperficiais em condições ferrorredutoras (ANDERSON et al., 1998; BOTTON et al., 2007; LIN; WESTERHOFF; RÖLING, 2009) e estas apresentam a capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos via ferrorredução (ANDERSON et al., 1998; BOTTON et al., 2007; LI et al., 2014; LOVLEY; LONERGAN, 1990; ZHANG et al., 2012). A predominância do gênero *Geobacter*, o aumento da produção de Fe(II) e a diminuição da concentração de Fe(III) (Figuras 5.17 e 5.10) observados até 7,4

meses de experimento, juntamente à manutenção de baixas concentrações de BTEX e HPAs obtidas ao longo de todo experimento, indicam que as espécies do gênero *Geobacter* foram micro-organismos chave envolvidos na biodegradação dos hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos via ferrorredução. Além disso, sabendo que em misturas de diesel/biodiesel o biodiesel é preferencialmente degradado em relação aos hidrocarbonetos aromáticos do diesel (CHIARANDA, 2011; OWSIANIAK et al., 2009; RAMOS et al., 2016), estes resultados sugerem que *Geobacter* spp. podem estar envolvidas na degradação dos metil ésteres de ácido graxo e/ou ácidos graxos de cadeia longa.

Embora as bactérias do gênero *Geobacter* possam mineralizar hidrocarbonetos aromáticos, sua elevada afinidade por acetato indica que podem também estar ligadas ao consumo desse subproduto de degradação (KLEINSTEUBER; SCHLEINITZ; VOGT, 2012). Neste sentido, estudos demonstraram o crescimento de *Geobacter* spp. em aquíferos contaminados por compostos orgânicos distintos e bioestimulados com acetato (LIVERMORE et al., 2013; RAMOS et al., 2013). Da mesma forma, a bioestimulação com acetato de amônio e o produto recuperado do tratamento da DAM tinha como objetivo a estimulação do crescimento das bactérias do gênero *Geobacter*, as quais foram majoritariamente preponderantes até 7,4 meses de experimento.

Transcorridos 13 meses de experimento, com a diminuição do Fe(III) disponível no poço localizado a 1,5m da fonte, condições sulfatorredutoras foram estabelecidas na água subterrânea e as bactérias do gênero *GOUTA19* passaram a ser as mais abundantes, representando 59,6% do total de micro-organismos do gene 16S rRNA. *GOUTA19* spp. são batérias pertencentes ao filo *Nitrospira*, classe *Nitrospira* e família *Thermodesulfovibrionaceae*. Embora a presença destas bactérias já tenha sido previamente documentada em plantações de arroz contaminadas por DAM (SUN et al., 2015), em uma cavidade de armazenamento de petróleo (WATANABE; KODAMA; KAKU, 2002), em um sistema de rotação de culturas de arroz e alfafa (LOPES; MANAIA; NUNES, 2014) e em reatores contendo águas subterrâneas contaminadas com monoclorobenzeno (ALFREIDER; VOGT; BABEL, 2002), este é o primeiro experimento que apresenta a *GOUTA19* como um potencial organismo chave na degradação de hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos. Além disso, estudos demonstram que as bactérias da família *Thermodesulfovibrionaceae* possuem a capacidade de respirar utilizando sulfato como receptor de elétrons (RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; SUN et al., 2015). Assim, a predominância do gênero *GOUTA19*, o consumo de sulfato e as baixas concentrações

de hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos, sugerem que estas bactérias estejam também envolvidas na biodegradação dos BTEX e HPAs via sulfatorredução. Além dos gêneros *Geobacter* e *GOUTA19*, bactérias das espécies do gênero *Desulfuporosinus* também foram abundantes no poço localizado a 1,5m da fonte. Assim como discutido anteriormente para o poço fonte, estes micro-organismos podem estar envolvidos na degradação dos contaminantes via ferro e sulfatorredução, uma vez que estiveram presentes ao longo de todo monitoramento.

Em resumo, a presença do diesel B20 e dos produtos de remediação exerceram uma pressão seletiva sobre a comunidade microbiana, estimulando o crescimento de gêneros específicos que estiveram envolvidos na degradação dos compostos orgânicos. As variações nas concentrações de receptores de elétrons (Fe(III) e sulfato) observadas nos poços da região da fonte (poço fonte e poço localizado a 1,5m da fonte) resultaram na predominância de diferentes comunidades microbianas em cada poço de monitoramento. Assim, os principais micro-organismos envolvidos na rápida biodegradação do biodiesel e na manutenção de baixas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos, no poço fonte, até 7,4 meses de experimento, foram as bactérias da família *Peptococcaceae* (*Desulfosporosinus* spp., *Desulfotomaculum* spp. e *Desulfurispora* spp.), as quais atuaram na biodegradação dos contaminates via ferro e sulfatorredução. Transcorridos 13 meses, apesar da manutenção da elevada abundância relativa dos micro-organismos da família *Peptococcaceae,* foi observado o crescimento de arqueas do gênero *Methanoregula*. A coexistência de micro-organismos tipicamente sulfatorredutores pertencentes à família *Peptococcaceae* (como, por exemplo, as espécies do gênero *Desulfotomaculum*) e arqueas metanogênicas sugere a possibilidade de cooperações sintróficas entre estes micro-organismos. Já no poço localizado a 1,5m da fonte, os micro-organismos chave responsáveis pela rápida degradação do diesel B20, até 7,4 meses, foram as bactérias do gênero *Geobacter* e, após este período, os micro-organismos do gênero *GOUTA19*; os quais atuaram na biodegradação dos compostos orgânicos via ferro e sulfatorredução, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foi avaliado o potencial da bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução na recuperação de águas subterrâneas impactadas por misturas de diesel/biodiesel (diesel B20), por meio da adição de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM e acetato de amônio. Baseando-se nos resultados e discussões aqui apresentados, as seguintes conclusões foram formuladas:

- A introdução de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM em água subterrânea impactada com diesel B20 resultou no fornecimento de receptores de elétrons alternativos, os quais repercutiram no estabelecimento de condições ferro e sulfatorredutoras. Já na primeira campanha de monitoramento, elevadas concentrações de Fe(III) e sulfato foram observadas quando comparadas ao *background*, o que indica que o produto é uma eficiente fonte alternativa de óxido-hidróxido de ferro (Fe(III)) e sulfato. Como consequência, foi observado o aumento das concentrações de Fe(II), metabólito da ferrorredução, e aumento das concentração de micro-organimos específicos envolvidos nos processos de ferro e sulfatorredução. Assim, o uso deste produto na remediação de águas subterrâneas representa uma solução sustentável para recuperação de áreas impactadas por misturas de biocombustíveis e derivados de petróleo.
- A adição de acetato de amônio como substrato prontamente assimilável pelos micro-organimos, juntamente com o fornecimento de receptores de elétrons alternativos (óxido-hidróxido de ferro e sulfato), em água subterrânea contaminada com diesel B20 estimulou o rápido crescimento de micro-organismos específicos capazes de oxidar o biodiesel e os hidrocarbonetos aromáticos do diesel via ferro e sulfatorredução.
- A bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução acelerou a biodegradação do diesel B20, resultando em baixas concentrações dissolvidas de BTEX e HPAs ao longo de todo período experimental, quando comparada à atenuação natural monitorada (ANM). Como resultado, transcorrido apenas 1 ano desde o inicio da liberação controlada do combustível, as concentrações de tolueno, etilbenzeno, xilenos e naftaleno estavam de acordo com as exigências dos órgãos ambientais no experimento de bioestimulação ativa, enquanto na ANM, as exigências legais não foram alcançadas mesmo após 5,3 anos, exceto para o naftaleno.

- Além dos benefícios observados na zona saturada do aquífero, a adição de óxidos de ferro recuperados da DAM e acetato de amônio acelerou a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos presentes na fase *NAPL* (fase livre), quando comparado à ANM. Assim, resultados das análises da concentração de BTEX e HPAs em amostra de solo, na região da fonte de contaminação, mostraram que no experimento de ANM, passados mais de 8 anos da liberação controlada do diesel B20, as concentrações de hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos eram 2 a 3 vezes mais elevadas que no experimento de bioestimulação, após apenas 2,6 anos.
- Os principais micro-organismos envolvidos na rápida biodegradação do biodiesel e na manutenção de baixas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos, no poço fonte, foram as bactérias da família *Peptococcaceae* (gêneros: *Desulfosporosinus* spp., *Desulfotomaculum* spp. e *Desulfurispora* spp.), conjuntamente à arquea *Methanoregula* spp., após 13 meses de experimento; enquanto no poço localizado a 1,5m da fonte, os micro-organismos chave responsáveis pela rápida degradação do diesel B20 foram as bactérias dos gêneros *Geobacter* e *GOUTA19*.

As conclusões apresentadas demonstram que a hipótese formulada nesta tese foi confirmada, visto que adição de óxidos de ferro recuperados do tratamento da DAM e acetato de amônio em águas subterrâneas impactadas com diesel B20 estimularam o estabelecimento de condições ferro e sulfatorredutoras no ambiente subsuperficial, o que resultou na rápida biodegradação do biodiesel e acelerou a biodegradação dos hidrocabonetos aromáticos, culminando em baixas concentrações dissolvidas de BTEX e HPAs ao longo de todo período experimental. Portanto, a aplicação do produto recuperado do tratamento da DAM e acetato de amônio, com o intuito de promover a bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução, é uma abordagem adequada para a remediação de águas subterrâneas contaminadas com diesel B20, promovendo a rápida biodegradação dos contaminantes por meio do uso de um produto sustentável e de baixo custo.

7. RECOMENDAÇÕES

A partir das conclusões obtidas neste estudo, recomenda-se:

- A continuidade do monitoramento do experimento de campo a fim de acompanhar as mudanças geoquímicas e microbiológicas ocorridas até a completa atenuação dos hidrocarbonetos aromáticos presentes no diesel B20;
- A realização de análises de sequenciamento de DNA microbiano no experimento de atenuação natural monitorada com o intuito de comparar os principais micro-organismos envolvidos na biodegradação natural do diesel B20 e os micro-organismos responsáveis pela rápida degradação do diesel B20 na bioestimulação conjunta dos processos de ferro e sulfatorredução;
- A execução de análises transcriptômicas, com o objetivo de determinar os genes expressos ao longo do experimento, podendo assim avaliar as funções metabólicas que foram efetivamente desempenhadas pelos micro-organismos envolvidos na biodegradação do diesel B20;
- A execução de análises metabolômicas, com o objetivo de determinar as rotas de degradação operadas pelos micro-organismos envolvidos na biodegradação do diesel B20;
- A realização de ensaios de toxicidade aguda, com o intuito de avaliar os efeitos sinérgicos da ação dos contaminantes sobre organismos aquáticos, bem como o comportamento da variável toxicidade aguda ao longo do tempo;
- A avaliação dos produtos secundários formados durante os processos de ferro e sulfatorredução, a fim de obter informações mais detalhadas sobre as transformações geoquímicas ocorridas no aquífero por meio da bioestimulação combinada dos processos de ferro e sulfatorredução.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 7181: Solos – Análise Granulométrica**. Rio de Janeiro, 1984. 13p.

ABU LABAN, N. et al. Anaerobic benzene degradation by Gram-positive sulfate-reducing bacteria. **FEMS microbiology ecology**, v. 68, n. 3, p. 300–311, 2009.

ABU LABAN, N. et al. Identification of enzymes involved in anaerobic benzene degradation by a strictly anaerobic iron-reducing enrichment culture. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 2783–2796, 2010.

ABU LABAN, N. et al. Draft Genome Sequence of Uncultivated *Desulfosporosinus* sp. Strain Tol-M, Obtained by Stable Isotope Probing Using [13C6]Toluene. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, 2015.

AKCIL, A.; KOLDAS, S. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. **Journal of Cleaner Production**, Improving Environmental, Economic and Ethical Performance in the Mining Industry. Part 2. Life cycle and process analysis and technical issuesImproving Environmental, Economic and Ethical Performance in the Mining Industry. Part 2. Life cycle and process analysis and technical issues. v. 14, n. 12–13, p. 1139–1145, 2006.

AKTAS, D. F. et al. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 2924–2928, 2010.

ALFREIDER, A.; VOGT, C.; BABEL, W. Microbial diversity in an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 232–240, 2002.

ALLEN, J. P. et al. The Microbial Community Structure in Petroleum-Contaminated Sediments Corresponds to Geophysical Signatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2860–2870, 2007.

ALMEIDA, P. S. R.; SADDI, V. A. Monitoring minimal residual disease in chronic myeloid leukemia by real time PCR. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 382–386, 2007.

ALVAREZ, P.J.A.; PÉREZ, E.G. **Biorremediación y atenuación natural de acuíferos contaminados por sustancias químicas peligrosas**. Valencia: Consejo del Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad de Carabobo, 2003.

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

AMIN, A. et al. Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 206–212, 2010.

ANDERSEN, S. L. F. et al. Synthesis and Characterization of Acicular Iron Oxide Particles Obtained from Acid Mine Drainage and Their Catalytic Properties in Toluene Oxidation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 2, p. 767–774, 2012.

ANDERSON, J. W. et al. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. **Marine Biology**, v. 27, n. 1, p. 75–88, 1974.

ANDERSON, R. T. et al. Anaerobic Benzene Oxidation in the Fe(III) Reduction Zone of Petroleum-Contaminated Aquifers. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 9, p. 1222–1229, 1998.

ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; MECKENSTOCK, R. U. Identical Ring Cleavage Products during Anaerobic Degradation of Naphthalene, 2-Methylnaphthalene, and Tetralin Indicate a New Metabolic Pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 852–858, 2002.

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (BRASIL). **Anuário Estatístico Brasileiro do**

Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2016. Rio de Janeiro: ANP, 2016. 264 p.

ANSCHUTZ, A. J.; PENN, R. L. Reduction of crystalline iron(III) oxyhydroxides using hydroquinone: Influence of phase and particle size. **Geochemical Transactions**, v. 6, n. 3, p. 60, 2005.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALT ASSOCIANTION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. Washington, DC: 1998.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. **E1739-95. Standard Guide for Risk-Based Corrective Action Applied at Petroleum Release Sites.** Philadelphia, 1995.

ATEKWANA, E. A.; AAL, G. Z. A. Iron biomineralization controls on geophysical signatures of hydrocarbon contaminated sediments. **Journal of Earth Science**, v. 26, n. 6, p. 835–843, 2015.

AÜLLO, T. et al. *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.

AÜLLO, T. et al. New Bio-Indicators for Long Term Natural Attenuation of Monoaromatic Compounds in Deep Terrestrial Aquifers. **Microbiotechnology, Ecotoxicology and Bioremediation**, p. 122, 2016.

AZAM, H. M.; FINNERAN, K. T. Ferric iron amendment increases Fe(III)-reducing microbial diversity and carbon oxidation in on-site wastewater systems. **Chemosphere**, v. 90, n. 4, p. 1435–1443, 2013.

BARLETT, M. et al. Integrative analysis of *Geobacter* spp. and sulfate-reducing bacteria during uranium bioremediation. **Biogeosciences**, v. 9, n. 3, p. 1033–1040, 2012.

BARTON, L. L.; FAUQUE, G. D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 68, p. 41–98, 2009.

BAULD, J.; STALEY, J. T. *Planctomyces maris* sp. nov.: a Marine Isolate of the *Planctomyces-Blastocaulis* Group of Budding Bacteria. **Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 45–55, 1976.

BEEMAN, R. E.; BLECKMANN, C. A. Sequential anaerobic-aerobic treatment of an aquifer contaminated by halogenated organics: field results. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 57, n. 3–4, p. 147–159, 2002.

BEEMAN, R. E.; SUFLITA, J. M. Environmental factors influencing methanogenesis in a shallow anoxic aquifer: a field and laboratory study. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 45–57, 1990.

BELLER, H. R. et al. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1188–1196, 1996.

BELLER, H. R. et al. 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, 2002.

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, 1997.

BENGELSDORF, F. R. et al. Genome Sequence of the Acetogenic Bacterium *Oxobacter pfennigii* DSM 3222T. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, 2015.

BERTRAND, G. et al. Groundwater contamination in coastal urban areas: Anthropogenic pressure and natural attenuation processes. Example of Recife (PE State, NE Brazil). **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 192, p. 165–180, 2016.

BOMBACH, P. et al. Enrichment and characterization of a sulfate-reducing toluene-degrading microbial consortium by combining in situ microcosms and stable isotope probing techniques. **FEMS microbiology ecology**, v. 71, n. 2, p. 237–246, 2010.

BONNEVILLE, S.; BEHRENDS, T.; VAN CAPPELLEN, P. Solubility and dissimilatory reduction kinetics of iron(III) oxyhydroxides: A linear free energy relationship. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 73, n. 18, p. 5273–5282, 2009.

BORGES, J. M.; DIAS, J. M.; DANKO, A. S. Influence of the Anaerobic Biodegradation of Different Types of Biodiesel on the Natural Attenuation of Benzene. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 10, p. 1–10, 2014.

BOSCH, J. et al. Nanosized iron oxide colloids strongly enhance microbial iron reduction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 184–189, 2010[a].

BOSCH, J. et al. Nanosized Ferrihydrite Colloids Facilitate Microbial Iron Reduction under Flow Conditions. **Geomicrobiology Journal**, v. 27, n. 2, p. 123–129, 2010[b].

BOTTON, S. et al. Dominance of *Geobacteraceae* in BTX-degrading enrichments from an iron-reducing aquifer. **FEMS microbiology ecology**, v. 62, n. 1, p. 118–130, 2007.

BOZINOVSKI, D. et al. Metaproteogenomic analysis of a sulfate-reducing enrichment culture reveals genomic organization of key enzymes in the m-xylene degradation pathway and metabolic activity of proteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 488–501, 2014.

BRADLEY, P. M.; CHAPELLE, F. H. Rapid Toluene Mineralization by Aquifer Microorganisms at Adak, Alaska: Implications for Intrinsic Bioremediation in Cold Environments. **Environmental Science & Technology**, v. 29, n. 11, p. 2778–2781, 1995.

BRASIL, CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº 396, de 03 de abril de 2008.** Dispõe sobre a classifcação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 7 de abril de 2008.

BRASIL. **Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005**. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis n°s 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. Presidência da República, Casa Civil, Sub Chefia para Assuntos Jurídicos, 2005.

BRASIL. **Lei n. 13.263, de 23 de março de 2016**. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Presidência da República, Casa Civil, Sub Chefia para Assuntos Jurídicos, 2016.

BRÄUER, S. L. et al. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n.1, p. 45–52, 2011.

BRAUNSCHWEIG, J.; BOSCH, J.; MECKENSTOCK, R. U. Iron oxide nanoparticles in geomicrobiology: from biogeochemistry to bioremediation. **New Biotechnology**, Biotechnology for the Bio and Green Economy. v. 30, n. 6, p. 793–802, 2013.

BRUCE, T. et al. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 840–849, 2010.

BRUTINEL, E. D.; GRALNICK, J. A. Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 41–48, 2012.

BURRELL, P. C. et al. Identification, Detection, and Spatial Resolution of *Clostridium* Populations Responsible for Cellulose Degradation in a Methanogenic Landfill Leachate Bioreactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2414–2419, 2004.

CACCAVO, F. et al. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3752–3759, 1994.

CACCAVO, F. et al. *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 6, p. 370–376, 1996.

CALLAGHAN, A. V. et al. Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 19, p. 7287–7294, 2010.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CARMONA, M. et al. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 73, n. 1, p. 71–133, 2009.

CETESB. Companhia Ambiental Do Estado De São Paulo. **Decisão de Diretoria 045: Valores orientadores para solo e água subterrânea no estado de São Paulo.** Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 21 de fevereiro de 2014.

CHANG, W.; UM, Y.; HOLOMAN, T. R. P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation Coupled to Methanogenesis. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 6, p. 425–430, 2006.

CHAPELLE, F.H. **Ground-water microbiology and geochemistry**. New York: Wiley, 2ª ed. New York: Wiley, 2001. 477 p.

CHAUHAN, A.; SAMANTA, S. K.; JAIN, R. K. Degradation of 4-nitrocatechol by *Burkholderia cepacia*: a plasmid-encoded novel pathway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 5, p. 764–772, 2000.

CHENG, S. et al. Efficient recovery of nano-sized iron oxide particles from synthetic acid-mine drainage (AMD) water using fuel cell technologies. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 303–307, 2011.

CHIARANDA, H. S. **Alterações Biogeoquímicas em Águas Subterrâneas Impactadas por Biodiesel de Soja e Misturas de Diesel/Biodiesel (B20).** Tese apresentada ao programa de Pós-

Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011. 221p.

CHRISOSTOMOS, S. et al. *Caloramator indicus* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from the deep-seated nonvolcanically heated waters of an Indian artesian aquifer. **Int J Syst Bacteriol**, p. 447–501, 1996.

COATES, J. D. et al. *Desulfuromonas palmitatis* sp. nov., a marine dissimilatory Fe(III) reducer that can oxidize long-chain fatty acids. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 6, p. 406–413, 1995.

COATES, J. D. et al. Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1531–1536, 1996.

COATES, J. D. et al. Carbohydrate oxidation coupled to Fe(III) reduction, a novel form of anaerobic metabolism. **Anaerobe**, v. 4, n. 6, p. 277–282, 1998.

COATES, J. D. et al. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49 n. 4, p. 1615–1622, 1999.

COATES, J. D.; CHAKRABORTY, R.; MCINERNEY, M. J. Anaerobic benzene biodegradation - a new era. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 621–628, 2002.

CORD-RUWISCH, R.; LOVLEY, D. R.; SCHINK, B. Growth of *Geobacter sulfurreducens* with Acetate in Syntrophic Cooperation with Hydrogen-Oxidizing Anaerobic Partners. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2232–2236, 1998.

CORSEUIL, H. X. et al. Biodegradation of Soybean and Castor Oil Biodiesel: Implications on the Natural Attenuation of Monoaromatic Hydrocarbons in Groundwater. **Ground Water Monitoring & Remediation**, v. 31, n. 3, p. 111–118, 2011.

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

DA 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**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4720-4726, 2004.

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

DARNOKO, D.; CHERYAN, M. Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 12, p. 1263–1267, 2000.

DE BOK, F. A. M. et al. The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1697–1703, 2005.

DE CARVALHO, C. M. **A expansão sustentável do cultivo da palma para a produção de biodiesel no Brasil: o caso do estado do Pará.** Tese apresentada ao programa de planejamento energético (COPPE). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2015. 105p.

DEMELLO, J. A. et al. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 7, p. 894–904, 2007.

DOJKA, M. A. et al. Microbial Diversity in a Hydrocarbon- and Chlorinated-Solvent-Contaminated Aquifer Undergoing Intrinsic Bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3869–3877, 1998.

DOLFING, J. et al. The thermodynamic landscape of methanogenic PAH degradation. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 566–574, 2009.

DORER, C. et al. Characterization of toluene and ethylbenzene biodegradation under nitrate-, iron(III)- and manganese(IV)-reducing conditions by compound-specific isotope analysis. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 211, p. 271–281, 2016.

EBERLEIN, C. et al. Identification and characterization of 2-naphthoyl-coenzyme A reductase, the prototype of a novel class of dearomatizing reductases. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 5, p. 1032–1039, 2013.

EDWARDS, E. A. et al. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 794–800, 1992.

EHC. ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA. EHC N°.171. **Diesel Fuel and Exhaust Emissions.** World Health Organization, Geneva. 1996.

EMDE, R.; SCHINK, B. Oxidation of glycerol, lactate, and propionate by *Propionibacterium freudenreichii* in a poised-potential amperometric culture system. **Archives of Microbiology**, v. 153, n. 5, p. 506–512, 1990.

FAHY, A. et al. Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1192–1199, ago. 2005.

FEITOSA, F. A. C.; MANOEL FILHO, JOÃO; FEITOSA, E. C.; DEMETRIO, J. G. A. **Hidrogeologia: Conceitos e Aplicações**. 3° ed. Rio de Janeiro: CPRM: LABHID, 2008. 812 p.

FENCHEL, T.; KING, G. M; BLACKBURN, T. H. **Bacterial Biogeochemistry.** Academic Press: London, 1998.

FERNANDES, M. **Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina.** Florianópolis. Tese de

Doutorado em Química – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002. 190p.

FETTER, C.W. **Applied hydrogeology**. 3rd ed. New York: Macmillan, 1994. 691 p.

FLORES, R. G. et al. Recovery of iron oxides from acid mine drainage and their application as adsorbent or catalyst. **Journal of Environmental Management**, v. 111, p. 53–60, 2012.

FONKNECHTEN, N. et al. *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation:revisiting its metabolism through its genome sequence. **BMC Genomics**, v. 11, p. 555, 2010.

FOWLER, S. J. et al. Methanogenic toluene metabolism: community structure and intermediates. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 754–764, 2012.

FOWLER, S. J. et al. Identification of toluene degraders in a methanogenic enrichment culture. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 89, n. 3, p. 625–636, 2014.

FOWLER, S. J.; TOTH, C. R. A.; GIEG, L. M. Community Structure in Methanogenic Enrichments Provides Insight into Syntrophic Interactions in Hydrocarbon-Impacted Environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

FREDRICKSON, J. K. et al. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 62, n. 19–20, p. 3239–3257, 1998.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 803–816, 2011.

GARCÍA-BALBOA, C. et al. Successive Ferric and Sulphate Reduction using Dissimilatory Bacterial Cultures. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 207, n. 1–4, p. 213–226, 2009.

GIHRING, T. M. et al. A Limited Microbial Consortium Is Responsible for Extended Bioreduction of Uranium in a Contaminated Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5955–5965, 2011.

GILBERT, B.; BANFIELD, J. F. Molecular-Scale Processes Involving Nanoparticulate Minerals in Biogeochemical Systems. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 59, n. 1, p. 109–155, 2005.

GILBERT, R. O. **Statistical Methods for Environmental Pollution Monitoring**. John Wiley & Sons, Inc: NY, 336p., 1987.

GOMES, A. P. N. **Biodegradação de Biodiesel Soja, Mamona e Hidrocarbonetos Monoaromáticos em Ambientes Aquáticos.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008. 89 p.

GORBY, Y. A. et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11358–11363, 2006.

GRBIĆ-GALIĆ, D.; VOGEL, T. M. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 254–260, 1987.

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

GUJER, W.; ZEHNDER, A. J. B. Conversion Processes in Anaerobic Digestion. **Water Science and Technology**, v. 15, n. 8–9, p. 127–167, 1983.

HAMJE, H. D. C. et al. **EU renewable energy targets in 2020: Revised analysis of scenarios for transport fuels.** European Commission, Joint Research Centre, Institute for Energy and Transport, Report EUR 26581 EN, 94p., 2013.

HAMLIN, J. N.; BLOODWORTH, R. A.; CARDONA, S. T. Regulation of phenylacetic acid degradation genes of *Burkholderia cenocepacia* K56-2. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 222, 2009.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 1–15, 2009.

HARMS, G. et al. Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 999–1004, 1999.

HEIDER, J. Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 188–194, 2007.

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

HEIDRICH, S.; WEISS, H.; KASCHL, A. Attenuation reactions in a multiple contaminated aquifer in Bitterfeld (Germany). **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 129, n. 2, p. 277–288, 2004.

HERNANDEZ, M. E.; KAPPLER, A.; NEWMAN, D. K. Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 921–928, 2004.

HIGASHIOKA, Y.; KOJIMA, H.; FUKUI, M. Isolation and characterization of novel sulfate-reducing bacterium capable of anaerobic degradation of p-xylene. **Microbes and environments / JSME**, v. 27, n. 3, p. 273–277, 2012.

HIRAISHI, A.; UEDA, Y. *Rhodoplanes* gen. nov., a New Genus of Phototrophic Bacteria Including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 665–673, 1994.

HOFFERT, J. R. Acid Mine Drainage. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 642–646, 1947.

HOLLEBONE, B. P. et al. Aqueous solubility, dispersibility and toxicity of biodiesels. **International Oil Spill Conference Proceedings**, v. 2008, n. 1, p. 929–936, 2008.

HOLMES, D. E. et al. Anaerobic oxidation of benzene by the hyperthermophilic archaeon *Ferroglobus placidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5926–5933, 2011.

HUANG, W. H.; KAO, C. M. Bioremediation of Petroleum-Hydrocarbon Contaminated Groundwater under Sulfate-Reducing Conditions: Effectiveness and Mechanism Study. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, n. 3, p. 4015089, 2016.

IM, W.-T. et al. Description of *Fimbriimonas ginsengisoli* gen. nov., sp. nov. within the *Fimbriimonadia* class nov., of the phylum *Armatimonadetes*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 2, p. 307–317, 2012.

IMACHI, H. et al. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. Pt 5, p. 1729–1735, 2002.

IMPERIO, T.; VITI, C.; MARRI, L. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. Pt 1, p. 221–225, 2008.

IRIANNI-RENNO, M. et al. Comparison of bacterial and archaeal communities in depth-resolved zones in an LNAPL body. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3347–3360, 2016.

JARAMILLO, I. R. **Fundamentos Teóricos-Práticos de temas selectos de La Ciência del Suelo. Parte 1.** Universidad Autónoma Metropolitana, México, 1996.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. Acid mine drainage remediation options: a review. **Science of The Total Environment**, Bioremediation of Acid Mine Drainage: The Wheal Jane Mine Wetlands Project. v. 338, n. 1–2, p. 3–14, 2005.

JOHNSON, G. R.; OLSEN, R. H. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 4047–4052, 1997.

JONES, D. M. et al. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 176–180, 2008.

JOZWIAK, W. K. et al. Reduction behavior of iron oxides in hydrogen and carbon monoxide atmospheres. **Applied Catalysis A: General**, v. 326, n. 1, p. 17–27, 2007.

KAIPPER, B. I. A. **Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel**. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química – Departamento de Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003. 179p.

KAKSONEN, A. H. et al. *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. Pt 5, p. 1089–1094, 2007.

KALYUZHNYI, S. V.; DE LEON FRAGOSO, C. B; RODRIGUEZ MARTINEZ, J. B. Biological sulfate reduction in a UASB reactor fed with ethanol as the electron donor. **Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 562–567, 1997.

KATO, S.; WATANABE, K. Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia. **Microbes and environments / JSME**, v. 25, n. 3, p. 145–151, 2010.

KELLY, W. R.; MACHESKY, M. **Enhancement of BTEX Biodegradation Rates Under Iron-reducing Conditions**. Illinois Waste Management and Research Center, 1997.

KERN, T.; LINGE, M.; ROTHER, M. *Methanobacterium aggregans* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogenic archaeon isolated from an anaerobic digester. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1975–1980, 2015.

KHAN, N.; WARITH, M. A.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. **Journal of the Air & Waste Management Association (1995)**, v. 57, n. 3, p. 286–296, 2007.

KIM, S.-J. et al. Metabolic versatility of toluene-degrading, iron-reducing bacteria in tidal flat sediment, characterized by stable isotope probing-based metagenomic analysis. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 189–204, 2014.

KIM, T. J. et al. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 411–417, 2003.

KLEEMANN, R.; MECKENSTOCK, R. U. Anaerobic naphthalene degradation by Gram-positive, iron-reducing bacteria. **FEMS microbiology ecology**, v. 78, n. 3, p. 488–496, 2011.

KLEINSTEUBER, S. et al. Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 143–157, 2008.

KLEINSTEUBER, S.; SCHLEINITZ, K. M.; VOGT, C. Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 851–873, 2012.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. e1, 2013.

KLOOS, W. E. Natural Populations of the Genus *Staphylococcus*. **Annual Review of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 559–592, 1980.

KNIEMEYER, O. et al. Anaerobic Degradation of Ethylbenzene by a New Type of Marine Sulfate-Reducing Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 760–768, 2003.

KNIEMEYER, O. et al. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 898–901, 2007.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, Biodiesel Processing and Production. v. 86, n. 10, p. 1059–1070, 2005.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. 1ª ed. Tradução: Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 340 p.

KOSAKA, T. et al. The genome of *Pelotomaculum thermopropionicum* reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota. **Genome Research**, v. 18, n. 3, p. 442–448, 2008.

KULKAMP, M.S**. Atenuação natural de hidrocarbonetos de petróleo em um aqüífero contaminado com derramamento simultâneo de óleo diesel e etanol.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003. 134p.

KUMAR, M.; KHANNA, S. Shift in microbial population in response to crystalline cellulose degradation during enrichment with a semi-desert soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 134–141, 2014.

KÜMMEL, S. et al. Anaerobic naphthalene degradation by sulfate-reducing *Desulfobacteraceae* from various anoxic aquifers. **FEMS microbiology ecology**, v. 91, n. 3, 2015.

KUNAPULI, U. et al. Identification of intermediates formed during anaerobic benzene degradation by an iron-reducing enrichment culture. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1703–1712, 2008.

KUNAPULI, U. et al. *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxydans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 686–695, 2010.

KUPPARDT, A. et al. Phylogenetic and Functional Diversity Within Toluene-Degrading, Sulphate-Reducing Consortia Enriched from a Contaminated Aquifer. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 2, p. 222–234, 2014.

KÜSEL, K. et al. Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. **Environmental and Experimental Botany**, Plants and Organisms in Wetland Environments. v. 46, n. 3, p. 213–223, 2001.

LAGE, I. C. **Avaliação de metodologias para determinação da permeabilidade em meios porosos: a área experimental da Fazenda Ressacada, SC.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Geociências – Instituto de Geociências. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005, 119 p.

LALMAN, J. D. A. **Anaerobic Degradation of Linoleic ($C_{18:2}$), Oleic ($C_{18:1}$) and Stearic ($C_{18:0}$) Acids and their Inhibitory Effects on Acidogens, Acetogens and Methanogens.** Tese apresentada ao curso de Engenharia Civil. Departamento de Eng. Civil. Universidade de Toronto. Toronto, CA, 2000. 187 p.

LANGSRUD, T.; SORHAUG, T.; VEGARUD, G. E. Protein degradation and amino acid metabolism by *propionibacteria*. **Le Lait**, v. 75, n. 4–5, p. 325–330, 1995.

LEAMER, R. W.; SHAW, B. A simple apparatus for measuring noncapillary porosity on an extensive scale. **Journal of the American Society of Agronomy**, v. 33, p. 1003-1008, 1941.

LEHMAN, R.M.; COLWELL, F.S.; BALA, G.A. Attached and Unattached Microbial Communities in a Simulated Basalt Aquifer under Fracture- and Porous-Flow Conditions. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 67, n. 6, p. 2799-2809, 2001.

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

LENS, P. N.; KUENEN, J. G. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. **Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 44, n. 8, p. 57–66, 2001.

LEUNG, D. Y. C.; KOO, B. C. P.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 250–256, 2006.

LI, J. et al. Effects of Groundwater Geochemical Constituents on Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Coupled to Microbial Dissimilatory Fe(III) Reduction. **Environmental Engineering Science**, v. 31, n. 4, p. 202–208, 2014.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 452–463, 2007.

LIEBEG, E. W.; CUTRIGHT, T. J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, n. 1, p. 55–64, 1999.

LIMA, G.; PARKER, B.; MEYER, J. Dechlorinating microorganisms in a sedimentary rock matrix contaminated with a mixture of VOCs. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 11, p. 5756–5763, 2012.

LIN, B.; WESTERHOFF, H. V.; RÖLING, W. F. M. How *Geobacteraceae* may dominate subsurface biodegradation: physiology of G*eobacter metallireducens* in slow-growth habitat-simulating retentostats. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 2425–2433, 2009.

LIU, C. et al. Kinetic Analysis of the Bacterial Reduction of Goethite. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 12, p. 2482–2490, 2001.

LIVERMORE, J. A. et al. Microbial Community Dynamics during Acetate Biostimulation of RDX-Contaminated Groundwater. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 14, p. 7672–7678, 2013.

LOHMAYER, R. et al. Sulfur Species as Redox Partners and Electron Shuttles for Ferrihydrite Reduction by Sulfurospirillum deleyianum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 10, p. 3141–3149, 2014.

LOPES, A. R.; MANAIA, C. M.; NUNES, O. C. Bacterial community variations in an alfalfa-rice rotation system revealed by 16S rRNA gene 454-pyrosequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, n. 3, p. 650–663, 2014.

LOPES, S. I. C. et al. 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. D. Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes**. Springer Berlin Heidelberg, p. 287–308, 2013.

LOVLEY, D. R. et al. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. **Nature**, v. 339, n. 6222, p. 297–300, 1989.

LOVLEY, D. R. et al. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. **Archives of Microbiology**, v. 159, n. 4, p. 336–344, 1993.

LOVLEY, D. R. Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 305–313, 1997.

LOVLEY, D. R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 35–44, 2003.

LOVLEY, D.R. et al. *Geobacter*: The microbe electric´s physiology, ecology , and practical applications. *In*: Advances in Microbial Physiology. v. 59. Academic Press, 2011. 276 p.

LOVLEY, D. R. Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 12, p. 4896–4906, 2011.

LOVLEY, D. R.; HOLMES, D. E.; NEVIN, K. P. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. **Advances in Microbial Physiology**, v. 49, p. 219–286, 2004.

LOVLEY, D. R.; LONERGAN, D. J. Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol, and p-Cresol by the Dissimilatory Iron-Reducing Organism, GS-15. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1858–1864, 1990.

LOVLEY, D. R.; PHILLIPS, E. J. P. Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1472–1480, 1988.

LOVLEY, D. R.; WOODWARD, J. C. Mechanisms for chelator stimulation of microbial Fe(III)-oxide reduction. **Chemical Geology**, Chemical And Biological Control On Mineral Growth And Dissolution Kinetics, American Chemical Society Meeting. v. 132, n. 1, p. 19–24, 1996.

LUO, Y. et al. The genome of archaeal prophage PsiM100 encodes the lytic enzyme responsible for autolysis of *Methanothermobacter wolfeii*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5788–5792, 2001.

LUTHER, G. W. et al. Seasonal iron cycling in the salt-marsh sedimentary environment: the importance of ligand complexes with Fe(II) and Fe(III) in the dissolution of Fe(III) minerals and pyrite, respectively. **Marine Chemistry**, Progress in Marine Chemistry. v. 40, n. 1, p. 81–103, 1992.

LYKIDIS, A. et al. The Complete Multipartite Genome Sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a Versatile Pollutant Degrader. **PLOS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9729, 2010.

LYKIDIS, A. et al. Multiple syntrophic interactions in a terephthalate-degrading methanogenic consortium. **The ISME journal**, v. 5, n. 1, p. 122–130, 2011.

MA, J.; RIXEY, W. G.; ALVAREZ, P. J. Microbial processes influencing the transport, fate and groundwater impacts of fuel ethanol releases. **Current Opinion in Biotechnology**, Energy biotechnology Environmental biotechnology. v. 24, n. 3, p. 457–466, 2013.

MACBETH, T. W. et al. Molecular characterization of a dechlorinating community resulting from in situ biostimulation in a trichloroethene-contaminated deep, fractured basalt aquifer and comparison to a derivative laboratory culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7329–7341, 2004.

MACKAY, D.M.; SHIU, W.Y. Aqueous Solubility of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. **Journal of Chemical and Engineering Data.** v. 22, n. 4, p. 399-402, 1977.

MACRAE, I. C.; RAGHU, K.; BAUTISTA, E. M. Anaerobic Degradation of the Insecticide Lindane by Clostridium sp. **Nature**, v. 221, n. 5183, p. 859–860, 1969.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13 edition ed. San Francisco: Pearson, 2010.

MAHADEVAN, R. et al. Characterization of Metabolism in the Fe(III)-Reducing Organism *Geobacter sulfurreducens* by Constraint-Based Modeling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1558–1568, 2006.

MALDONADO, L. A. et al. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. Pt 5, p. 1759–1766, 2005.

MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. **Trends in Analytical Chemistry.** v. 18, n. 6, p. 417-428. 1999.

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

MARSILI, E. et al. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3968–3973, 2008.

MASELLA, A. P. et al. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 31, 2012.

MATTHIES, C. et al. *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1591–1594, 2000.

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

MCCORMICK, R.; ALLEMAN, T. L. Efeito do Biodiesel sobre a Emissão de Poluentes de Motores Diesel. *In:* **Manual do Biodiesel**. 1ª ed. Tradução: Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 340 p.

MCINERNEY, M. J. et al. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1029–1039, 1981.

MECKENSTOCK, R. U. et al. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2743–2747, 2000.

MIETTINEN, H. et al. Microbiome composition and geochemical characteristics of deep subsurface high-pressure environment, Pyhäsalmi mine Finland. **Terrestrial Microbiology**, p. 1203, 2015.

MORASCH, B. et al. Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. **Archives of Microbiology**, v. 181, n. 6, p. 407–417, 2004.

MORRIS, B. E. L. et al. A PCR-based assay for the detection of anaerobic naphthalene degradation. **FEMS microbiology letters**, v. 354, n. 1, p. 55–59, 2014.

MOSER, B. R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 3, p. 229–266, 2009.

MPOC. Malaysian Palm Oil Council, 2016. Disponível em: <http://www.mpoc.org.my/>. Acesso em: 22 mar. 2016.

MUCCI, A. et al. The fate of carbon in continental shelf sediments of eastern Canada: a case study. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 47, n. 3–4, p. 733–760, 2000.

MÜLLER, J. B. **Avaliação da Toxicidade da Fração Solúvel em Água do Biodiesel, Diesel e da Mistura Binária Diesel/Biodiesel de 5% (B5).** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011. 114p.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.

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. et al. Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. **Water Research**, v. 36, n. 11, p. 2813–2823, 2002.

NG, Y. F. et al. An environmentally friendly approach to treat oil spill: Investigating the biodegradation of petrodiesel in the presence of different biodiesels. **Fuel**, v. 139, p. 523–528, 2015.

NARIHIRO, T. et al. Draft Genome Sequence of *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica* Strain 4J5T (JCM 14075), a Mesophilic Butyrate- and 2-Methylbutyrate-Degrading Syntroph. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. e00047-16, 2016.

O'FLAHERTY, V. et al. 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.

OGG, C. D.; PATEL, B. K. C. *Caloramator australicus* sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. Pt 1, p. 95–101, 2009.

OLIVEIRA, J. C. S. **Contaminação de sedimentos argilosos por combustíveis automotivos: problema de avaliação da permeabilidade.** Tese apresentada ao Instituto de Geociências. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2001. 102 p.

OREN, A. The Family *Methanoregulaceae*. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes**. Springer Berlin Heidelberg, p. 253–258, 2014.

OWSIANIAK, M. et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1497–1500, 2009.

PARSHINA, S. N. et al. *Desulfotomaculum carboxydivorans* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium capable of growth at 100% CO. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. Pt 5, p. 2159–2165, 2005.

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 10, p. 874–879, 2006.

PÉDROT, M. et al. How does organic matter constrain the nature, size and availability of Fe nanoparticles for biological reduction? **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 359, n. 1, p. 75–85, 2011.

PÉREZ-PANTOJA, D. et al. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 5, p. 736–794, 2008.

PESTER, M. et al. Complete Genome Sequences of *Desulfosporosinus orientis* DSM765T, *Desulfosporosinus youngiae* DSM17734T, *Desulfosporosinus meridiei* DSM13257T, and *Desulfosporosinus acidiphilus* DSM22704T. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6300–6301, 2012.

PETERSON, C. L.; MÜLLER, G. Biodiesel: biodegradabilidade, Demandas Química e Biológica de Oxigênio e Toxicidade. In: **Manual do Biodiesel**. 1ª ed. Tradução: Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 340 p.

PILLONI, G. et al. Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 1, p. 165–175, 2011.

RABUS, R. et al. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1444–1451, 1993.

RABUS, R.; HANSEN, T. A.; WIDDEL, F. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer New York, p. 659–768, 2006.

RABUS, R.; WIDDEL, F. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 96–103, 1995.

RAKOCZY, J. et al. Effects of hydrogen and acetate on benzene mineralisation under sulphate-reducing conditions. **FEMS microbiology ecology**, v. 77, n. 2, p. 238–247, 2011.

RAMAMOORTHY, S. et al. *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. Pt 12, p. 2729–2736, 2006.

RAMOS, D. T. **Biostimulação de Processos Metanogênicos com Acetato de Amônio para a Degradação Acelerada de Hidrocarbonetos de Petróleo em Águas Subterrâneas Contaminadas com Diesel B20.** Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013, 248p.

RAMOS, D. T. et al. Biodiesel presence in the source zone hinders aromatic hydrocarbons attenuation in a B20-contaminated groundwater. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 193, p. 48–53, 2016.

RAMOS, D. T. et al. 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, 2013.

RAMOS, D. T. et al. Assessment of microbial communities associated with fermentative-methanogenic biodegradation of aromatic hydrocarbons in groundwater contaminated with a biodiesel blend (B20). **Biodegradation**, v. 25, n. 5, p. 681–691, 2014.

REGUERA, G. et al. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1098–1101, 2005.

REGUERA, G. et al. Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 2125–2127, 2007.

REINHARD, M. et al. In Situ BTEX Biotransformation under Enhanced Nitrate- and Sulfate-Reducing Conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 1, p. 28–36, 1997.

REINHARD, M. et al. In Situ Biotransformation of BTEX Compounds Under Methanogenic Conditions. **Ground Water Monitoring & Remediation**, v. 25, n. 4, p. 50–59, 2005.

RIOS-HERNANDEZ, L. A.; GIEG, L. M.; SUFLITA, J. M. Biodegradation of an alicyclic hydrocarbon by a sulfate-reducing enrichment from a gas condensate-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 434–443, 2003.

RITTMANN, B. E.; McCARTY, P. L. Stoichiometry and bacterial energetic. In **Environmental Biotechnology**. New York: McGraw-Hill, 2001. 126-161p.

ROBERTSON, W. J.; FRANZMANN, P. D.; MEE, B. J. Spore-forming, *Desulfosporosinus*-like sulphate-reducing bacteria from a shallow aquifer contaminated with gasolene. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 248–259, 2000.

ROCHA, R. N. C. **Culturas Intercalares para Sustentabilidade da Produção de Dendê na Agricultura Familiar.** Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2007. 75p.

RODEN, E. E. et al. Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. **Nature Geoscience**, v. 3, n. 6, p. 417–421, 2010.

RODEN, E. E.; LOVLEY, D. R. Dissimilatory Fe(III) Reduction by the Marine Microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 734–742, 1993.

RODEN, E. E.; ZACHARA, J. M. Microbial Reduction of Crystalline Iron(III) Oxides: Influence of Oxide Surface Area and Potential for Cell Growth. **Environmental Science & Technology**, v. 30, n. 5, p. 1618–1628, 1996.

RODRIGUES, R. V. et al. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 9, p. 2054–2059, 2010.

ROONEY-VARGA, J. N. et al. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3056–3063, 1999.

SAFINOWSKI, M.; MECKENSTOCK, R. U. Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing

enrichment culture. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 347–352, 2006.

SALEH-LAKHA, S. et al. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2005.

SALVADOR, A. F. et al. **Proteomics of *Syntrophomonas zehnderi* and *Methanobacterium formicicum* growing on long-chain fatty acids**. FEMS 2015 - 6th Congress of European Microbiologists. **Anais**... In: FEMS 2015 - 6TH CONGRESS OF EUROPEAN MICROBIOLOGISTS. 2015.

SATO, Y. et al. *Cupriavidus pinatubonensis* sp. nov. and *Cupriavidus laharis* sp. nov., novel hydrogen-oxidizing, facultatively chemolithotrophic bacteria isolated from volcanic mudflow deposits from Mt. Pinatubo in the Philippines. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 973–978, 2006.

SAWYER, C. N.; MCCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. **Chemistry for Environmental Engineering**. 4th. ed. McGraw-Hill, Inc, 1994.

SBCS – CQFS. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Comissão Química de Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10ª ed., Porto Alegre, 400 p., 2004.

SCHERER, M. M. et al. Chemistry and microbiology of permeable reactive barriers for in situ groundwater clean up. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 221–264, 2000.

SCHEUNER, C. et al. Complete genome sequence of *Planctomyces brasiliensis* type strain (DSM 5305(T)), phylogenomic analysis and reclassification of *Planctomycetes* including the descriptions of *Gimesia* gen. nov., *Planctopirus* gen. nov. and *Rubinisphaera* gen. nov. and emended descriptions of the order *Planctomycetales* and the family *Planctomycetaceae*. **Standards in Genomic Sciences**, v. 9, p. 10, 2014.

SCHNOOR, J.L. **Environmental modeling: fate and transport of pollutants in water, air and soil**. New York: Wiley, 2ª ed. New York: Wiley, 1996. 682 p.

SCHREIBER, M. E.; BAHR, J. M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 55, n. 1–2, p. 29–56, 2002.

SENDZIKIENE, E. et al. Biodegradability of biodiesel fuel of animal and vegetable origin. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 5, p. 493–497, 2007.

SHARMA, M.; BISWAS, N. Diverting electron fluxes towards sulfate reduction using linoleic acid in a mixed anaerobic culture. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v. 37, n. 11, p. 1492–1504, 2010.

SHERRY, A. et al. Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized sulphate-reducing taxa. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Special Issue: 3rd International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems. v. 81, p. 105–113, 2013.

SHIM, H. et al. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida*. **Biodegradation**, v. 16, n. 4, p. 319–327, 2005.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html. Acesso em: 27 dez. 2013.

SILVA, M. L. B. D.; 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.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 1, p. 112–120, 2008.

SINGER, M.M. et al. Making, Measuring, and Using Water-Accommodated Fractions of Petroleum for Toxicology Testing. **Proceedings of the 2001 International Oil Spill Conference**. Tampa, Florida, U.S.A, p. 1269-1274, 2001.

SNOEYENBOS-WEST, NULL et al. Enrichment of *Geobacter* Species in Response to Stimulation of Fe(III) Reduction in Sandy Aquifer Sediments. **Microbial Ecology**, v. 39, n. 2, p. 153–167, 2000.

SØRENSEN, G. et al. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5259–5264, 2011.

SOUSA, D. Z. et al. Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. **FEMS microbiology ecology**, v. 68, n. 3, p. 257–272, 2009.

SOUSA, D. Z. et al. Degradation of Long-Chain Fatty Acids by Sulfate-Reducing and Methanogenic Communities. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). . **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 963–980, 2010.

SPARKS, D.L. **Environmental Soil Chemistry**, 2ª ed., Academic Press, London, 352 p., 2003.

SRINIVAS, A.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V. R*hodoplanes oryzae* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from the rhizosphere soil of paddy. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt 7, p. 2198–2203, 2014.

STAMS, A. J. M. et al. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 371–382, 2006.

STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 568–577, 2009.

STIEB, M.; SCHINK, B. Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. **Archives of Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 387–390, 1985.

STRAUB, K. L.; BENZ, M.; SCHINK, B. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, n. 3, p. 181–186, 2001.

STULTS, J. R. et al. 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, 2001.

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

SUN, M. et al. Microbial community analysis in rice paddy soils irrigated by acid mine drainage contaminated water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2911–2922, 2015.

SUN, W.; SUN, X.; CUPPLES, A. M. Identification of *Desulfosporosinus* as toluene-assimilating microorganisms from a methanogenic consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 13–19, 2014[a].

SUN, W.; SUN, X.; CUPPLES, A. M. Presence, diversity and enumeration of functional genes (bssA and bamA) relating to toluene degradation across a range of redox conditions and inoculum sources. **Biodegradation**, v. 25, n. 2, p. 189–203, 2014[b].

TAMAMURA, S. et al. Possibility of formic and acetic acids as active substrates for methanogenesis in the groundwater in Horonobe, Hokkaido. **Journal of MMIJ**, v. 128, n. 10–11, p. 570–575, 2012.

TAN, B. et al. Comparative analysis of metagenomes from three methanogenic hydrocarbon-degrading enrichment cultures with 41 environmental samples. **The ISME Journal**, 2015.

TARLERA, S. et al. *Caloramator proteoclasticus* sp. nov., a new moderately thermophilic anaerobic proteolytic bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 651–656, 1997.

TEBO, B. M.; OBRAZTSOVA, A. Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, n. 1, p. 193–198, 1998.

TGSC – THE GOOD SCENT COMPANY. Disponível em: <http://www.thegoodscentscompany.com/search2.html>. Acesso em: 08 dez. 2013.

THAMDRUP, B. Bacterial Manganese and Iron Reduction in Aquatic Sediments. In: SCHINK, B. (Ed.). . **Advances in Microbial Ecology**. Advances in Microbial Ecology. [s.l.] Springer US, p. 41–84, 2000.

THIERRIN, J. et al. Natural degradation rates of BTEX compounds and naphthalene in a sulphate reducing groundwater environment. **Hydrological Sciences Journal**, v. 38, n. 4, p. 309–322, 1993.

THIERRY, A. et al. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 19–27, 2011.

TISCHER, K. et al. Microbial communities along biogeochemical gradients in a hydrocarbon-contaminated aquifer. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2603–2615, 2013.

TOBLER, N. B.; HOFSTETTER, T. B.; SCHWARZENBACH, R. P. Carbon and hydrogen isotope fractionation during anaerobic toluene oxidation by *Geobacter metallireducens* with different Fe(III) phases as terminal electron acceptors. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 21, p. 7786–7792, 2008.

TOXNET – TOXICOLOGY DATA NETWORK. **Hazardous Substances Data Bank (HSDB),** 2006. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>. Acesso em: 08 dez. 2013.

TSAI, J.-C.; KUMAR, M.; LIN, J.-G. Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2–3, p. 847–855, 2009.

ULRICH, A. C.; BELLER, H. R.; EDWARDS, E. A. Metabolites detected during biodegradation of 13C6-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 17, p. 6681–6691, 2005.

USDE, US Department of Energy, 2016. Disponível em: <http://www.afdc.energy.gov/fuels/biodiesel_blends.html>. Acesso em: 22 mar. 2016.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Carcinogenic effects of benzene: an update**, vol 63. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, p 30495, 1998.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. **Method 8015A - Aromatic Volatile Organics by Gas Chromatografia.** Washington, DC, USA. 1996.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. **Quality Criteria for Water 1986.** EPA 440/5-86-001. Washington, DC, USA. 1986.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285–2289, 2004.

VODYANITSKII, Y. N. Iron compounds and oil biodegradation in overmoistened contaminated soils: A review of publications. **Eurasian Soil Science**, v. 44, n. 11, p. 1250, 2011.

VOGT, C.; KLEINSTEUBER, S.; RICHNOW, H.-H. Anaerobic benzene degradation by bacteria. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 710–724, 2011.

VOORDECKERS, J. W. et al. Role of *Geobacter sulfurreducens* outer surface c-type cytochromes in reduction of soil humic acid and anthraquinone-2,6-disulfonate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2371–2375, 2010.

VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. Springer Science & Business Media, 2011.

WARD, N. L. et al. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2046–2056, 2009.

WASHER, C. E.; EDWARDS, E. A. Identification and expression of benzylsuccinate synthase genes in a toluene-degrading methanogenic consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1367–1369, 2007.

WASSERFALLEN, A. et al. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50 Pt 1, p. 43–53, 2000.

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; KAKU, N. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. **BMC Microbiology**, v. 2, p. 23, 2002.

WEBER, K. A.; ACHENBACH, L. A.; COATES, J. D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 752–764, 2006.

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

WIEDEMEIER, T.H.; RIFAI, H.S.; NEWELL, C.J.; WILSON, J.T**. Natural Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1999. 617p.

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

WINDERL, C.; SCHAEFER, S.; LUEDERS, T. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 1035–1046, 2007.

WOLF, M. et al. Effects of Humic Substances and Quinones at Low Concentrations on Ferrihydrite Reduction by *Geobacter metallireducens*. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 15, p. 5679–5685, 2009.

WU, C.; LIU, X.; DONG, X. *Syntrophomonas cellicola* sp. nov., a spore-forming syntrophic bacterium isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar, and assignment of *Syntrophospora bryantii* to *Syntrophomonas bryantii* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. Pt 10, p. 2331–2335, 2006.

WU, S. et al. Anaerobic biodegradation of soybean biodiesel and diesel blends under methanogenic conditions. **Water Research**, v. 87, p. 395–402, 2015.

WU, S. et al. Anaerobic biodegradation of soybean biodiesel and diesel blends under sulfate-reducing conditions. **Chemosphere**, v. 161, p. 382–389, 2016.

YASHIRO, Y. et al. *Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. Pt 1, p. 53–59, 2011.

YASSINE, M. H. et al. Aerobic Biodegradation Kinetics and Mineralization of Six Petrodiesel/Soybean-Biodiesel Blends. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 9, p. 4619–4627, 2013.

YASSINE, M. H. et al. Partitioning Behavior of Petrodiesel/Biodiesel Blends in Water. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 14, p. 7487–7494, 2012.

YASSINE, M. H.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. Microbial kinetic model for the degradation of poorly soluble organic materials. **Water Research**, v. 47, n. 4, p. 1585–1595, 2013.

YERGEAU, E. et al. Metagenomic Analysis of the Bioremediation of Diesel-Contaminated Canadian High Arctic Soils. **PLOS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30058, 2012.

ZEIKUS, J. G.; WOLFE, R. S. *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. **Journal of Bacteriology**, v. 109, n. 2, p. 707–715, 1972.

ZHANG, T. et al. Anaerobic Benzene Oxidation by *Geobacter* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8304–8310, 2012.

ZHANG, X.; PETERSON, C.; REECE, D.; MOLLER, G.; HAWS, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the ASABE**, St. Joseph, Mi, v. 41, n. 5, p. 1423-1430, 1998.]

ZHANG, X.; YOUNG, L. Y. Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4759–4764, 1997.

ZUO, Z. et al. Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for simultaneous degradation of organophosphates and pyrethroids and its application in bioremediation of soil. **Biodegradation**, v. 26, n. 3, p. 223–233, 2015.

APÊNDICE A - Modelo Energético de Biodegradação

O modelo energético de McCarty (1969) é baseado na termodinâmica clássica e envolve duas reações básicas, uma para a produção de energia para o crescimento e manutenção dos micro-organismos e outra para a síntese celular, assim, a energia livre liberada na reação é utilizada para estimar a produção de biomassa e a taxa de utilização máxima da espécie para um determinado substrato e receptor final de elétrons (RITTMANN e MCCARTY, 2001). Desta forma, a equação estequiométrica geral (Equação A.1) é formada por três meias-reações: a do doador de elétrons (R_d), a do receptor de elétrons (R_r) e a da reação de síntese celular bacteriana (R_c). As meias reações R_d, R_r e R_c podem ser observadas na Tabela A.1.

$$R = f_e R_r + f_s R_c - R_d \qquad \text{Equação A.1}$$

Onde f_e representa a fração do doador de elétrons que é transferida para o receptor de elétrons (produção de energia) e f_s representa a parte do doador de elétrons destinada à formação das células microbianas (síntese celular). A soma de f_s e f_e é igual a 1. Para a determinação de f_s e f_e é necessário que seja calculado, anteriormente, o A, que representa o equivalente do elétron doador usado para produzir energia por equivalente de células formadas. O Termo A é representado matematicamente pela Equação A.2.

$$A = -\frac{\dfrac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \dfrac{\Delta G_{pc}}{\varepsilon}}{\varepsilon\, \Delta G_r}, \qquad \text{Equação A.2}$$

Onde ΔGp é a energia requerida para converter a fonte de carbono para um composto intermediário (piruvato) e é calculado como a diferença entre a energia livre da meia-reação do piruvato e da fonte de carbono. Quando o ΔGp positivo, energia é requerida para a conversão do carbono em piruvato e o n = +1,0. Quando o ΔGp é negativo, energia é obtida para a conversão da fonte de carbono a piruvato e o n= -1,0. ΔGpc é a energia necessária para converter o intermediário da fonte de carbono e a fonte de nitrogênio dentro do material celular. Quando a fonte de nitrogênio é amônia, o valor de ΔGpc é 18,8 kJ/e^- eq. O ΔGr é a energia livre liberada por equivalente de elétrons doador convertido a energia. Parte da energia é perdida nas transferências de elétrons. Portanto, para expressar esta perda, é utilizado o termo (ε) que

representa a eficiência de transferência de energia. O valor habitualmente adotado para ε é de 0,6 (RITTMANN & McCARTY, 2001).

Tabela A.1: Meias-reações de formação de células (Rc), receptores de elétrons (Rr) e doadores de elétrons (Rd)

MEIAS-REAÇÕES	ΔG^o (KJ por elétron equivalente)
Reação para a síntese celular bacteriana (R_c)	
Amônia como fonte de nitrogênio $1/5\ CO_2 + 1/20HCO_3^- + 1/20NH_4^+ + H^+ + \bar{e} = 1/20\ C_5H_7O_2N + 9/20\ H_2O$	18,8
Reação para os receptores de elétrons (R_r)	
Ferro (Fe(III)) $Fe^{3+} + \bar{e} = Fe^{2+}$	-74,27
Sulfato $1/8\ SO_4^{2-} + 19/16\ H^+ + \bar{e} = 1/16\ H_2S + 1/16\ HS^- + 1/2\ H_20$	20,85
Reação para os doadores de elétrons (R_d)	
Doadores orgânicos (Reações heterotróficas)	
Benzeno $1/5\ CO_2 + H^+ + \bar{e} = 1/30\ C_6H_6 + 2/5\ H_2O^{(a)}$	26,67
Naftaleno $5/24\ CO_2 + H^+ + \bar{e} = 1/48\ C_{10}H_8 + 5/12\ H_2O^{(a)}$	29,39
Palmitato $15/92\ CO_2 + 1/92\ HCO_3^- + H^+ + \bar{e} = 1/92\ CH_3(CH_2)_{14}COO^- + 31/92\ H_2O$	27,26
Acetato $1/8\ CO_2 + 1/8\ HCO_3^- + H^+ + \bar{e} = 1/8\ CH_3COO^- + 3/8\ H_2O$	27,40
Piruvato $1/5\ CO_2 + 1/10\ HCO_3^- + H^+ + \bar{e} = 1/10\ CH_3COCOO^- + 2/5\ H_2O$	35,09

Fonte: (RITTMANN e MCCARTY, 2001; WIEDEMEIER et al.,1998[a])

A seguir são apresentados os cálculos para obtenção das equações estequiométricas de Mccarty utilizadas neste trabalho.

Benzeno via ferrorredução

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

$\Delta G_r = \Delta G^o_{(Fe(III))} - \Delta G^o_{(benzeno)}$
$\Delta G_r = -74,27 - 26,67$
$\Delta G_r = -100,94$ KJ/e^- eq.

Assim, sabendo que $\varepsilon = 0,6$ e $n = +1,0$ (ΔG_p positivo),

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

$$A = -\frac{(8,42/0,6) + (18,8/0,6)}{0,6(-100,94)} = 0,75$$

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

Como, $f_e + f_s = 1$, então $f_e = 0,43$

De posse dos valores de *fe* e *fs* pode-se obter a reação geral através da seguinte equação:

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

$f_e R_r$ 0,43 Fe^{3+} + 0,43 e^- → 0,43 Fe^{2+}
$f_s R_c$ 0,114 CO_2 + 0,028 HCO_3^- + 0,028 NH_4^+ + 0,57 H^+ + 0,57 e^- → 0,028 $C_5H_7O_2N$ + 0,26 H_2O
- R_d 0,033 C_6H_6 + 0,42 H_2O → 0,20 CO_2 + H^+ + e^-

R: 0,033 C_6H_6 + 0,43 Fe^{3+} + 0,028 HCO_3^- + 0,028 NH_4^+ + 0,43 H^+ + 0,16 H_20 → 0,028 $C_5H_7O_2N$ + 0,43 Fe^{2+} + 0,086 CO_2

Reação geral de biodegradação do benzeno via ferrorredução:

C_6H_6 + 13,03 Fe^{3+} +0,85 HCO_3^- + 0,85 NH_4^+ + 13,03 H^+ + 4,85 H_2O → 0,85 $C_5H_7O_2N$ + 13,03 Fe^{2+} + 2,61 CO_2

Naftaleno via ferrorredução

$\Delta G_p = \Delta G^o_{(piruvato)} - \Delta G^o_{(naftaleno)}$
$\Delta G_p = 35,09 - 29,39$
$\Delta G_p = 5,7$ KJ/e^- eq.

$\Delta G_r = \Delta G^o_{(Fe(III))} - \Delta G^o_{(naftaleno)}$
$\Delta G_r = -74,27 - 29,39$
$\Delta G_r = -103,66$ KJ/e^- eq.

Assim, sabendo que ε = 0,6 e n = +1,0 (ΔG_p positivo),

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

$$A = -\frac{(5,7/0,6) + (18,8/0,6)}{0,6(-103,66)} = 0,66$$

$$f_s = \frac{1}{1+A} = 0,6$$

Como, $f_e + f_s = 1$, então $f_e = 0,4$

De posse dos valores de *fe* e *fs* pode-se obter a reação geral através da seguinte equação:

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

$f_e R_r$ 0,40 Fe^{3+} + 0,40 e^- → 0,4 Fe^{2+}
$f_s R_c$ 0,12 CO_2 + 0,03 HCO_3^- + 0,03 NH_4^+ + 0,6 H^+ + 0,6 e^- → 0,03 $C_5H_7O_2N$ + 0,27 H_2O
$-R_d$ 0,02 $C_{10}H_8$ + 0,42 H_2O → 0,21 CO_2 + H^+ + e^-

R: 0,02 $C_{10}H_8$ + 0,40 Fe^{3+} + 0,03 HCO_3^- + 0,03 NH_4^+ + 0,4 H^+ + 0,15 H_2O → 0,03 $C_5H_7O_2N$ + 0,4 Fe^{2+} + 0,09 CO_2

Reação geral de biodegradação do naftaleno via ferrorredução:

$C_{10}H_8$ + 20 Fe^{3+} +1,50 HCO_3^- + 1,50 NH_4^+ + 20 H^+ + 7,50 H_2O → 1,50 $C_5H_7O_2N$ + 20 Fe^{2+} + 4,50 CO_2

Palmitato via ferrorredução

$\Delta G_p = \Delta G^o_{(piruvato)} - \Delta G^o_{(palmitato)}$
$\Delta G_p = 35,09 - 27,26$
$\Delta G_p = 7,83$ KJ/e^- eq.

$\Delta G_r = \Delta G^o_{(Fe(III))} - \Delta G^o_{(palmitato)}$
$\Delta G_r = -74,27 - 27,26$
$\Delta G_r = -101,53$ KJ/e^- eq.

Assim, sabendo que ε = 0,6 e n = +1,0 (ΔG_p positivo),

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

$$A = -\frac{(7,83/0,6) + (18,8/0,6)}{0,6(-101,53)} = 0,73$$

$$f_s = \frac{1}{1+A} = 0{,}58$$

Como, $f_e + f_s = 1$, então $f_e = 0{,}42$

De posse dos valores de *fe* e *fs* pode-se obter a reação geral através da seguinte equação:

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

$f_e R_r$ 0,42 Fe^{3+} + 0,42 e^- → 0,42 Fe^{2+}
$f_s R_c$ 0,116 CO_2 + 0,029 HCO_3^- + 0,029 NH_4^+ + 0,58 H^+ + 0,58 e^- → 0,029 $C_5H_7O_2N$ + 0,26 H_2O
- R_d 0,011 $CH_3(CH_2)_{14}COO^-$ + 0,337 H_2O → 0,789 CO_2 + 0,011 HCO_3^- + 0,011 H^+ + e^-

---

R: 0,011 $CH_3(CH_2)_{14}COO^-$ + 0,42 Fe^{3+} + 0,018 HCO_3^- + 0,029 NH_4^+ + 0,42 H^+ + 0,076 H_2O → 0,029 $C_5H_7O_2N$ + 0,42 Fe^{2+} + 0,673 CO_2

Reação geral de biodegradação do palmitato via ferrorredução:

$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$ + 38,18 Fe^{3+} +1,64 HCO_3^- + 2,64 NH_4^+ + 38,18 H^+ + 6,91 H_2O → 2,64 $C_5H_7O_2N$ + 38,18 Fe^{2+} + 61,18 CO_2

Acetato via ferrorredução

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

$\Delta G_r = \Delta G^o_{(Fe(III))} - \Delta G^o_{(acetato)}$
$\Delta G_r = -74{,}27 - 27{,}40$
$\Delta G_r = -101{,}67$ KJ/e^- eq.

Assim, sabendo que $\varepsilon = 0{,}6$ e $n = +1{,}0$ (ΔG_p positivo),

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

$$A = -\frac{(7{,}69/0{,}6) + (18{,}8/0{,}6)}{0{,}6(-101{,}67)} = 0{,}72$$

$$f_s = \frac{1}{1+A} = 0{,}58$$

Como, $f_e + f_s = 1$, então $f_e = 0{,}42$

De posse dos valores de *fe* e *fs* pode-se obter a reação geral através da seguinte equação:

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

$f_e R_r$ 0,42 Fe^{3+} + 0,42 e^- → 0,42 Fe^{2+}

$f_s R_c$ 0,116 CO_2 + 0,029 HCO_3^- + 0,029 NH_4^+ + 0,58 H^+ + 0,58 e^- → 0,029 $C_5H_7O_2N$ + 0,26 H_2O

$-R_d$ 0,125 CH_3COO^- + 0,375 H_2O → 0,125 CO_2 + 0,125 HCO_3^- + H^+ + e^-

---

R: 0,125 CH_3COO^- + 0,42 Fe^{3+} + 0,029 NH_4^+ + 0,42 H^+ + 0,114 H_2O → 0,029 $C_5H_7O_2N$ + 0,42 Fe^{2+} + 0,009 CO_2 + 0,096 HCO_3^-

Reação geral de biodegradação do acetato via ferrorredução:

CH_3COO^- + 3,36 Fe^{3+} + 0,23 NH_4^+ + 3,36 H^+ + 0,91 H_2O → 0,23 $C_5H_7O_2N$ + 3,36 Fe^{2+} + 0,07 CO_2 + 0,77 HCO_3^-

APÊNDICE B - Cálculos Elaborados para Quantificação de Micro-Organismos na Curva de Calibração e nas Amostras de Água subterrânea

Para a construção da curva de calibração, alíquotas de DNA microbiano padrão foram diluídas em série (de 10^{-1} até 10^{-6}) e, foram plotados em um gráfico a concentração (cópias de gene.μL^{-1}) e os valores de CT (*cycle threshold*) correspondentes até a obtenção da equação da reta. Para tanto, foi utilizada a equação proposta por DaSilva e Alvarez (2004), na qual são consideradas as seguintes hipóteses: i) o conjunto de iniciadores e sondas é compatível com a sequência de genes alvo existente em qualquer micro-organismo que contenha esta informação genética (não somente nas cepas padrão utilizadas); ii) o tamanho aproximado do genoma, em milhões de pares de base (Mpb), da cepa padrão utilizada deve ser consultado; iii) em virtude da diversidade genética microbiana encontrada em amostras ambientais, foi necessário padronizar que 9,1257 10^{14} pares de bases (pb) estão presentes em cada µg de DNA (conforme observado no genoma de *Escherichia coli*); iv) e que há um determinado número de cópias de gene por genoma de cada cepa padrão. Deste modo, utilizou-se a equação apresentada a seguir:

$$\frac{\text{Cópias de gene}}{\mu L} = \left(\frac{\text{Concentração de DNA padrão}\left(\frac{\mu g}{\mu L}\right)}{\text{Tamanho da cepa}\left(\frac{\text{Mpb}}{\text{genoma}}\right)}\right)\left(\frac{9.1257 \times 10^{14}\text{bp}}{\mu g \text{ de DNA}}\right)\left(\frac{\text{cópias de gene}}{\text{genoma}}\right)$$

As características genômicas (concentração de DNA, tamanho da cepa e cópias por genoma) dos micro-organismos padrão utilizados na construção das curvas de calibração estão apresentadas na Tabela A.2. Os dados usados foram obtidos de bancos de dandos disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e na Universidade de Michigan (http://rrndb.mmg.msu.edu/search.php).

Tabela A.2: Características genômicas dos micro-organismos padrão utilizados na construção das curvas de calibração

Micro-organismo	Concentração de DNA ($\mu g.\mu L^{-1}$)	Tamanho da cepa (Mpb)	Cópias de gene por genoma
Pseudomonas aeruginosa	0,1095	6,6	4
Geobacter metallireducens	0,1095	4,01	2
Methanococcus maripaludis	0,1095	1,8	3

De posse do número de cópias de gene por µL de amostra, foi utilizada a equação abaixo para a determinação do número de cópias de gene por grama de sólidos suspensos totais (SST) de água subterrânea, considerando a massa de SST retira no filtro. Nesta equação, o número de cópias de gene.μL^{-1} foi dividido pelo volume de DNA utilizado para realizar a PCR (2 µL de DNA), então, foi multiplicado pelo volume de DNA obtido em cada amostra após a extração do DNA (100 µL) e, por fim, foi dividido pela quantidade de massa seca retida no filtro, resultando no número de cópias de gene por grama de SST (cópias de gene.g^{-1}) (GUIMARÃES, 2011).

$$\frac{\text{cópias de gene}}{\text{g}} = \left(\frac{\text{Cópias de gene}}{\text{reação}}\right)\left(\frac{\text{reação}}{2\mu\text{L de DNA}}\right)\left(\frac{100\mu\text{L de DNA por filtro}}{\text{g DNA por filtro}}\right)$$

ANEXO A - Composição Química do Produto Recuperado do Tratamento da Drenagem Ácida de Mina

CARBONÍFERA CRICIÚMA S.A.

DIVISÃO QUÍMICA P & D

ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA Goetita em pó

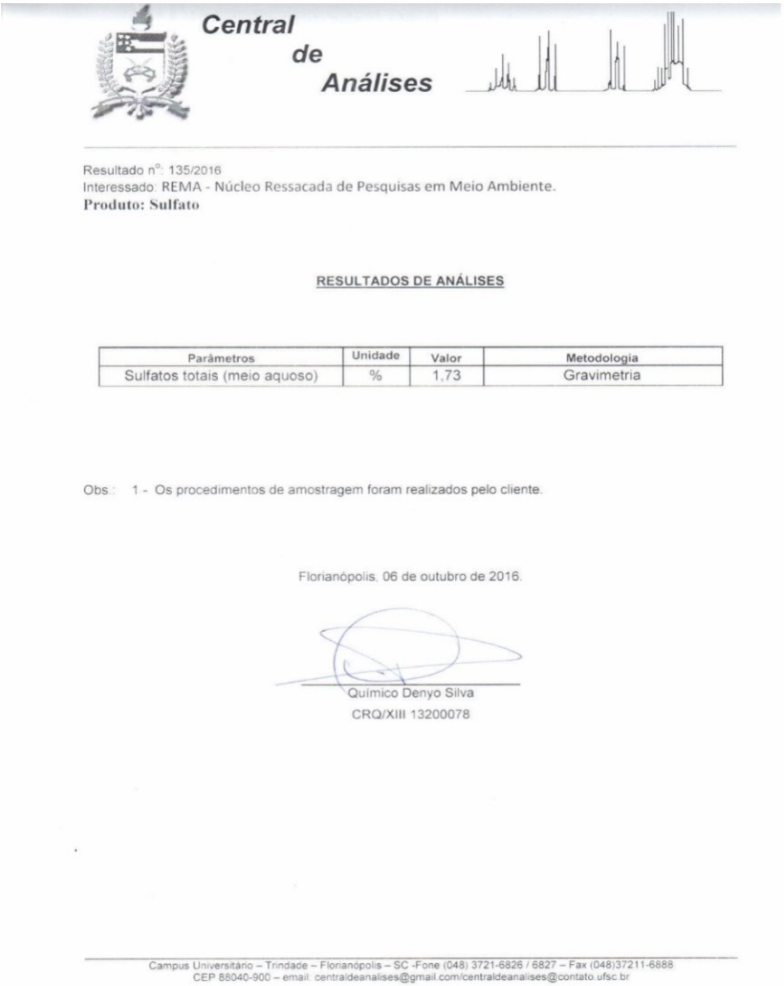
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA			
ELEMENTOS	**TEOR (%)**	**ELEMENTOS**	**TEOR (%)**
Al_2O_3	0,69	B_2O_3	-
CaO	3,64	Li_2O	-
Fe_2O_3	78,29	BaO	0,25
K_2O	<0,05	Co_2O_3	<0,1
MgO	0,11	Cr_2O_3	<0,1
MnO	0,10	PbO	<0,1
Na_2O	0,34	SrO	<0,1
P_2O_5	<0,05	ZnO	0,31
SiO_2	0,97	ZrO_2+HfO_2	<0,1
TiO_2	<0,05	Perda fogo	13,53

Elementos Majoritários: Fe
Elementos em pequeno percentual: S, Ca, Zn
Elementos traços: Na, Al, Si, Cl, K, Mn, Co, Ni
Dp < 1,0mm

Eng. Leonardo Casaril
(48) 3463 8000

SEDE: Av. Presidente Juscelino, 715 – Caixa Postal 341 – Fone: (48) 3431 3100 – Fax: (48) 3437 0479 – End. Telegráfico: "CRICIUMINA"
E-mail: carbocri.@carbocri.com.br – CEP: 88810-200 – CRICIÚMA – Santa Catarina
UNIDADE MINEIRA: Rua Nereu Beloli, 44 – Fone/fax: (48) 3463 8000 – CEP: 88.850-000 – FORQUILHINHA – Santa Catarina

ANEXO B - Laudo da Análise de Sulfato do Produto Recuperado do Tratamento da Drenagem Ácida de Mina



Central de Análises

Resultado nº: 135/2016
Interessado: REMA - Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente.
Produto: Sulfato

RESULTADOS DE ANÁLISES

Parâmetros	Unidade	Valor	Metodologia
Sulfatos totais (meio aquoso)	%	1,73	Gravimetria

Obs.: 1 - Os procedimentos de amostragem foram realizados pelo cliente.

Florianópolis, 06 de outubro de 2016.

Químico Denyo Silva
CRQ/XIII 13200078

Campus Universitário – Trindade – Florianópolis – SC -Fone (048) 3721-6826 / 6827 – Fax (048)37211-6888
CEP 88040-900 – email: centraldeanalises@gmail.com/centraldeanalises@contato.ufsc.br

ANEXO C - Caracterização do Biodiesel

PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.
PETROBRAS

iLAB

BOLETIM DE ENSAIO

Certificado de Ensaio: 0097-13 G

Local: TQ - 5943012
Tipo: COMPOSTA DE UM UNICO TANQUE
Finalidade: VENDA NACIONAL
Executante: UPBQ - UNIDADE DE PRODUCAO DE BIODIESEL DE QUIXADA

Número da Amostra: 195152
Data/Hora do recebimento: 30/06/2013 09:11:00
Data/Hora da amostragem: 30/06/2013 09:10:00
Solicitante: UPBQ - UNIDADE DE PRODUCAO DE BIODIESEL DE QUIXADA

Produto: 9AY - BIODIESEL B100

Característica	Método	Result.	Und.	Esp		
ASPECTO	VIS 000	LII		G		T
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	877,5	kg/m3	G		T
VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	4,367	mm2/s	G		T
TEOR DE AGUA	D 6304	237	mg/kg	G		T
CONTAMINACAO TOTAL	EN 12662	14,1	mg/kg	G		T
PONTO DE FULGOR	D 93	168,5	grau C	G		T
TEOR DE ESTER	EN 14103	99,1	% massa	G		T
RESIDUO DE CARBONO (METODO MICRO)	D 4530	0,00	% massa	G		T
CINZAS SULFATADA	NBR 6294	<0,005	% massa	G		T
ENXOFRE TOTAL	D 5453	1,6	mg/kg	G		T
TEOR DE SODIO+POTASSIO - NA+K	NBR 15556	<0,5	mg/kg	G		T
TEOR DE CALCIO+MAGNESIO - CA+MG	NBR 15553	<1,0	mg/kg	G		T
TEOR DE FOSFORO - P	NBR 15553	2,1	mg/kg	G		T
CORROSIVIDADE AO COBRE 3H 50 GC	D 130	1A		G		T
PONTO DE ENTUPIMENTO	D 6371	3	grau C	G		T
INDICE DE ACIDEZ TOTAL	D 664	0,14	mg KOH/g	G		T
GLICERINA LIVRE	D 6584	0,011	% massa	G		T
GLICERINA TOTAL	D 6584	0,178	% massa	G		T
TEOR DE MONOGLICERIDEOS	D 6584	0,499	% massa	G		T
TEOR DE DIGLICERIDEOS	D 6584	0,154	% massa	G		T
TEOR DE TRIGLICERIDEOS	D 6584	0,142	% massa	G		T
INDICE DE IODO	EN 14111	89,4	g/100g	G		T
ESTABILIDADE OXIDACAO A 110 GRAU CELSIUS	EN 14112	10,8	h	G		T

NOTAS:

Produto especificado na(s) característica(s) avaliada(s).

Comentário da Amostra:
TANQUE:3012 VOLUME:1031m3
LOTE: PBIOQX240627061312
SEQUÊNCIA NO ANO.:50/2013
LACRES AT:056848/056849
MATERIAL GRAXO:66% DENDE; 34% SOJA
DATA DA PRODUÇÃO:24.06.13 A 27.06.13

Os resultados deste boletim referem-se à amostra acima indicada, sendo sua circulação restrita à PETROBRAS e PROPRIETÁRIO DO PRODUTO	Responsável: TASSIO LESSA DO NASCIMENTO CRQ: 104000053 10ª REGIÃO

Data de Emissão: 12/07/2013 13:57:26 , por ANTONIO CARLOS SOUSA DE ALMEIDA