

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP
EXEMPLAR REVISADO
Data de entrada no Serviço: 05/06/02
Ass.: *Amm*

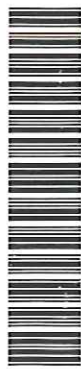
**DEGRADAÇÃO DE BENZENO, TOLUENO,
ETILBENZENO E XILENOS (BTEX) EM
REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE
LEITO FIXO (RAHLF)**

IVANA RIBEIRO DE NARDI

Tese apresentada à Escola de Engenharia
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Hidráulica e Saneamento

ORIENTADOR: Prof. Tit. Eugenio Foresti

DEDALUS - Acervo - EESC



31100036999




São Carlos

2002

FOLHA DE JULGAMENTO


Candidata: Engenheira **IVANA RIBEIRO DE NARDI**

Tese defendida e julgada em 05-04-2002 perante a Comissão Julgadora:



Prof. Tit. **EUGENIO FORESTI (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADA



Prof. Dr. **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada



Dra. **MÁRCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC**
(Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello")

APROVADA




Prof. Dr. **HENRY XAVIER COURSEUIL**
(Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC)

Aprovada



Profa. Dra. **MARIA DE LOURDES FLORÊNCIO DOS SANTOS**
(Universidade Federal de Pernambuco/UFPE)

Aprovada



Profa. Associada **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia (Hidráulica e Saneamento)



JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Aos meus amores Max e João Francisco

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Eugenio Foresti pela excelente orientação, sugestões e discussões fornecidas durante a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Zaiat pelas valiosas sugestões, discussões, apoio, disponibilidade e incentivo durante a fase experimental e no tratamento cinético dos dados.

À Prof^ª. Elisabeth Moraes pelo auxílio incansável nas análises cromatográficas, pelos ensinamentos em química e pela revisão do texto.

À Bióloga Maria Bernadete Varesche pela ajuda na realização dos exames microbiológicos, pelos ensinamentos em biologia e pelas sugestões e discussões nessa área.

Às técnicas Maria Ângela Tallarico Adorno e Eloísa Pozzi pelo apoio técnico durante a realização das análises no Laboratório de Processos Biológicos.

Aos grandes colegas de laboratório Márcio e Selma por terem cuidado com tanto zelo do experimento na minha ausência.

Ao colega Neyson pela pronta ajuda na edição de fotos e na utilização de recursos computacionais.

Às queridas Livia, Luciana, Mércia e Valéria pelo companheirismo nas participações em congressos.

Aos colegas muito especiais Aurélio, Cláudio, Deisa, Dirlane, Fernando, Flávia, Giovana, Gunther, Lyda, Marilu, Nélia, Regiane, Rogers, Samantha, Sávia, Sonia e Valmir pela troca de experiências, apoio e convívio no laboratório.

Aos meus pais Antonio e Ivete, ao meu irmão Marcelo e à minha cunhada Giovana pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus sogros Marcos e Maria Helena e aos meus cunhados Marcos Jr. e Ana Elisa, minha nova família, que muito me incentiva e acolhe.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudo concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiii
<i>ABSTRACT</i>	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1 x
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Compostos aromáticos.....	5 x
3.2 Fontes de contaminação de BTEX.....	9 x
3.3 Degradação anaeróbia de BTEX.....	13 x
3.4 Fatores que limitam a degradação anaeróbia do compostos.....	23
3.5 Reações estequiométricas para BTEX.....	24 x
3.6 Mecanismos de reações.....	27
3.7 Estudos cinéticos com BTEX.....	43
3.8 Microrganismos observados.....	52 x
3.9 Técnicas de enriquecimento para análise de BTEX.....	61
3.10 Considerações finais.....	64 x
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	65 x
4.1 Fases do experimento.....	65 x
4.2 Descrição dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF).....	67 x
4.3 Suporte e imobilização do lodo anaeróbio.....	67
4.4 Composição da água residuária sintética.....	68 x
4.5 Determinações analíticas durante a operação dos reatores.....	69
4.6 Partida e operação dos reatores.....	77

4.7 Exames microbiológicos do lodo.....	78
4.8 Avaliação quantitativa de bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas nos reatores.....	79
4.9 Avaliação da adsorção de BTEX no meio suporte e no lodo imobilizado.....	79
4.10 Cinéticas de degradações de BTEX.....	80
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
5.1 Análise de BTEX por headspace estático / cromatografia gasosa.....	82
5.2 Primeira etapa experimental.....	89
5.3 Segunda etapa experimental.....	120
5.4 Terceira etapa experimental: reator alimentado com solução etanólica de BTEX.....	140
5.5 Morfologias dos organismos presentes no biofilme durante a operação do reator alimentado com solução etanólica de BTEX nas segunda e terceira etapas experimentais.....	143
5.6 Avaliação de adsorção de BTEX na espuma de poliuretano e na biopartícula.....	144
5.7 Análise de BTEX nos pontos de coleta de biogás.....	146
5.8 Determinações das constantes cinéticas aparentes de primeira ordem de degradação de BTEX.....	146
6. CONCLUSÕES.....	150
7. SUGESTÕES.....	153
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Modelo para degradação anaeróbia de benzeno por cultura metanogênica mista (Grbic-Galic & Vogel, 1987).....	28
Figura 3.2 – Mecanismos de reações postulados para a degradação anaeróbia do tolueno, baseados em resultados de vários trabalhos: (i) oxidação do grupo metila; (ii) carboxilação do anel aromático; (iii) hidroxilação do grupo metila; (iv) <i>para</i> -hidroxilação do anel; (v) ataque nucleofílico ao grupo metila (Colberg & Young, 1995 e Biegert & Fuchs, 1995).....	30
Figura 3.3 – Proposta de seqüências da degradação anaeróbia de tolueno por cultura metanogênica mista. Todos os compostos foram detectados e identificados por cromatografia gasosa / espectrometria de massas (Grbic-Galic & Vogel, 1987).....	31
Figura 3.4 – Mecanismo de reação de degradação de tolueno sob condições desnitrificantes pela linhagem T1. (a) seqüência I: mineralização de tolueno. (b) seqüência II: transformação de tolueno (Evans <i>et al.</i> , 1992 e Fraser <i>et al.</i> , 1993).....	33
Figura 3.5 – Mecanismos de reações de degradação de tolueno sob condições desnitrificantes pela linhagem Tol-4. (a) rota de mineralização proposta. (b) formação do ácido <i>E</i> -fenilitacônico. Asteriscos indicam intermediários hipotéticos (Chee-Sanford <i>et al.</i> , 1996).....	35
Figura 3.6 – Formação de benzilsuccinato a partir de tolueno e fumarato (Biegert <i>et al.</i> , 1996).....	36
Figura 3.7 – Mecanismo de reação proposto para a degradação anaeróbia de tolueno a benzoil-CoA (Heider <i>et al.</i> , 1999).....	37
Figura 3.8 – Reações iniciais da degradação de etilbenzeno pela linhagem desnitrificante EB1. Asteriscos indicam os intermediários identificados por cromatografia gasosa / espectrometria de massas (Ball <i>et al.</i> , 1996).....	39
Figura 3.9 – Rota central de benzoil-CoA na degradação anaeróbia de compostos aromáticos (Heider & Fuchs, 1997a).....	42

Figura 4.1 – Fluxograma das etapas do experimento.....	66
Figura 4.2 – Esquema de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada. (1) Reservatório de afluente, (2) Bolsa de gás N ₂ , (3) Bomba peristáltica, (4) Reator, (5) Saída de gás.....	67
Figura 5.1 – Perfis do tempo de aquecimento de amostra para BTEX, pela análise de headspace estático (banho de água a 100°C). A é a área do pico cromatográfico do composto e A _{pi} é a área do padrão interno.....	83
Figura 5.2 – Efeito da influência de sal na determinação de BTEX em headspace de amostras aquosas por cromatografia gasosa (20 mg/L de cada BTEX). A é a área do pico cromatográfico do composto e A _{pi} é a área do padrão interno.....	84
Figura 5.3 – Cromatograma dos padrões. (a) 5,0 µg/L e (b) 10,0 mg/L de cada BTEX....	84
Figura 5.4 – Gráficos de calibração para determinação de BTEX em água residuária sintética e sumário dos dados de regressão linear para faixa de concentração de 5,0 µg/L a 1000,0 µg/L. A é a área do pico cromatográfico do composto e A _{pi} é a área do padrão interno.....	85
Figura 5.5 – Gráficos de calibração para determinação de BTEX em água residuária sintética e sumário dos dados de regressão linear para faixa de concentração de 1,0 mg/L a 40,0 mg/L. A é a área do pico cromatográfico do composto e A _{pi} é a área do padrão interno.....	86
Figura 5.6 – Dados de amostras do efluente ao reator controle durante o período de carga de choque orgânica. (a) concentração de ácido acético efluente. (b) concentração de ácidos propiônico, iso-butírico, butírico e iso-valérico efluente. (c) DQO _b efluente.....	91
Figura 5.7 – Concentrações de BTEX afluente e efluente ao reator controle com TDH de 5,3 horas na presença de detergente comercial.....	92
Figura 5.8 – Fotomicrografias em contraste de fase de bactérias e arqueas metanogênicas presentes no biofilme do reator controle. (a) vibrios, fase de adaptação. (b) arqueas metanogênicas semelhantes a <i>Methanosaeta</i> , fase de adaptação (c) bacilos com pontuações nas extremidades, primeira fase. (d) arqueas metanogênicas semelhantes a <i>Methanosarcina</i> , primeira fase. (e) cocos, primeira fase. (f) coco-bacilos, primeira fase.....	94
Figura 5.9 – Precipitado composto de ferro e enxofre observado por microscopia eletrônica de varredura ao final do experimento e espectro de energia realizado por EDX mostrando os elementos constituintes da amostra.....	98

Figura 5.10 – Dados de amostras do efluente ao reator com adição de nitrato durante o período onde ocorreu sobrecarga orgânica. (a) concentração de ácido acético efluente. (b) concentração de ácidos propiônico, iso-butírico, butírico e iso-valérico efluente. (c) DQO _b efluente.....	101
Figura 5.11 – Fotomicrografias em contraste de fase de bactérias e arqueas metanogências presentes no biofilme do reator com adição de nitrato. (a) cocos e cocobacilos, primeira fase. (b) bacilos fluorescentes, primeira fase (c) filamentos finos, segunda fase. (d) vibrios, segunda fase. (e) bacilos retos, segunda fase - NMP diluição 10 ⁻¹ . (f) bacilos em pares, segunda fase - NMP diluição 10 ⁻⁴	104
Figura 5.12 – Dados de amostras do efluente ao reator com adição de sulfato durante o período onde ocorreu carga de choque orgânica. (a) concentração de ácido acético efluente. (b) concentração de ácidos propiônico, iso-butírico, butírico e iso-valérico efluente. (c) DQO _b efluente.....	110
Figura 5.13 – Fotomicrografias em contraste de fase de bactérias e arqueas metanogências presentes no biofilme do reator com adição de sulfato. (a) cocos em cadeia, fase de adaptação. (b) bacilos fluorescentes, primeira fase (c) e (d) arqueas metanogências semelhantes a <i>Methanosarcina</i> , segunda fase. (e) bacilos retos e em pares, segunda fase – NMP diluição 10 ⁻⁵ . (f) bacilos com pontuações nas extremidades, segunda fase - NMP diluição 10 ⁻⁷	112
Figura 5.14 – Variação temporal da concentração de DQO afluente e efluente ao longo da 2 ^a etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	122
Figura 5.15 – Variação temporal da concentração de BTEX afluente e efluente ao longo da 2 ^a etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	123
Figura 5.16 – Variação temporal da eficiência de remoção de DQO _b e de BTEX ao longo da 2 ^a etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	124
Figura 5.17 – Variação temporal da carga orgânica removida de DQO e BTEX em função da carga orgânica aplicada ao reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	125
Figura 5.18 – Variação temporal da relação alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial do efluente ao longo da 2 ^a etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	126

Figura 5.19 – Variação temporal da alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	127
Figura 5.20 – Variação temporal da concentração de CH ₄ e de CO ₂ e porcentagem de CH ₄ e de CO ₂ ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	128
Figura 5.21 – Fotos do RAHLF mostrando a distribuição do material suporte.....	130
Figura 5.22 – Variação temporal da concentração de DQO afluente e efluente ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.....	132
Figura 5.23 – Variação temporal da concentração de BTEX afluente e efluente ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.....	133
Figura 5.24 – Variação temporal da eficiência de remoção de DQO _b e de BTEX ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.....	134
Figura 5.25 – Variação temporal da relação alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial do efluente ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.....	135
Figura 5.26 – Variação temporal da AB e AVT ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.....	136
Figura 5.27 – Variação temporal da concentração de CH ₄ e de CO ₂ e porcentagem de CH ₄ e de CO ₂ ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.....	137
Figura 5.28 – Perfis de adsorção dinâmicos de BTEX em espuma de poliuretano e biopartícula.....	145
Figura 5.29 – Análise cromatográfica de BTEX em ponto de coleta de biogás.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Compostos aromáticos presentes em efluentes de processos industriais.....	10
Tabela 3.2 – Valores orientadores para solos e para águas subterrâneas do estado de São Paulo.....	11
Tabela 3.3 – Contaminação de águas superficiais e aquíferos.....	12
Tabela 3.4 – Revisão da literatura de degradação de BTEX <i>in situ</i> e em microcosmos....	15
Tabela 3.5 – Bioreatores utilizados no tratamento de águas subterrâneas e suas principais vantagens e desvantagens.....	19
Tabela 3.6 – Energia livre das reações de transformação anaeróbia de BTEX.....	26
Tabela 3.7 – Reações envolvidas na conversão de benzoato em metano, na presença de sulfato.....	43
Tabela 3.8 – Coeficientes cinéticos para degradações de BTEX.....	46
Tabela 3.9 – Modelos cinéticos de inibição por substrato.....	51
Tabela 3.10 – Microrganismos observados em vários estudos de degradação anaeróbia de BTEX.....	56
Tabela 3.11 – Concentrações inibitórias (IC) de 50 % e 80 % de compostos aromáticos observadas na metanogênese acetoclástica.....	60
Tabela 4.1 – Composição da água residuária sintética utilizada nas 1 ^a e 2 ^a etapas.....	68
Tabela 4.2 – Composição da água residuária sintética utilizada na 3 ^a etapa.....	69
Tabela 4.3 – Frequência e métodos analíticos dos parâmetros analisados.....	70
Tabela 4.4 – Tempos de retenção aproximados dos BTEX.....	73
Tabela 4.5 – Resultados cromatográficos com soluções de m-xileno e de p-xileno e com solução de m-xileno e p-xileno, na concentração de 10 mg/L.....	73
Tabela 4.6 – Tempo de retenção de várias substâncias para escolha do padrão interno....	74
Tabela 5.1 – Sumário dos dados de regressão linear para o cálculo do limite de detecção para faixa de concentração de 0 a 2000,0 µg/L e limite de detecção.....	87

Tabela 5.2 – Reprodutibilidade, como coeficiente de variação, de amostras de solução de BTEX em água residuária sintética, para diferentes concentrações.....	87
Tabela 5.3 – Eficiência da extração calculada comparando-se a análise do padrão em água residuária sintética com solução do padrão em metanol em água destilada, para concentrações entre 25,07 µg/L a 1000,0 µg/L.....	88
Tabela 5.4 – Eficiência da extração calculada comparando-se a análise do padrão em água residuária sintética com solução do padrão em metanol em água destilada, para concentrações entre 1,0 mg/L a 40,0 mg/L.....	88
Tabela 5.5 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente durante a fase de adaptação do reator controle.....	89
Tabela 5.6 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente ao reator controle durante a 1ª fase de operação com etanol como co-solvente.....	90
Tabela 5.7 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente ao reator controle da 2ª fase de operação com detergente comercial como co-solvente.....	92
Tabela 5.8 – Morfologias microbianas em amostras ao final de cada fase de operação do reator controle.....	93
Tabela 5.9 – NMP durante o período de operação do reator controle.....	96
Tabela 5.10 – Morfologias microbianas observadas no NMP na fase de adaptação do reator controle.....	97
Tabela 5.11 – Morfologias microbianas observadas no NMP na segunda fase do reator controle.....	97
Tabela 5.12 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente durante a fase de adaptação do reator com adição de nitrato.....	99
Tabela 5.13 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente ao reator com adição de nitrato durante a 1ª fase de operação com etanol como co-solvente.....	100
Tabela 5.14 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente ao reator com adição de nitrato da 2ª fase de operação com detergente comercial como co-solvente.....	102
Tabela 5.15 – Morfologias microbianas em amostras ao final de cada fase de operação do reator com adição de nitrato.....	103
Tabela 5.16 – NMP durante o período de operação do reator com adição de nitrato.....	105
Tabela 5.17 – Morfologias microbianas observadas no NMP na fase de adaptação do reator com adição de nitrato.....	106

Tabela 5.18 – Morfologias microbianas no NMP na 2ª fase do reator com adição de nitrato.....	107
Tabela 5.19 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente durante a fase de adaptação do reator com adição de sulfato.....	107
Tabela 5.20 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente ao reator com adição de sulfato durante a 1ª fase de operação com etanol como co-solvente.....	108
Tabela 5.21 – Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente ao reator com adição de sulfato da 2ª fase de operação com detergente comercial como co-solvente.....	110
Tabela 5.22 – Morfologias microbianas em amostras ao final de cada fase de operação do reator com adição de sulfato.....	111
Tabela 5.23 – NMP durante o período de operação do reator com adição de sulfato.....	114
Tabela 5.24 – Morfologias microbianas observadas no NMP na fase de adaptação do reator com adição de sulfato.....	115
Tabela 5.25 – Morfologias microbianas observadas no NMP na segunda fase do reator com adição de sulfato.....	116
Tabela 5.26 – Valores médios de parâmetros analisados dos três reatores.....	117
Tabela 5.27 – Parâmetros físico-químicos do afluyente e efluente ao reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	121
Tabela 5.28 – Variação espacial de DQO ₆ , de concentrações de BTEX e de ácidos voláteis, nas diferentes fases de operação do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX, obtidas em posições de L/D de 0 a 20.....	129
Tabela 5.29 – Concentração de sólidos totais e sólidos totais voláteis nas matrizes de espuma de poliuretano e suspensos no reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.....	130
Tabela 5.30 – Parâmetros físico-químicos afluyente e efluente ao reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.....	131
Tabela 5.31 – Concentração de sólidos totais e sólidos totais voláteis nas matrizes de espuma de poliuretano e suspensos no reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.....	138
Tabela 5.32 – Morfologias microbianas em amostras de cada fase de operação do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial..	139
Tabela 5.33 – Parâmetros físico-químicos monitorados do reator alimentado com solução etanólica de BTEX durante a 3ª etapa experimental.....	140

Tabela 5.34 – Variação espacial de concentrações de BTEX e de ácidos voláteis, na operação do reator alimentado com solução etanólica de BTEX, obtidas em posições de L/D de 0 a 20.....	142
Tabela 5.35 – Concentração de sólidos totais e sólidos totais voláteis nas matrizes de espuma de poliuretano, ao final do período de operação do reator alimentado com solução etanólica de BTEX.....	142
Tabela 5.36 – Morfologias microbianas em amostras das 2ª e 3ª etapas experimentais do reator alimentado com solução etanólica de BTEX.....	143
Tabela 5.37 – Parâmetros das expressões hiperbólicas de BTEX na espuma de poliuretano e biopartícula.....	145
Tabela 5.38 – Valores dos parâmetros obtidos pela expressão cinética (5.3). C_o foi fixo no modelo.....	148
Tabela 5.39 – Valores das constantes cinéticas aparente de primeira ordem (k_1^{app}).....	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	- Alcalinidade a bicarbonato
AI	- Alcalinidade intermediária
AP	- Alcalinidade parcial
AVT	- Ácidos voláteis totais
BEmX	- Benzeno, etilbenzeno e m-xileno
BTEX	- Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
BTX	- Benzeno, tolueno e xilenos
BRS	- Bactérias redutoras de sulfato
BSA	- Benzeno sulfonato de alquila
C.V.	- Coeficiente de variação
ClO_4^-	- Percloratos
CETESB	- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA	- Conselho Nacional de Meio Ambiente
DQO	- Demanda química de oxigênio
DQO_b	- Demanda química de oxigênio bruta
DQO_f	- Demanda química de oxigênio filtrada
EDX	- Energy Dispersive X-ray Spectrometer
ETE	- Estação de tratamento de esgotos
HS	- Headspace estático
HS/SPME	- Headspace estático / microextração em fase sólida combinados
HSCG	- Headspace estático / cromatografia gasosa
IC_{50}	- Concentração de composto que causa inibição de 50 % da atividade metanogênica
IC_{80}	- Concentração de composto que causa inibição de 80 % da atividade metanogênica
L/D	- Relação comprimento / diâmetro
LD	- Limite de detecção

LD ₅₀	- Dose letal média de composto, fatal a 50 % dos organismos testados
MIMS	- Membrana de passagem / espectrometria de massas
NMP	- Número Mais Provável
pH	- Potencial hidrogeniônico
PCE	- Tetracloroetano
PSR	- Primeiro segmento do reator
P&T	- "Purge and Trap"
RAHLF	- Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
SAAE	- Serviço Autônomo de Águas e Esgotos
SPME	- Microextração em fase sólida
ST	- Sólidos totais
STV	- Sólidos totais voláteis
TDH	- Tempo de detenção hidráulica
TmX	- Tolueno, m-xileno
UASB	- Reator Anaeróbio de Manta de Lodo com Fluxo Ascendente
USR	- Último segmento do reator

LISTA DE SÍMBOLOS

- A - Área do pico cromatográfico do composto
- A_{pi} - Área do pico cromatográfico do padrão interno
- A_{RAHLF} - Área da seção transversal do RAHLF, L^2
- b - Interseção da reta
- C - Concentração de BTEX na fase líquida numa determinada posição longitudinal
L/D, $M.L^{-3}$
- C_o - Concentração inicial de BTEX na fase líquida, $M.L^{-3}$
- C_p - Concentração de produto, $M.L^{-3}$
- C_r - Concentração de BTEX residual, $M.L^{-3}$
- C_s - Concentração de substrato, $M.L^{-3}$
- C_x - Concentração de microrganismos, $M.L^{-3}$
- D - Diâmetro do RAHLF, L
- ϵ - Porosidade do leito
- F_{sp} - Capacidade de adsorção de composto na partícula, $M.L^{-3}$ composto / M partícula
- F_{sp}^{max} - Capacidade máxima de adsorção de composto na partícula, $M.L^{-3}$ composto / M partícula
- H - Constante da lei de Henry
- k_o - Constante de velocidade para reação de ordem zero, $M.L^{-3}.T^{-1}$
- k_1 - Constante de velocidade para reação de primeira ordem, T^{-1}
- K_1^{app} - Constante cinética aparente de primeira ordem, T^{-1}
- K_i - Constante de inibição por substrato, $M.L^{-3}$
- K_s - Constante de saturação do substrato, $M.L^{-3}$
- K_s^{app} - Constante de saturação de substrato aparente, $M.L^{-3}$
- M - Massa total de substrato, M
- m - Inclinação da reta
- P_{max} - Constante de inibição por produto, $M.L^{-3}$

Q	- Vazão de líquido, $L^3.T^{-1}$
R^2	- Coeficiente de correlação
R_{obs}	- Velocidade global de reação, $M.L^{-1}.T^{-1}$
r_{max}^{app}	- Velocidade específica máxima de consumo de substrato aparente, $M.M^{-1}.T^{-1}$
SE_b	- Erro padrão do intercepto
SE_m	- Erro padrão da inclinação
T	- Tempo, T
U	- Velocidade específica de consumo de substrato, M substrato. M^{-1} células. T^{-1}
U_{max}	- Velocidade específica máxima de consumo de substrato, M substrato. M^{-1} células. T^{-1}
V_G	- Volume de headspace, L^{-3}
V_L	- Volume líquido, L^{-3}
v_s	- Velocidade superficial de líquido, $L.T^{-1}$
x	- Concentração de BTEX, $M.L^{-3}$
y	- Razão entre as áreas cromatográficas do composto e do padrão interno
$Y_{X/S}$	- Fator de crescimento ou a produção bruta de microrganismos por unidade de massa de substrato, M células / M substrato
μ	- Velocidade específica de crescimento celular, T^{-1}
μ_{max}	- Velocidade máxima de crescimento celular, T^{-1}
τ	- Tempo necessário para adsorver metade da quantidade máxima, T^{-1}

RESUMO

de Nardi, I. R. (2002). *Degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos, 2002. 165p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A atividade industrial diversificada tem sido responsável pelo lançamento, no ambiente, de resíduos que contém materiais tóxicos e/ou de difícil degradação. Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são compostos importantes, por estarem presentes em águas superficiais e subterrâneas, geralmente, a partir de contaminações por derivados de petróleo. Enquanto a degradação aeróbia de BTEX já está amplamente entendida e descrita, a aplicação de processos anaeróbios de tratamento, iniciados na década de 80 ainda requer muitos estudos. Reatores anaeróbios horizontais de leito fixo de bancada preenchidos com cubos de espuma de poliuretano, contendo lodo anaeróbio proveniente de diversas fontes trataram água residuária sintética a base de proteínas, carboidratos, lipídios, contendo solução etanólica de BTEX e solução de BTEX em detergente comercial; e solução etanólica de BTEX como únicas fontes de carbono. A influência da adição de nitrato e sulfato como aceptores de elétrons na degradação anaeróbia também é discutida. Os reatores foram capazes de remover BTEX nas concentrações testadas de até 15,0 mg/L de cada composto, com tempos de detenção hidráulica de 11,4 horas e 13,5 horas. Os reatores forneceram condições excelentes para o desenvolvimento de biofilme complexo capaz de degradar BTEX, contendo organismos degradadores de BTEX, acetogênicos, acetoclásticos e hidrogenotróficos. Arqueas metanogênicas representaram menos de 0,5 % do total de organismos anaeróbios na biomassa dos reatores. O modelo cinético de primeira ordem com residual foi o que melhor representou os dados experimentais e as velocidades de degradações de BTEX, estimadas neste trabalho, foram cerca de 10 a 94 vezes maiores que as encontradas na literatura, em ensaios realizados em microcosmos.

Palavras-chave: processo anaeróbio, BTEX, reator de filme fixo, RAHLF, biomassa imobilizada, espuma de poliuretano.

ABSTRACT

de Nardi, I. R. (2002). *Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) degradation in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor*. São Carlos, 2002. 165p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The diversified industrial activity has been responsible for discharge in the environment of toxic and/or difficult degradation compounds. Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) are important compounds present in surface and ground waters, usually from petroleum products contamination. While BTEX aerobic degradation is extensively understood and described, anaerobic treatment application, started in the eighties, associated to fundamental studies need to be improved. Bench-scale horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactors filled with polyurethane foam matrices, containing immobilized anaerobic biomass from various sources, treated synthetic substrate containing protein, carbohydrates, lipids, BTEX solution in ethanol and BTEX solution in commercial detergent, as well as BTEX solution in ethanol as the sole carbon source. The influence of the addition of nitrate and sulfate as electron acceptors on anaerobic degradation is also discussed. The reactors were able to remove up to 15.0 mg/L of each BTEX compound, with hydraulic detention time of 11.4 hours and 13.5 hours. The reactors provided excellent conditions for developing a complex biofilm with BTEX-degraders, acetogenic, acetoclastic and hydrogenotrophic microorganisms. Methanogenic archaea were found to represent less than 0.5 % of the total anaerobic organisms in the biomass inside the reactors. Residual first order kinetic model fitted well the experimental data and the BTEX degradation rates, estimated in this work, were about 10- to 94-fold higher than those found in the literature, in microcosms studies.

Keywords: anaerobic process, BTEX, fixed-bed reactor, HAIB reactor, immobilized biomass, polyurethane foam.

1. INTRODUÇÃO

A atual atividade industrial tem sido responsável por lançamentos, no ambiente, de resíduos contendo materiais tóxicos ou de difícil degradação. Um grupo de compostos que tem recebido atenção crescente devido ao seu potencial carcinogênico é o de hidrocarbonetos aromáticos, principalmente benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros xilenos, conhecidos coletivamente como BTEX. Estes compostos são os principais componentes aromáticos em muitos produtos derivados do petróleo e são amplamente utilizados como solventes industriais em sínteses orgânicas e em limpezas de equipamentos.

Os compostos BTEX são freqüentemente encontrados em águas subterrâneas como resultado de vazamentos em tanques e tubulações subterrâneas de estocagem de petróleo, de práticas inadequadas de disposição de resíduos, de derramamentos acidentais e de percolação em aterros sanitários (Shim & Yang, 1999). A poluição de águas subterrâneas freqüentemente resulta da migração de poluentes e contaminação durante a captação de águas de abastecimento (Langwaldt & Puhakka, 2000). Gobato (1995) detectou benzeno, tolueno e xilenos em água potável de São Carlos, proveniente de poço artesiano e de águas superficiais, mesmo após o tratamento realizado pelo Serviço Autônomo de Águas e Esgotos (SAAE), em concentrações menores que 1 µg/L.

As tecnologias de tratamento anaeróbio foram inicialmente desenvolvidas para o tratamento de frações facilmente biodegradáveis de esgotos sanitários, esterco e lodos. O desenvolvimento de sistemas de alta taxa, entre as décadas de 50 a 80, propiciou a aplicação de tais tecnologias no tratamento de efluentes agroindustriais. Com o desenvolvimento crescente dessa tecnologia, houve significativo avanço no conhecimento sobre toxicidade e biodegradabilidade, permitindo a aplicação de processos anaeróbios em efluentes contendo compostos tóxicos e recalcitrantes de indústrias químicas, petroquímicas e de polpa e papel, além da aplicação em bioremediação. O conhecimento da capacidade de consórcios anaeróbios em transformar e mineralizar compostos está em expansão, com muitos estudos sendo realizados (Field, 2001).

A partir da década de 80, tem-se reconhecido que a diversidade do metabolismo microbiano anaeróbio é muito mais ampla do que foi previamente estabelecida. Muitos contaminantes considerados recalcitrantes sob condições anóxicas, como hidrocarbonetos, percloratos (ClO_4^-), compostos halogenados e compostos nitroaromáticos, podem, de fato, ser biodegradados na ausência de oxigênio molecular (Coates & Anderson, 2000).

Enquanto as rotas de degradação aeróbia de BTEX já estão amplamente entendidas e descritas, a aplicação de processos anaeróbios de tratamento, iniciados na década de 80, ainda requer muitos estudos. Pesquisas de laboratório mostram que a degradação anaeróbia de BTEX pode ocorrer sob ampla faixa de potenciais redox. As reações bioquímicas de degradação podem ser mediadas através de bactérias redutoras de nitrato, sulfato ou ferro (III), bem como por consórcios fermentativo e metanogênico que têm demonstrado habilidade em metabolizar pelo menos um dos compostos BTEX (Stoner, 1994). O tratamento anaeróbio de águas residuárias contendo BTEX é possível, desde que o reator retenha o lodo anaeróbio adaptado a esse tipo de despejo.

Há grande interesse no desenvolvimento de tecnologias que utilizam bioreatores para a degradação eficiente de BTEX, bem como na melhor compreensão da cinética de biodegradação de BTEX em bioreatores e em águas subterrâneas. A maioria dos estudos de biodegradação de BTEX tem sido realizada em microcosmos utilizando consórcios microbianos provenientes de lodo de estação de tratamento de esgotos (ETE), de solo ou de águas subterrâneas (Shim & Yang, 1999). Os resultados desses estudos são freqüentemente contraditórios e variam de acordo com as diferentes condições experimentais. Várias culturas puras também têm sido estudadas, mas, usualmente, não são capazes de degradar todos os compostos simultaneamente (Shim & Yang, 1999). Nesses estudos, o efeito de fatores ambientais tais como: concentração de BTEX, concentração de biomassa viável, temperatura, pH, interações do substrato, adaptação e competição microbiana foram investigados. Essas experiências têm auxiliado na compreensão do comportamento da degradação de poluentes em sistemas fechados, mas sistemas de tratamento capazes de tratar grandes quantidades de águas residuárias contendo compostos voláteis, em bioreatores, são escassos na prática de engenharia (Yeom & Yoo, 1999).

O tratamento aeróbio de BTEX pode acarretar na volatilização de considerável fração desses componentes devido às altas velocidades de aeração e agitação normalmente empregadas nos tanques de aeração, causando poluição do ar e riscos relatados, tais como odores desagradáveis, inalação de tóxicos em áreas próximas à planta de tratamento (Chaudhuri & Wiesmann, 1995).

Os reatores biológicos utilizando biomassa imobilizada apresentam inúmeras vantagens frente aos reatores operando com biomassa suspensa na degradação de poluentes, tais como: elevada concentração de biomassa, elevada atividade metabólica atribuída a elevadas concentrações de nutrientes aderidos ao biofilme e às diferentes interações entre espécies microbianas, e resistência a compostos tóxicos principalmente devida ao efeito protetor da matriz extracelular (barreira de difusão) que reduz a concentração de tóxico no biofilme (Cohen, 2001).

Damianovic (1997) estudou a degradação e a influência de pentaclorofenol no tratamento de substrato orgânico em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF). Foi possível tratar substratos contendo 0,2 mg/L a 8,0 mg/L de pentaclorofenol, sem que o desempenho do reator fosse afetado, com remoção de aproximadamente 98 % de matéria orgânica (pentaclorofenol, glicose, ácidos acético e fórmico). Bolaños (2001) estudou a degradação de fenol, única fonte de carbono, em concentrações entre 50 mg/L a 1200 mg/L em RAHLF com 99 % de eficiência de remoção. Dessa forma, a degradação de compostos aromáticos em Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo (RAHLF), operados com espuma de poliuretano como meio suporte para desenvolvimento microbiano, tem-se mostrado uma tecnologia promissora. Esse é o principal fator que justifica o estudo aprofundado da degradação de BTEX em reatores RAHLF.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o tratamento biológico anaeróbio dos compostos BTEX, sob condições mesofílicas, em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) utilizando espuma de poliuretano como suporte de imobilização de biomassa, inoculada com mistura de lodos provenientes de reatores Anaeróbio de Manta de Lodo com Fluxo Ascendente (UASB) tratando águas residuárias de diferentes composições.

Os objetivos específicos foram:

- Testar a degradação de BTEX em condições fermentativa e metanogênica, desnitrificante e de redução de sulfato;
- Verificar a influência de BTEX no desempenho de RAHLF tratando água residuária sintética em consórcio metanogênico;
- Avaliar a degradação de BTEX na presença de etanol e de detergente comercial, visando enquadrar o trabalho na área de bioremediação;
- Adaptar método analítico cromatográfico para determinação de BTEX;
- Avaliar o potencial de adsorção de BTEX nas matrizes de espuma de poliuretano e na biopartícula;
- Avaliar a cinética de degradação de BTEX;
- Por meio da aplicação do método do Número Mais Provável (NMP), monitorar e quantificar bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas em RAHLF.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

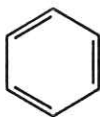
3.1 Compostos Aromáticos

As características dos compostos aromáticos, cujas degradações foram estudadas neste trabalho, são apresentadas a seguir (THE MERCK INDEX, 1996 e <http://www.crossroads.nsc.org/chemicals.cfm>).

3.1.1 Benzeno

O benzeno é o principal composto produzido a partir de petróleo, além de estar presente em muitas plantas, animais e em fumaças vulcânicas e de incêndios florestais. É um dos componentes da gasolina, sendo usado também na produção de outros intermediários e de alguns tipos de plásticos, detergentes líquidos, borrachas, fibras sintéticas e pesticidas. Emissões de benzeno podem ser detectadas de colas de tapete, tapetes texturados e ceras de mobiliário.

- Sinônimos: fenil hidreto, benzol, benzina, ciclohexatrieno
- Fórmula molecular: C_6H_6
- Fórmula estrutural:



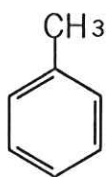
- Massa molecular: 78,11
- Ponto de fusão: 5,5 °C
- Ponto de ebulição: 80,1 °C
- Densidade: 0,88 g/mL
- Forma física: líquido incolor, com odor característico de thinner, detectável a 12 ppm
- Solubilidade em água: 0,18 g/100 mL

- Solúvel em: acetona, ácido acético glacial, álcool, disulfeto de carbono, éter, óleos, tetracloreto de carbono
- Dose letal média (quantidade de composto estimado ser fatal a 50 % dos organismos testados, LD₅₀, em ratos): 3,3 g/kg
- Toxicidade aguda: desmaios, dores de cabeça, vômitos, irritação das membranas mucosas
- Toxicidade crônica: essa substância tem sido listada como carcinogênica pela Agência de Proteção Ambiental, podendo levar à leucemia. A exposição a elevadas concentrações de benzeno pode ser fatal em minutos, com convulsões e depressão do sistema nervoso central.

3.1.2 Tolueno

É produzido no refinamento de petróleo e como sub-produto na produção de estireno e operações de forno a carvão. Suas fontes naturais incluem óleo cru e alcatrão de madeira. Cerca de 92 % do tolueno produzido é utilizado como componente da gasolina; 1 % é utilizado em solventes de tintas, adesivos, agentes de limpeza e em extrações químicas. O restante é utilizado na síntese química do benzeno, espumas de uretano e outros compostos orgânicos, como fármacos, tintas e cosméticos para unhas.

- Sinônimos: toluol, fenil metano, metilbenzol e metilbenzeno
- Fórmula molecular: C₇H₈
- Fórmula estrutural:



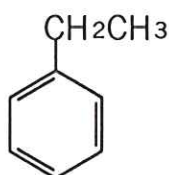
- Massa molecular: 92,14
- Ponto de fusão: -95,0 °C
- Ponto de ebulição: 110,6 °C
- Densidade: 0,87 g/mL
- Forma física: líquido incolor, com odor aromático similar ao benzeno, detectável a 0,16 ppm - 37 ppm
- Solubilidade em água: 0,0526 g/100 mL
- Solúvel em: acetona, ácido acético glacial, álcool, clorofórmio, disulfeto de carbono, éter
- LD₅₀ (ratos): 7,53 g/kg

- Toxicidade: disfunção do sistema nervoso central, fadiga, fraqueza, perda de memória, náusea e perda de apetite. Os dados são insuficientes com relação ao seu potencial carcinogênico. Pode prejudicar o desenvolvimento de fetos.

3.1.3 Etilbenzeno

É produzido a partir da alquilação de benzeno com etileno. Superfracionamento de compostos aromáticos com 8 átomos de carbono (C_8) fornece somente pequena fração de etilbenzeno. É quase exclusivamente (99 %) utilizado na produção de monômero estireno; menos de 1 % é utilizado como solvente de tintas ou como intermediário na produção de dietilbenzeno e acetofenona.

- Sinônimos: fenil etano, etilbenzol.
- Fórmula molecular: C_8H_{10}
- Fórmula estrutural:



- Massa molecular: 106,16
- Ponto de fusão: -94,9 °C
- Ponto de ebulição: 136,2 °C
- Densidade: 0,87 g/mL
- Forma física: líquido incolor com odor aromático
- Solubilidade em água: 0,0206 g/100 mL
- Solúvel em solventes orgânicos
- LD₅₀ (ratos): 5,46 g/kg
- Toxicidade: irritação das membranas mucosas, dores de cabeça, dermatites, narcose, coma.

3.1.4 Xileno

As frações da reforma de petróleo são as principais fontes de xilenos. Xileno comercial é uma mistura dos isômeros o-xileno, m-xileno e p-xileno sendo m-xileno o predominante. Quantidades traço de etilbenzeno podem estar presentes. É um líquido incolor à temperatura ambiente, com odor aromático. Xileno é usado como solvente, na produção de

gasolina, como matéria-prima de compostos usados na fabricação de fibras de poliéster, em tintas e inseticidas.

o-Xileno é usado principalmente nas produções de anidrido ftálico e ftalonitrila, convertido no pigmento cobre ftalocianina. Uma pequena quantidade é usada como solvente e na produção de bactericidas, herbicidas de soja e óleos lubrificantes.

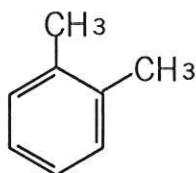
m-Xileno é usado na manufatura de ácido isoftálico e, em menor extensão, em isoftalonitrila, utilizado na produção do fungicida tetracloroisoftalonitrila.

p-Xileno, o isômero mais importante comercialmente, é principalmente consumido na produção de ácido tereftálico, usado na produção de filmes, resinas e fibras poliésteres para confecção de produtos domésticos, tapetes e tecidos. Também é usado como solvente e na manufatura de di-paraxileno e herbicidas.

Toxicidade: irritação das membranas mucosas, problemas estomacais, sonolência, náuseas, vômitos, dores abdominais, dermatite, falta de coordenação, problemas de memória e de concentração, podendo prejudicar o desenvolvimento de fetos. Xilenos são considerados altamente tóxicos à vida aquática.

o-xileno:

- Sinônimos: o-dimetilbenzeno, 1,2-dimetilbenzeno, o-metiltolueno, 1,2-xileno, o-xilol
- Fórmula molecular: C_8H_{10}
- Fórmula estrutural:

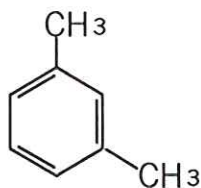


- Massa molecular: 106,16
- Ponto de fusão: $-25,2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Ponto de ebulição: $144,0\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Densidade: 0,88 g/mL
- Solúvel em: álcool, éter

m-xileno:

- Sinônimos: m-dimetilbenzeno, 1,3-dimetilbenzeno, 1,3-xileno, m-xilol
- Fórmula molecular: C_8H_{10}

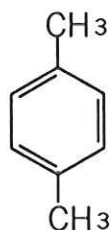
- Fórmula estrutural:



- Massa molecular: 106,16
- Ponto de fusão: -47,4 °C
- Ponto de ebulição: 139,1 °C
- Densidade: 0,86 g/mL
- Solúvel em: álcool, éter e muitos outros solventes orgânicos
- LD₅₀ (ratos): 6,6 g/kg

p-xileno:

- Sinônimos: p-dimetilbenzeno, 1,4-dimetilbenzeno, p-metiltolueno, 1,4-xileno
- Fórmula molecular: C₈H₁₀
- Fórmula estrutural:



- Massa molecular: 106,16
- Ponto de fusão: -13,3 °C
- Ponto de ebulição: 138,3 °C
- Densidade: 0,86 g/mL
- Solúvel em: álcool, éter, solventes orgânicos

3.2 Fontes de contaminação de BTEX

Hidrocarbonetos monoaromáticos são compostos de origem natural, constituintes do óleo cru, e alguns como benzeno, tolueno, etilbenzeno e propilbenzeno são também biogenicamente produzidos por microrganismos, em condições anaeróbias, durante transformações de derivados aromáticos da lignina ou de aminoácidos aromáticos (Grbic-Galic, 1990).

Quantidades consideráveis de petróleo são liberadas em águas superficiais e subterrâneas e no solo, provenientes de diversas atividades industriais, vazamentos de tanques e tubulações e derramamentos acidentais. Uma parte significativa do petróleo consiste de compostos aromáticos que são considerados uma ameaça ao meio ambiente devido à sua toxicidade (Chaudhuri & Wiesmann, 1996). BTEX estão presentes em combustíveis sendo a fração aromática de menor massa molecular obtidos pelo fracionamento do petróleo e da reforma de hidrocarbonetos (Bowlen & Kosson, 1995).

Vários hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e clorados, entre eles BTEX, foram identificados em amostras aquosas em uma instalação de tratamento de águas residuárias recebendo esgotos doméstico e industrial (van Langenhove *et al.*, 1985). Percolados de aterros sanitários industriais freqüentemente contêm consideráveis quantidades de BTEX dissolvidos (Bowlen & Kosson, 1995). A Tabela 3.1 lista alguns compostos aromáticos presentes em águas residuárias de diferentes processos industriais.

Tabela 3.1: Compostos aromáticos presentes em efluentes de processos industriais.

Fonte	Compostos aromáticos significantes
Refinaria de petróleo	Benzeno, benzenos substituídos, tolueno, n-octanos, n-decanos, naftaleno, bifenis, fenol, cianeto, sufeto e amônia
Petroquímicas	Naftaleno, heptano, benzeno, butadieno, álcoois C ₄ , fenol e resorcinol
Indústrias química	m-Aminofenol, resorcinol, dinitrofenol, p-nitrofenol, trinitrofenol, ácidos benzeno-sulfônicos, anilina, clorobenzenos, tolueno e resorcinol
Refinaria de carvão	Fenol, catecol, cresóis, resorcinol, hidroquinona, pirogalol, hidrocarbonetos poliaromáticos, piridinas, picolínicas, lutidinas, xilenos, tolueno e ácido benzóico
Indústrias farmacêutica	Tolueno, álcool benzílico, ácido fenil acético, produtos clorados do benzeno, clorofórmio, éter, álcool etílico

Fonte: Kumaran & Paruchuri (1997)

Outra fonte de contaminação por BTEX significativa é a gasolina. Um litro de gasolina tem o potencial de contaminar $2 \cdot 10^6$ m³ de água subterrânea (Nadim *et al.*, 2000). Na composição típica de gasolina pura, estão presentes cerca de 39%, em massa, de aromáticos (0,8 % de benzeno, 3,9 % de tolueno, 1,3 % de etilbenzeno, 3,8 % de m-xileno, 1,3 % de p-xileno e 2,2 % de o-xileno) (Seabra, 1999). A gasolina brasileira contém de 20 % a 26 % de etanol, em volume, cuja finalidade é o aumento de seu grau de octanagem. Vazamentos em tanques de combustíveis, principalmente em postos de gasolina, têm resultado na poluição de corpos d'água e de aquíferos (Seabra, 1999). O aumento de ocorrências de vazamentos em sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e de

outros combustíveis levou à formulação da Resolução nº 273 de 29 de novembro de 2000 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), que estabelece diretrizes de localização, construção, operação de postos revendedores e de postos de abastecimento.

Muitos pesticidas contêm quantidades significativas de solventes orgânicos em sua formulação, entre eles tolueno, xilenos e clorobenzeno, que podem constituir de 7 % a 14 %, em massa, da formulação de pesticidas, contaminando solos destinados a agricultura (Phelps & Young, 2001).

A contaminação de rios por compostos orgânicos voláteis pode ocorrer por descarga direta, ou por lixiviação de resíduos depositados ao longo do rio. Benzeno e tolueno ocorrem, com frequência, em níveis superiores a 1,0 µg/L; ocasionalmente, níveis maiores que 10,0 µg/L foram detectados em rios e em suas respectivas águas tratadas (Gobato, 1995). No Brasil, o CONAMA, de acordo com a Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986, estabelece somente alguns teores máximos para compostos orgânicos, entre eles o benzeno (10,0 µg/L). Entretanto, a Portaria nº 1469 de 29 de dezembro de 2000 do Ministério da Saúde, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, determina além do valor máximo permitido para o benzeno na água potável (5,0 µg/L), valores para o tolueno (170,0 µg/L), o etilbenzeno (200,0 µg/L) e os xilenos (300,0 µg/L). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) apresenta um relatório de estabelecimento de valores orientadores para proteção da qualidade de solos e das águas subterrâneas no estado de São Paulo sendo incluídos benzeno, tolueno e xilenos (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Valores orientadores para solos e para águas subterrâneas no estado de São Paulo.

Substância	Referência	Solos (mg/kg)			Águas subterrâneas (µg/L)
		Intervenção			Intervenção
		Agrícola	Residencial	Industrial	
Benzeno	0,25	0,6	1,5	3,0	5,0
Tolueno	0,25	30,0	40,0	140,0	170,0
Xilenos	0,25	3,0	6,0	15,0	300,0

O valor de referência indica o limite de qualidade para um solo considerado limpo.

O valor de intervenção indica o limite de contaminação do solo e das águas subterrâneas, acima do qual, existe risco potencial à saúde humana e quando excedido requer alguma forma de intervenção na área avaliada.

Fonte: Casarini *et al.* (2001)

A Tabela 3.3 apresenta alguns dados de contaminação de BTEX em águas superficiais e aquíferos. Os valores variam de acordo com o local de amostragem, período de contaminação e tempo decorrido da contaminação até a amostragem.

Tabela 3.3: Contaminação de águas superficiais e aquíferos.

Fonte de contaminação	Composto	Referência
Plataformas – golfo do México: Descarga de resíduos gasosos	< 10 % de hidrocarbonetos aromáticos (1,5 µgBTEX/L) 20 mg/L hidrocarbonetos (13,1 mgBTEX/L)	Sauer (1981)
Descarga de resíduos líquidos		
Rio Glatt, Suíça	m-xileno (0,2 µg/L)	Kuhn <i>et al.</i> (1985)
Produção biogênica no hipolímnio anóxico, lago Schleinsee, Alemanha	Benzeno (300 ng/L) Tolueno (1500 ng/L)	Jüttner & Henatsch (1986) Jüttner (1988)
Rio Rhine, Alemanha	Benzeno (0,1 µg/L)	Van Beelen & van Keulen(1990)
Rio Jurong, Singapura	Benzeno (0,8 – 2,1 µg/L)	Foo (1991)
Água de lavagem de posto de gasolina	Benzeno (1,1 – 40,4 µg/L)	
Pluma de percolado de aterro sanitário, Canadá	BTEX (20,2 – 1916,0 µg/L)	Reinhard & Goodman (1984)
Aquífero contaminado com percolado de aterro sanitário, Dinamarca	Benzeno (2 – 77 µg/L) Tolueno (1 – 14 µg/L) Etilbenzeno (1 – 77 µg/L) Xilenos (2 – 1548 µg/L)	Rügge <i>et al.</i> (1995)
Aquífero contaminado com óleo cru, EUA	Benzeno e alquilbenzenos (4 – 9 mg/L)	Cozzareli <i>et al.</i> (1990)
Aquífero contaminado com gás condensante, Holanda	BTEX (20 mg/L)	Morgan <i>et al.</i> (1993)
Aquíferos contaminados com combustível, EUA	Benzeno (1,5 – 14,0 mg/L)	Salanitro (1993)
Aquífero contaminado com combustível JP-4, EUA	BTEX (20 µg/L – 21,5 mg/L)	Wiedemeier <i>et al.</i> (1996)
Aquífero contaminado com combustível, Canadá	BTEX (4,6 mg/L)	Curtis & Lamme (1998)
Aquífero contaminado com gasolina, EUA	BTEX (0,5 µg/L – 120 mg/L)	Kelley <i>et al.</i> (1997)
Aquífero contaminado com gasolina, Austrália	Benzeno (8,0 – 38,2 mg/L) Tolueno (1,0 – 75,0 mg/L) Etilbenzeno (0,3 – 8,2 mg/L) xilenos (0,4 – 38,7 mg/L)	Davis <i>et al.</i> (1999) Johnston <i>et al.</i> (1998)
Aquífero contaminado com resíduo de processamento de gás natural, Canadá	BTEX (< 12 mg/L)	Granger <i>et al.</i> (1999)
Aquífero contaminado com solventes clorados e hidrocarbonetos, EUA	BTEX (< 10 mg/L)	Morkin <i>et al.</i> (2000)
Óleo cru	0 – 6 % BTEX	Wang <i>et al.</i> (1995)
Efluente de unidade de floculação e sedimentação tratando água de lavagem de veículos, Holanda	BTEX (1,9 - 12,7 mg/L)	Zilverentant (1997)
Águas residuárias de indústrias químicas	Tolueno (2,7 mg/L) Etilbenzeno, xilenos (1,8 mg/L)	Ketola <i>et al.</i> (1997)
Urinas de fumantes (20 cigarros / dia)	BTEX (1058 ng/L)	Fustinoni <i>et al.</i> (1999)
Vazamento de resíduos de alcatrão	BTEX (338 ng/mL)	Menéndez <i>et al.</i> (2000)

3.3 Degradação anaeróbia de BTEX

Os compostos aromáticos são relativamente resistentes à degradação devido à estabilidade da nuvem de elétrons π . Bactérias aeróbias usam monoxigenases e dioxigenases para introduzir átomos de oxigênio, desestabilizando a estrutura de ressonância, tornando possível a quebra do anel. Dessa forma, dioxigenases reagem com substratos aromáticos, introduzindo átomos de oxigênio no núcleo benzênico formando ortodíois. Estes compostos são atacados por outras oxigenases que quebram o anel, levando a ácidos dióicos, facilmente degradáveis. Oxigênio molecular é usado tanto como acceptor de elétrons para respiração, como reagente (Schink, 1988). Na ausência de oxigênio molecular, outras rotas metabólicas têm sido descobertas na degradação de compostos aromáticos previamente considerados de difícil degradação.

Microorganismos medeiam reações de oxidação de matéria orgânica usando aceptores de elétrons durante processos de respiração. A utilização preferencial de aceptores de elétrons dá-se em ordem decrescente de acordo com o potencial de oxidação do acceptor de elétrons (oxigênio > nitrato > ferro > sulfato > dióxido de carbono). Em geral, a cinética de oxidação de hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com maiores potenciais de oxidação (Corseuil & Alvarez, 1996).

Vários processos de degradação de BTEX podem ocorrer durante a redução de nitrato a nitrogênio molecular, devido à formação dos intermediários nitrito e óxido nitroso, que podem ser também utilizados como aceptores de elétrons (Kuhn *et al.*, 1988; Hutchins, 1991a; Schocher *et al.*, 1991). Entretanto, Burland & Edwards (1999) observaram que a degradação do benzeno pareceu ser fortemente dependente da redução de nitrato a nitrito e não da etapa seguinte, a redução de nitrito a nitrogênio molecular.

A maior parte dos estudos conhecidos sobre degradação anaeróbia de BTEX refere-se a trabalhos em microcosmos contendo solo, água subterrânea ou culturas enriquecidas. Microcosmos são úteis à investigação da diversidade de ambientes onde organismos degradadores de BTEX podem ser encontrados e para avaliação de possíveis métodos para estimular a degradação de BTEX. Apesar das dificuldades envolvidas nos experimentos de degradação *in situ*, estes são indispensáveis pois são as únicas formas de documentar quais processos ocorrerão em condições reais. Porém, pode ser difícil o controle adequado de perdas abióticas em campo, tais como: absorção, adsorção e evaporação comprometendo a interpretação dos resultados com relação aos processos microbianos de degradação. Assim, colunas com material de aquífero são utilizadas com a finalidade de superar essas

desvantagens do estudo em campo. Colunas representam a aproximação mais próxima das condições de campo do que microcosmos (Phelps & Young, 2001).

3.3.1 Degradação anaeróbia de BTEX em microcosmos

Estudos verificando a possibilidade de degradação de contaminantes *in situ* são geralmente realizados em laboratório com material subsuperficial coletado em sítio contaminado. A biodegradação deveria ser estudada em vários locais do aquífero pois há variabilidade da capacidade de degradação ao longo do local contaminado. O uso de água subterrânea para determinar o potencial de degradação pode levar a resultados enganosos pois microrganismos não ativos estão freqüentemente associados a poços (Thomas & Ward, 1989). De acordo com Corseuil & Weber (1994), a baixa população microbiana tipicamente presente nesses sistemas pode resultar em longos períodos antes do início de medidas de biodegradação mesmo sob condições altamente favoráveis. Tais atrasos, devido ao período de desenvolvimento da população microbiana, variam inversamente com o número de organismos iniciais presentes no consórcio nativo (Weber & Corseuil, 1994). Nielsen *et al.* (1992) citam que ensaios utilizando somente água subterrânea como fonte de microrganismos apresentaram velocidades de degradação próximas aos ensaios utilizando água subterrânea e sedimento na degradação de contaminantes xenobióticos. Contudo, os ensaios podem não ser reprodutíveis como os obtidos em ensaios contendo sedimento.

Estudos em microcosmos com diferentes tipos de inóculos, aceptores de elétrons e temperaturas foram realizados em frascos de soro ou de antibiótico, contendo, basicamente, sais minerais, agentes redutores, fonte de nitrogênio, vitaminas e solução tampão (Tabela 3.4). Geralmente, as únicas fontes de carbono foram BTEX. Degradação de BTEX ocorreu concomitantemente à fermentação, em combinação com metanogênese ou reduções de nitrato, sulfato ou ferro (III). Nesses estudos, controles foram usados para detectar perdas abióticas durante os ensaios.

A Tabela 3.4 apresenta um resumo dos trabalhos encontrados sobre estudos de biodegradabilidade de BTEX em microcosmos e bioremediação *in situ* de áreas contaminadas. Os resultados mostram que degradações de BTEX são processos complexos e que compostos individuais podem apresentar comportamentos distintos sob diferentes condições ambientais. Segundo Alvarez & Vogel (1991), compostos individuais poderiam estimular ou inibir a degradação de outros compostos de BTEX. A presença de um dado composto poderia estimular a degradação de outro, pela indução de enzimas, ou atuando como substrato primário e estimulando o crescimento microbiano que aumentaria o

cometabolismo de um outro composto. Por outro lado, poderia inibir devido à toxicidade, repressão catabólica, inibição competitiva por enzimas ou depleção de aceptores de elétrons.

A utilização seqüencial ou preferencial dos compostos BTEX tem sido observada por vários pesquisadores. Tolueno, freqüentemente, é o primeiro hidrocarboneto degradado, seguido pelos isômeros xilenos, em ordem variada de degradação. Etilbenzeno e benzeno, se completamente degradados, seriam os últimos (Haag *et al.*, 1991; Ball & Reinhard, 1996; Edwards & Grbic-Galic, 1992; Kao & Prosser, 2001). Fatores ambientais e o processo de biodegradação predominante (metanogênese, desnitrificação, redução de sulfato, redução de ferro (III)) seriam os principais responsáveis por variações na ordem de degradação.

Diversos trabalhos têm sugerido a ocorrência de cometabolismo de o-xileno e tolueno, ou seja, a degradação de o-xileno ocorre somente durante o período de degradação do tolueno (Ball & Reinhard, 1996; Kao & Borden, 1997; Phelps & Young, 1999). Cometabolismo pode ser explicado pela baixa especificidade da enzima (habilidade em catalisar a transformação de ampla faixa de substratos), bem como pela carência eletrônica de enzimas que participam das reações iniciais (Jorgensen *et al.*, 1995a).

As aparentes ausências de degradação de BTEX podem ser causadas por diversas limitações, tais como: ausência de microrganismos com capacidades catabólicas necessárias, concentrações de BTEX insuficientes para indução de enzimas degradativas, falta de nutrientes, temperatura, pH, limitações de difusão e transferência de massa e período de adaptação microbiana maior que o período do ensaio (Anid *et al.*, 1993; Alvarez *et al.*, 1998).

Tabela 3.4: Revisão da literatura de degradação de BTEX *in situ* e em microcosmos.

	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	o-xileno	m-xileno	p-xileno
<i>In situ</i>						
Acton & Barker (1992)		M	M	M	M	
Anderson & Lovley (2000)	S					
Barbaro <i>et al.</i> (1992)		M,N				
Borden <i>et al.</i> (1997)		N	N	N	N	N
Cozzarelli <i>et al.</i> (1990)	M,F,Mn	M,F,Mn		M,F,Mn	M,F,Mn	M,F,Mn
Gersberg <i>et al.</i> (1995a, 1995b)	N	N	N	N	N	N
Hutchins <i>et al.</i> (1991b, 1998)		N	N		N	N
Kao & Wang (2000)	N,F	N,F	N,F	N,F	N,F	N,F
Reinhard <i>et al.</i> (1997)		N,S	N,S	N,S	N,S	N,S
Cunningham <i>et al.</i> (2001)						
Thierrin <i>et al.</i> (1993)		S	S	S	S	S
Davis <i>et al.</i> (1999)						

(continua)

Tabela 3.4: Revisão da literatura de degradação de BTEX *in situ* e em microcosmos
(Continuação).

	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	o-xileno	m-xileno	p-xileno
Microcosmos						
Anderson <i>et al.</i> (1998)	F	F				
Anderson & Lovley (1999)						
Ball & Reinhard (1996)		N, S	N	N	N, S	N,S
Beller <i>et al.</i> (1992a)		S				
Borden <i>et al.</i> (1997)		N		N	N	N
Bregnard <i>et al.</i> (1996)		N		N	N	N
Burland & Edwards (1999)	N					
Chaudhuri & Wiesmann (1995)	S					
Chen & Taylor (1997)	S	S	S	S	S	S
Coates <i>et al.</i> (1996c, 1997)	S	S				
Corseuil <i>et al.</i> (1998)		M,N,S,F				
Davis <i>et al.</i> (1994)	M,S					
Edwards <i>et al.</i> (1992)		S		S	S	S
Edwards & Grbic-Galic (1992)	S	S				
Edwards & Grbic-Galic (1994)		M		M		
Evans <i>et al.</i> (1991a)		N		N	N	
Flyvbjerg <i>et al.</i> (1993)		N,S				
Gersberg <i>et al.</i> (1991)	N	N		N	N	N
Carroquino <i>et al.</i> (1992)						
Grbic-Galic & Vogel (1987)	M	M				
Häner <i>et al.</i> (1995)		N			N	N
Hunt <i>et al.</i> (1997)	F	M,F	M	F	F	
Hutchins (1991a, 1991b, 1992)		N	N	N	N	N
Hutchins <i>et al.</i> (1991a)						
Johnston <i>et al.</i> (1996)		M				
Kao & Borden (1997)		N	N	N	N	
Kao & Prosser (2001)	M	M	M	M	M	M
Kazumi <i>et al.</i> (1997)	M, S, F					
Lovley <i>et al.</i> (1989)		F				
Lovley <i>et al.</i> (1994, 1996)	F	F				
Lovley <i>et al.</i> (1995)	S					
Major <i>et al.</i> (1988)	N	N			N	
Morasch <i>et al.</i> (2001)				S	S	
Morgan <i>et al.</i> (1993)	N	N	N		N	N
Nales <i>et al.</i> (1998)	N,S,F	N,S,F	N,S,F	N,S,F	N,S,F	N,S,F
Phelps <i>et al.</i> (1996)	S					
Phelps & Young (1999)	S	M,N,S,F	M,N,S,F	N,S,F	N,S,F	N,S,F
Rabus <i>et al.</i> (1996)		S		S	S	
Rueter <i>et al.</i> (1994)		S		S	S	
Schocher <i>et al.</i> (1991)		N				
van Beelen & van Keulen(1990)	M					
Weiner <i>et al.</i> (1998)	M,S,F					
Weiner & Lovley (1998b)						
Wilson <i>et al.</i> (1986)	M	M	M	M		

M: consórcio metanogênico, N: desnitrificação, S: redução de sulfato, F: redução de ferro, Mn: redução de manganês.

3.3.2 Estudos de degradação de BTEX em reatores biológicos e colunas com sedimento

Os efeitos de fatores ambientais tais como, concentração de BTEX, concentração de biomassa viável, temperatura, pH, assim como, interações do substrato, adaptação e competição microbiana têm sido extensamente investigados em microcosmos, que auxiliam na compreensão das degradações de BTEX em sistemas fechados. Contudo, também são importantes estudos detalhados de bioreatores tratando grandes quantidades de águas residuárias contendo compostos voláteis de indústrias.

Os sistemas de tratamento de águas residuárias contendo compostos voláteis podem ser classificados de acordo com o estado físico em que se encontram. O tratamento de compostos voláteis na fase líquida é realizado em reatores de mistura e reatores tipo torre, trifásicos (bioreatores “airlift”). Nesses sistemas, compostos voláteis podem ser liberados ao ambiente devido à aeração e à agitação utilizadas nos sistemas aeróbios de tratamento. Compostos voláteis podem ser alimentados juntamente com ar em unidades de tratamento, tais como lavadores de gases, colunas de absorção e reatores de leito fixo. Os poluentes contidos na corrente de ar são absorvidos em água nos lavadores de gases ou nas colunas de absorção, sendo degradados em sistemas de lodos ativados. Em reatores de leito fixo, a corrente de ar contendo compostos voláteis, alimentada na base do leito, segue fluxo contrário ao da fase aquosa que contém nutrientes inorgânicos essenciais para o crescimento microbiano, alimentada no topo do leito (Yeom & Yoo, 1999).

Reator de leito fixo com recirculação e adição de peróxido de hidrogênio como fonte de oxigênio dissolvido para evitar aeração (Lodaya *et al.*, 1991), filtro biológico (Schindler & Friedl, 1995), reatores aeróbios seqüenciais em batelada (Zilverentant, 1997), reator híbrido contendo seção de coluna de borbulhamento e biofiltro (Yeom & Yoo, 1999), e reator de leito fibroso (Shim & Yang, 1999) são tecnologias usadas para otimizar as degradações de BTEX, cujas cinéticas têm sido buscadas com grande interesse.

Contudo, muitos compostos tóxicos não são prontamente biodegradáveis nos processos de tratamento convencionais e volatilização, sorção e passagem pelo sistema são seus principais destinos. A volatilização desses compostos para a atmosfera pode expor as pessoas a compostos carcinogênicos, além de contribuir para a degradação de camada de ozônio (Sayles & Suidan, 1993). Compostos tóxicos sorvidos no lodo podem contaminar aterros sanitários resultando na contaminação de aquíferos que pode atingir o sistema de abastecimento de água. A passagem incólume por sistemas de tratamento sem remoção faz com que sejam liberados nas águas superficiais podendo também contaminar fontes de águas de abastecimento, além de prejudicar o ecossistema local. A volatilização de compostos

tóxicos pode ser importante nos sistemas de tratamento convencional, por exemplo, 87 % do benzeno, 74 % do tolueno e 56 % do etilbenzeno presentes no afluente do sistema de lodos ativados foram removidos por degradação e sorção no lodo e 13 %, 25 % e 43 %, respectivamente, foram liberados para a atmosfera (Sayles & Suidan, 1993). Dessa forma, o tratamento anaeróbio poderia ser uma boa alternativa, pois evita volatilização desses compostos por aeração e agitação normalmente utilizadas nos sistemas de tratamento aeróbios.

Tecnologias de bombeamento e tratamento de águas subterrâneas são utilizadas para limpar plumas de poluentes, evitando posteriores contaminações de aquíferos por dissolução e dispersão. O desenvolvimento de projetos de bioreatores para limpeza de águas subterrâneas segue tendências similares às utilizadas no tratamento de águas residuárias. Contudo, as concentrações efluentes de contaminantes devem alcançar os padrões de potabilidade, em $\mu\text{g/L}$, muito menores que os normalmente fixados para a maioria dos poluentes nos efluentes de sistemas de tratamento de águas residuárias, expressos em mg/L . Como as concentrações de contaminantes em águas subterrâneas são menores que em águas residuárias, o processo deve funcionar com baixas concentrações de fonte de carbono, podendo causar pouco acúmulo de biomassa e possíveis problemas na partida. Os processos de enriquecimento do solo com microrganismos que degradam contaminantes presentes na água subterrânea podem ter longa duração, pois 97 % – 99 % dos microrganismos estão aderidos nas partículas do solo. Dessa forma, alternativas devem ser pesquisadas para superar tais dificuldades.

A Tabela 3.5 apresenta os reatores utilizados em bioremediação e suas principais vantagens e desvantagens. Filtros biológicos e biodiscos foram utilizados na década de 80, apresentando baixa eficiência de remoção, qualidade inadequada do efluente e sensibilidade a cargas choques. Aplicação de reatores de leito fixo com fluxo ascendente e leito fluidificado melhoraram a eficiência da limpeza da água subterrânea, principalmente quando carvão ativado granular era utilizado como suporte, pois favorecia o crescimento microbiano devido à sorção de contaminantes no meio suporte (Massol-Deyá *et al.*, 1995 e Massol-Deyá *et al.*, 1997). Reator anaeróbio fluidificado com carvão ativado granular apresentou remoção de 86 % de tolueno e etilbenzeno presentes em percolado de aterro sanitário (Sayles & Suidan, 1993). A principal limitação da aplicação desses sistemas é a temperatura da água subterrânea que impede maiores velocidades de degradação (Langwaldt & Puhakka, 2000).

Tabela 3.5: Bioreatores utilizados no tratamento de águas subterrâneas e suas principais vantagens e desvantagens.

Processo	Tipo de degradação	Vantagens	Desvantagens
Filtro biológico	Aeróbio	Projeto, operação e manutenção simples	Qualidade inadequada do efluente
Biodisco	Aeróbio	Projeto simples e barato, baixo consumo de energia	Qualidade inadequada do efluente
Reator de filme fixo com fluxo ascendente	Aeróbio	Tempo de retenção ajustável	
	Anaeróbio	Possível desalogenação redutiva dos contaminantes	Temperatura elevada e concentrações elevadas de carbono orgânico
Reator de leito fluidificado	Aeróbio	Operação confiável, baixas concentrações no efluente, diluição do contaminante, partida fácil	Consumo de energia elevado
Lodos ativados	Aeróbio		Difícil de gerar e manter a biomassa, consumo de energia elevado
Reator anaeróbio de manta de lodo com fluxo ascendente	Anaeróbio	Possível desalogenação redutiva dos contaminantes	Temperatura elevada e concentrações elevadas de carbono orgânico

Fonte: Langwaldt & Puhakka (2000)

van der Hoek *et al.* (1989) operaram três reatores aeróbios: filtro biológico, biodisco e reator de filme fixo e fluxo ascendente, preenchido com espumas de poliuretano, para remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, BTEX e compostos fenólicos presentes em água subterrânea. O reator de filme fixo e fluxo ascendente apresentou as maiores eficiências de remoção sendo o filtro biológico o menos eficiente. Phelps *et al.* (1991) trataram água subterrânea contaminada com tricloroetileno, tetracloroeteno, BTX e vários hidrocarbonetos alifáticos clorados, em reator de leito expandido, com recirculação, alcançando eficiência de remoção de BTX de 99 %.

Chaudhuri & Wiesmann (1996) operaram um reator com biomassa suspensa variando o tipo de escoamento, em batelada ou contínuo, para degradação de tolueno por cultura mista proveniente de esterco de vaca e cultura enriquecida adaptada ao benzeno, sob condições metanogênicas. O reator em escala de laboratório com volume útil de 4 L foi operado a 35°C, com 150 rpm de agitação e pH igual a 7,2. Quando operado com fluxo contínuo, o efluente foi coletado no meio do reator em um recipiente fechado. Nos ensaios em batelada foram utilizadas concentração inicial de tolueno de 450 mg/L e concentração de biomassa inicial de 18 mg/L (massa seca). Em 40 horas, a concentração de tolueno decresceu a aproximadamente 110 mg/L, com aumento de biomassa para 120 mg/L, estabilizando em

162 mg/L em 70 horas, quando tolueno foi totalmente degradado. Em ensaios com escoamento contínuo, foram aplicados diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH), variando de 12 horas a 8 dias. A concentração afluente de tolueno foi de 150 mg/L. Com TDH de 12 horas, a concentração de tolueno no efluente foi de 25,2 mg/L, a concentração de ácidos voláteis totais foi de 32,5 mg/L e o teor de carbono orgânico dissolvido de 115,5 mg/L. Para TDH maiores que 96 horas, a concentração de tolueno ficou abaixo de 1 mg/L no efluente. No caso extremo de TDH de 8 dias, a concentração de tolueno no efluente foi de 0,2 mg/L, a concentração de ácidos voláteis totais foi de 9,2 mg/L e o teor de carbono orgânico dissolvido de 37,5 mg/L. A porcentagem de metano no gás foi diretamente proporcional ao TDH.

Shim & Yang (1999) operaram reator com células imobilizadas sob condições de batelada com recirculação. O leito era constituído de tecido absorvente, 100 % algodão, fixo em tela de aço inoxidável em forma de espiral. O reator foi inoculado com co-cultura de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* já adaptada a degradar tolueno. O reator foi operado à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), sem aeração ou adição de qualquer outra fonte de oxigênio. Perda abiótica de BTEX em reator controle, sem microrganismos e tratado com azido de sódio foi menor que 20 %. Degradações quase completas de benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno (150 mg/L cada) foram obtidas em 116 horas. Contudo a degradação de benzeno foi a mais lenta. Estudos com compostos individuais no reator apresentaram velocidades de degradação de 10 mg/L.h para benzeno, 13 mg/L.h para tolueno, 16 mg/L.h para etilbenzeno e 12 mg/L.h para o-xileno.

Kuhn *et al.* (1985) estudaram as transformações de p-diclorobenzeno, tetracloretileno e isômeros do xileno (0,04 mg/L a 0,75 mg/L cada) sob condições desnitrificantes, em coluna contendo sedimento proveniente da interface de um rio com um sítio de infiltração de água subterrânea, inicialmente degradando esses compostos sob condições aeróbias. A coluna apresentava as seguintes dimensões: 100 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro. A velocidade de líquido era de 7,6 cm/h, sendo operada a 20°C . Após mais de três meses operando a coluna na ausência de oxigênio sob condições desnitrificantes, 70 % de p-xileno e de m-xileno foram degradados, sendo removidos já nos primeiros 7,7 cm da coluna. Em 6 meses de operação sob condições desnitrificantes, após os outros terem sido degradados, o-xileno foi degradado, a partir de 17,7 cm da coluna, atingindo concentrações abaixo do limite de detecção a 87,7 cm. A remoção dos xilenos coincidiu com a redução de nitrato a nitrito. Adição de m-xileno marcado resultou na recuperação de 48 % como $^{14}\text{CO}_2$ no efluente, 27 % foi provavelmente incorporado a

biomassa aderida e o restante possivelmente ligado ao sedimento. p-Diclorobenzeno e tetracloroetileno não foram degradados.

Zeyer *et al.* (1986) estudaram a degradação de m-xileno em coluna com 21,5 cm de comprimento e 4,0 cm de diâmetro, inoculada com sedimento proveniente do trabalho de Kuhn *et al.* (1985), com velocidade superficial de 2,6 cm/h, a 30°C. Até 42,5 mg/L de m-xileno foram degradados sob condições desnitrificantes. A constante de velocidade de degradação, considerando modelo de pseudo-primeira ordem foi de $> 0,45 \text{ h}^{-1}$. Cerca de 80 % de m-xileno com anel marcado foi oxidado a $^{14}\text{CO}_2$. m-Xileno foi substituído por tolueno (23,0 mg/L) que também foi degradado com 75 % do tolueno com anel marcado convertido em $^{14}\text{CO}_2$.

Haag *et al.* (1991) estudaram as degradações de BTEX, 1,3,5-trimetilbenzeno e naftaleno em três colunas contendo solo de diferentes partes de um aquífero exposto à gasolina. As colunas eram incubadas por 2 a 4 semanas, à temperatura ambiente de 23°C. Tolueno foi o único composto degradado e quando removido da corrente afluyente, teve início a degradação de p-xileno. Ensaio com tolueno marcado no grupo metila mostraram que 60 % foi transformado em $^{14}\text{CO}_2$, 8 % em produtos não voláteis ou biomassa. Ensaio com tolueno marcado no anel, 77 % foi transformando em $^{14}\text{CO}_2$, 8 % em produtos não voláteis ou biomassa. A metanogênese foi excluída como processo de transformação predominante, pois foram formadas quantidades insignificantes de metano. Como o meio não apresentava nenhum acceptor de elétrons, a degradação de tolueno foi associada ao sulfato presente no solo.

Acton & Barker (1992) avaliaram os potenciais de biodegradação utilizando colunas *in situ* em dois aquíferos impactados com percolado de aterro sanitário contendo hidrocarbonetos aromáticos. Colunas preenchidas com material saturado do aquífero foram nele instaladas, com a parte inferior aberta e a parte superior equipada com pontos de amostragem. A água subterrânea alimentava a coluna à medida que amostras eram retiradas. Além dos hidrocarbonetos presentes no aquífero, com concentrações variando de 1,0 µg/L a 90,0 µg/L dependendo do composto, foram adicionados mais 150,0 µg/L de cada composto. Tolueno, etilbenzeno, m-xileno, o-xileno, cumeno (iso-propil benzeno) e 1,2,4-trimetilbenzeno foram completamente degradados sob condições fermentativa e metanogênica. Tolueno, m-xileno e etilbenzeno foram completamente degradados nos primeiros 20 dias de experimento, enquanto os demais, durante os 100 dias de ensaio.

Patterson *et al.* (1993) estudaram os comportamentos de BTEX (1,0 mg/L) e tetracloroeteno (0,5 mg/L) em colunas contendo solo e alimentadas com água subterrânea proveniente de aquífero localizado sob área urbana. O experimento foi realizado com

temperatura controlada, a 22°C. As colunas apresentavam as seguintes dimensões: 2,0 m de comprimento por 150 mm de diâmetro e velocidade de escoamento de 0,5 cm/h. Microrganismos nativos do solo foram capazes de degradar tolueno após período de adaptação entre 31 e 57 dias; sulfato presente na água subterrânea foi considerado o principal acceptor de elétrons. Nitrato foi adicionado em algumas colunas para estimular a atividade de bactérias desnitrificantes, consideradas predominantes no solo. Na presença do nitrato, tolueno foi rapidamente degradado (< 4 dias) e etilbenzeno foi também degradado após 111 dias de ensaio. As concentrações de bactérias totais ($5,0 \times 10^6$ bactérias/mL) e bactérias redutoras de nitrato ($1,6 \times 10^6$ bactérias/mL) foram maiores onde ocorreu a degradação de tolueno, nos primeiros 6 cm da entrada, com decréscimo ao longo da coluna.

Anid *et al.* (1993) operaram coluna contendo solo proveniente de aquífero contaminado, alimentada com nutrientes inorgânicos, benzeno (20 mg/L), tolueno (20 mg/L), etilbenzeno (3 mg/L), o-xileno (4 mg/L), (m+p)-xileno (13 mg/L), nitrato (330 mg/L) e oxigênio dissolvido (< 1 mg/L). A coluna foi mantida em câmara anaeróbia, a 25°C, com tempo de detenção hidráulica de 4,6 dias. Inicialmente, a coluna foi operada com nitrato e ar (9 mg O₂/L). Posteriormente, a concentração de oxigênio foi mantida menor que 1 mg/L. Nessas condições, ocorreram degradações de mais de 25 % de benzeno, 95 % de tolueno, 40 % de etilbenzeno, 60 % de o-xileno e 50 % de (m+p)-xileno. Tornou-se evidente a participação de bactérias desnitrificantes na degradação de benzeno, uma vez que nitrato era consumido e a concentração de oxigênio dissolvido era muito baixa para corresponder a sua degradação. Contudo, a obtenção de culturas enriquecidas desnitrificantes ocorreu somente na presença de tolueno e não apenas de benzeno, sugerindo que a degradação de benzeno não estaria diretamente relacionada à respiração do nitrato, ou que seria degradado cometabolicamente por organismos degradadores de tolueno.

Langenhoff *et al.* (1996) examinaram as degradações de tolueno, benzeno e naftaleno (concentrações individuais entre 1,9 mg/L a 25,6 mg/L), em coluna contendo mistura de solo, sedimento e lodo granular. Cinco colunas foram operadas com aceptores de elétrons diferentes: bicarbonato em excesso, sulfato, nitrato, óxido de Fe (III) amorfo e óxido de Mn (IV) amorfo. O tempo de detenção hidráulica foi de 10 horas e os ensaios foram realizados a 20°C. Tolueno foi degradado em todas as colunas e após 1 a 2 meses da partida, suas concentrações no efluente estavam abaixo do limite de detecção (5,0 µg/L). Benzeno foi recalcitrante em todas as condições e degradações de naftaleno ocorreram em colunas contendo sulfato, manganês e nitrato.

Weiner *et al.* (1998) operaram seis colunas contendo sedimento metanogênico de aquífero contaminado com petróleo, a 20°C. As colunas foram alimentadas com água

subterrânea e benzeno (1,9 mg/L a 23,4 mg/L). Três colunas receberam complementação com sulfato. O tempo de detenção hidráulica foi de 5 dias. Após 18 dias de operação com concentração afluyente de benzeno de 1,9 mg/L, sua remoção foi de 100 % em todas as colunas. Quando a concentração de benzeno afluyente foi aumentada, diferenças significativas na degradação foram observadas nos dois tratamentos. Na presença de sulfato, concentração de benzeno de 7,8 mg/L, foi totalmente degradado no quinquagésimo dia de operação. Na ausência de sulfato, a remoção foi de 40 %. Quando a concentração afluyente de benzeno aumentou para 23,4 mg/L em presença de sulfato, a capacidade de remoção pelos organismos, foi excedida, e a concentração efluente estabilizou-se em torno de 7,8 mg/L. A relação entre taxas de remoção de sulfato e de benzeno apresentou valor de 3,5.

3.4 Fatores que limitam a degradação anaeróbia dos compostos

A recalcitrância de compostos sob condições anaeróbias está associada a hidrocarbonetos sem grupos funcionais, moléculas ramificadas (gasolina oxigenada), aminas aromáticas e sulfonatos aromáticos (Field, 2001). Os compostos considerados mais recalcitrantes são polímeros não hidrolizáveis, de elevadas massas moleculares, como plástico, lignina e húmus, não utilizáveis pelas células.

Vários fatores condenam compostos orgânicos à recalcitrância em ambientes anaeróbios, devido a limitações intrínsecas e de biodisponibilidade.

As limitações intrínsecas referem-se à ausência de capacidade de biodegradação, que pode ser devida aos seguintes fatores:

- Ausência de grupos funcionais na molécula. Organismos aeróbios podem introduzir funcionalidade em hidrocarbonetos não-substituídos, inserindo oxigênio, na forma de hidroxila, pelas enzimas oxigenases. Organismos anaeróbios devem introduzir grupos funcionais com H_2O , HCO_3^- ou ácidos orgânicos
- Presença de grupos funcionais doadores de elétrons na molécula, tais como aminas, podem impedir o ataque nucleofílico da molécula por organismos anaeróbios
- Impedimentos estéricos devido a moléculas ramificadas. No caso de hidrocarbonetos, as ramificações podem interferir nas reações de *beta*-oxidação
- Reações desfavoráveis termodinamicamente.

As limitações de biodisponibilidade podem resultar da baixa velocidade de utilização de polímeros não-hidrolizáveis ou da lenta dissolução de poluentes altamente apolares. Plásticos, lignina e compostos húmicos não são atacados por microrganismos, pois não são utilizados intracelularmente e não são susceptíveis as enzimas hidrolíticas extracelulares.

Limitações de transferência de massa devido a baixa solubilidade em água e elevada tendência de adsorção em solo e em sedimento ou permanecendo na fase líquida não aquosa, levando a lenta dissolução e desorção desses compostos na fase aquosa, tem sido considerada a etapa limitante na cinética de biodegradação. Nesse caso, a recalcitrância é devido a limitação física preferencialmente a limitação biológica (Field, 2001).

A revisão da literatura mostra que há o potencial para todos os BTEX serem degradados em aquíferos com nitrato, sulfato, ferro (III), manganês como aceptores de elétrons e por consórcios metanogênicos. Contudo, a avaliação do metabolismo do benzeno tem sido estudado superficialmente, pois em alguns aquíferos anaeróbios sua degradação foi inconsistente e em muitos casos onde foi observada, seu metabolismo não foi investigado e nem o isolamento de organismos anaeróbios que o degradam.

Os fatores que controlam a distribuição e atividade de organismos degradadores de benzeno não são determinados. Porque o benzeno pode ser rapidamente degradado sob condições anaeróbias em alguns sedimentos assim que são coletados (Anderson *et al.*, 1998; Coates *et al.*, 1996c; Grbic-Galic & Vogel, 1987; Lovley *et al.*, 1994; Weiner & Lovley, 1998b), em outros desenvolvem a capacidade após extensas incubações em laboratório (Anderson & Lovley, 1999; Burland & Edwards, 1999; Davis *et al.*, 1994; Edwards & Grbic-Galic, 1992; Kazumi *et al.*, 1997; Lovley *et al.*, 1995; Nales *et al.*, 1998; Weiner & Lovley, 1998a; Weiner & Lovley, 1998b; Weiner *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1986) e em alguns nunca desenvolvem esta capacidade (Acton & Barker, 1992; Barbaro *et al.*, 1992; Barker *et al.*, 1987; Flyvbjerg *et al.*, 1993; Kuhn *et al.*, 1988; Patterson *et al.*, 1993). Essa questão provavelmente pode ser respondida, pelo menos em parte, pelas diferenças nas populações de microrganismos degradadores de benzeno nos sedimentos (Lovley, 1997).

Anderson & Lovley (1997) citam que a degradação de benzeno ocorre na presença de organismos apropriados no aquífero. A degradação de benzeno ligada a redução de Fe (III) pode ser controlada pela habilidade de bactérias redutoras de ferro (III) acessarem óxidos de ferro insolúveis, principais fontes de ferro em aquíferos. Segundo Weiner *et al.* (1998), a adição de sulfato também poderia estimular a degradação de benzeno em ambientes onde comunidades de bactérias redutoras de sulfato capazes de degradá-lo estivessem presentes.

3.5 Reações estequiométricas para BTEX

Os hidrocarbonetos representam um estado reduzido da matéria e sua oxidação é termodinamicamente muito favorecida. Em organismos quimiotróficos, os elétrons gerados

durante a transformação em metabólitos intermediários, precisam ser transferidos a aceptores de elétrons com potencial redox mais positivo para permitir conservação de energia para crescimento. Na ausência de oxigênio, a conservação de energia pode ser realizada pela respiração anaeróbia com nitrato, Fe (III) ou sulfato. Alguns organismos obtêm energia a partir da transferência interespecies de hidrogênio produzido por bactérias fermentativas, sendo termodinamicamente possível em associações sintróficas (Heider *et al.*, 1999).

Reações estequiométricas teóricas para BTEX, sob condições anaeróbias, através da utilização de diferentes aceptores de elétrons são apresentadas na Tabela 3.6. Todas as reações são termodinamicamente favoráveis, como indicado pelos valores negativos de energia livre, sob condições padrão de 1 atm e 298 K.

Balanços de massa de compostos orgânicos metabolizados completamente por culturas puras ou consórcio microbiano utilizando nitrato, sulfato ou Fe (III) como aceptores de elétrons ou por consórcio microbiano que pode converter matéria orgânica em dióxido de carbono e metano, em geral, são concordantes com as reações estequiométricas.

A oxidação de hidrocarbonetos utilizando nitrato ou Fe (III) produz elevadas quantidades de energia livre. Bactérias desnitrificantes crescem relativamente rápido em alquilbenzenos. A velocidade máxima de crescimento de *Thauera aromatica* K172 em tolueno foi de $0,12 \text{ h}^{-1}$ com tempo de geração de 6 horas, que representa 70 % da velocidade de crescimento obtida com benzoato como substrato. O coeficiente de produção celular foi de 57 g células / mol de tolueno consumido (massa seca) (Altenschmidt & Fuchs, 1992).

Na presença de sulfato, o processo produz pequenas quantidades de energia livre e são observadas baixas velocidades de crescimento. O tempo de geração da *Desulfobacula toluolica* Tol-2 foi de 27 horas em tolueno (Rabus *et al.*, 1993) e para a linhagem PRTOL1 de 36 horas, com coeficiente de produção celular de 19 g células / mol de tolueno (massa seca) (Beller *et al.*, 1996).

A baixa energia livre disponível da conversão de alquilbenzenos a CO_2 e CH_4 em consórcio deve sustentar todos os organismos envolvidos na associação sintrófica. A pressão parcial de hidrogênio que permite crescimento dos organismos do consórcio deve estar em 1 Pa (10^{-5} atm) (Heider *et al.*, 1999).

Tabela 3.6: Energia livre das reações de transformação anaeróbia de BTEX.

Reações	ΔG° (kJ/mol)	Referência
Sob condições fermentativa e metanogênica		
Benzeno		Burland & Edwards
$C_6H_6 + 6,75H_2O \rightarrow 2,25HCO_3^- + 3,75CH_4 + 2,25H^+$	-116	(1999)
Tolueno		Edwards & Grbic-
$C_7H_8 + 7,5H_2O \rightarrow 2,5HCO_3^- + 4,5CH_4 + 2,5H^+$	- 131	Galic (1994)
o-xileno		
$C_8H_{10} + 8,25H_2O \rightarrow 2,75HCO_3^- + 5,25CH_4 + 2,75H^+$	-169	
Sob condições de desnitrificação		
Benzeno		Burland & Edwards
$C_6H_6 + 6NO_3^- \rightarrow 6HCO_3^- + 3N_2$	-2990	(1999)
$C_6H_6 + 15NO_3^- + 3H_2O \rightarrow 6HCO_3^- + 15NO_2^- + 6H^+$	-2020	
Tolueno		Heider <i>et al.</i> , 1999
$C_7H_8 + 7,2NO_3^- + 0,2H^+ \rightarrow 7HCO_3^- + 3,6N_2 + 0,6H_2O$	-3554	
Etilbenzeno		Rabus & Widdel
$C_8H_{10} + 8,4NO_3^- + 0,4H^+ \rightarrow 8HCO_3^- + 4,2N_2 + 1,2H_2O$	-4148	(1995a)
Sob condições de redução de sulfato		
Benzeno		Burland & Edwards
$C_6H_6 + 3,75SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow 1,875H_2S + 1,875HS^- + 6HCO_3^- + 0,375H^+$	-200	(1999)
Tolueno		Edwards <i>et al.</i> (1992)
$C_7H_8 + 4,5SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow 2,25H_2S + 2,25HS^- + 7HCO_3^- + 0,25H^+$	-205	Rabus <i>et al.</i> (1993)
		Beller <i>et al.</i> (1996)
Xilenos		
$C_8H_{10} + 5,25SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow 8HCO_3^- + 2,625HS^- + 2,625H_2S + 0,125H^+$	-265	Edwards <i>et al.</i> (1992)
Sob condições de redução de Fe (III)*		
Benzeno		Burland & Edwards
$C_6H_6 + 18H_2O + 30Fe^{3+} \rightarrow 6HCO_3^- + 30Fe^{2+} + 36H^+$	-3070	(1999)
Tolueno		Lovley & Lonergan
$C_7H_8 + 36Fe^{3+} + 21H_2O \rightarrow 36Fe^{2+} + 7HCO_3^- + 43H^+$	-3630	(1990)
$C_7H_8 + 108Fe(OH)_3 \rightarrow 36Fe_3O_4 + 7HCO_3^- + 7H^+ + 159H_2O$	-3174	

*considerando-se diferentes formas de ferro.

3.6 Mecanismos de reações

A degradação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos tem recebido atenção significativa por envolver reações bioquímicas incomuns e por ser importante na bioremediação intrínseca (Ball *et al.*, 1996). Diversos mecanismos de reações iniciais de degradação de BTEX são propostos, provavelmente intermediados por diferentes microrganismos. Dentre esses compostos, tolueno tem sido objeto da maioria dos estudos e a elucidação de sua rota metabólica pode levar ao entendimento da degradação de outros compostos monoaromáticos (Stoner, 1994; Chee-Sanford *et al.*, 1996).

O metabolismo de degradação de compostos aromáticos pode ser dividido em duas rotas metabólicas: periférica e central. A rota periférica converte uma grande variedade de compostos aromáticos em poucos intermediários centrais. As enzimas dessas rotas não são específicas para certos substratos de crescimento e são geralmente induzidas pelo substrato correspondente. O intermediário central é, geralmente, prontamente desaromatizado (Heider & Fuchs, 1997a).

Estudos realizados com diferentes microrganismos mostram que benzoato, usualmente com sua coenzima A (benzoil-CoA), é o intermediário central na degradação anaeróbia de diversos hidrocarbonetos aromáticos, mas fornece informações limitadas das reações iniciais de degradação.

Em todas as espécies capazes de degradar anaerobiamente compostos aromáticos, está presente uma clara hierarquia de indução de caminhos catabólicos do substrato. Enzimas centrais, por exemplo, a benzoil-CoA redutase, são sempre detectadas quando as células estão crescendo em substratos aromáticos, enquanto que as enzimas de rotas periféricas geralmente são ativadas apenas quando são necessárias na degradação de um dado substrato (Heider & Fuchs, 1997a). A indução da utilização anaeróbia do tolueno foi observada em culturas desnitrificantes (Altenschmidt & Fuchs, 1991; Schocher *et al.*, 1991; Frazer *et al.*, 1993). A linhagem T desnitrificante foi induzida a degradar tolueno e m-xileno na mesma extensão (Seyfried *et al.*, 1994).

Os metabólitos de degradação anaeróbia de BTEX têm sido evidenciados por: espectrometria de massas dos intermediários transientes, medidas de atividades enzimáticas e habilidades das culturas crescerem utilizando compostos intermediários potenciais. Existem vários métodos para induzir o acúmulo de metabólitos, tais como: abaixamento da temperatura, para reduzir as atividades enzimáticas; adição de excesso de um intermediário potencial ou de substâncias inibidoras de degradações posteriores (iodoacetamida, para

enzimas por carboximetilação; fluoroacetato, para aconitase no ciclo do ácido tricarboxílico; ácido 2-bromoetanosulfônico, para metanogênese).

3.6.1 Benzeno

Vários mecanismos de degradação são propostos para o metabolismo anaeróbico do benzeno, incluindo hidroxilação para produzir fenol, carboxilação para produzir benzoato e redução inicial do anel para formar ciclohexano (Lovley *et al.*, 1995). As reduções de benzeno e de tolueno seriam transformações esperadas em sistemas anaeróbios. Contudo, essas reduções não explicariam a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -benzeno e ^{14}C -tolueno, como descrito por Grbic-Galic & Vogel (1987). Benzeno e tolueno devem ser oxidados fermentativamente (Vogel & Grbic-Galic, 1986).

Grbic-Galic & Vogel (1987), baseados na produção de fenol, propuseram o mecanismo de degradação de benzeno apresentado na Figura 3.1, por cultura metanogênica mista. Todos os compostos foram detectados e identificados por cromatografia gasosa / espectrometria de massas. Através do uso de água com oxigênio marcado, H_2^{18}O , Vogel e Grbic-Galic (1986) mostraram que a origem do primeiro átomo de oxigênio incorporado a benzeno e tolueno, na oxidação anaeróbica, foi fornecido pela água. Fenol proveniente de benzeno e cresol, de tolueno, apresentaram até 8 % de ^{18}O depois de incubação em meio com 9 % de H_2^{18}O .

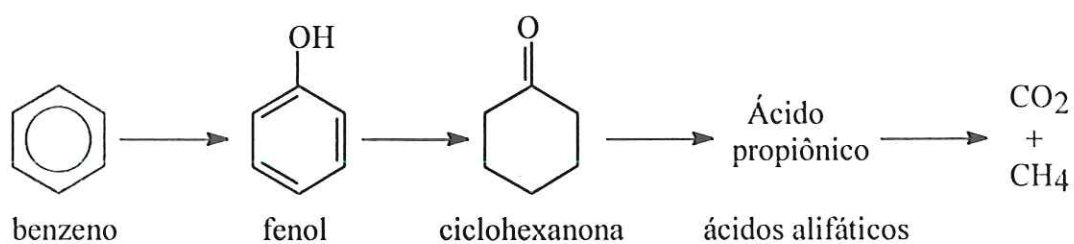


Figura 3.1: Modelo para degradação anaeróbica de benzeno por cultura metanogênica mista (Grbic-Galic & Vogel, 1987).

Fenol, propionato e acetato foram os intermediários encontrados na degradação de benzeno por microrganismos presentes em sedimento contaminado por hidrocarbonetos aromáticos, sob condições metanogênicas, estudados por Weiner & Lovley (1998b). Weiner *et al.* (1998) sugerem que fenol é um intermediário extracelular da degradação de benzeno sob condições de redução de sulfato e Fe (III) pois sua adição inibiu a produção de $^{14}\text{CO}_2$ em ensaios com benzeno marcado.

Chaudhuri & Wiesmann (1995), estudando a degradação de benzeno através de consórcio anaeróbio misto, identificaram os seguintes intermediários: fenol e ácidos o-hidroxibenzoico, benzóico e acético. Provavelmente, as bactérias redutoras de sulfato foram o principal grupo responsável pela degradação, pois a porcentagem de metano produzido foi de apenas 3,0 % a 3,5 %.

Em estudos realizados por Lovley *et al.* (1995) na degradação de ^{14}C -benzeno por redutoras de sulfato, não foram encontrados intermediários extracelulares como fenol, benzoato, p-hidroxibenzoato, ciclohexano, catecol e acetato, sugerindo que as redutoras de sulfato são capazes de oxidar completamente benzeno a CO_2 , sem a produção de produtos intermediários extracelulares. Apesar de não ter sido isolada nenhuma cultura pura, esses resultados são consistentes com o fato de que culturas puras de redutoras de sulfato metabolizam completamente tolueno a CO_2 (Rabus *et al.*, 1993). A oxidação direta de benzeno a CO_2 , sob condições de redução de sulfato, contrasta com seu metabolismo sob condições metanogênicas, quando foram observados intermediários extracelulares.

3.6.2 Tolueno

Vários mecanismos envolvidos nas etapas iniciais da degradação anaeróbia do tolueno têm sido sugeridos, e incluem:

- (i) oxidação do grupo metila, formando benzoato,
- (ii) carboxilação do anel aromático, com produção de toluato,
- (iii) hidroxilação do grupo metila, produzindo álcool benzílico,
- (iv) *para*-hidroxilação do anel aromático, resultando em p-cresol,
- (v) ataque nucleofílico ao grupo metila pela acetil-CoA, formando fenilpropionil-CoA.

A Figura 3.2 apresenta as reações iniciais postuladas anteriormente.

Os postulados (iii) e (iv) são os mais frequentes e ocorrem em diferentes condições. Ambos incluem a formação do ácido benzóico como um intermediário via hidroxilação inicial do grupo metila, para formar álcool benzílico, posteriormente oxidado a benzaldeído, ou via hidroxilação inicial do anel aromático, para formar p-cresol. No postulado (iii), quatro atividades enzimáticas são necessárias: tolueno metilhidroxilase, álcool benzílico desidrogenase, benzaldeído desidrogenase e benzoil-CoA sintetase. As reações subsequentes do postulado (iv) para a transformação de p-cresol a p-hidroxibenzoato estão bem estabelecidas nas condições aeróbias e anaeróbias. A enzima p-cresol metilhidroxilase catalisa sucessivas oxidações do grupo metila de p-cresol, primeiro a álcool p-hidroxibenzílico e então a p-hidroxibenzaldeído por um conjunto de reações mediadas por

enzimas não oxigenases. *p*-Cresol poderia ser formado do tolueno, a partir do grupo hidroxila derivado da água (Frazer *et al.*, 1995).

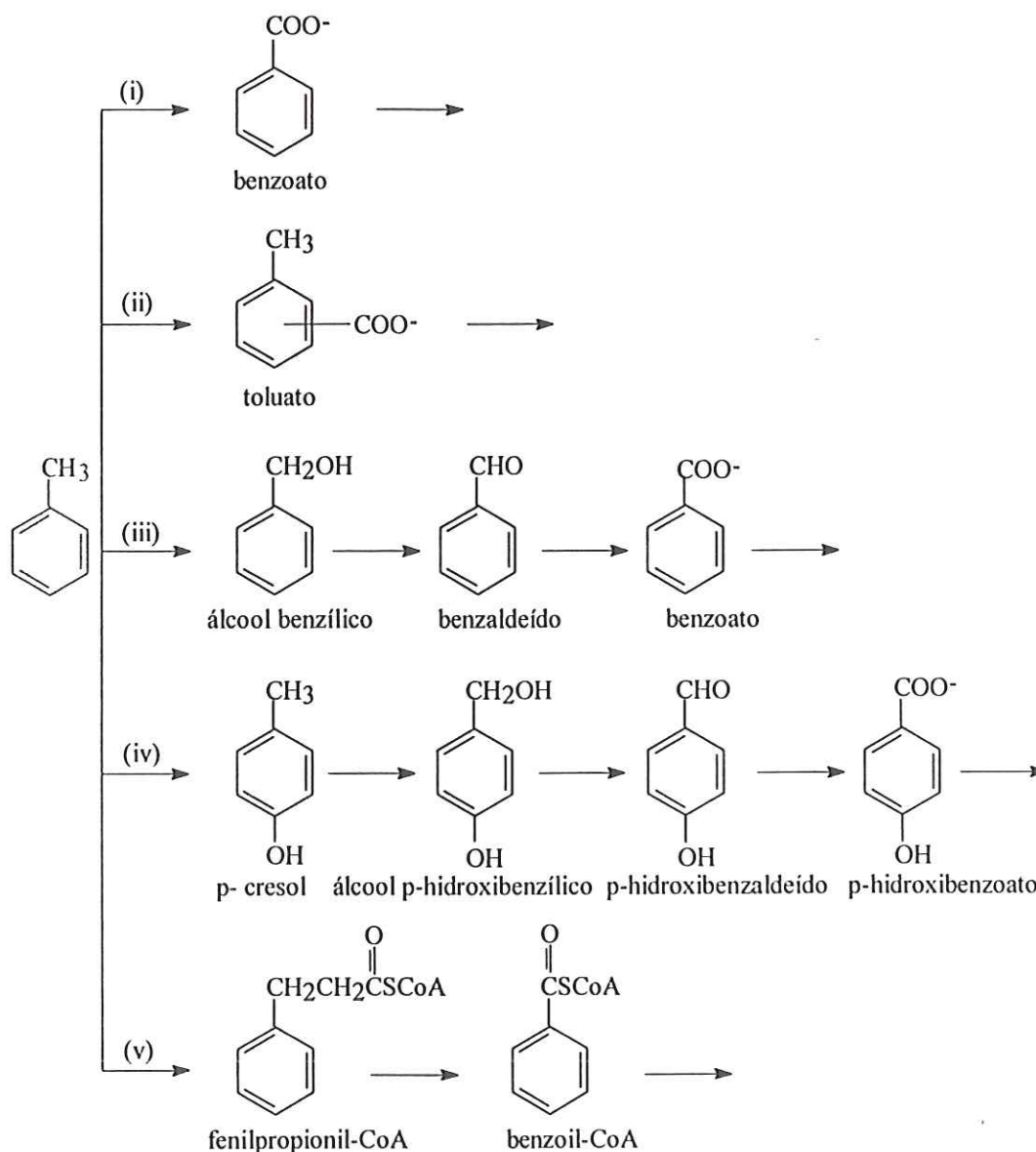


Figura 3.2: Mecanismos de reações postulados para a degradação anaeróbica do tolueno, baseados em resultados de vários trabalhos: (i) oxidação do grupo metila; (ii) carboxilação do anel aromático; (iii) hidroxilação do grupo metila; (iv) *para*-hidroxilação do anel; (v) ataque nucleofílico ao grupo metila (Colberg & Young, 1995 e Biegert & Fuchs, 1995).

Grbic-Galic & Vogel (1987) propuseram as etapas de degradação do tolueno, por cultura metanogênica mista, a partir dos intermediários formados (Figura 3.3). A reação de tolueno foi caracterizada como fermentação, com o substrato sofrendo oxidação e redução. Inicialmente, ocorre a oxidação via grupo metila ou hidroxilação do anel, resultando na

produção de álcoois aromáticos, cresóis ou fenóis. Reações adicionais como desmetilação e redução do anel também podem ser possíveis. As formações de p-cresol e de o-cresol podem ser devidas ao complexo consórcio de bactérias fermentativas, incluindo anaeróbias facultativas. Concentrações de p-cresol superaram as de o-cresol, que podem ser explicadas pela substituição aromática eletrofílica, formando preferencialmente p-cresol devido à capacidade do substituinte metila em liberar elétrons no anel. Os ácidos alifáticos foram degradados a precursores de metano por bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio.

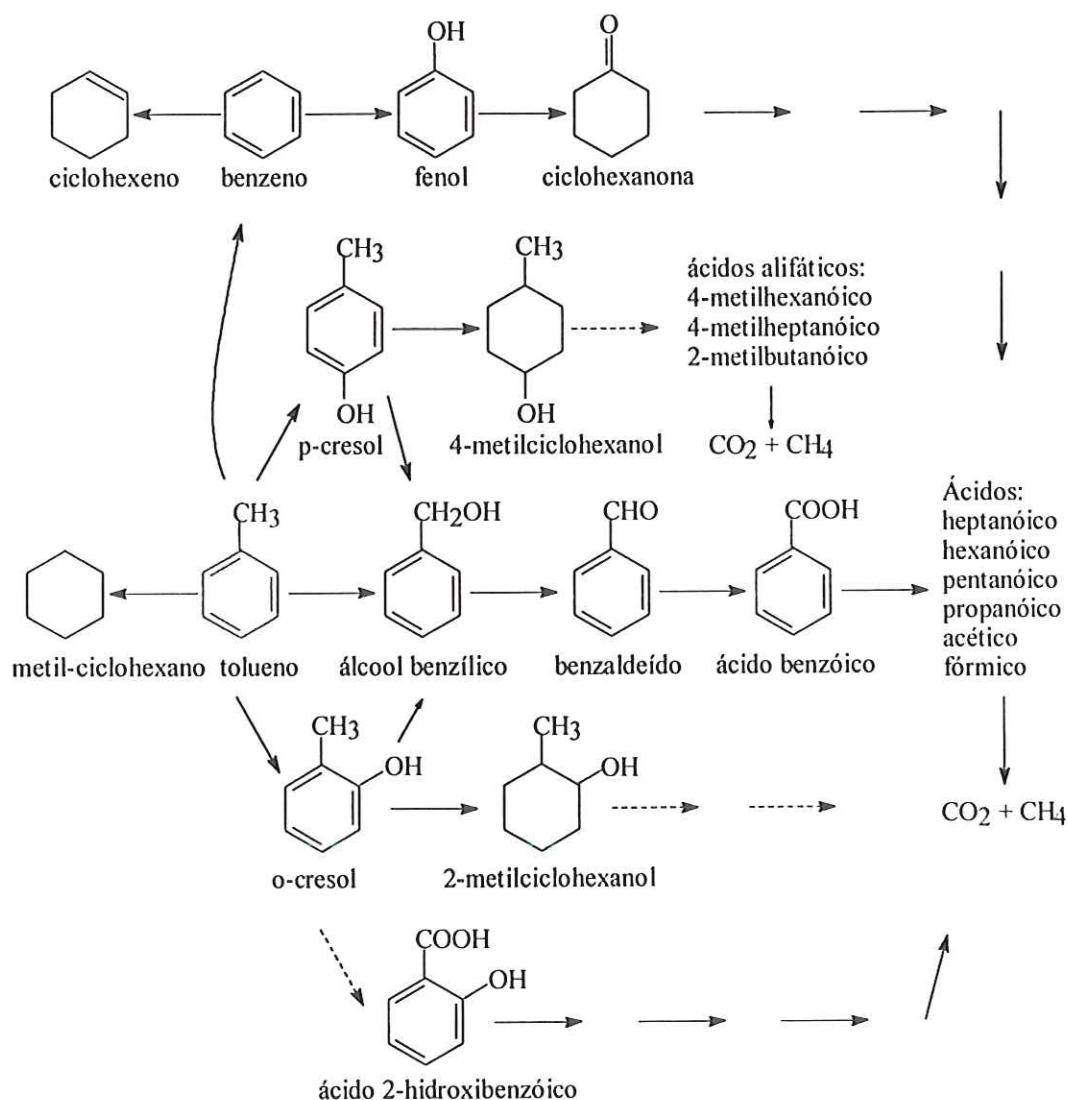


Figura 3.3: Proposta de seqüências da degradação anaeróbica de tolueno por cultura metanogênica mista. Todos os compostos foram detectados e identificados por cromatografia gasosa / espectrometria de massas (Grbic-Galic & Vogel, 1987).

Edwards *et al.* (1994), em experimentos utilizando aprisionamento de isótopos, observaram que a degradação de tolueno por cultura metanogênica mista ocorreu via

hidroxilação no substituinte metila, formando álcool benzílico, oxidado a benzaldeído e benzoato. Pode ter ocorrido, também, uma rota paralela via hidroxilação do anel, formando p-cresol.

Lovley e Lonergan (1990) basearam a rota metabólica na habilidade da linhagem redutora de Fe (III), GS-15, crescer utilizando tais compostos, sugerindo a degradação de tolueno via álcool benzílico, benzaldeído e benzoato.

Vários trabalhos evidenciam que a degradação de tolueno, por bactérias desnitrificantes, ocorre via benzoato. Estudos com a linhagem K172 mostraram a presença das enzimas: álcool benzílico desidrogenase e benzaldeído desidrogenase (Altenschmidt & Fuchs, 1991 e Biegert & Fuchs., 1995) e a formação de ^{14}C -álcool benzílico e posteriormente ^{14}C -benzaldeído de ^{14}C -tolueno, através da inibição parcial do metabolismo pela adição de iodoacetamida (Altenschmidt & Fuchs, 1992). Os autores concluíram que a degradação anaeróbia de tolueno através da linhagem K172 ocorre via desidrogenação do grupo metila, independente de oxigênio, e que água, atua como fonte do grupo hidroxila. Seyfried *et al.* (1994) detectaram a formação de benzaldeído e benzoato utilizando desnitrificantes linhagem T e linhagem K172.

A indicação da oxidação do grupo metila, mas sem rota determinada, foi observada ocorrer através de bactérias redutoras de sulfato, linhagem Tol-2, *Desulfobacula toluolica* (Rabus *et al.*, 1993 e Rabus & Widdel, 1995b).

Evans *et al* (1992) propuseram mecanismos de degradação e transformação de tolueno sob condições desnitrificantes pela linhagem T1, não relacionada com *Pseudomonas* sp., mostrados na Figura 3.4. A reação inicial é um ataque nucleofílico ao carbono do substituinte metila do tolueno, pelo carbono alfa do acetil-CoA, ou do succinil-CoA, resultando, respectivamente, na formação de fenilpropionil-CoA, precursor da mineralização de tolueno, ou de benzilsuccinil-CoA, precursor de metabólitos finais. A primeira seqüência ilustra as etapas iniciais da oxidação de tolueno a dióxido de carbono. A reação inicial envolve o ataque nucleofílico ao carbono do grupo metila do tolueno, pela acetil-CoA, formando fenilpropionil-CoA. Essa reação é seguida pela β -oxidação do fenilpropionil-CoA, produzindo benzoil-CoA. Frazer *et al.* (1993) detectaram benzoato durante o metabolismo de tolueno, utilizando a mesma linhagem. A segunda seqüência mostra a conversão parcial de tolueno em metabólitos finais. O grupo metila do tolueno pode sofrer ataque de succinil-CoA, um forte agente nucleofílico, formando benzilsuccinil-CoA, posteriormente hidrolisado a ácido benzilsuccínico, então oxidado a ácido benzilfumárico. Como succinil-CoA é um intermediário no ciclo de Krebs, pode ser seguidamente utilizado na degradação de tolueno.

Os autores estimaram que 10% a 17 % do carbono de tolueno foram convertidos nos ácidos benzilsuccínico e benzilfumárico, 29 %, em biomassa e 51 %, em CO₂.

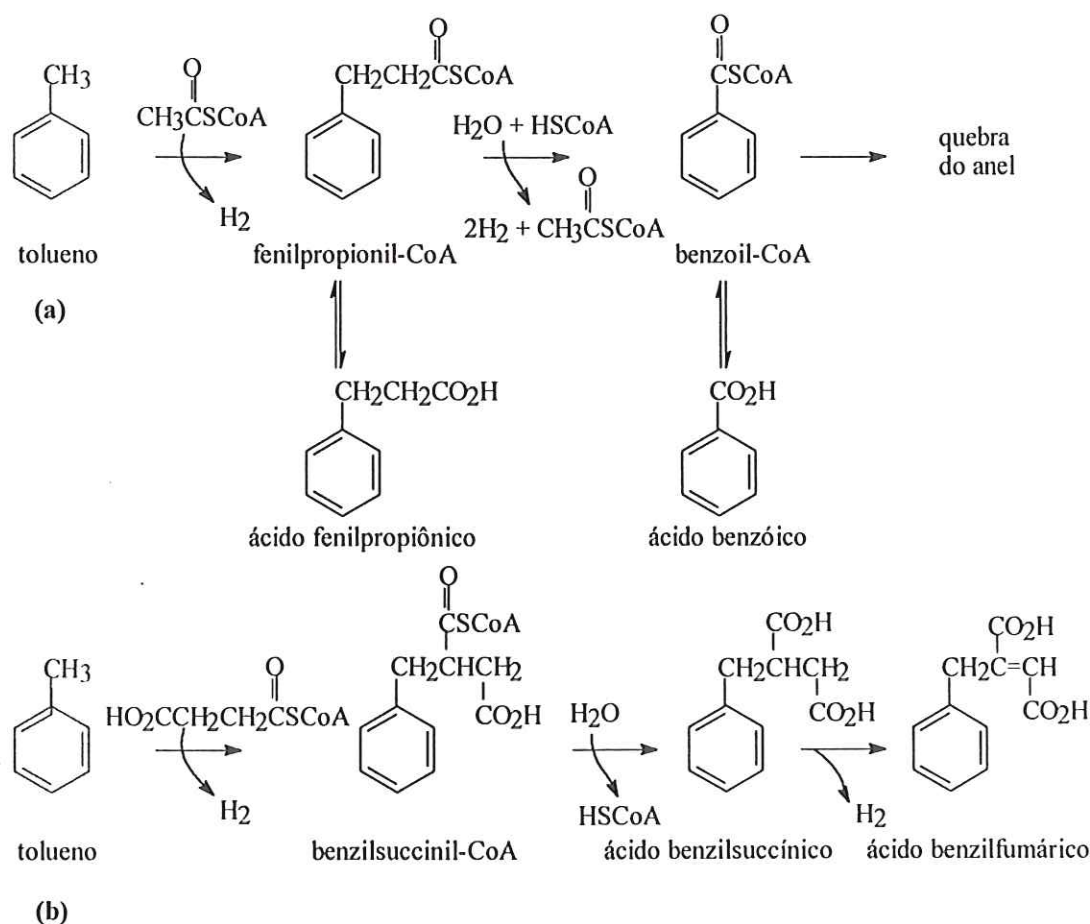


Figura 3.4: Mecanismo de reação de degradação de tolueno sob condições desnitrificantes pela linhagem T1. (a) seqüência I: mineralização de tolueno. (b) seqüência II: transformação de tolueno (Evans *et al.*, 1992 e Fraser *et al.*, 1993).

Frazer *et al.* (1993), submetendo a mesma linhagem a fluoroacetato, inibidor do ciclo do ácido tricarbóxico (maior fonte de succinil-CoA), observaram a redução da utilização de tolueno e da formação de benzilsuccinato e de benzilfumarato, representando 10 % a 31 % do observado em culturas controle que não receberam fluoroacetato. Como tolueno e succinil-CoA são os precursores para a formação desses metabólitos finais, a falta de succinil-CoA, nas células, inibiu a formação desses metabólitos.

Beller *et al.* (1992b), estudando a degradação de tolueno em cultura enriquecida com bactérias redutoras de sulfato, encontraram os mesmos metabólitos finais observados por Evans *et al.* (1992), o que indica que essa via não é restrita a culturas puras ou mesmo a desnitrificantes em geral, podendo ocorrer com diferentes organismos anaeróbios. Estudos

com tolueno marcado no anel (Beller *et al.*, 1992a) mostraram que 83,6 % do carbono do tolueno foram totalmente degradados; 7 % a 9 % convertidos em ácidos benzilsuccínico e benzilfumárico e o restante, em biomassa. Beller *et al.* (1996) isolaram bactérias redutoras de sulfato mesofílicas, linhagem PRTOL1, da cultura enriquecida utilizada por Beller *et al.* (1992b). Em cultura pura, 2,70 % a 2,75 % do carbono do tolueno foi convertido em ácido benzilsuccínico e quantidades traço de ácido benzilfumárico (< 0,1 % do carbono do tolueno).

Durante o crescimento anaeróbico utilizando tolueno, sob condições de desnitrificação, ambas as linhagens T e K172 produziram benzilsuccinato e benzilfumarato, correspondendo a aproximadamente 0,5 % do carbono do tolueno (Seyfried *et al.*, 1994).

Rabus e Widdel (1995b), estudando a degradação de tolueno por bactéria redutora de sulfato, *Desulfobacula toluolica*, detectaram benzilsuccinato correspondente a 0,1 % do tolueno consumido.

Chee-Sanford *et al.* (1996) propuseram uma modificação da rota metabólica proposta por Evans e colaboradores (1992) para bactérias desnitrificantes, *Azoarcus toluolyticus* Tol-4, sugerindo cinamoil-CoA como metabólito responsável pelo desvio da rota de degradação do tolueno a benzoil-CoA ou a ácido *E*-fenilitacônico. Este é formado através de duas reações sucessivas com acetil-CoA, sendo a primeira com o grupo metila do tolueno resultando em fenilpropionil-CoA e a segunda, com cinamoil-CoA formando ácido benzilsuccínico, precursor do ácido *E*-fenilitacônico (Figura 3.5).

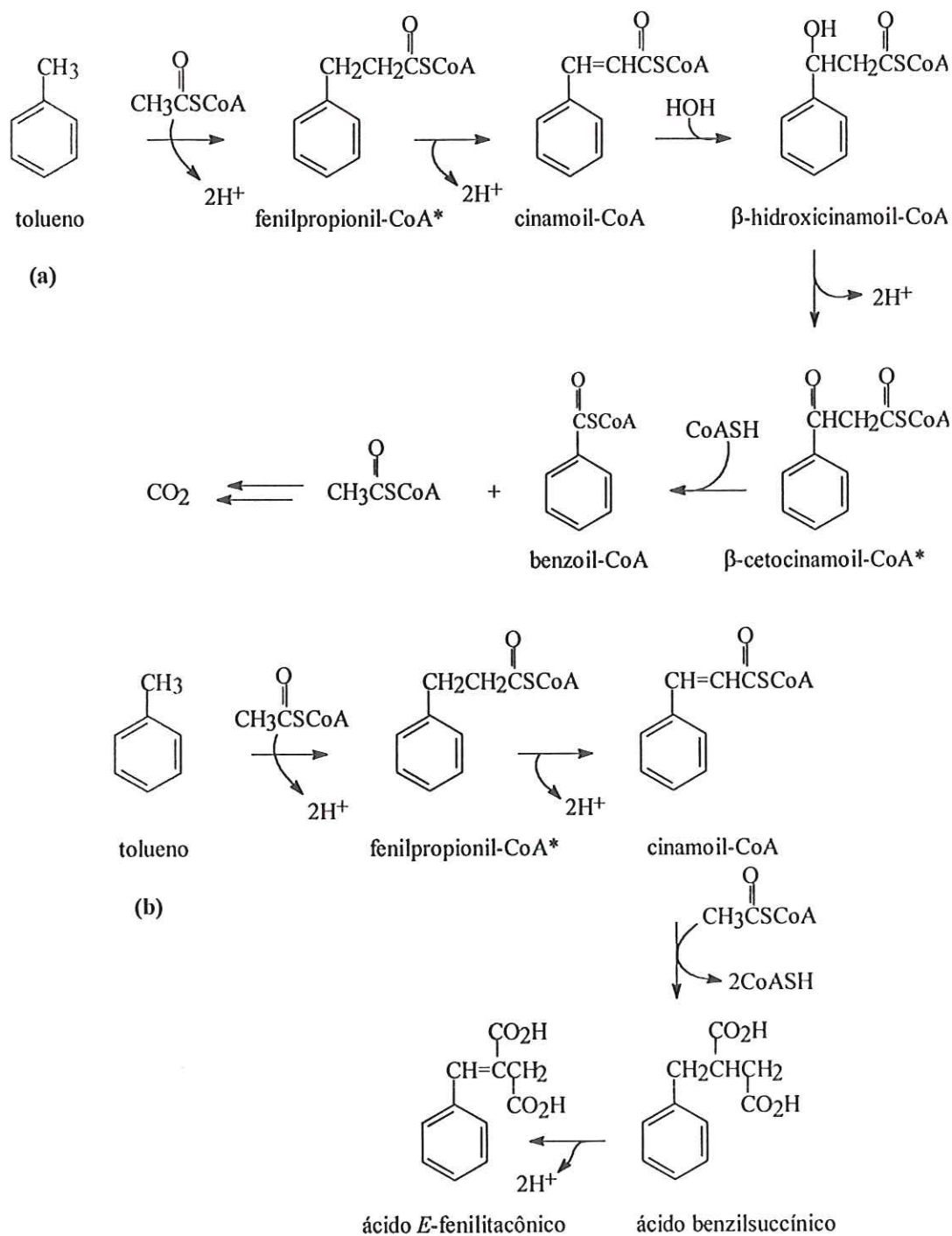


Figura 3.5: Mecanismos de reações de degradação de tolueno sob condições desnitrificantes pela linhagem Tol-4. (a) rota de mineralização proposta. (b) formação do ácido *E*-fenilitacônico. Asteriscos indicam intermediários hipotéticos (Chee-Sanford *et al.*, 1996).

Em estudos realizados por Migaud *et al.* (1996), a mesma linhagem Tol-4 converteu 1 % a 2 % do carbono do tolueno em benzilsuccinato e *E*-fenilitaconato, na razão de 1:10. Quantidades similares de ácido *E*-fenilitacônico foram produzidas por outras sete linhagens

de *Azoarcus toluolyticus* isoladas por Fries *et al.* (1994) e Zhou *et al.* (1995) durante o metabolismo de tolueno.

Como ácido benzilsuccínico e compostos insaturados relacionados (ácido benzilfumárico ou *E*-fenilitacônico) acumularam-se durante os ensaios anteriores, sem utilização posterior, foram considerados como produtos finais do metabolismo dos organismos envolvidos. Biegert e colaboradores (1996) mostraram que benzilsuccinato é um intermediário verdadeiro em uma rota de degradação do tolueno a benzoil-CoA, via adição de fumarato no substituinte metila do tolueno, através de bactérias desnitrificantes *Thauera aromatica* K172. A partir de tolueno e de fumarato ocorreu produção de benzilsuccinato, reação processada sob condições estritamente anaeróbias, mas independente de coenzima A e de nitrato (Figura 3.6). Fumarato poderia ser parcialmente substituído por outros intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico, tais como: citrato, malato e succinato, previamente convertidos em fumarato. Benzilsuccinato foi oxidado a benzoil-CoA numa reação dependente da adição da coenzima A e de nitrato.

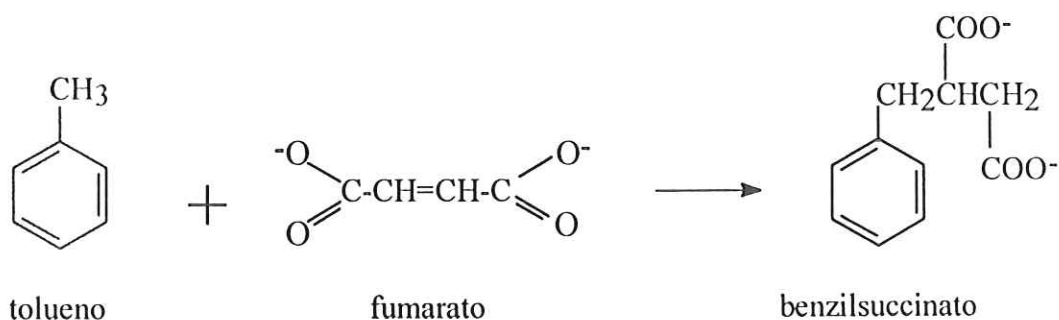


Figura 3.6: Formação de benzilsuccinato a partir de tolueno e fumarato (Biegert *et al.*, 1996).

A reação inicial de tolueno com fumarato, formando benzilsuccinato, também foi estudada por Beller & Spormann (1997a), com tratamento de permeabilização para a linhagem desnitrificante T. Essa reação não foi dependente da presença de coenzima A ou de ATP. Benzilsuccinato foi convertido em *E*-fenilitaconato e benzoato na presença de coenzima A. Assim, os autores consideraram que *E*-fenilitaconil-CoA e benzoil-CoA são intermediários durante a mineralização de tolueno. Tolueno marcado com deutério revelou que o átomo de hidrogênio retirado do substituinte metila do tolueno ou o-xileno durante reação com fumarato foi introduzido no grupo succinila (durante a quebra da dupla ligação) do benzilsuccinato ou 2-metilbenzilsuccinato, respectivamente. Rabus & Heider (1998) utilizando ^{14}C -tolueno em experimentos com extratos de células de bactérias desnitrificante linhagem EbN1 e redutora de sulfato *Desulfobacula toluolica* confirmaram a reação de tolueno e fumarato com formação de ^{14}C -benzilsuccinato. Assim, essa reação

inicial não é limitada a bactérias desnitrificantes. Beller & Spormann (1997b) também a observaram em células com tratamento de permeabilização, para bactérias redutoras de sulfato, linhagem PRTOL1, bem como Beller & Edwards (2000) em cultura metanogênica enriquecida.

A degradação anaeróbia de tolueno parece ser iniciada pela adição de fumarato ao grupo metila do tolueno por bactérias distantes filogeneticamente. Apesar das diferenças dos valores de energia livre de oxidação do tolueno acoplados à desnitrificação, redução de sulfato e consórcios fermentativo e metanogênico, a formação do benzilsuccinato parece ser uma reação inicial ideal para o metabolismo de tolueno sob condições limitadas de energia, pois é exergônica, $\Delta G^{\circ} = -40 \text{ kJ/mol}$ e requer somente um catalisador apropriado para ocorrer: benzilsuccinato sintase (Rabus & Heider, 1998).

O verdadeiro mecanismo de degradação anaeróbia de tolueno foi elucidado somente a partir de 1999 (Figura 3.7). Tolueno e fumarato formam benzilsuccinato que é ativado a benzilsuccinil-CoA. Este é oxidado em *E*-fenilitaconil-CoA que, forma 2-carboximetil-3-hidroxi-fenilpropionil-CoA, posteriormente oxidado a benzoilsuccinil-CoA. Então, este é quebrado em benzoil-CoA e succinil-CoA (Heider *et al.*, 1999).

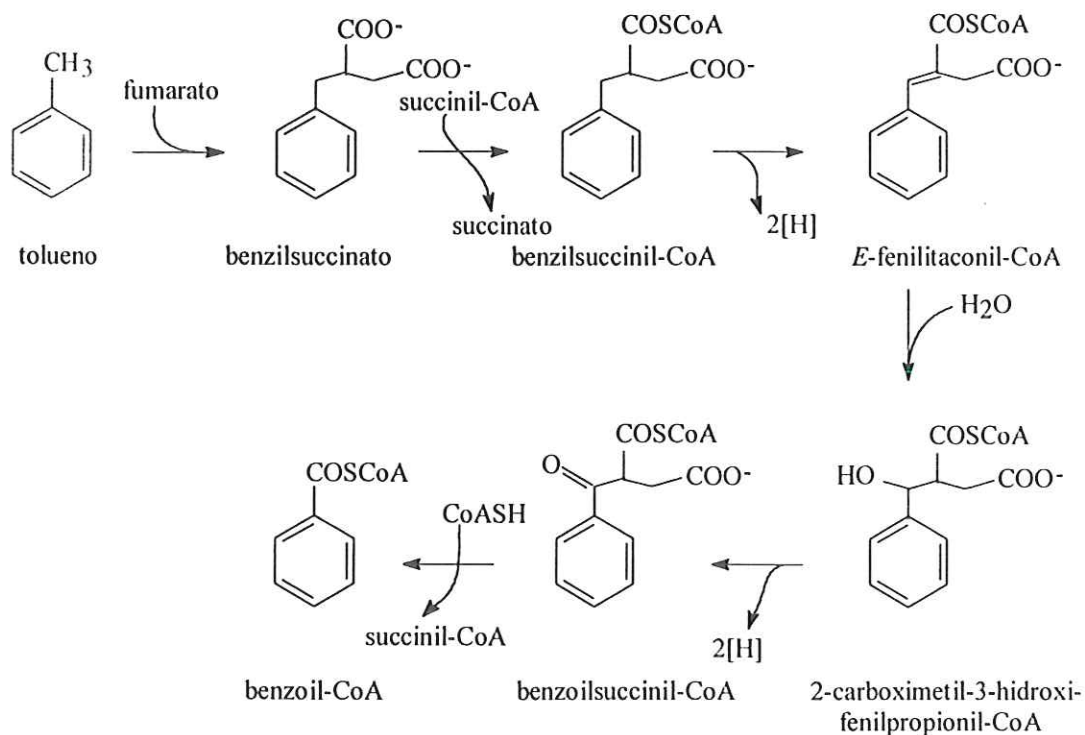


Figura 3.7: Mecanismo de reação proposto para a degradação anaeróbia de tolueno a benzoil-CoA (Heider *et al.*, 1999).

3.6.3 Etilbenzeno

As etapas da degradação anaeróbia de etilbenzeno foram demonstradas somente para culturas puras, sob condições de desnitrificação e seguem via metabólica diferente de tolueno (Rabus & Widdel, 1995a e Ball *et al.*, 1996). Ball *et al.* (1996) propuseram um mecanismo de degradação do etilbenzeno baseado na identificação dos intermediários, em experimentos realizados com a linhagem desnitrificante EB1 (Figura 3.8). A primeira reação de oxidação de etilbenzeno consiste na hidroxilação do substituinte etila, formando 1-feniletanol, sendo oxidado a acetofenona. Esta é, então, metabolizada via carboxilação, formando benzoil acetato, então ativado a benzoil acetyl-CoA. A subsequente clivagem desse composto gera acetyl-CoA e benzoil-CoA. Este pode ser então reduzido a compostos alicíclicos e posteriormente oxidados a acetyl-CoA e CO₂. Testes com H₂¹⁸O mostraram que a primeira reação de oxidação do etilbenzeno ocorre através da incorporação do átomo de oxigênio proveniente da água, formando 1-feniletanol. Rabus & Widdel (1995a) e Rabus & Heider (1998) apresentaram uma seqüência de reações similares à degradação do etilbenzeno pela linhagem EbN1, baseados na habilidade da cultura pura em crescer nesses intermediários. Johnson & Spormann (1999) examinaram as atividades das enzimas etilbenzeno deshidrogenase e 1-feniletanol deshidrogenase em extratos de células de *Azoarcus* sp. Linhagem EB1, confirmando as etapas de degradação do etilbenzeno.

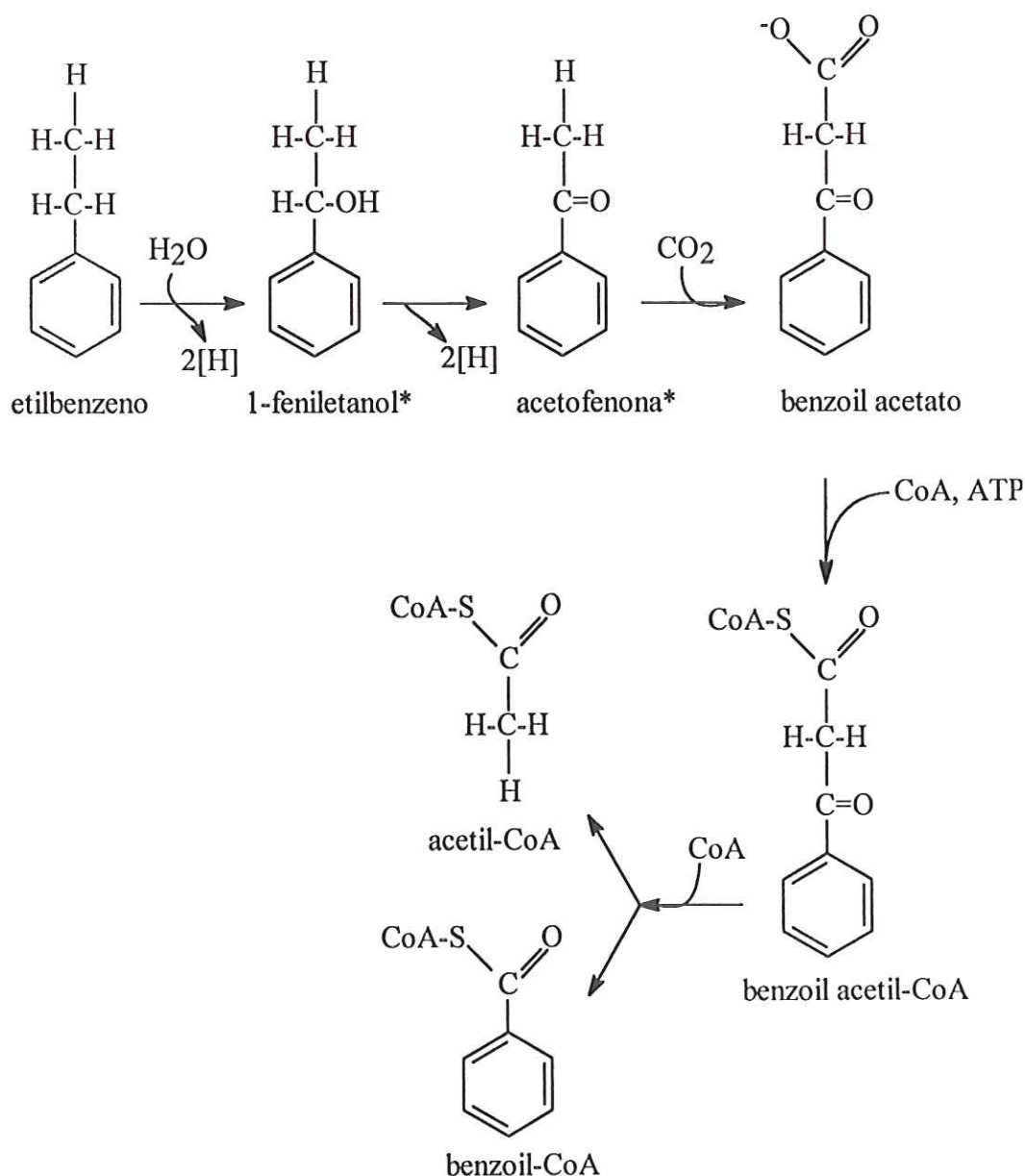


Figura 3.8: Reações iniciais da degradação de etilbenzeno pela linhagem desnitrificante EB1. Asteriscos indicam os intermediários identificados por cromatografia gasosa / espectrometria de massas (Ball *et al.*, 1996).

3.6.4 Xilenos

A etapa inicial da degradação de xilenos foi observada ocorrer através de duas rotas metabólicas diferentes, envolvendo reação de um dos grupos metila.

Na presença de tolueno, Evans *et al.* (1992) observaram que o-xileno não foi mineralizado, mas transformado em metabólitos análogos aos do tolueno: ácido 2-(metilbenzil)succínico e ácido 2-(metilbenzil)fumárico, por bactérias desnitrificantes,

linhagem T1. A transformação de o-xileno também ocorreu durante crescimento em meio de ácido succínico, sugerindo que o ataque ao grupo metila pela succinil-CoA é a reação central nessa transformação. Bactérias desnitrificantes, linhagem T converteram 70 % a 80 % de o-xileno, em reação com fumarato, em 2-(metilbenzil)succinato. Como o-xileno não é substrato de crescimento para a linhagem, sua transformação foi considerada como resultado de cometabolismo (Beller & Spormann, 1997a). Bactérias redutoras de sulfato, da linhagem PRTOL1, utilizaram completamente o-xileno, transformando-o principalmente em ácido 2-(metilbenzil)succínico e pequena fração de ácido 2-(metilbenzil)fumárico (13 % do o-xileno consumido). Ácido 2-metilbenzóico foi detectado em baixas concentrações (0,3 % do o-xileno consumido); p-xileno foi parcialmente transformado em ácido 4-metilbenzóico (ácido p-toluíco) via p-tolualdeído e ácido 4-(metilbenzil)succínico, com 23 % e 3 % do p-xileno consumido, respectivamente (Beller *et al.*, 1996).

Beller *et al.* (1995) observaram a degradação *in situ* de mais de 95 % de tolueno, o-xileno e m-xileno sendo sulfato o único aceptor de elétrons disponível. As produções dos ácidos: benzilsuccínico, 2-(metilbenzil)succínico e 3-(metilbenzil)succínico no aquífero foram consistentes com os desaparecimentos de tolueno, o-xileno e m-xileno, respectivamente. A ausência de ácido 4-(metilbenzil)succínico foi consistente com a ausência de p-xileno no aquífero.

Krieger *et al.* (1999) propuseram que as reações iniciais da degradação de m-xileno por *Azoarcus* sp., linhagem T são a oxidação de m-xileno a 3-metilbenzoato ou a 3-metilbenzoil-CoA via 3-(metilbenzil)succinato e *E*-(3-metilfenil)itaconato ou na forma de CoA. o-Xileno e p-xileno também foram utilizados como substrato formando os correspondentes homólogos do benzilzuccinato. Essas reações são análogas à oxidação de tolueno a benzoil-CoA, propostas por Biegert *et al.* (1996) e Beller & Spormann (1997a). 3-(Metilbenzil)succinato é formado pela adição de m-xileno ao fumarato. Ensaio com m-xileno marcado com deutério mostraram que o átomo de hidrogênio retirado do substituinte metila do m-xileno durante reação com fumarato foi introduzido no grupo succinila do 3-(metilbenzoil)succinato.

Biegert & Fuchs (1995) observaram a transformação dos isômeros de xileno a isômeros do metilbenzoato por bactérias desnitrificantes *Thauera* sp., linhagem K172.

Jorgensen *et al.* (1995a) verificaram que a degradação de o-xileno foi dependente da de tolueno em cultura desnitrificante mista enriquecida. Um dos grupos metila foi oxidado, resultando no acúmulo transiente de o-metilbenzaldeído e de ácido o-metilbenzóico. A relação cometabólica entre tolueno e o-xileno foi atribuída à reação inicial do grupo metila, pois, ao contrário de o-xileno, a transformação de álcool o-metilbenzílico ou de

o-metilbenzaldeído foi independente da degradação de tolueno. A adição de succinato na cultura também induziu à remoção de o-xileno, mas o-metilbenzaldeído e ácido o-metilbenzóico não foram acumulados no meio.

Seyfried *et al.* (1994) examinaram a reação inicial da degradação anaeróbia de m-xileno pela bactéria desnitrificante linhagem T, identificando 3-metilbenzaldeído e 3-metilbenzoato.

Häner *et al.* (1995) consideraram provável que a degradação de p-xileno, por cultura desnitrificante enriquecida, seja também iniciada pela oxidação do substituinte metila formando aldeído, devido à habilidade da cultura em crescer em p-metilbenzaldeído e p-metilbenzoato. p-Xileno foi convertido em p-metilbenzoato, como produto final, por bactérias redutoras de sulfato que metabolizam tolueno, *Desulfobacula toluolica* linhagem Tol-2 (Rabus & Widdel, 1995b).

Wilkes *et al.* (2000) identificaram ácidos benzóicos alquilados como os principais produtos metabólicos de bactérias redutoras de sulfato linhagens oXyS1 e mXyS1, que degradam o-xileno e m-xileno, respectivamente.

3.6.5 Benzoato

Benzoato e benzoil-CoA são intermediários comuns no metabolismo anaeróbio de compostos aromáticos. Benzoato foi identificado, em várias culturas puras e enriquecidas, como um intermediário transiente, durante a degradação anaeróbia de tolueno. Benzoil-CoA é um provável intermediário nas degradações de etilbenzeno e xileno.

Na ausência do oxigênio molecular, o anel aromático é inicialmente reduzido, para que possa então ocorrer a sua quebra. Benzoato é ativado a benzoil-CoA, posteriormente reduzido a ciclohex-1,5-diene-1-carboxil-CoA. Adições seguidas de água levam à formação dos intermediários 6-hidroxíciclohex-1-ene-1-carboxil-CoA e 2,6-dihidroxi-ciclohexano-1-carboxil-CoA. A oxidação da hidroxila a cetona, no carbono 2, torna a ligação C1-C2 do anel alicíclico, facilmente hidrolisável a 3-hidroxipimelil-CoA. A β -oxidação de 3-hidroxipimelil-CoA fornece glutaril-CoA e acetil-CoA. A descarboxilação de glutaril-CoA produz crotonil-CoA e CO₂. Essa seqüência de reações, ilustrada na Figura 3.9, produz, para cada molécula de benzoil-CoA degradada, três moléculas de acetil-CoA e uma de CO₂ (Heider & Fuchs, 1997a e Heider *et al.*, 1998).

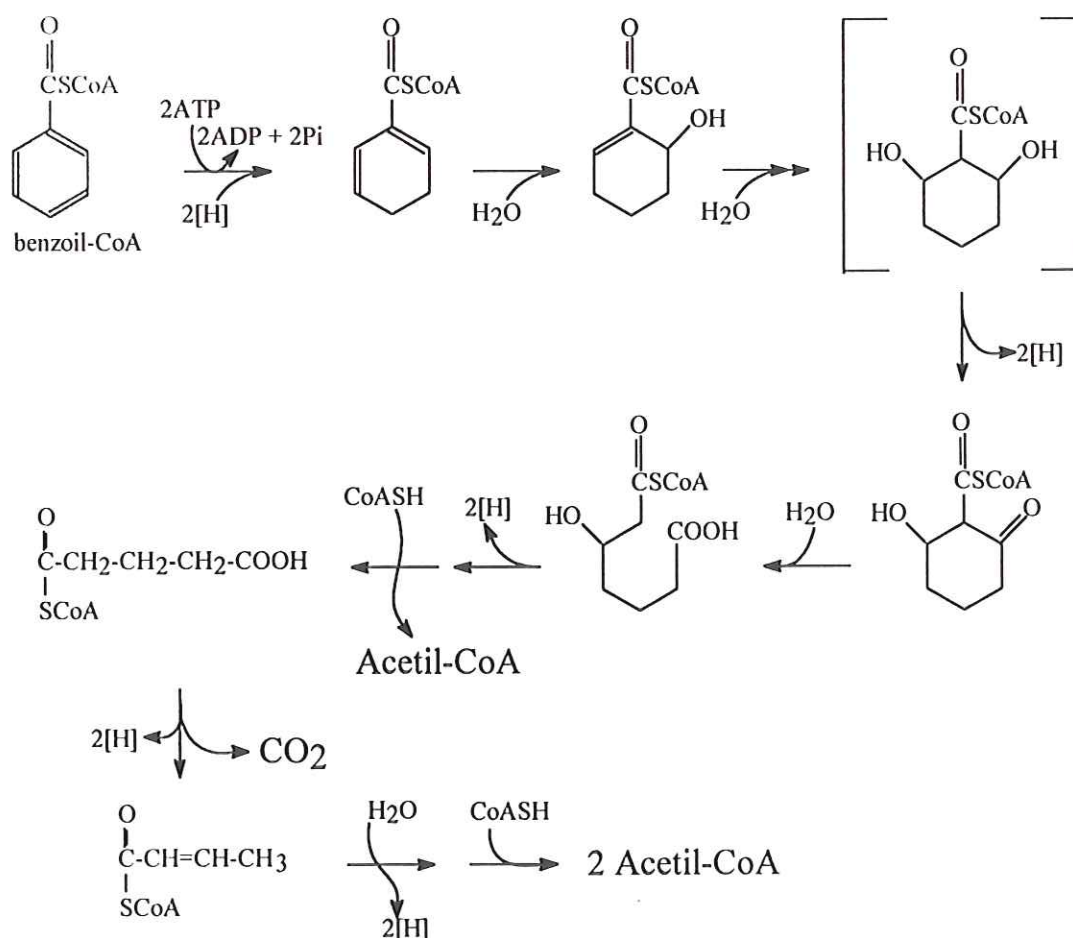


Figura 3.9: Rota central de benzoil-CoA na degradação anaeróbia de compostos aromáticos (Heider & Fuchs, 1997a).

Segundo Fang *et al.* (1997), a degradação anaeróbia de benzoato, na presença de sulfato, envolve vários grupos de bactérias em diferentes etapas, como apresentado na Tabela 3.7.

Benzoato é convertido, pelas bactérias acetogênicas sintróficas, em acetato e hidrogênio (reação 1) ou pelas bactérias redutoras de sulfato, em acetato (reação 2) ou diretamente em gás carbônico (reação 3). Posteriormente, arqueas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato competem por acetato e hidrogênio, produzindo metano (reações 4 e 6) e sulfeto (reações 5 e 7). Dessa forma, os doadores de elétrons são convertidos em metano ou em sulfeto.

Tabela 3.7: Reações envolvidas na conversão de benzoato em metano, na presença de sulfato.

Nº	Doador de elétrons	Organismo	Reação
1	Benzoato	BAS	$C_6H_5COO^- + 7H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + HCO_3^- + 3H_2 + 3H^+$
2	Benzoato	BRS(i)	$C_6H_5COO^- + 0,75SO_4^{2-} + 4H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + 0,75HS^- + HCO_3^- + 2,25H^+$
3	Benzoato	BRS(c)	$C_6H_5COO^- + 3,75SO_4^{2-} + 4H_2O \rightarrow 7HCO_3^- + 3,75HS^- + 2,25H^+$
4	Acetato	AM-A	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$
5	Acetato	BRS(c)	$CH_3COO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2HCO_3^- + HS^-$
6	Hidrogênio	AM-H	$HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$
7	Hidrogênio	BRS(c)	$SO_4^{2-} + 4H_2 + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$

BAS = bactérias acetogênicas sintróficas. BRS(i) = bactérias redutoras de sulfato, realizando degradação incompleta. BRS(c) = bactérias redutoras de sulfato, realizando degradação completa. AM-A = arqueas metanogênicas acetoclásticas. AM-H = arqueas metanogênicas hidrogenotróficas.

Fonte: Fang *et al.* (1997)

3.7 Estudos cinéticos com BTEX

A cinética bioquímica estuda as velocidades de crescimento dos microrganismos, de consumo de substratos e de formação de produtos. Tais velocidades devem ser expressas em termos matemáticos, por modelos que representem adequadamente a dinâmica desses processos.

Diversos parâmetros podem influenciar a cinética de populações microbianas, relacionados ao meio, estão composição, pH, reologia, temperatura e características multi-componentes; relacionados à microbiologia, estão controles internos, adaptabilidade e heterogeneidade. Além disso, as interações entre a massa celular e o ambiente, como transferência de nutrientes e de produtos também podem influenciar na cinética.

Os modelos mais simples que descrevem a cinética de populações microbianas, como os de ordem zero, primeira ordem e o modelo clássico de Monod, têm sido utilizados em estudos cinéticos de degradações de BTEX.

Nas reações elementares de ordem zero, a velocidade não é afetada pela concentração de substrato e a expressão de velocidade para consumo de um determinado substrato é escrita como:

$$(-r_S) = -\frac{dC_S}{dt} = k_0 \quad (3.1)$$

Nessa expressão, k_0 é a constante de ordem zero ($M.L^{-3}.T^{-1}$).

Segundo Reinhard *et al.* (1997), para compostos que são transformados sem período de adaptação da biomassa, a cinética de ordem zero parece ser mais aplicável que a de primeira ordem.

Reações irreversíveis de primeira ordem podem ser representadas pela equação estequiométrica $S \rightarrow P$. A equação cinética pode ser expressa como:

$$(-r_S) = -\frac{dC_S}{dt} = k_1 \cdot C_S \quad (3.2)$$

Nessa expressão, k_1 é a constante de velocidade para reação de primeira ordem (T^{-1}).

O modelo cinético de Monod pode ser resumidos em três equações básicas:

I. A velocidade bruta de crescimento dos microrganismos é proporcional à velocidade de utilização do substrato:

$$\left(\frac{dC_X}{dt}\right)_c = Y_{X/S} \left(\frac{dC_S}{dt}\right)_u \quad (3.3)$$

Nessa expressão, C_X é a concentração de microrganismos ($M.L^{-3}$), C_S é a concentração de substrato ($M.L^{-3}$), t é o tempo (T) e $Y_{X/S}$ é o fator de crescimento ou a produção bruta de microrganismos por unidade de massa de substrato (M células / M substrato). O índice c representa o crescimento de microrganismos e o índice u , a utilização de material orgânico.

II. A velocidade de crescimento dos microrganismos é proporcional à concentração dos mesmos e depende da concentração de substrato:

$$\left(\frac{dC_X}{dt}\right)_c = C_X \cdot \mu = \mu_{\max} \frac{C_S \cdot C_X}{K_S + C_S} \quad (3.4)$$

Na expressão cinética de Monod (3.4), μ é a velocidade específica de crescimento celular (T^{-1}) e μ_{\max} e K_S são constantes cinéticas, μ_{\max} é a velocidade máxima de crescimento celular e K_S é a constante de saturação do substrato e tem o valor da concentração de substrato na qual μ atinge metade de seu valor máximo.

III. Paralelo ao crescimento de microrganismos, devido à atividade anabólica, há também decaimento devido à morte de células. A velocidade de decaimento pode ser formulada como um processo de primeira ordem:

$$\left(\frac{dC_x}{dt}\right)_d = -C_x \cdot K_d \quad (3.5)$$

Nessa expressão, K_d é a constante da velocidade de decaimento ou constante de morte celular. O índice d representa o decaimento da massa bacteriana.

Os modelos cinéticos podem ser representados também em termos de velocidade específica de consumo de substrato (U). Dessa forma, a expressão de Monod pode ser representada por:

$$U = U_{\max} \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (3.6)$$

Nessa expressão, U é a velocidade específica de consumo de substrato (M substrato. M^{-1} células. T^{-1}) e U_{\max} é a velocidade específica máxima de consumo de substrato (Bailey, 1986; Da Silveira, 1996; Levenspiel, 1999).

Dados cinéticos para degradações anaeróbias de BTEX são apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8: Coeficientes cinéticos para degradações de BTEX.

Composto	T (°C)	k_0 ($\mu\text{g/L.h}$)	k_1 (dia^{-1})	K_s (mg/L)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	$U_{\text{máx}}$ ($\text{g substrato/g células.d}$)	$Y_{X/S}$ ($\text{g células/g mol substrato}$)	Condições	Referência
Condições Fermentativa e metanogênica									
Benzeno	17		0,004 ^c					Microcosmos com sedimento e água de aquífero contaminado	Wilson <i>et al.</i> (1986)
Tolueno			0,047 ^c						
Etilbenzeno			0,005 ^c						
o-xileno			0,005 ^c						
Tolueno ^{a,b}	35			2,76	0,11		17,0	Microcosmos contendo cultura enriquecida, pH = 6,8 – 7,0	Edwards & Grbic-Galic (1994)
o-xileno				2,12	0,07		17,0		
Tolueno	35			4,7	1,44		33,2	Cultura mista, pH = 7,2	Chaudhuri & Wiesmann (1996)
				9,0	1,39		32,2	Reator contínuo	
								Reator batelada	
Tolueno	22 - 24		0,09					Microcosmos contendo água de aquíferos	Salanitro <i>et al.</i> (1997)
BEmX			0,01						
Benzeno	22 - 24		0,16 – 0,20					Microcosmos contendo solo e água de aquíferos contaminados	Salanitro <i>et al.</i> (1997)
TmX			0,037 – 0,17						
Condições desnitrificantes									
Benzeno ^a							8,8	Microcosmos contendo cultura enriquecida, pH = 6,8 – 7,2	Burland & Edwards (1999)
Benzeno	15		0,022					Microcosmos contendo água de aquífero contaminado com BTEX, pH = 7,0	Morgan <i>et al.</i> (1993)
Tolueno			0,046						
Etilbenzeno			0,016						
(m+p)-xilenos			0,005						
Benzeno	22 - 24		< 0,01 – 0,07					Microcosmos contendo solo e água de aquíferos contaminados	Salanitro <i>et al.</i> (1997)
TmX			0,09 – 0,22						
Tolueno ^a	28					1,12 – 2,25	57	Incubações em batelada com cultura pura K172, pH = 7,8	Altenschmidt & Fuchs (1991)

(continua)

Tabela 3.8: Coeficientes cinéticos para degradações de BTEX (Continuação).

Composto	T (°C)	Parâmetros cinéticos				Y _{x/s} (g células/ g substrato/g mol substrato)	Condições	Referência
		k _o (µg/L.h)	k ₁ (dia ⁻¹)	K _s (mg/L)	µ _{máx} (dia ⁻¹)			
Tolueno ^a	30					2,65 – 6,63 0,66 – 1,59	Linhagem K172 Linhagem T, pH = 7,8	Schocher <i>et al.</i> (1991)
Tolueno ^a	30					7,43	Incubações em batelada com cultura pura T1, pH = 7,5	Evans <i>et al.</i> (1991b)
Tolueno ^a	30					7,46	Incubações em batelada com cultura pura linhagem T1	Frazer <i>et al.</i> (1993)
Tolueno Etilbenzeno (m+p)-xilenos o-xileno	12		0,16 – 0,15 0,015 – 0,065 0,18 – 0,38 0,018 – 0,016				Microcosmos contendo sedimento, valores obtidos com 30 e 75 mgNO ₃ -N/L, respectivamente	Hutchins <i>et al.</i> (1991a)
Tolueno Etilbenzeno	Ambiente		>1,1 0,55				Adicionados individualmente em microcosmos com sedimento	Hutchins <i>et al.</i> (1991a)
Tolueno (m+p)-xilenos	12		0,022 0,067				Microcosmos com sedimento contaminado com combustível de aviiação JP-4, 75 mgNO ₃ -N/L	Hutchins <i>et al.</i> (1991b)
Tolueno Etilbenzeno	22		3,4 3,4				Coluna com solo, alimentada com água subterrânea, BTEX, PCE e nitrato	Patterson <i>et al.</i> (1993)
Tolueno	25			8,6		0,28	Microcosmos contendo cultura enriquecida, pH = 7,0	Alvarez <i>et al.</i> (1994)
Tolueno ^a	20			0,2	2,4	17,04	Experimentos em batelada com mistura de lodos de ETE, pH = 7,2	Jorgensen <i>et al.</i> (1995b)
Tolueno Xilenos	12		0,04 ^c 0,02 – 0,04 ^c				Microcosmos com sedimento de aquiífero contaminado	Bregnard <i>et al.</i> (1996)

(continua)

Tabela 3.8: Coeficientes cinéticos para degradações de BTEX (Continuação).

Composto	T (°C)	Parâmetros cinéticos				Y _{x/s} (g células/ mol substrato)	Condições	Referência
		k _o (µg/L.h)	k ₁ (dia ⁻¹)	K _s (mg/L)	µ _{max} (dia ⁻¹)			
Tolueno ^a	30				6,63	49,6	Incubações em batelada com cultura pura <i>Azoarcus toluolyticus</i> Tol-4, pH = 7,0	Chee-Sanford et al. (1996)
Tolueno	21	30,1					Microcosmos com sedimento contaminado com gasolina	Ball & Reinhard (1996)
Etilbenzeno		4,2	0,57 ^c					
(m+p)-xilenos		5,4						
Tolueno	Ambiente	4,5					Testes <i>in situ</i> em poço em aquífero contaminado com gasolina	Reinhard et al. (1997)
Etilbenzeno		2,8						
m-xileno		4,5						
o-xileno		0,1						
Tolueno, etilbenzeno, m-xileno e o-xileno totais	16	0,83 – 3,04					Microcosmos com diferentes sedimentos contaminados com gasolina, pH = 7,4	Kao & Borden (1997)
Tolueno						140	Cultura pura de <i>Azoarcus toluolyticus</i>	Elmén et al. (1997)
Etilbenzeno						55		
m-xileno						76		
Tolueno	20	0,40 – 775					Microcosmos com sedimento variando a concentração inicial de tolueno	Hutchins (1997)
Tolueno	20	84 – 283					Microcosmos variando a relação sedimento / líquido	Hutchins (1997)

(continua)

Tabela 3.8: Coeficientes cinéticos para degradações de BTEX (Continuação).

Composto	T (°C)	Parâmetros cinéticos			Y _{X/S} (g células/ g substrato/g mol substrato)	Condições	Referência
		k _o (µg/L.h)	k _i (dia ⁻¹)	K _s (mg/L)			
Condições de redução de sulfato							
Benzeno	Ambiente		0,20°			Microcosmos contendo cultura enriquecida	Edwards & Grbic-Galic (1992)
Benzeno	35		0,38 - 0,46			Incubações em batelada com cultura mista enriquecida, pH=7,3	Chaudhuri & Wiesmann (1995)
Benzeno TmX	22 - 24		< 0,01 - 0,19 0,024 - 0,16			Microcosmos contendo solo e água de aquíferos contaminados	Salanitro <i>et al.</i> (1997)
Tolueno	22		3,4			Coluna com solo, alimentada com água subterrânea, BTEX e PCE	Patterson <i>et al.</i> (1993)
Tolueno o-xileno	20		0,04° 0,01 - 0,02°			Microcosmos contendo cultura enriquecida	Edwards <i>et al.</i> (1992)
Tolueno (m+p)-xileno	21	7,2 4,1				Microcosmos com sedimento contaminado com gasolina	Ball & Reinhard (1996)
Condições de redução de Fe (III)							
Benzeno	22 - 24		< 0,01			Microcosmos contendo solo e água de aquíferos contaminados	Salanitro <i>et al.</i> (1997)
TmX			< 0,01 - 0,02			Microcosmos com sedimento e água de aquífero contaminado	Lowley <i>et al.</i> (1994)
Benzeno	20		0,24°				
Tolueno			0,12°				

^a Concentração de células medida em proteína.

^b Foi utilizado modelo cinético de Monod adaptado para substrato volátil em sistema duas fases.

^c Cálculo por Salanitro *et al.* (1997) a partir dos gráficos publicados.

k_o é a constante de velocidade para reação de ordem zero.

k_i é a constante de velocidade para reação de primeira ordem.

K_s, µ_{max} e U_{max} são constantes cinéticas do modelo de Monod.

Y_{X/S} é o fator de crescimento.

A variabilidade dos dados cinéticos pode ser devida aos seguintes fatores: diversidade metabólica dos organismos isolados de diferentes sistemas, e variações nas condições ambientais e nos procedimentos experimentais e analíticos. Dessa forma, cuidados devem ser tomados na extrapolação de dados cinéticos obtidos em um sistema, para outro (Alvarez *et al.*, 1994).

A aplicação desses modelos é justificada quando o composto orgânico de interesse atua como fonte de energia primária para a comunidade microbiana. Quando a degradação de um contaminante produz pouca ou nenhuma energia à célula, esses modelos podem ainda ser aplicados em certas condições. Por exemplo, a velocidade de degradação de um contaminante orgânico pode ser independente de sua concentração (ordem zero), quando for degradado como resultado de cometabolismo. Neste caso, a cinética de degradação é basicamente controlada pela disponibilidade de substrato primário e de aceptores de elétrons (Hunter *et al.*, 1998).

Os parâmetros cinéticos, apresentados na Tabela 3.7, foram obtidos em ensaios em microcosmos utilizando células suspensas. Shim & Yang (1999) observaram que células imobilizadas em bioreatores apresentaram velocidades de degradações de BTEX de 9 a 75 vezes maiores que células suspensas em frascos de soro, devidas à elevada densidade celular e a melhoramentos da cultura no reator.

Edwards & Grbic-Galic (1994) utilizaram modelo cinético de Monod adaptado para substrato volátil em sistemas duas fases. O termo referente ao decaimento (respiração endógena) foi negligenciado, pois as velocidades de decaimento são relativamente pequenas em sistemas anaeróbios.

$$-\frac{dm}{dt} = \left(\frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \right) C_{X_0} \cdot V_L \left[\frac{C_S}{(K_S + C_S)} \right] \quad (3.7)$$

$$C_S = \frac{m}{(V_L + H \cdot V_G)} \quad (3.8)$$

Nessas expressões, m é a massa total de substrato (M), V_L é o volume líquido (L^{-3}), C_S é a concentração de substrato na fase aquosa ($M \cdot L^{-3}$), H é a constante da lei de Henry para o substrato e V_G é o volume de headspace (L^{-3}).

Elmén *et al.* (1997) utilizaram três modelos cinéticos de inibição por substrato para degradação de tolueno, sob condições de redução de nitrato. As expressões cinéticas são apresentadas na Tabela 3.9. Os modelos que apresentaram melhores ajustes foram escolhidos

para representar os efeitos de tolueno, nitrato e nitrito no crescimento microbiano: equação de Edwards para tolueno ($K_s = 51,6$ mg/L, $K_i = 92,1$ mg/L), equação de Andrews para nitrato ($K_s = 80,6$ mg/L, $K_i = 582,8$ mg/L) e inibição por produto, de Luong, para nitrito ($P_{max} = 552,0$ mg/L).

Tabela 3.9: Modelos cinéticos de inibição por substrato.

Modelo	Função
Andrews	$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot C_s}{(K_s + C_s)(1 + C_s/K_i)}$
Edwards	$\mu = \mu_{max} (\exp(-C_s/K_i) - \exp(C_s/K_s))$
Luong	$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot C_s}{C_s + K_s} \left(1 - \frac{C_s}{C_{Smax}}\right)^n$
Inibição por produto (Luong)	$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{C_p}{C_{Pmax}}\right)^n$

K_i é a constante de inibição.

C_p é a concentração de produto.

n indica o tipo de relação entre μ e C_s . (Luong 1987).

Fonte: Elmén *et al.* (1997)

3.7.1 Estudos cinéticos em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo tratando compostos considerados tóxicos

O reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) proposto por Zaiat *et al.* (1994) tem sido utilizado no tratamento de esgoto sanitário natural (Zaiat *et al.*, 2000 e Lima, 2001) e águas residuárias sintéticas de composição simples, à base de glicose (Zaiat *et al.*, 1997), complexas, com proteínas, carboidratos e lipídios (Sarti *et al.*, 2001); e contaminadas por compostos tóxicos. Damianovic (1997) estudou a degradação e a influência de pentaclorofenol no tratamento de substrato orgânico, entre concentrações de 0,2 mg/L a 8,0 mg/L, porém não estudou a cinética dessa degradação. Bolaños (2001) e Oliveira (2001) avaliaram a degradação de fenol e formaldeído, respectivamente, ajustando modelos cinéticos aos dados obtidos.

Bolaños (2001) realizou estudo cinético de degradação de fenol em RAHLF, a 30°C, variando sua concentração afluente de 90,5 mg/L a 1229,8 mg/L. O estudo cinético mostrou que sua degradação foi efetiva na primeira metade do reator, correspondendo ao tempo de detenção hidráulica de 6 horas, sendo mínimas as velocidades específicas globais de reação

após essa seção do reator. Modelo cinético de primeira ordem foi ajustado para degradação de fenol, obtendo-se valor médio da constante cinética aparente de primeira ordem (k_1^{app}) de $0,204 \pm 0,053 \text{ h}^{-1}$.

Oliveira (2001) estudou a cinética de degradação de formaldeído em RAHLF com concentrações aplicadas entre 23 mg/L a 1378 mg/L, a 35°C. O método das velocidades iniciais foi aplicado para estimar as velocidades específicas de utilização de substrato observadas (r_{obs}). Os dados de r_{obs} foram correlacionados com as concentrações de formaldeído para obtenção de parâmetros cinéticos do modelo clássico de Monod, sendo a velocidade específica máxima de consumo de substrato aparente (r_{max}^{app}) de $2,79 \times 10^{-3} \pm 0,37 \times 10^{-3} \text{ mg formaldeído/mg SSV.h}$ e a constante de saturação de substrato aparente (K_s^{app}) de $242,8 \pm 114,1 \text{ mg formaldeído/L}$. O comportamento cinético observado de degradação de formaldeído não apresentou qualquer inibição da velocidade global de reação na faixa de concentração estudada.

3.8 Microrganismos observados

A degradação anaeróbia de compostos aromáticos é um “talento” fisiológico restrito a bactérias, pois números crescentes de linhagens bacterianas desnitrificantes, redutoras de sulfato (BRS) e de Fe (III), bem como fermentativas, têm sido isoladas e estudadas em culturas puras pelas habilidades em degradar hidrocarbonetos aromáticos, halogenados e fenóis. Vale ressaltar que a capacidade metabólica de fungos anaeróbios é pouco conhecida e que degradação do anel aromático não foi ainda reportada para membros das arqueas (Harwood e Gibson, 1997).

Bactérias desnitrificantes que degradam compostos aromáticos pertencem ao mesmo grupo evolucionário da divisão *Proteobacteria*, subdivisão β . A maioria das bactérias isoladas, anteriormente classificadas como *Pseudomonas* sp., representam novas espécies dos gêneros *Thauera* e *Azoarcus*, previamente estabelecidos para bactérias que respiram selenato (*T. selenatis*) e fixadoras de nitrogênio (*A. indigenis*), respectivamente. Entre as desnitrificantes, são conhecidas as seguintes espécies: *Thauera aromatica*, *Azoarcus evansii* (Anders *et al.*, 1995) e *Azoarcus toluolyticus* (Zhou *et al.*, 1995). Todas utilizam benzoato e vários substratos aromáticos e não aromáticos, sob condições anaeróbias. Por exemplo, a *T. aromatica* pode degradar tolueno e fenol, enquanto a *A. toluolyticus* degrada tolueno, mas não fenol e a *A. evansii* não degrada ambos (Hurek & Reinhold-Hurek, 1995 e Heider & Fuchs, 1997b). As linhagens EB1, EbN1 e PbN1, que degradam etilbenzeno, estão

fortemente relacionadas e são pertencentes ao gênero *Azoarcus* (Heider *et al.*, 1999). Alguns compostos como benzeno, aromáticos halogenados e aromáticos metoxilados são considerados recalcitrantes para as desnitrificantes, apesar de alguns trabalhos relatarem a degradação, atribuída a associações sintróficas similares às encontradas em consórcio metanogênico (Heider & Fuchs, 1997b). Coates *et al.* (2001) isolaram duas linhagens de *Dechloromonas* que oxidam benzeno a CO₂. As linhagens RCB e JJ apresentam 98,1 % de similaridade na seqüência filogenética e ambas são membros da subdivisão β da *Proteobacteria*. A espécie mais próxima é a *Ferribacterium limneticum*, uma redutora de Fe (III) estritamente anaeróbia. Todos os outros membros do subgrupo *Dechloromonas* são redutoras de (per)cloratos anaeróbias facultativas.

Entretanto, outras possibilidades de degradação de compostos aromáticos, utilizando nitrato, estão relacionadas com BRS *Desulfobacterium catecholicum* (Szewzyk & Pfennig, 1987) e bactéria redutora de Fe (III) *Geobacter metallireducens* (Lovley *et al.*, 1993), que podem usar alternativamente nitrato através da redução dissimilativa de nitrato a amônia.

A maioria das espécies de BRS degradadoras de compostos aromáticos são membros da Família *Desulfobacteriaceae*, oxidadoras completas, pertencentes à subdivisão δ da *Proteobacteria* (Widdel, 1988) ou são gram-positivas, formadoras de esporos semelhantes a *Desulfotomaculum* (Heider & Fuchs, 1997b). O potencial das BRS para degradar compostos aromáticos é muito maior que o conhecido. A degradação completa de benzeno e xilenos foi relacionada com a redução de sulfato em sedimentos e culturas enriquecidas (Lovley *et al.*, 1995; Coates *et al.*, 1996a, Rueter *et al.*, 1994, Rabus *et al.*, 1996). Linhagens de BRS que metabolizam alquilbenzenos foram descritas, todas da família *Desulfobacteriaceae*, são gram-negativas e não formam esporos. Três linhagens utilizam tolueno: *Desulfobacula toluolica* (Rabus *et al.*, 1993), linhagem PRTOL1, com 96 % de similaridade na seqüência filogenética em relação a *Desulforhabdus amnigenus* (Beller *et al.*, 1996) e *Desulfobacterium cetonicum* (Harms *et al.*, 1999). Duas linhagens, oXyS1 e mXyS1 foram isoladas em o-xileno e m-xileno, respectivamente. A linhagem oXyS1 apresentou elevada similaridade com a *Desulfobacterium cetonicum* (98,4 %) e a *Desulfosarcina variabilis* (98,7 %), também metabolizou tolueno, o-etiltolueno, benzoato e o-metilbenzoato. A linhagem mXyS1 apresentou maior similaridade com *Desulfococcus multivorans* (86,9 %), também cresceu em tolueno, m-etiltolueno, m-isopropiltolueno (m-cimeno), benzoato e m-metilbenzoato (Harms *et al.*, 1999).

Robertson *et al.* (2000) isolaram oito linhagens de BRS de aquífero contaminado com gasolina. As linhagens T1 e T2 foram isoladas em meio contendo tolueno e as linhagens S4, S5, S6, S7, S8 e S10, em meio contendo benzoato. Todas as linhagens são bacilos curvos

ou retos, formadores de esporos. A amplificação e o seqüenciamento do rDNA 16S mostraram maior afinidade com *Desulfosporosinus orientis* DSM 8344, anteriormente classificada como *Desulfotomaculum orientis*, com 97,1 % a 98,9 % de similaridade na seqüência filogenética. As linhagens também foram relacionadas com *Desulfosporosinus orientis* DSM 765 (95,3 % a 97,3 %) e *Desulfotomaculum auripigmentum* (95,9 % a 97,9 %). As mineralizações de BTEX, 1,3,5-trimetilbenzeno e naftaleno não ocorreram em culturas puras. Bactérias anaeróbias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos em culturas puras têm realizado degradações completas. As rotas metabólicas não foram investigadas mas como as linhagens estão fortemente relacionadas com *D. orientis* DSM 8344, oxidadora incompleta, as linhagens provavelmente apresentam o mesmo metabolismo, não degradando qualquer hidrocarboneto aromático em cultura pura. As linhagens de *Desulfosporosinus* sp. têm o potencial de participar nas degradações de BTEX através de associações sintróficas com bactérias fermentativas. Robertson *et al.* (2001) propuseram que essas linhagens sejam representativas de novas espécies do gênero *Desulfosporosinus*, sendo proposto o nome *Desulfosporosinus meridiei*.

A única bactéria redutora de Fe (III) isolada foi *Geobacter metallireducens* que oxida completamente tolueno, fenol, p-cresol, aldeídos aromáticos, benzoato reduzindo íon Fe^{3+} a íon Fe^{2+} . *Geobacter* sp. pertence à divisão *Proteobacteria* subdivisão δ , relacionada com *Desulfuromonas* sp. e *Pelobacter* sp. (Lovley *et al.*, 1989; Lovley & Lonergan, 1990). Várias outras espécies de *Geobacter* podem também oxidar compostos aromáticos utilizando Fe (III) (Coates *et al.*, 1996b).

Um consórcio sintrófico que degrada BTEX é composto por bactérias fermentativas que metabolizam compostos aromáticos e de organismos consumidores de hidrogênio, tais como: acetogênicos, metanogênicos ou redutores de sulfato. Várias culturas mistas têm mostrado habilidades em degradar benzeno em consórcios metanogênicos, com redução de sulfato ou de Fe (III).

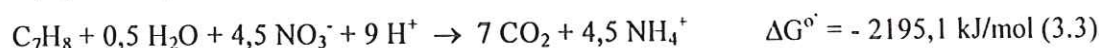
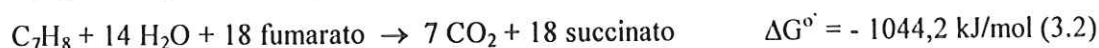
Edwards & Grbic-Galic (1994) tentaram isolar culturas puras degradadoras de tolueno e de o-xileno, a partir de cultura mista metanogênica. Contudo, a degradação de tolueno foi acompanhada pela produção de metano, indicando consórcio de bactérias fermentativas e arqueas metanogênicas que não puderam ser separadas.

Ficker *et al.* (1999) verificaram a presença de bactérias formando cadeias finas e longas, *Desulfotomaculum* sp. e duas espécies de arqueas metanogênicas, em consórcio, degradando tolueno. As bactérias em cadeia, não relacionadas aos gêneros descritos pertencentes ao consórcio, foram consideradas responsáveis por iniciar o ataque ao tolueno. *Desulfotomaculum* sp., que crescem em etanol, propionato, butirato e benzoato na ausência

de sulfato, foram consideradas responsáveis por utilizar os intermediários, convertendo-os em acetato e hidrogênio. As duas espécies de arqueas metanogênicas pertencentes aos gêneros *Methanosaeta* e *Methanospirillum* foram responsáveis por desempenhar papéis complementares no consórcio. As *Methanosaeta* sp. utilizaram acetato e as *Methanospirillum* sp. utilizaram formiato e hidrogênio.

Tolueno não pode ser degradado formando ácidos orgânicos e hidrogênio sob condições padrão, pois a reação é endergônica. (reação 3.1). Assim, a degradação fermentativa de tolueno ocorre com organismos consumidores de hidrogênio: a redução da pressão parcial permite que valores de energia livre de Gibbs tornem-se negativos para a primeira reação de oxidação. Meckenstock (1999) estudou a degradação fermentativa de tolueno em coculturas sintróficas definidas. Tolueno foi usado como única fonte de carbono e de energia pela BRS, linhagem TRM1 na presença de sulfato e pela *Geobacter metallireducens* que utiliza Fe (III). Culturas puras não foram capazes de degradar tolueno na presença de outros aceptores de elétrons, como fumarato e nitrato. No entanto, em cocultura da linhagem TRM1 com *Wolinella succinogenes*, ocorreu a degradação de tolueno, em presença de fumarato ou de nitrato. Em cocultura de *G. metallireducens* com *W. succinogenes* também ocorreu a degradação de tolueno na presença de fumarato. Hidrogênio transportou elétrons dos produtos da oxidação das duas linhagens para *W. succinogenes*, responsável pela redução do acceptor de elétrons adicionado. Desse modo, as bactérias oxidadoras de tolueno cultivadas com sulfato ou Fe (III), não necessariamente reduzem os respectivos aceptores de elétrons no ambiente, mas poderiam cooperar com organismos consumidores de hidrogênio que, por sua vez, poderiam reduzir outros aceptores de elétrons, tais como nitrato ou mesmo dióxido de carbono.

A conversão de tolueno a CO_2 e H_2 é uma reação endergônica sob condições padrão (reação 3.1) mas torna-se exergônica se acoplada à redução de fumarato (reação 3.2) ou de nitrato (reação 3.3).



Portanto, essas condições mostram as diferentes rotas metabólicas possíveis para as degradações anaeróbias de BTEX.

A Tabela 3.10 ilustra os microrganismos encontrados em estudos de degradações de BTEX e suas respectivas fontes de enriquecimento ou isolamento. A variedade de ambientes de onde foram isoladas as culturas indica que organismos degradadores de compostos aromáticos estão amplamente distribuídos na natureza.

Tabela 3.10: Microorganismos observados em vários estudos de degradação anaeróbia de BTEX.

Referência	Hidrocarboneto metabolizado	Organismos	Morfologia	Habitat original
Condições fermentativa e metanogênica				
Edwards & Grbic-Galic (1994)	Tolueno, o-xileno	Consórcio	Bacilos com extremidades arredondadas (0,3 – 0,5 µm diâmetro) <i>Methanosaepta soehngeni</i>	Sedimento de aquífero contaminado – creosoto
Ficker <i>et al.</i> (1999)	Tolueno	Cultura enriquecida	Células em cadeia fina e longa <i>Desulfotomaculum</i> sp. <i>Methanosaepta</i> sp. <i>Methanospirillum</i> sp.	Sedimento de aquífero contaminado – creosoto
Condições desnitrificantes				
Dolfing <i>et al.</i> (1990) Heider <i>et al.</i> (1999)	Tolueno, m-xileno	<i>Azoarcus</i> sp. Linhagem T	Bacilos (0,5-0,7 µm x 1,5-3,5 µm)	Efluente de coluna de aquífero tratando tolueno
Tschech & Fuchs (1987) Schocher <i>et al.</i> (1991)	Tolueno	Linhagem T Linhagem K172 Linhagem S100 Linhagem S2	Bacilos Bacilos com extremidades arredondadas e coco-bacilos Bacilos com extremidades arredondadas	Efluente de coluna de aquífero tratando tolueno Lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgotos Sedimento de enseada poluída Sedimento de enseada poluída
Evans <i>et al.</i> (1991b) Coschigano & Young (1997) Coschigano <i>et al.</i> (1998) Song <i>et al.</i> (1998)	Tolueno, o-xileno	<i>Thauera aromatica</i> T1	Bacilos	Solo contaminado com gasolina
Su & Kafkewitz (1994)	Tolueno, xilenos	<i>Pseudomonas maltophilia</i> SUI		Lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgotos

(continua)

Tabela 3.10: Microrganismos observados em vários estudos de degradação anaeróbia de BTEX (Continuação).

Referência	Hidrocarboneto metabolizado	Organismos	Morfologia	Habitat original
Fries <i>et al.</i> (1994)	Tolueno	<i>A. toluityticus</i> Tol-4	Bacilos	Sedimento de aquífero contaminado – petróleo
Zhou <i>et al.</i> (1995)	Tolueno	<i>A. toluityticus</i> Td-1	(1,4-2,1 µm de comprimento)	Solo contaminado – petróleo
Zhou <i>et al.</i> (1997)	Tolueno	<i>A. toluityticus</i> Td-2	Linhagens Td-3, Td-15, Td-17, Td-19	Solo contaminado – petróleo
	Tolueno	<i>A. toluityticus</i> Td-3	formar cadeias	Sedimento marinho contaminado – petróleo
	Tolueno, m-xileno	<i>A. toluityticus</i> Td-15		Compostagem
	Tolueno	<i>A. toluityticus</i> Td-17		Solo de área industrial
	Tolueno	<i>A. toluityticus</i> Td-19		Solo de aterro sanitário
	Tolueno	<i>A. toluityticus</i> Td-21		Solo não contaminado
Biegert & Fuchs (1995) Anders <i>et al.</i> (1995)	Tolueno	<i>Thauera aromatica</i> K172	Bacilos com extremidades arredondadas (0,5-1,5 µm x 1,0-2,5 µm)	Lodo de estação de tratamento de esgotos
Rabus & Widdel (1995a) Rabus & Widdel (1996)	Tolueno	Linhagem ToN1	Coco-bacilos (0,6-0,8 µm x 1,0-2,0 µm)	Lodo de água doce
	Etilbenzeno, tolueno	Linhagem EbN1	Coco-bacilos (0,6-0,8 µm x 1,5-2,5 µm)	
	Etilbenzeno, propilbenzeno	Linhagem PbN1	Coco-bacilos (1,0 µm x 1,5-2,5 µm)	
	xilenos, tolueno	Linhagem mXyN1	Coco-bacilos (0,5-1,0 µm x 1,5-3,0 µm)	
Ball <i>et al.</i> (1996)	Etilbenzeno	Linhagem EB1	Bacilos (1,0 µm x 3,0 µm)	Sedimento - lagoa tratando efluente de refinaria de petróleo
Hess <i>et al.</i> (1997)	Tolueno	Linhagens T2, T4, T6, T10 <i>Azoarcus</i> sp. T3 Linhagens M4, M5, M6, M7, M9, M10, M11, M12 <i>Azoarcus</i> sp. M3	Cocos	Aquífero contaminado – diesel
	m-xileno, tolueno		Bacilos	

(continua)

Tabela 3.10: Microorganismos observados em vários estudos de degradação anaeróbia de BTEX (Continuação).

Referência	Hidrocarboneto metabolizado	Organismos	Morfologia	Habitat original
Coates <i>et al.</i> (2001)	Benzeno, tolueno	<i>Dechloromonas</i> Linhagem RCB Linhagem JJ	Bacilos (0,5 µm x 1,8 µm)	Sedimento de rio Sedimento de lago
Condições de redução de sulfato				
Edwards <i>et al.</i> (1992)	Tolueno, xilenos	Cultura enriquecida	Bacilos (1,3 µm x 2,8 µm) formam cadeias: 2 a 20 células Filamentosos (0,2 µm diâmetro)	Sedimento contaminado – gasolina
Rabus <i>et al.</i> (1993) Rabus & Widdel (1995b)	Tolueno, p-xileno	<i>Desulfobacula toluolica</i> Tol-2	Células ovais (1,2-1,4 µm x 1,2-2,0 µm)	Sedimento marinho com sulfeto
Rueter <i>et al.</i> (1994) Rabus <i>et al.</i> (1996)	Tolueno, o-xileno, m-xileno	Cultura enriquecida	Coco-bacilos	Tanque de petróleo
Beller <i>et al.</i> (1996)	Tolueno, o-xileno, p-xileno	Linhagem PRTO1	Células ovais (1,2-1,7 µm x 2,0-3,0 µm)	Solo contaminado – combustível de aviação
Chen & Taylor (1997)	BTEX	Consórcio termofílico	Predomínio de cocos (0,5 µm – 1,5 µm)	Aqüífero contaminado – gasolina
Harms <i>et al.</i> (1999) Wilkes <i>et al.</i> (2000)	Tolueno o-xileno, tolueno m-xileno, tolueno	<i>Desulfobacterium</i> <i>cetonicum</i> Linhagem oXyS1 Linhagem mXyS1	Bacilos (0,8 - 1,0 µm x 2,5 - 4,0 µm) Bacilos (0,6 - 1,0 µm x 1,0 - 2,0 µm)	Cultura enriquecida crescendo em óleo cru e água do mar
Meckenstock (1999)	Tolueno	Linhagem TRM1		Coluna com material de aquífero contaminado – BTEX
Condições de redução de Fe (III)				
Lovley & Phillips (1988) Lovley & Lonergan (1990)	Tolueno	<i>Geobacter</i> <i>metallireducens</i> GS-15	Bacilos (0,5 µm x 2,0-4,0 µm)	Sedimento de rio de água doce
Rooney-Varga <i>et al.</i> (1999)	Benzeno	Cultura enriquecida	<i>Geobacter</i> spp. <i>Geothrix fermentans</i> <i>Variovorax paradoxus</i>	Aquífero contaminado - petróleo

Solventes orgânicos, tais como BTEX, são tóxicos aos organismos devido ao acúmulo nas células alterando a permeabilidade específica da membrana celular, deixando vazar macromoléculas tais como RNA, fosfolipídios ou proteínas; diminuindo o estado energético da célula devido à inibição parcial da atividade da ATPase; afetando a função das proteínas presentes na membrana celular; e sua fluidez. Aumento na fluidez da membrana celular resulta em mudanças na estabilidade, na estrutura e nas interações dentro da membrana. Assim, uma vez nas membranas, afetará suas funções como barreira, manancial de enzimas e transdutor de energia. Apesar dos solventes orgânicos serem tóxicos aos organismos vivos devido ao acúmulo e rompimento da membrana celular, mais e mais microrganismos têm sido encontrados sobreviventes e adaptados a essas condições adversas. A combinação de diferentes mecanismos contribui para a tolerância ao solvente: alterações nas composições das membranas citoplasmática e externa, suprimindo os efeitos dos solventes na estabilidade das membranas e limitando velocidades de difusão através dela; mudanças na velocidade de biosíntese de fosfolipídios, acelerando processos de reparo; transformações ou degradações de solventes e excreções do solvente da célula (Isken & Bont, 1998).

Bactérias desnitrificantes degradadoras de tolueno linhagem K172, T, S100 e S2 toleraram aproximadamente 92,1 mg/L de tolueno (Altschmidt & Fuchs, 1991 e Schocher *et al.*, 1991). A linhagem T1 tolerou concentrações tão altas quanto 276,4 mg/L (Evans *et al.*, 1991b) e a linhagem Tol-4 tolerou 49,7 mg/L (Chee-Sanford *et al.*, 1996). Tolueno foi tóxico em concentrações acima de 46,0 mg/L para *Desulfobacula toluolica* Tol-2 (Rabus *et al.*, 1993). Redutora de Fe (III), cresceu em tolueno em concentrações de 921,4 mg/L (Lovley & Lonergan, 1990).

Em consórcio metanogênico, a completa degradação de compostos aromáticos pode ser limitada pela inibição da metanogênese exercida por esses compostos. Informações sobre a manifestação de efeito tóxico devem ser levantadas com a finalidade de avaliar se os organismos degradadores primários são inibidos, resultando em menos substrato disponível para metanogênese, ou se as arqueas metanogênicas são afetadas. Sierra-Alvarez & Lettinga (1991) avaliaram o efeito da estrutura aromática na inibição da metanogênese acetoclástica utilizando lodo granular metanogênico. O efeito inibitório na atividade das bactérias metanogênicas acetoclásticas foi avaliado pelo IC_{50} e IC_{80} , definidos como as concentrações de composto que causam inibições de 50 % e de 80 % da atividade metanogênica, respectivamente. A Tabela 3.11 apresenta esses valores para BTEX.

Tabela 3.11: Concentrações inibitórias (IC) de 50 % e 80 % de compostos aromáticos observadas na metanogênese acetoclástica.

Composto	IC ₅₀ (mg/L)	IC ₈₀ (mg/L)
Benzeno	1477,1	1799,6
Tolueno	622,9	750,0
Etilbenzeno	525,5	599,8
o-xileno	449,0	534,0

Fonte: Sierra-Alvarez & Lettinga (1991)

Substituintes do anel foram considerados fatores importantes na determinação da inibição causada por compostos aromáticos. A toxicidade de benzenos monossustituídos aumentou na seguinte ordem: COOH < SO₃H < H < OH < CH₃ < CHO < OCH₃ < Cl. Em geral, a toxicidade de compostos aromáticos aumentou com o aumento do número e o comprimento de substituintes alquila, bem como com o aumento do número de átomos de cloro no composto aromático. Essas relações entre toxicidade e estrutura não são exclusivas de metanogênicas acetoclásticas, com resultados similares na literatura para ampla faixa de organismos (Sierra-Alvarez & Lettinga, 1991). Battersby & Wilson (1989) estudando o potencial de degradação de 77 compostos químicos em lodo de digestor anaeróbio, sob condições metanogênicas, observaram que substituintes hidroxila ou carboxila em núcleos aromáticos facilitam a biodegradação, enquanto grupos cloro e nitro tendem a ser inibitórios.

Späth *et al.* (1998) examinaram sítios de sorções de BTX em biofilme e encontraram mais de 60 % nas substâncias poliméricas extracelulares que são constituídas principalmente de polissacarídeos, proteínas, ácidos urônico e húmico, DNA e fragmentos celulares; o restante foi sorvido na parede celular, membrana citoplasmática ou no citoplasma. Como substâncias poliméricas extracelulares podem ser vistas como um tipo de hidrogel (96 % – 98 % água), o teor encontrado no biofilme foi surpreendente, devido ao caráter lipofílico de BTEX. Tais mecanismos de ligação podem ser devidos a partes apolares das proteínas ou formação de áreas hidrofóbicas na presença de polissacarídeos. Por várias razões, maior resistência a tóxicos é encontrada em biofilmes quando comparados a células suspensas: microrganismos imobilizados e suspensos apresentam diferenças fisiológicas; o aumento da concentração de nutrientes no biofilme ajuda os microrganismos a sobreviverem em concentrações maiores de compostos tóxicos, e o efeito protetor da matriz extracelular, atuando como barreira difusiva e reduzindo a concentração de tóxico no biofilme (Cohen, 2001).

3.9 Técnicas de enriquecimento para análise de BTEX

Várias técnicas de enriquecimento de compostos, baseadas em princípios físico-químicos, estão disponíveis, entre elas, extrações líquido-líquido e gás-líquido, microextração na fase sólida, extração por membrana, técnicas de destilação e injeção direta (Kurán & Soják, 1996). Sempre que possível, há uma tendência de evitar-se extração com solvente para amostras aquosas contendo compostos orgânicos voláteis. Assim, a técnica preferida em grande parte da Europa é o headspace estático, enquanto “Purge and Trap” domina nos Estados Unidos (Voice & Kolb, 1994).

Uma amostra de headspace é, em princípio, uma amostra volatilizável que esteve previamente em contato com meio líquido ou sólido, do qual compostos voláteis foram liberados para a fase de vapor, para posterior análise através de cromatografia (Kolb, 1999). Como o procedimento da extração gasosa substitui a extração por solvente, evita problemas com solventes e interferentes em potencial. Compostos com até 40 átomos de carbono podem ser extraídos e analisados utilizando-se extração gasosa (Kurán & Soják, 1996). Dois modos de extração gasosa podem ser realizados: headspace estático, quando a amostra entra em equilíbrio com vapor, a uma temperatura definida ou headspace dinâmico (geralmente referido como “Purge and Trap”), quando é feita usando gás inerte para retirar os componentes voláteis da amostra.

Essa técnica tem várias vantagens: não é muito cara, não requer instrumentação complicada, pode ser automatizada e as sensibilidades para BTEX são aumentadas se comparadas com técnicas de injeção direta. Headspace estático, de menor sensibilidade que headspace dinâmico, é adequado para análises de amostras com teores maiores de voláteis, tais como águas residuárias (Kurán & Soják, 1996).

Headspace estático é o caso mais simples de análise por headspace e consiste do seguinte procedimento: a amostra, com volume V_L e concentração da substância analisada C_L^0 , é colocada em um frasco de capacidade fixa, de volume V . O frasco é fechado, lacrado e aquecido a uma temperatura constante, até que se estabeleça o equilíbrio para a substância entre as fases líquida e de vapor. No equilíbrio, as concentrações no líquido e no vapor são C_L e C_G , respectivamente ($C_L < C_L^0$). Desse modo, o headspace estático pode ser considerado como uma extração de um único estágio, que ocorre pela vaporização de solvente e solutos, a partir de uma solução (Ioffe & Vitenberg, 1984).

A quantidade de substância extraída da solução por meio da fase de vapor depende da relação entre os volumes das fases e do valor do coeficiente de distribuição. O coeficiente

de distribuição é definido como a razão entre as concentrações do composto na fase líquida e fase gasosa.

Esse método é adequado para substâncias voláteis, porém seu uso para análise de substâncias instáveis termicamente ou facilmente oxidáveis deve ser cuidadosamente considerado.

A sensibilidade da análise pode ser aumentada diminuindo-se os valores dos coeficientes de distribuição das substâncias analisadas, através do aumento de temperatura, durante o estabelecimento do equilíbrio, da redução da solubilidade das substâncias analisadas ou convertendo-as em compostos mais voláteis e menos solúveis. A sensibilidade da análise também pode ser melhorada consideravelmente, aumentando-se o volume de vapor introduzido na coluna cromatográfica.

O fator limitante no aumento de temperatura é a complexidade experimental de conduzir análises a temperaturas acima de 80°C - 100°C. A detecção de substâncias orgânicas em solventes suficientemente voláteis (álcool, ácido acético, dimetilformamida), em que um considerável aumento na temperatura durante o estabelecimento de equilíbrio seria indesejável, pois poderia levar a um aumento acentuado para fase de vapor, da concentração do solvente, resultando em um pico largo no cromatograma, que poderia sobrepor-se aos picos das substâncias analisadas. Nesse caso, melhores resultados seriam obtidos diluindo-se a solução em água. Dessa forma, a sensibilidade de substâncias menos solúveis em água apresentariam um considerável aumento.

A sensibilidade da análise aumenta com o decréscimo da solubilidade da substância em água. A introdução de sais minerais na solução pode diminuir o coeficiente de distribuição e também aumentar a sensibilidade da análise.

Um método promissor de aumento da sensibilidade da análise é a conversão dos compostos em derivados mais voláteis e menos solúveis. Esse método é aplicável à determinação de compostos reativos, caracterizados por elevados coeficientes de distribuição, incluindo ácidos orgânicos e álcoois em solução aquosa. Por exemplo, ácidos orgânicos reagindo com dimetilsulfato são convertidos a ésteres metílicos, diminuindo o limite mínimo detectável.

Um problema peculiar do headspace estático é a pressão interna no frasco, gerado pela soma das pressões parciais dos vapores dos constituintes voláteis da amostra, do qual, em geral, a umidade é predominante.

A amostragem feita com seringa especial para gases, "gas tight", seguida pela introdução da amostra na câmara de vaporização do cromatógrafo é a mais simples e comum (Ioffe & Vitenberg, 1984).

Voice & Kolb (1994) apresentaram alguns resultados preliminares dos efeitos do tempo e temperatura de equilíbrio na análise de headspace estático de vários compostos em amostras aquosas, entre eles, benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno e p-xileno. As temperaturas estudadas variaram entre 60°C a 90°C e os tempos de equilíbrio variaram de 10 minutos a 60 minutos. Menores tempos de equilíbrio, por exemplo, 10 minutos, podem ser um problema para grandes volumes de amostras, que poderiam ser remediados, por agitação. Pequenas perdas de cloreto de metileno foram observadas a 90°C, sugerindo que temperaturas menores devem ser consideradas para compostos altamente voláteis ou instáveis. A sensibilidade pode ser melhorada aumentando-se o volume da amostra e adicionando-se sal para produzir o efeito “salting-out”. Porém a adição de sal reduz a recuperação de amostras contendo elevados teores de carbono orgânico pois pode formar um precipitado com materiais húmicos, que constituir-se-á em uma terceira fase no sistema, competindo pelo composto e reduzindo as quantidades nas outras duas fases. Os autores estudaram a recuperação de compostos de diferentes matrizes, incluindo água destilada e concluíram que é razoável preparar amostras em matriz aquosa e esperar resultados acurados para a maioria das diferentes soluções.

Ketola *et al.* (1997) compararam as características analíticas de três métodos: membrana de passagem/espectrometria de massas (MIMS), “Purge and Trap”/espectrometria de massas (P&T) e headspace estático/cromatografia gasosa (HSCG) de BTX em amostras aquosas. Nas condições estudadas, os métodos MIMS e P&T apresentaram os menores limites de detecção (0,10 µg/L por MIMS e 0,20 µg/L por P&T) porém com faixas dinâmicas lineares de 4 ordens de magnitude (0,10µg/L - 1000µg/L para benzeno, 0,30µg/L - 1000µg/L para tolueno, 0,10µg/L - 5000 µg/L para xilenos) usando MIMS e duas ordens de magnitude (0,20µg/L - 20 µg/L para benzeno e 0,2 - 15 µg/L para tolueno e xilenos) usando o método P&T. O limite de detecção por HSCG foi maior (3,0 µg/L para tolueno, 4,0 µg/L para benzeno e xilenos) mas a faixa dinâmica linear muito mais ampla (3,0 µg/L - 380.000 µg/L para tolueno e 4,0 µg/L - 100.000 µg/L para benzeno e xilenos). A razão para isto é que os métodos MIMS e P&T permitem concentração dos compostos muito efetivamente, por membrana ou “trap” adsorvente, respectivamente, etapa de concentração que não ocorre no HSCG e as concentrações dos compostos detectados são determinados pelos coeficientes da lei de Henry, na temperatura medida. A reprodutibilidade, como coeficiente de variação, dos três métodos foi da mesma ordem de magnitude, na faixa de 1 % a 13 %.

Menéndez *et al.* (2000) realizaram estudo comparativo de determinações de BTEX em amostras aquosas utilizando três técnicas de amostragem antes da detecção final por

cromatografia gasosa. Headspace estático (HS), microextração em fase sólida (SPME) e headspace estático / microextração na fase sólida combinados, (HS/SPME) usando fibra de polidimetilsiloxano. Os parâmetros experimentais ótimos para análises de headspace estático foram temperatura de extração de 70°C, em 25 minutos e não foi adicionado cloreto de sódio pois a saturação da amostra levou a resultados ligeiramente melhores para benzeno, mas não favoreceu os demais compostos. Os autores concluíram que as três técnicas forneceram resultados acurados com limites de detecção na faixa de \leq ng/mL, contudo HS/SPME alcançou limites de detecção mais baixos com menor tempo de análise, 0,6 ng/mL para benzeno, 0,2 ng/mL para tolueno e 0,08 ng/mL para etilbenzeno e xilenos; SPME 1 ng/mL para benzeno, 0,3 ng/mL para tolueno e 0,2 ng/mL para etilbenzeno e xilenos; HS 1 ng/mL para benzeno e tolueno e 2 ng/mL para etilbenzeno e xilenos.

3.10 Considerações finais

A maior parte dos estudos conhecidos sobre degradação anaeróbia de BTEX refere-se a trabalhos em microcosmos, colunas contendo material de aquífero ou culturas enriquecidas como fonte de biomassa bem como estudos *in situ*, visando a bioremediação intrínseca. Estudos realizados em microcosmos diferem completamente dos realizados em bioreatores devido às características da biomassa suspensa, da transferência de massa e da hidrodinâmica do sistema, podendo levar a resultados completamente diferentes.

A literatura mostra escassez de dados sobre degradação anaeróbia de BTEX em bioreatores. Dessa forma, este trabalho pretende verificar a possibilidade de degradação anaeróbia de BTEX, utilizando-se reator de leito fixo com biomassa imobilizada desenvolvido na EESC-USP, com potencial comprovado de degradação de compostos considerados tóxicos como pentaclorofenol (Damianovic, 1997), fenol (Bolaños, 2001) e formaldeído (Oliveira, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fases do experimento

O trabalho, realizado em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), de bancada, foi dividido em três etapas:

Na primeira, foram avaliadas degradações de BTEX presentes em água residuária sintética enriquecida. A influência da adição de nitrato e sulfato, como aceptores de elétrons na degradação anaeróbia foi também avaliada. Dessa forma, três reatores com 26,0 cm de comprimento e 2,6 cm de diâmetro foram operados, sendo um reator alimentado somente com água residuária sintética e BTEX (reator controle - condições fermentativa e metanogênica) e as alimentações dos outros dois reatores foram diferenciadas pela adição de nitrato ou sulfato. Após adição de BTEX, esta etapa foi dividida em duas fases, a primeira, utilizando etanol como co-solvente e a segunda, utilizando detergente comercial.

A segunda etapa consistiu na operação de dois reatores em escala maior (100 cm de comprimento e 5,04 cm de diâmetro), sob condições fermentativa e metanogênica, utilizando-se água residuária sintética e solução etanólica de BTEX em um reator e água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial em outro. O objetivo desta etapa foi obter parâmetros cinéticos de degradação de BTEX.

Na terceira etapa, o reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX, da segunda etapa, foi operado com adição de BTEX solubilizado em etanol como únicas fontes de carbono para o consórcio fermentativo metanogênico. O objetivo desta etapa foi enquadrar o trabalho na área de bioremediação.

A Figura 4.1 apresenta o fluxograma das etapas do experimento.

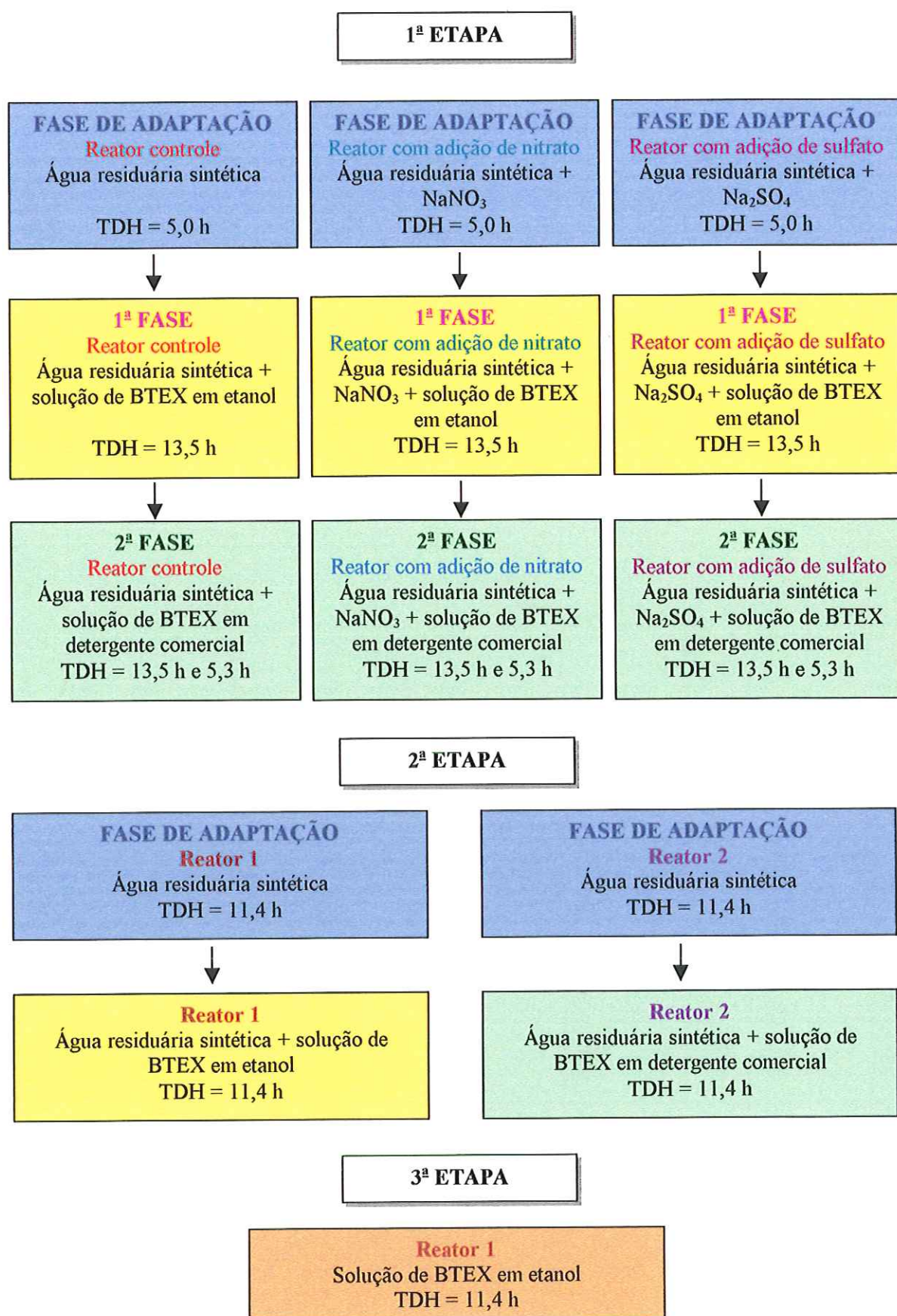


Figura 4.1: Fluxograma das etapas do experimento.

4.2 Descrição dos Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo (RAHLF)

Na 1ª etapa, os ensaios foram realizados em três reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), de bancada, com 26,0 cm de comprimento e 2,6 cm de diâmetro (L/D 10) e volume total de 138,0 mL. O leito apresentou 40 % de porosidade, resultando em volume líquido de 55,2 mL.

Nas etapas seguintes, os ensaios foram realizados em dois RAHLF, de bancada, confeccionados em vidro boro silicato, com 100 cm de comprimento e 5,04 cm de diâmetro (L/D 20), volume total de 1995,0 mL e volume líquido de 798,0 mL. Bolsa de gás contendo gás nitrogênio acoplada ao reservatório de afluente foi utilizada para evitar contato da água residuária com o ambiente. A captação do gás gerado foi feita na parte superior, com uma mangueira acoplada externamente, ao longo do comprimento do reator. Amostradores intermediários ao longo do comprimento do reator foram alocados em posições correspondentes a L/D de 4, 8, 12 e 16.

A Figura 4.2 apresenta o esquema da instalação experimental, incluindo o RAHLF. Todos os ensaios foram realizados dentro de uma câmara termocontrolada, a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Os reatores foram alimentados através de bomba peristáltica marca Ismatec, modelo IPC-N-4-V2-03, ligada a “no-break”.

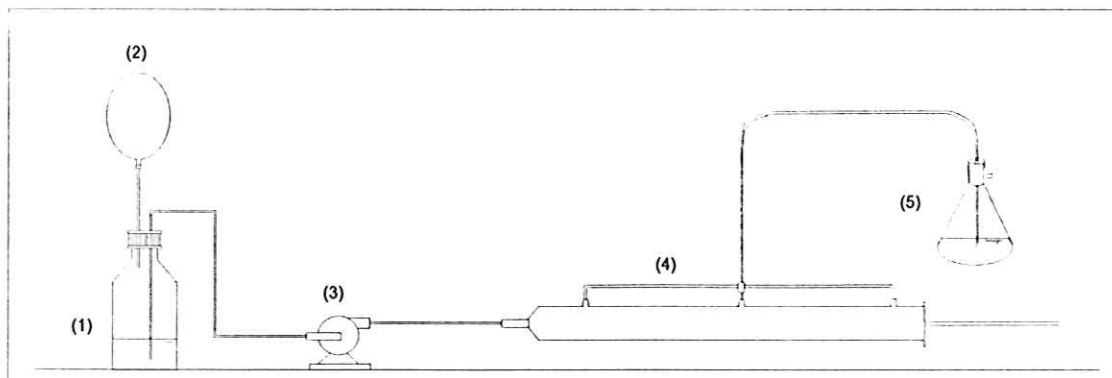


Figura 4.2: Esquema de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada. (1) Reservatório de afluente, (2) Bolsa de gás N_2 , (3) Bomba peristáltica, (4) Reator, (5) Saída de gás.

4.3 Suporte e imobilização do lodo anaeróbio

Como material de recheio dos reatores, foi utilizada espuma de poliuretano, com densidade de 23 Kg/m^3 e 95 % de porosidade, na forma de cubos com 5 mm de lado, cedida pela EDMIL Indústria e Comércio Ltda.

A biomassa foi obtida a partir de partes iguais de lodos provenientes de reatores anaeróbios tratando águas residuárias: de abatedouro de aves, de indústria de reciclagem de papel e de esgotos sanitários gerados nas cidades de São Carlos e de Piracicaba. As matrizes de espuma foram impregnadas com mistura dos lodos macerados (sólidos totais voláteis de 25 g/L) e deixadas em repouso por 24 horas, de acordo com metodologia estabelecida por Zaiat *et al.* (1994).

4.4 Composição da água residuária sintética

A composição básica da água residuária sintética utilizada nas 1^a e 2^a etapas está apresentada na Tabela 4.1. Essa composição, responsável por demanda química de oxigênio de aproximadamente 500 mg/L, foi desenvolvida por Torres (1992).

Tabela 4.1: Composição da água residuária sintética utilizada nas 1^a e 2^a etapas.

	Constituinte	Concentração
Proteínas	Extrato de carne	208 mg/L
Carboidratos	Sacarose	36 mg/L
	Amido comercial ^a	112 mg/L
	Celulose	41 mg/L
Lipídios	Óleo de soja ^b	0,056 mL/L
Sais minerais	Cloreto de sódio (NaCl)	50 g/L
	Cloreto de magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	1,4 g/L
	Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,9 g/L
Bicarbonato de sódio		200 mg/L

^a dissolvido por fervura, até solução ficar incolor.

^b emulsionado em 3 gotas de detergente.

Foram utilizados dois tipos de extrato de carne ao longo do trabalho: concentrado e liofilizado. Alíquotas de solução estoque de extrato concentrado foram mantidas congeladas para a preparação diária do meio. Os sais minerais foram mantidos em solução estoque. Óleo de soja só foi utilizado na fase de adaptação, antes da adição de BTEX.

Na terceira etapa, foi utilizado substrato composto de sais minerais, de acordo com Del Nery (1987), apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Composição da água residuária sintética utilizada na 3ª etapa.

Composto	Concentração após diluição (mg/L)
Sulfato de níquel	0,5
Sulfato ferroso	2,5
Cloreto férrico	0,25
Cloreto de cálcio	23,5
Cloreto de cobalto	0,04
Óxido de selênio	0,035
Fosfato de potássio monobásico	42,5
Fosfato de potássio dibásico	10,85
Fosfato de sódio dibásico	16,7
Bicarbonato de sódio	1000,0
Uréia	62,5

A água residuária sintética, utilizada nessa etapa, foi preparada pela diluição de duas soluções concentradas, uma contendo sulfatos, cloretos e óxido de selênio e outra, fosfatos. Alíquotas retiradas das soluções estoque foram adicionadas em água não destilada. Bicarbonato de sódio e uréia foram adicionados na forma sólida.

As concentrações de BTEX variaram de 1,5 mg/L a 20,0 mg/L de cada composto e suas solubilidades no substrato foram melhoradas, através de etanol ou detergente comercial.

A solução estoque de BTEX em etanol na concentração de 20 g/L de cada composto foi mantida em freezer. Alíquotas dessa solução foram adicionadas em tubo de 10 mL com fechamento hermético, contendo pequeno volume de água residuária sintética. A solução foi agitada por 2 minutos em agitador de tubos vortex e então transferida para reservatório de afluyente contendo água residuária sintética preparada, seguida de vigorosa agitação.

A solução preparada pela mistura de volumes iguais de: benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno também foi mantida em freezer. Alíquotas da solução de BTEX eram adicionadas em tubo de 10 mL, com fechamento hermético, contendo 0,80 mL/L (0,70 g/L) de detergente comercial líquido para lava-louças da marca Ypê clear. A solução foi agitada por 1 minuto em agitador de tubos vortex. Água residuária sintética foi adicionada preenchendo quase completamente o tubo sendo agitado por mais 1 minuto. Em seguida a solução foi transferida para reservatório de afluyente contendo o restante da água residuária sintética, seguida de vigorosa agitação.

A água residuária sintética foi preparada diariamente, utilizando-se água de torneira.

4.5 Determinações analíticas durante a operação dos reatores

Na Tabela 4.3 são apresentados os parâmetros avaliados durante o período de operação dos reatores, a frequência das amostragens e os métodos utilizados. Foram

coletadas amostras afluente e efluente do reator, além dos pontos intermediários para avaliação do desempenho do tratamento ao longo do reator.

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), nitrato, nitrito, sulfato, sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) foram realizadas de acordo com métodos descritos em Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1995). Foram analisadas demanda química de oxigênio em amostras brutas (DQO_b) e filtradas (DQO_f) em membrana com poros de 1,2 µm.

Tabela 4.3: Freqüência e métodos analíticos dos parâmetros analisados.

Parâmetro	Local de coleta	Freqüência na semana	Método Analítico
DQO	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Espectrofotométrico
Alcalinidade	Afluente e efluente	2 vezes	Titulométrico
pH	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Potenciométrico
Temperatura	Termômetro da câmara	Diária	
Nitrato	Afluente e efluente	2 vezes	Espectrofotométrico
Nitrito	Afluente e efluente	2 vezes	Espectrofotométrico
Sulfato	Afluente e efluente	2 vezes	Espectrofotométrico
Composição do biogás	Mangueira de captação	2 a 3 vezes	Cromatográfico
Ácidos voláteis	Efluente	Variável*	Titulométrico
			Cromatográfico
BTEX	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Cromatográfico

*diária, durante a sobrecarga orgânica.

4.5.1 Ácidos voláteis por cromatografia gasosa

A determinação cromatográfica de ácidos voláteis foi realizada com metodologia desenvolvida no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo (Moraes *et al.*, 2000), utilizando-se ácido crotônico como padrão interno em meio ácido (ácido sulfúrico) e extração com éter dietílico.

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

Cromatógrafo a gás: HP 6890

Coluna capilar: HP INNOWAX - 30 m (diâmetro interno 0,25 mm e espessura de filme 0,25 µm)

Temperatura do injetor: 250°C

Temperatura do detector: 300°C

Programação de temperatura da coluna:

Temperatura inicial: 100°C (3 min)

Taxa de aquecimento: 5°C / min

Temperatura final: 180°C (5 min)

Razão de split: 20

H₂ para alimentar a chama: 30 mL/min

Vazão do ar sintético: 300 mL/min

Vazão do gás de make up (N₂): 33 mL/min

Detector: ionização de chama

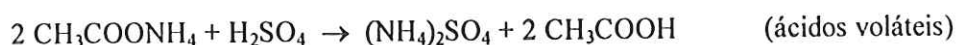
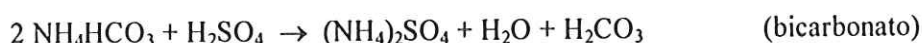
Volume de amostra: 1,0 µL

4.5.2 Alcalinidade e ácidos voláteis por titulometria

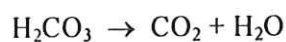
As análises de alcalinidade (AB) foram feitas segundo metodologia descrita por Ripley *et al.* (1986). A amostra filtrada em membrana com poros de 1,2 µm foi titulada com solução padronizada de ácido sulfúrico até pH 5,75 (alcalinidade parcial devido ao bicarbonato) e pH 4,3 (alcalinidade intermediária devido aos ácidos voláteis).

Ácidos voláteis totais (AVT), como ácido acético (Hac), foram analisados de acordo com metodologia proposta por Dillalo & Albertson (1961). Após realizar análise de alcalinidade, o pH da amostra de 4,3 foi abaixado até 3,3 com ácido sulfúrico. A amostra foi fervida por 3 minutos para remover ácido carbônico como CO₂ (interferente) e então titulada, com solução padronizada de hidróxido de sódio, de pH 4,0 até 7,0. As seguintes reações descrevem as etapas envolvidas. O principal cátion considerado foi o amônio.

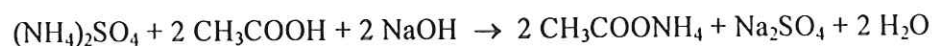
- Titulação do pH original até 4,3 (alcalinidade total)



- Fervura por 3 minutos em pH 3,3 (remover ácido carbônico)



- Titulação do pH 4,0 até 7,0



4.5.3 Composição do biogás

A composição do biogás foi determinada em cromatógrafo a gás, marca Gow-Mac série 150, acoplado a integrador HP 3396 série II. A coluna utilizada foi Porapak-Q (comprimento de 2 metros e diâmetro interno de ¼" – 80 a 100 mesh), detector de condutividade térmica. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio super seco (White Martins).

As condições de operação do aparelho foram: vazão do gás de arraste 1 mL/s, temperatura do detector, coluna e injetor 55°C, corrente 150 mA, volume de injeção 500,0 µL.

4.5.4 BTEX por cromatografia gasosa

Para determinação das concentrações de BTEX, em amostras ambientais, foi adaptada e validada metodologia por cromatografia gasosa utilizando a técnica de enriquecimento por “headspace” estático, que consiste na análise da fase de vapor em equilíbrio com a amostra líquida. A informação química contida na fase de vapor é usada para determinar a natureza e a composição da fase condensada com a qual está em equilíbrio dinâmico. Desse modo, o “headspace” estático pode ser considerado como uma extração através de um único estágio, que ocorre pela vaporização da substância analisada a partir de uma solução (Gobato, 1995).

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

Cromatógrafo a gás: HP 6890

Coluna capilar: HP1-30 m (diâmetro interno 0,53 mm e espessura de filme 2,65 µm)

Temperatura do injetor: 250°C

Temperatura do detector: 300°C

Programação de temperatura da coluna:

Temperatura inicial: 70°C (3 min)

Taxa de aquecimento: 4°C / min

Temperatura final: 110°C (3 min)

Razão de split: 40

H₂ para alimentar a chama: 30 mL/min

Vazão do ar sintético: 300 mL/min

Vazão do gás de make up (N₂): 30,8 mL/min

Detector: ionização de chama

Volume de amostra: 300,0 µL

Substâncias e solventes

Foram utilizadas as seguintes substâncias:

Benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno, grau P.A. – Merck.

Foram utilizados como solventes: metanol (grau P.A. – Merck) e lauril éter sulfato de sódio (grau técnico). Metanol foi utilizado na preparação de solução intermediária dos

padrões nas curvas de baixas concentrações e nos testes de recuperação. Lauril éter sulfato de sódio foi utilizado para solubilizar BTEX em meio aquoso.

Verificação dos tempos de retenção dos compostos

Inicialmente foram injetados, no cromatógrafo, o headspace de frascos contendo, cada um dos compostos usados, para determinar-se seus tempos de retenção. A Tabela 4.4 apresenta os tempos de retenção aproximados.

Tabela 4.4: Tempos de retenção aproximados dos BTEX.

Composto	Tempo de retenção (minutos)
Benzeno	3,6
Tolueno	5,8
Etilbenzeno	8,7
(m+p)-xileno	9,0
o-xileno	9,7

Os isômeros m-xileno e p-xileno não foram separados na coluna cromatográfica utilizada. A Tabela 4.5 apresenta resultados de análises de soluções individuais de m-xileno e p-xileno e solução (m+p)-xileno, nas concentrações de 10 mg/L de cada composto, em água residuária sintética, utilizando-se detergente comercial como solubilizador e clorobenzeno como padrão interno.

Tabela 4.5: Resultados cromatográficos com soluções de m-xileno e de p-xileno e com solução de m-xileno e p-xileno, na concentração de 10 mg/L.

Solução	Tempo de retenção (minutos)	Área do composto	Área do padrão interno	Fator de resposta
m-xileno	9,0	75447	119903	0,6292
p-xileno	9,0	101902	193908	0,5255
(m+p)-xileno	9,0	337125	278706	1,2096

Fator de resposta = área do composto / área do padrão interno.

Como o fator de resposta foi o dobro na solução de (m+p)-xileno que nas soluções de m-xileno e de p-xileno, as curvas analíticas foram elaboradas considerando-se o dobro da concentração em cada ponto.

Escolha do padrão interno

Dentre os vários procedimentos utilizados para quantificação em cromatografia, optou-se pela padronização interna, que consiste em adicionar-se quantidades idênticas e conhecidas de uma substância escolhida em padrões e amostras, a serem analisados, e relacionar as áreas cromatográficas dos compostos com a do padrão interno. A substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada (concentração e tempo de retenção próximos), ser inerte, não fazer parte da amostra e, quando injetada na coluna cromatográfica, apresentar pico perfeitamente distinto das demais substâncias presentes na amostra.

O método consiste na preparação de soluções padrão, às quais adiciona-se uma quantidade conhecida de padrão interno. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico (curva de calibração), relacionando a razão de áreas (área do composto a ser quantificado / área do padrão interno) com a concentração do composto. A amostra também é analisada após adição da mesma quantidade de padrão interno. Através da razão de áreas obtidas do cromatograma obtém-se a concentração da substância na amostra com a equação da curva.

Este método é extremamente útil, especialmente pelo fato de ser menos sensível a erros de injeção, variações instrumentais (temperatura da coluna, fluxo de gás de arraste) e tamanho da amostra (Collins *et al.*, 1997).

Foram testadas várias substâncias na tentativa de encontrar-se uma substância com tempo de retenção em torno de 7,0 minutos (média dos tempos de retenção dos compostos) para ser usada como padrão interno. Da mesma forma, foram injetados headspace dos frascos contendo essas substâncias puras. A Tabela 4.6 apresenta as substâncias testadas e seus respectivos tempos de retenção na coluna cromatográfica.

Tabela 4.6: Tempo de retenção de várias substâncias para escolha do padrão interno.

Substância	Tempo de retenção (min)	Substância	Tempo de retenção (min)
Ácido n-butírico	5,7	Álcool iso-propílico	2,0
Ácido capróico	12,6	Clorobenzeno	8,1
Ácido propiônico	2,0	Fenol	12,3
Ácido valérico	8,3	Monoclorofenol	13,1

A partir dos resultados obtidos optou-se pela escolha de clorobenzeno como padrão interno, com tempo de retenção de 8,1 minutos. Foi preparada solução de clorobenzeno (grau pesticida – Merck) em metanol, na concentração de 200 µg/mL.

Efeito do tempo de aquecimento

O tempo de aquecimento da amostra, para extração gasosa por headspace estático de BTEX, foi determinado aquecendo a amostra em banho de água a 100°C, de 5 a 30 minutos.

Influência da força iônica

A adição de compostos iônicos solúveis em amostras tem sido usada em muitos trabalhos para alterar o coeficiente de partição, aumentar a quantidade do composto na fase de vapor e, conseqüentemente, a sensibilidade da análise. Na análise de BTEX foram testadas amostras puras e contendo cloreto de sódio ou sulfato de sódio.

Técnica de enriquecimento por headspace estático e cromatografia gasosa

Em frascos de antibiótico de 17,0 mL, adicionou-se padrões e solução de clorobenzeno (usado como padrão interno). Imediatamente, os frascos eram tampados com tampas de butil e lacrados com alumínio. As tampas de butil eram novas e usadas uma única vez. Então o frasco era aquecido em banho de água em ebulição, durante 15 minutos. Foram realizadas análises em dois conjuntos de padrões, que permitiram as quantificações de BTEX na entrada e na saída dos reatores. Para padrões mais diluídos, foram utilizados 10,0 mL de amostra e 40,0 µL de solução de clorobenzeno e para padrões mais concentrados, 2,0 mL de amostra e 200,0 µL de solução de clorobenzeno. Os volumes dos frascos de antibiótico foram padronizados através da adição de diferentes massas de pérolas de vidro. Massas dos frascos vazios e cheios com água destilada foram medidas para determinar-se o volume de cada um. As diferenças entre eles foram anuladas pela adição de pérolas de vidro.

Através da técnica de headspace estático, a introdução direta da fase de vapor no cromatógrafo pode ser realizada por vários métodos. A transferência mais simples e utilizada neste trabalho foi realizada com uma seringa especial para gases (“gas tight”) seguida pela introdução da amostra vaporizada na câmara de vaporização do cromatógrafo. A temperatura da seringa deve ser igual ou maior do que a do vapor, caso contrário o solvente pode condensar-se e provocar perdas dos compostos. Alíquotas de 300,0 µL da fase vaporizada foram injetadas no cromatógrafo através de seringa de 1000,0 µL, “gas-tight”, aquecida em estufa a 100°C, por 15 minutos.

Levantamento de gráficos de calibração, determinações de limites de detecção e reprodutibilidade

Foram estudadas duas faixas de concentrações: 5,0 µg/L a 1000,0 µg/L, em triplicata, 1,0 mg/L a 40 mg/L, em sextuplicata. Calibrações foram realizadas a cada 15 dias, com os pontos em duplicata. A preparação de soluções padrão de BTEX de 1,0 mg/L a 40,0 mg/L, foi iniciada em tubos de 10 mL com fechamento hermético, adicionando-se alíquotas de solução de BTEX em pequeno volume de água residuária sintética, 10 gotas de lauril éter sulfato de sódio, e agitando-se por 2 minutos em agitador de tubos vortex. A solução foi transferida para balão volumétrico e o volume completado com água residuária sintética. Para concentrações de 5,0 µg/L a 1000,0 µg/L alíquotas de solução de BTEX em metanol foram diluídas com água residuária sintética e 3 gotas de lauril éter sulfato de sódio, agitando-se por 1 minuto, segundo o procedimento descrito anteriormente.

Foi utilizado lauril éter sulfato de sódio para garantir solubilização completa. Inicialmente, foram testados detergente comercial e extran Merck mas foram descartados por conterem benzeno, detectado em testes cromatográficos.

Análise de regressão linear por mínimos quadrados foi utilizada para obtenção das equações das retas:

$$y = m \cdot x + b \quad (4.1)$$

Nessa expressão: y é a razão entre as áreas cromatográficas do composto e do padrão interno, x é a concentração de BTEX, m é a inclinação e b é a interseção.

O limite de detecção foi primeiramente estabelecido através de diluições progressivas de solução de BTEX, em triplicata. Depois de construídas as curvas analíticas, o limite de detecção (LD), para cada composto, foi calculado de acordo com a expressão 4.2.

$$LD = \frac{(3 \cdot SE_b + b)}{m} \quad (4.2)$$

Nessa expressão: SE_b é o erro padrão do intercepto (Fustinoni *et al.*, 1999).

A reprodutibilidade das análises foi avaliada pelo coeficiente de variação (C.V.), definido como o quociente entre desvio-padrão e média, expresso em porcentagem. É um

parâmetro vantajoso por caracterizar a dispersão dos dados em termos relativos a seu valor médio; assim, uma pequena dispersão absoluta pode, na verdade, ser considerável, quando comparada com a ordem de grandeza dos valores da variável, e vice-versa (Costa Neto, 1977). A reprodutibilidade das análises foi estimada por réplicas (seis para cada concentração) de amostras contendo BTEX nas concentrações de 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 20,0 mg/L, 30,0 mg/L e 40,0 mg/L de cada substância.

Teste de recuperações de BTEX da água residuária sintética

Para estimar-se a eficiência da extração, a injeção direta da amostra líquida no cromatógrafo não foi possível, pois o volume injetado de 300,0 µL de amostra vaporizada excedeu o volume utilizado de 1,0 µL para amostra líquida. Desse modo, foi considerado como referência à técnica, baseada no trabalho de Corrêa e Pedroso (1997) para quantificação de etanol em urina utilizando headspace estático, cuja recuperação foi verificada por comparação de amostras de urina contendo etanol com amostras aquosas de etanol. Para concentrações de 25,0 µg/L a 1000,0 µg/L, alíquotas da solução de BTEX em metanol foram colocadas em 10,0 mL de água destilada, obtendo-se as concentrações desejadas, em duplicata. Para concentrações de 5,0 mg/L a 40,0 mg/L, foram preparadas soluções padrões de BTEX em metanol, dez vezes mais concentradas. Nos frascos usados para preparação da amostra para análise foram adicionados 0,2 mL da solução de BTEX em metanol e completado o volume de amostra com 1,8 mL de água destilada, em triplicata.

As recuperações de BTEX em amostras de água residuária foram calculadas para diferentes concentrações, comparando-se os fatores de resposta dessas análises com os obtidos nas análises de solução aquosa de BTEX. Um valor de recuperação de 100 % foi atribuído a soluções aquosas.

4.6 Partida e operação dos reatores

Nos três reatores utilizados na 1ª etapa, primeiramente, adaptou-se a biomassa à água residuária sintética (Tabela 4.1), com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 5,0 horas, com o objetivo de promover-se adesão e desenvolvimento adequado do biofilme no suporte. Após 10 dias de operação, os parâmetros analisados no efluente apresentaram valores estabilizados, caracterizando a partida dos sistemas. Nos cinco meses posteriores, nitrato foi adicionado em um reator e sulfato em outro com relações DQO / NO₃⁻ e DQO / SO₄⁻ iguais a 5. O TDH foi aumentado para aproximadamente 13,5 horas e solução de BTEX foi

adicionada ao substrato sintético. Na 1ª fase, os reatores foram operados por 75 dias, recebendo solução etanólica de BTEX. Na 2ª fase, cuja duração foi de 72 dias, etanol foi substituído por detergente comercial. Durante essa fase, o TDH foi ajustado em 5,3 horas, a fim de verificar-se os limites do sistema. As relações DQO / NO_3^- e DQO / SO_4^{2-} foram sempre mantidas em 5. As condições experimentais foram alteradas, somente após os reatores apresentarem condições estáveis, indicando que os sistemas haviam atingindo o estado de equilíbrio dinâmico aparente, nas condições impostas.

Na 2ª etapa, após inoculação dos reatores, a biomassa presente foi adaptada à água residuária sintética (Tabela 4.1), com TDH de aproximadamente 11,4 horas. Da mesma forma, após 10 dias do início da operação, os sistemas atingiram o estado de equilíbrio dinâmico aparente. Os reatores foram operados por aproximadamente um mês, nessas condições, para obtenção dos perfis de DQO e ácidos voláteis. Durante dois meses, a alimentação de um dos reatores passou a ser acrescida de solução etanólica de BTEX, enquanto a do outro, com solução aquosa de detergente comercial e BTEX.

Na 3ª etapa do trabalho, cuja duração foi de aproximadamente 20 dias, a solução etanólica de BTEX foi, então, complementada com meio apresentado na Tabela 4.2.

4.7 Exames microbiológicos do lodo

Amostras do lodo coletadas ao final de cada etapa, retiradas do suporte através de compressões foram examinadas ao microscópio para avaliação da biomassa.

Foram realizados exames por microscopia ótica comum, de contraste de fase e de fluorescência, empregando-se microscópio Olympus modelo BH-2 (objetiva 100, ocular 10, zoom 1,25).

Para microscopia eletrônica de varredura, a biomassa aderida no suporte foi deixada por 12 horas em tampão fosfato (0,1M, pH 7,3), fixada com glutaraldeído e desidratada em concentrações crescentes de etanol em água. As amostras foram secas com hexametildisilazane e examinadas com microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM-960 (Nation, 1983 e Varesche *et al.*, 1997).

As amostras eram observadas sob microscopia, procurando-se percorrer o maior número de campos possíveis observando a predominância do tipo morfológico no campo.

4.8 Avaliação quantitativa de bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas nos reatores

Na 1ª etapa foi utilizado o método do número mais provável (NMP) adaptado de Vazoller (1995), para estimar-se o número de microrganismos presentes após a fase de adaptação e ao final da operação dos reatores.

Em frasco de antibiótico contendo 3 cubos de espuma impregnados de lodo, 10 mL de substrato e 5 g de pérolas de vidro, o sistema foi submetido a fluxo de nitrogênio livre de oxigênio (coluna de cobre aquecida) por 3 minutos e agitação manual por 20 minutos para desprendimento da biomassa do suporte. Alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para frascos de antibiótico lacrados e autoclavados contendo 9,0 mL de água residuária sintética. A partir dessa primeira diluição (10^{-1}), foi realizada a segunda, e assim sucessivamente, até 10^{-15} , sendo cada conjunto de diluição realizado em quintuplicata. As diluições foram feitas sob condições assépticas e utilizando-se seringa de insulina de 1,0 mL, renovada a cada frasco inoculado. Os frascos foram mantidos a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a leitura realizada após 30 dias. A quantificação de organismos anaeróbios foi realizada através de turbidez e de arqueas metanogênicas, através da produção de metano. Foram realizados também exames microscópicos de material colhido nas diluições. Para a determinação do valor do NMP foi utilizada a tabela de MAN, com limite de confiança de 95 %.

4.9 Avaliação da adsorção de BTEX no meio suporte e no lodo imobilizado

Testes de adsorção de BTEX no suporte foram realizados com a finalidade de verificar-se se a adsorção de BTEX no suporte poderia ser responsável por sua remoção da água residuária. Metodologia adaptada de Enkiri *et al.* (1995) foi utilizada para avaliar a capacidade de adsorção de BTEX na espuma de poliuretano e no lodo imobilizado.

Cubos de espuma contendo lodo foram retirados dos reatores durante a 1ª etapa do trabalho e secos em estufa por 21 horas, a $55,2^{\circ}\text{C}$. Em seguida, a biomassa foi inativada em radiação UV por 2 horas, como sugerido por Bolaños (2001).

Em frascos de antibiótico de 39 mL foram testados 0,133 g de espuma limpa (40 cubos de 5 mm de lado) e 0,284 g de espuma contendo biomassa imobilizada (40 cubos). Adicionou-se 5,0 mL de água destilada, com várias compressões e descompressões com bastão de vidro até que o ar retido nos cubos fosse removido. A água residuária sintética (Tabela 4.1, sem óleo de soja) contendo aproximadamente 25,0 mg/L de cada BTEX, solubilizados através de lauril éter sulfato de sódio, foi adicionada nos frascos até enchê-los

completamente, para que não ocorressem perdas por volatilização de BTEX durante o ensaio. Os frascos receberam tampas de teflon e foram lacrados, em duplicata. Testes em branco foram feitos com 5,0 mL de água destilada e água residuária sintética.

Os frascos foram mantidos a 30°C e agitados em shaker a 50 rpm. A adsorção foi determinada por análises cromatográficas de BTEX no meio líquido em conjuntos de frascos retirados do shaker em intervalos de tempo regulares, até alcançar o equilíbrio. A cada ponto amostrado, foi feita análise de um branco para verificar se perdas bióticas poderiam estar ocorrendo. Expressões hiperbólicas foram ajustadas aos perfis de adsorção dinâmicos, através de regressão não linear, usando o método de Levenberg-Marquardt, pelo aplicativo Microcal Origin 5.0[®]:

$$F_{sp} = F_{sp}^{\max} \left(\frac{t}{\tau + t} \right) \quad (4.3)$$

Nessa expressão, F_{sp} é a capacidade de adsorção e representa a quantidade de composto adsorvido na partícula ($M.L^{-3}$ composto / M partícula), t é o tempo (T). O parâmetro F_{sp}^{\max} indica o valor máximo de F_{sp} e τ representa o tempo necessário para adsorver metade da quantidade máxima.

4.10 Cinéticas de degradações de BTEX

As cinéticas de degradações de BTEX foram avaliadas nas 2^a e 3^a etapas, através de perfis de concentrações de BTEX ao longo do reator, após estabilidade do processo, para cada uma das concentrações de BTEX aplicadas.

Primeiramente, as coletas de amostras para o teste cinético, feitas ao longo do reator, foram realizadas na seqüência: ponto de saída (L/D 20), amostradores intermediários (L/D 16, 12, 8, 4) e ponto de entrada (L/D 0).

Para amostragem dos pontos intermediários do reator foi, também, utilizada metodologia desenvolvida por Oliveira (2001) eliminando-se possíveis amostras não representativas. Após coleta normal do efluente, foram descartados cerca de 30 mL de líquido em cada ponto intermediário, do final para o início do reator, secando-se o líquido em torno dos amostradores. Após aproximadamente 1,5 horas, ocorria o reinício do gotejamento do efluente. Novamente, coletava-se amostra, dessa vez, para análise, aguardando entre cada coleta, o reinício do gotejamento do efluente, que durava cerca de 15 minutos. As coletas foram feitas através de agulha longa especial, evitando a abertura dos

pontos de amostragem do reator. Foram realizadas análises cromatográficas de BTEX e de ácidos voláteis.

Através de análise de regressão não linear exponencial foi ajustado modelo cinético aparente de primeira ordem, com residual, usando o método de Levenberg-Marquardt, pelo aplicativo Microcal Origin 5.0[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de BTEX por headspace estático / cromatografia gasosa

Inicialmente, foram testadas as condições de extração gasosa por headspace estático de BTEX em amostras aquosas. Os parâmetros experimentais analisados foram tempo de aquecimento e influência da adição de sal. Estabelecidas as condições de análise, foram levantadas as curvas de calibração, os limites de detecção, a reprodutibilidade do método e a eficiência da extração.

5.1.1 Efeito do tempo de aquecimento

As áreas dos picos cromatográficos dos compostos (A) em relação a área do padrão interno (A_{pi}) no headspace de solução de BTEX em água residuária sintética, em relação ao tempo de aquecimento, são apresentadas na Figura 5.1. Pela análise da Figura 5.1, observa-se que o período de 15 minutos de aquecimento de soluções em banho de água em ebulição, escolhido para este trabalho, contempla o estabelecimento do equilíbrio dinâmico entre as fases líquida e de vapor.

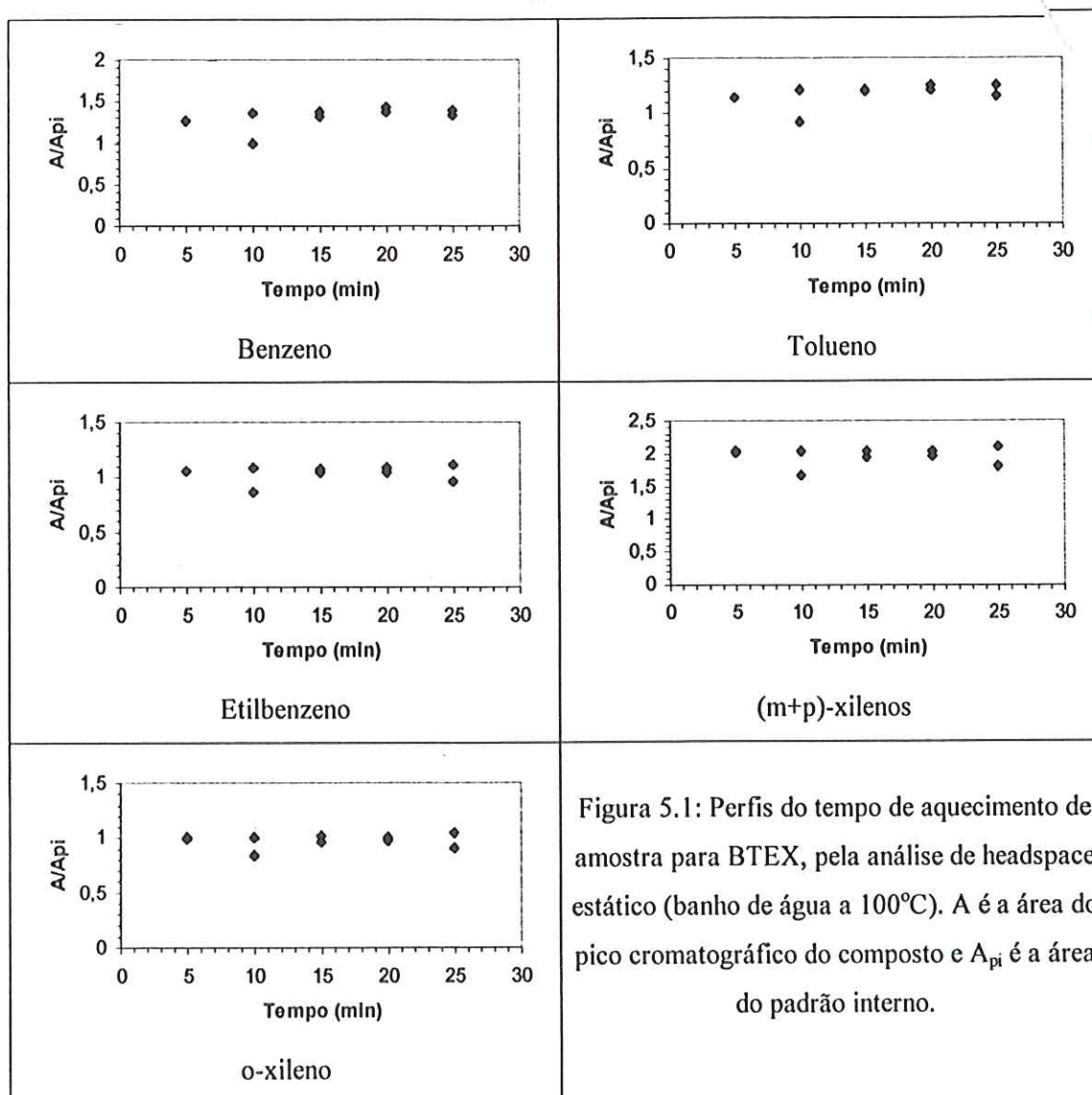


Figura 5.1: Perfis do tempo de aquecimento de amostra para BTEX, pela análise de headspace estático (banho de água a 100°C). A é a área do pico cromatográfico do composto e A_{pi} é a área do padrão interno.

5.1.2 Influência da força iônica

A adição de compostos iônicos solúveis em amostras tem sido usada para aumentar a sensibilidade da análise. A Figura 5.2 apresenta a influência de cloreto de sódio e de sulfato de sódio no fator de resposta (relação entre a área do pico cromatográfico do composto e a área do padrão interno) após 15 minutos de aquecimento em banho de água a 100°C. Como nas amostras puras o fator de resposta foi maior, optou-se por não adicionar sal.

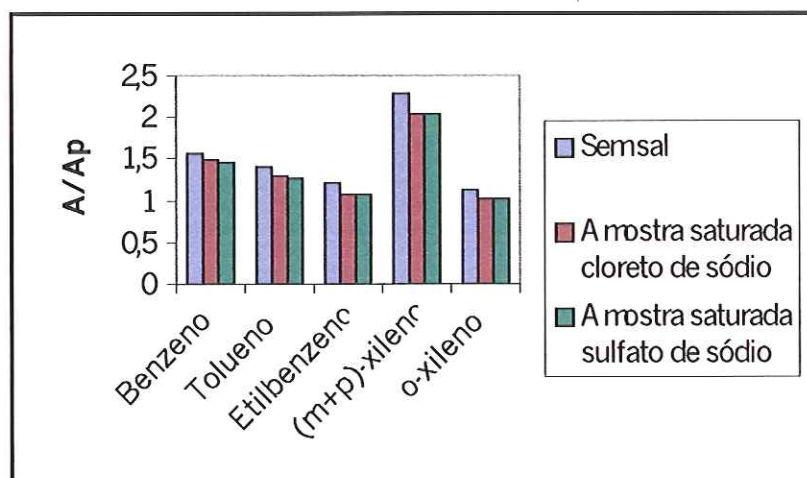


Figura 5.2: Efeito da influência de sal na determinação de BTEX em headspace de amostras aquosas por cromatografia gasosa (20 mg/L de cada BTEX). A é a área do pico cromatográfico do composto e A_{pi} é a área do padrão interno.

5.1.3 Separação cromatográfica

A Figura 5.3 mostra os cromatogramas de padrões das duas curvas de calibração.

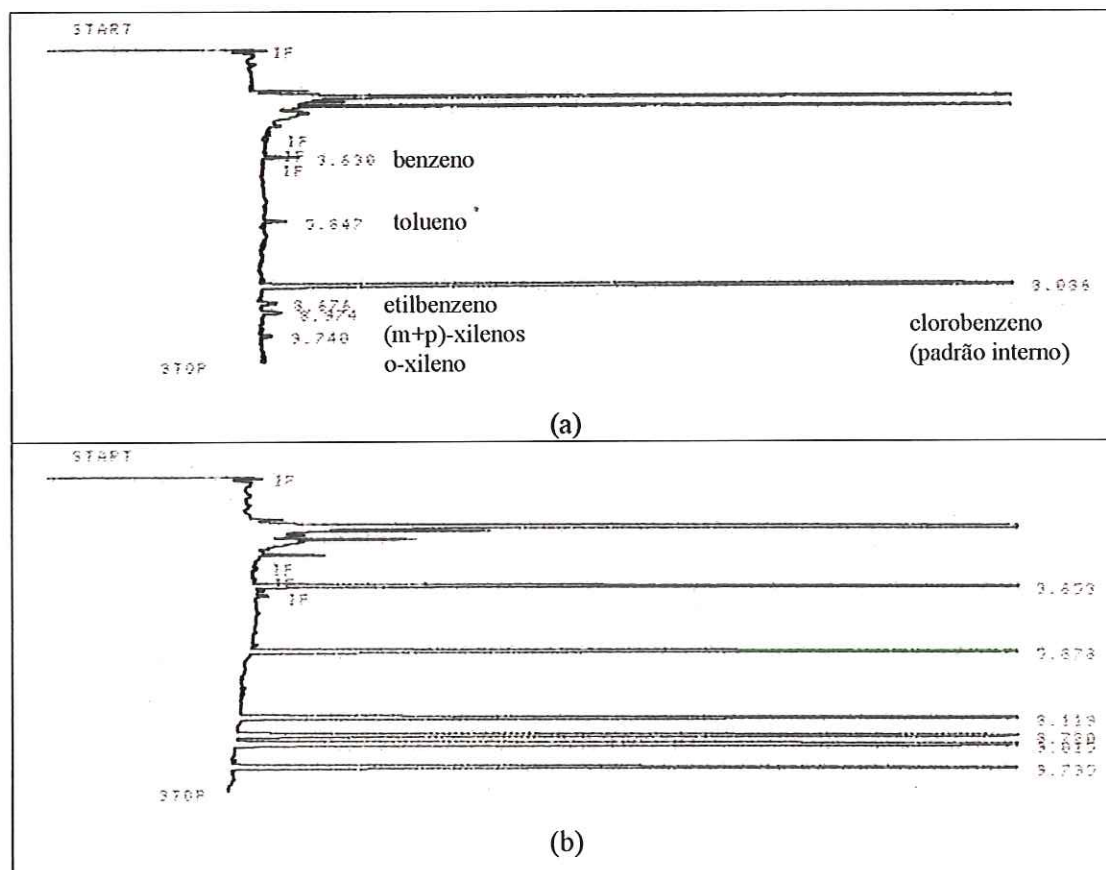
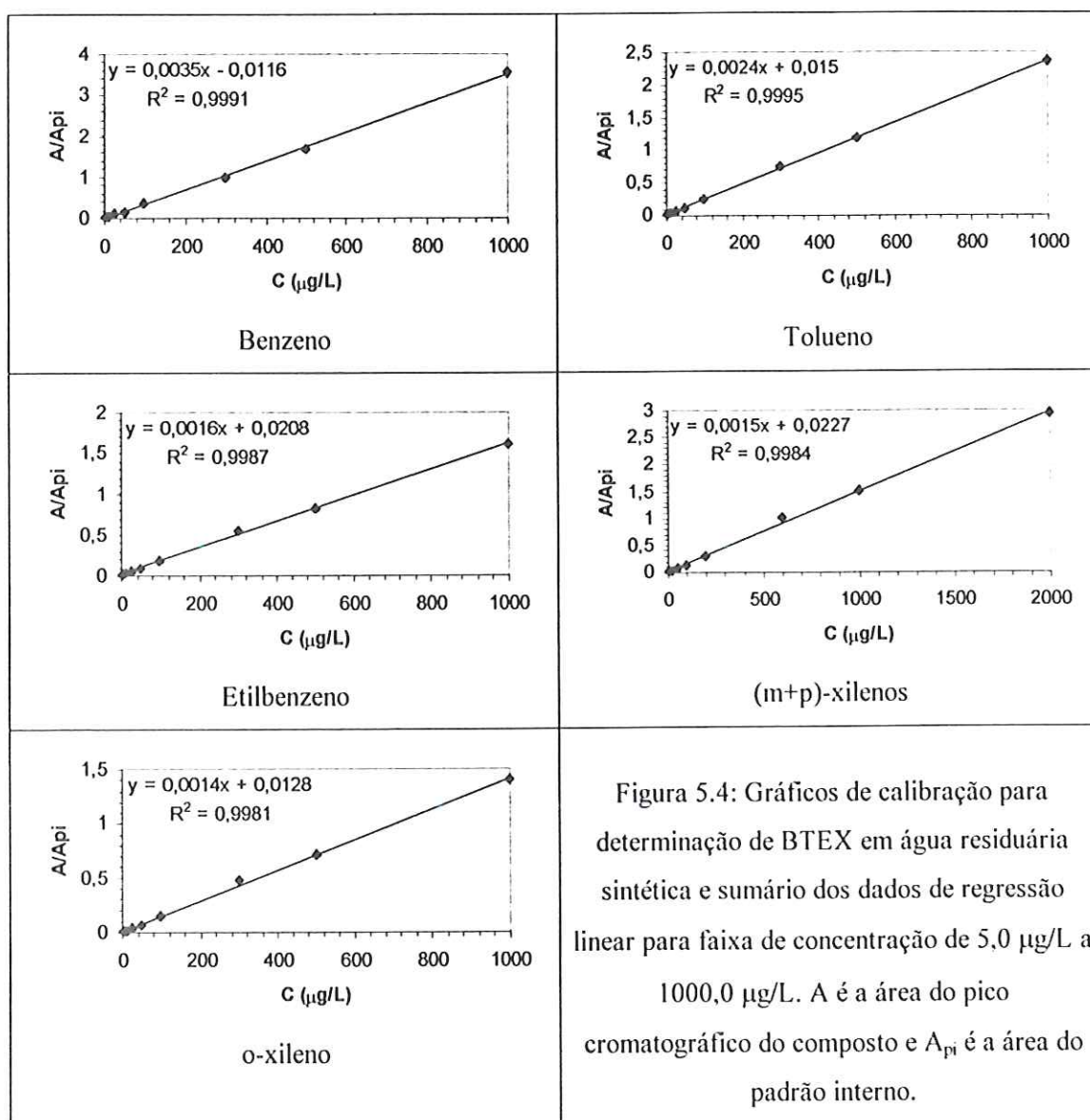


Figura 5.3: Cromatograma dos padrões. (a) 5,0 µg/L e (b) 10,0 mg/L de cada BTEX.

5.1.4 Curvas de calibração, limite de detecção e reprodutibilidade

As Figuras 5.4 e 5.5 apresentam um dos conjuntos de equações obtidas das curvas de calibração relativas as respostas do método para as substâncias analisadas e os respectivos valores do coeficiente de correlação. As curvas foram lineares para todos os compostos na faixa de concentração de 5,0 µg/L a 40,0 mg/L, com coeficientes de correlação maiores que 0,997.



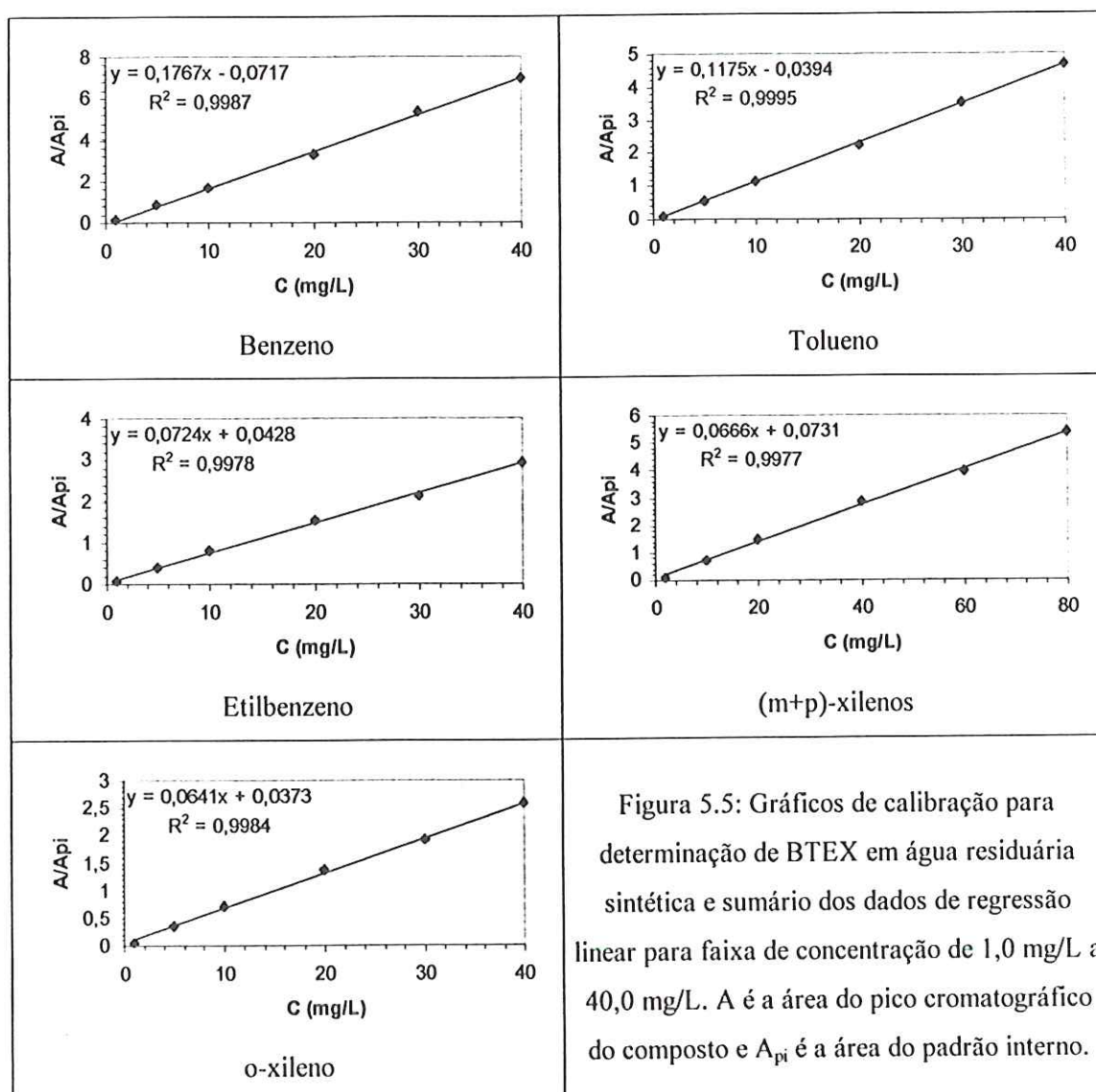


Figura 5.5: Gráficos de calibração para determinação de BTEX em água residuária sintética e sumário dos dados de regressão linear para faixa de concentração de 1,0 mg/L a 40,0 mg/L. A é a área do pico cromatográfico do composto e A_{pi} é a área do padrão interno.

Pelo método de diluições progressivas, o limite de detecção foi de 5,0 $\mu\text{g/L}$ para todos os compostos. Os limites de detecção obtidos pela equação 4.2 são apresentados na Tabela 5.1. Para o cálculo, foram consideradas as faixas de concentração de 0 a 1000,0 $\mu\text{g/L}$ para benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno e 0 a 2000,0 $\mu\text{g/L}$ para (m+p)-xilenos. Esses valores foram maiores que os obtidos por diluições progressivas e foram considerados como o limite de detecção do método.

Tabela 5.1: Sumário dos dados de regressão linear para o cálculo do limite de detecção para faixa de concentração de 0 a 2000,0 µg/L e limite de detecção.

	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	(m+p)-xilenos	o-xileno
Parâmetros da regressão linear					
$m \pm SE_m^a$	0,0035 ± 3,9597.10 ⁻⁵	0,0024 ± 2,0765.10 ⁻⁵	0,0016 ± 2,2905.10 ⁻⁵	0,0015 ± 2,2090.10 ⁻⁵	0,0014 ± 2,2748.10 ⁻⁵
$b \pm SE_b^b$	- 0,0097 ± 0,01535	0,0125 ± 0,00805	0,0174 ± 0,00888	0,0189 ± 0,01713	0,0107 ± 0,00882
R ²	0,9996	0,9997	0,9993	0,9992	0,9991
Limite de detecção					
LD (µg/L)	10	15	27	47	26

^a inclinação e erro padrão.

^b intercepto e erro padrão.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados dos ensaios de reprodutibilidade de amostras de solução de BTEX na água residuária sintética na faixa de concentração de cada composto de 1,0 mg/L a 40,0 mg/L.

Tabela 5.2: Reprodutibilidade, como coeficiente de variação, de amostras de solução de BTEX em água residuária sintética, para diferentes concentrações.

Concentração (mg/L)	C.V. (%)					
	1,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
Benzeno	13,79	9,74	4,84	13,16	5,10	5,14
Tolueno	7,73	4,95	1,45	6,21	1,91	3,01
Etilbenzeno	13,67	2,31	2,01	2,12	0,75	2,53
o-xileno	3,82	3,45	2,14	1,92	1,09	2,49
Concentração (mg/L)	2,0	10,0	20,0	40,0	60,0	80,0
(m+p)-xilenos	3,94	3,06	2,32	2,28	0,81	2,46

O coeficiente de variação para os compostos, das análises de amostras realizadas em réplicas (seis para cada concentração), resultou na faixa de 0,75 % a 9,74 %, mostrando que o método é reprodutível (C.V. menor que 10,00%). Para duas concentrações de benzeno e uma de etilbenzeno, o coeficiente de variação foi em torno de 13,00 %. Isso foi atribuído a erro experimental, pois somente uma análise, das réplicas de 1,0 mg/L para benzeno e etilbenzeno e 20,0 mg/L para benzeno, apresentou valor discrepante e não foi descartada.

5.1.5 Eficiência da extração

Os valores da eficiência do método de extração para diferentes concentrações de BTEX são mostrados nas Tabelas 5.3 e 5.4.

Tabela 5.3: Eficiência da extração calculada comparando-se a análise do padrão em água residuária sintética com solução do padrão em metanol em água destilada, para concentrações entre 25,07 µg/L a 1000,0 µg/L.

Concentração (µg/L)	Eficiência (%)					
	25,07	50,0	100,0	300,0	500,0	1000,0
Benzeno	101,79	74,78	81,02	68,87	70,18	66,94
Tolueno	110,13	78,20	87,22	84,96	78,18	66,00
Etilbenzeno	92,55	83,98	93,88	98,51	85,65	68,60
o-xileno	111,49	81,27	91,62	106,62	89,22	73,23
Concentração (µg/L)	50,14	100,0	200,0	600,0	1000,0	2000,0
(m+p)-xilenos	98,35	87,24	95,29	102,42	87,18	69,46

Tabela 5.4: Eficiência da extração calculada comparando-se a análise do padrão em água residuária sintética com solução do padrão em metanol em água destilada, para concentrações entre 1,0 mg/L a 40,0 mg/L.

Concentração (mg/L)	Eficiência (%)					
	1,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
Benzeno	60,73	70,94	87,67	83,81	84,71	88,77
Tolueno	67,78	74,71	87,34	86,71	90,74	96,04
Etilbenzeno	80,14	81,62	89,63	88,59	84,51	92,00
o-xileno	80,38	86,65	93,15	90,74	87,45	90,71
Concentração (mg/L)	2,0	10,0	20,0	40,0	60,0	80,0
(m+p)-xilenos	78,81	83,65	90,92	89,31	85,37	92,13

Os valores de recuperação encontrados para faixa de concentração de BTEX de 25,07 µg/L a 40,0 mg/L foram considerados satisfatórios, mostrando concordância com as eficiências de métodos de extração aceitas internacionalmente de 70 % a 120 % (Veningerová *et al.*, 1997). Embora porcentagens de recuperação próximas a 100 % sejam desejadas, admitem-se valores menores, entre 50 % e 60 %, desde que a recuperação seja precisa e exata (Cass, 2001). Valores superiores a 100 % podem ser obtidos, pois a recuperação foi verificada por comparação dos fatores de resposta (relação entre a área do pico cromatográfico do composto e a área do padrão interno) das amostras de solução de BTEX em água residuária sintética com amostras aquosas de BTEX (menor solubilidade). Um valor de recuperação de 100 % foi atribuído a soluções aquosas de BTEX.

5.2 Primeira etapa experimental

A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos na primeira etapa do trabalho, que consistiu na avaliação da degradação de BTEX presente em água residuária sintética enriquecida. A influência da adição de nitrato e de sulfato, como aceptores de elétrons na degradação anaeróbia foi também avaliada. Dessa forma, três reatores foram operados simultaneamente: reator controle operado sob condições fermentativa e metanogênica, reator com adição de nitrato e reator com adição de sulfato. Após adição de BTEX, esta etapa foi dividida em duas fases, a primeira, utilizando etanol como co-solvente e a segunda, utilizando detergente comercial.

5.2.1 Reator controle

Inicialmente, o reator foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 5,0 horas, alimentado com substrato sintético contendo proteína, carboidratos e lipídios, promovendo adesão e desenvolvimento adequado do biofilme no suporte. Após 10 dias do início da operação do reator, os parâmetros analisados no efluente apresentaram valores estáveis, tendo sido considerada encerrada a etapa de partida do sistema. O reator foi operado nessas condições por 6 meses. A Tabela 5.5 apresenta os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e do efluente ao reator dos 6 meses de operação, após atingir o equilíbrio dinâmico aparente.

Tabela 5.5: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente durante a fase de adaptação do reator controle.

Parâmetros	Afluyente			Efluente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
DQO _b (mg/L)	492 ± 77	289	582	95 ± 18	58	133
DQO _r (mg/L)	394 ± 92	149	488	73 ± 12	55	108
AB (mg CaCO ₃ /L)	119 ± 31	64	162	174 ± 37	104	214
AVT (mgHac/L)	47 ± 11	25	75	18 ± 4	8	23
pH		6,6	7,7		7,5	8,2

O TDH foi aumentado para aproximadamente 13,5 horas; a fonte de lipídios foi retirada e foi adicionada solução de BTEX ao substrato sintético. Na 1ª fase, o reator foi operado com etanol como co-solvente por 75 dias. Inicialmente, foi adicionada solução etanólica de BTEX com concentrações em torno de 1,5 mg/L de cada composto (1ª sub-fase). A concentração de BTEX foi aumentada em torno de 6,0 mg/L de cada composto

(2ª sub-fase) pois a solubilidade dos compostos na fase aquosa foi aumentada, melhorando-se a forma e a intensidade de agitação, bem como aumentando-se o tempo de agitação da solução de BTEX na água residuária. A Tabela 5.6 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e do efluente ao reator após atingir o equilíbrio dinâmico aparente.

Tabela 5.6: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente ao reator controle durante a 1ª fase de operação com etanol como co-solvente.

Parâmetros	Afluyente			Efluente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
1ª Sub-fase						
Benzeno (mg/L)	1,7 ± 1,1	0,1	3,6	< LD	-	-
Tolueno (mg/L)	1,8 ± 1,0	0,1	3,1	< LD	-	-
Etilbenzeno (mg/L)	1,7 ± 1,0	0,1	2,5	< LD	-	-
(m+p)-xilenos (mg/L)	2,9 ± 1,7	0,1	4,8	-	-	-
o-xileno (mg/L)	1,4 ± 0,9	0,1	2,6	-	-	-
DQO _b (mg/L)	612 ± 98	487	775	67 ± 10	61	86
AB (mg CaCO ₃ /L)	113 ± 17	96	136	155 ± 2	153	158
AVT (mgHac/L)	57 ± 10	46	70	20 ± 1	19	22
pH		7,1	7,2		7,8	8,0
2ª Sub-fase						
Benzeno (mg/L)	9,7 ± 3,2	5,3	13,0	< LD	-	-
Tolueno (mg/L)	7,1 ± 1,3	5,9	9,0	< LD	-	-
Etilbenzeno (mg/L)	5,3 ± 0,7	4,6	6,3	< LD	-	-
(m+p)-xilenos (mg/L)	9,9 ± 1,4	8,7	12,0	-	-	-
o-xileno (mg/L)	5,6 ± 1,0	4,7	7,0	-	-	-
DQO _b (mg/L)	1968 ± 407	1025	2494	131 ± 21	104	158
pH		7,1	8,6		4,9	8,7

LD é o limite de detecção.

Nessa fase, a concentração de benzeno, de tolueno e de etilbenzeno no efluente foi menor que 0,1 mg/L e não foram detectados isômeros do xileno ao longo de todo o experimento. O limite de detecção foi considerado igual a 0,1 mg/L, pois ainda não havia sido feito curva de calibração para concentrações menores.

Apesar de quase completa degradação anaeróbia ter sido obtida, durante essa fase, o principal problema operacional foi decorrente da carga de choque orgânica imposta ao reator no 34º dia de operação, quando a concentração de etanol foi aumentada de 170 mg/L para 848 mg/L. A concentração de BTEX e etanol foi aumentada com a finalidade de aumentar a concentração de BTEX na fase aquosa, que elevou a DQO_b média afluyente de 612 ± 98 mg/L (1ª sub-fase) para 1968 ± 407 mg/L (2ª sub-fase). O reator foi prontamente afetado pelo efeito da carga orgânica com queda do pH no efluente para 4,9, como conseqüência do elevado acúmulo de ácidos voláteis, atingindo concentrações máximas de 1036 mg/L de

ácido acético, 32 mg/L de ácido propiônico, 27 mg/L de ácido butírico, 11 mg/L de ácido iso-butírico e 15 mg/L de ácido iso-valérico. A fim de melhorar as condições de tamponamento, foi adicionado bicarbonato de sódio (3,0 g/L) ao substrato sintético para correção do pH, após o 3º dia do aumento na concentração de DQO_b (37º dia de operação), quando foi observada queda do pH. Após o 20º dia do aumento na concentração de DQO_b (54º dia de operação), o acúmulo de ácidos voláteis caiu e no 30º dia (64º dia de operação) o sistema recuperou seu desempenho inicial, mesmo na condição de concentração de DQO_b afluyente elevada. Bicarbonato de sódio foi retirado gradualmente do substrato sintético até voltar à concentração inicial. A DQO efluente caiu para 131 ± 21 mg/L e o pH aumentou para 8,2. A Figura 5.6 apresenta os dados de concentração dos ácidos voláteis e DQO_b efluente durante a carga de choque orgânica.

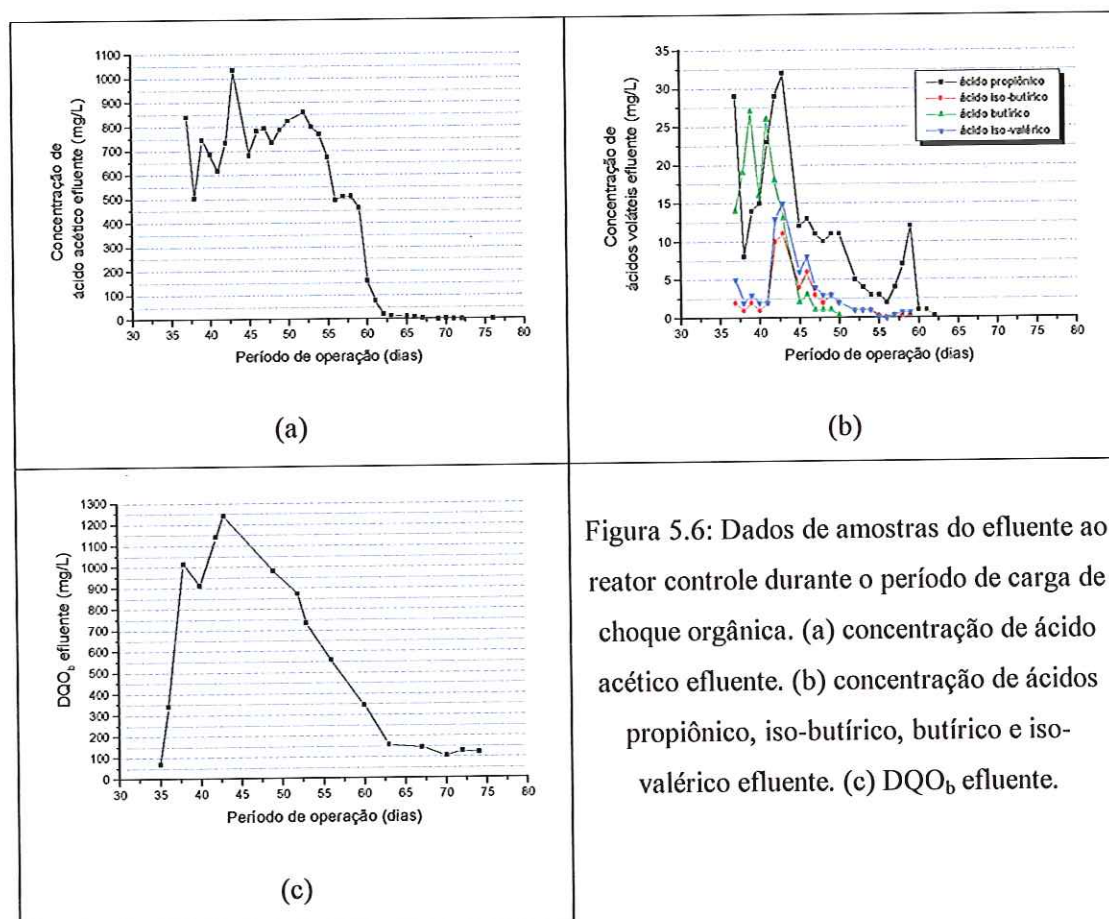


Figura 5.6: Dados de amostras do efluente ao reator controle durante o período de carga de choque orgânica. (a) concentração de ácido acético efluente. (b) concentração de ácidos propiônico, iso-butírico, butiríco e iso-valérico efluente. (c) DQO_b efluente.

Na 2ª fase, etanol foi substituído por detergente comercial, que aumentou a dissolução de BTEX, resultando em concentrações afluyentes maiores que as obtidas na 1ª fase. A Tabela 5.7 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente.

Tabela 5.7: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluente ao reator controle da 2ª fase de operação com detergente comercial como co-solvente.

Parâmetros	Afluente		
	Média	Mínimo	Máximo
Benzeno (mg/L)	11,8 ± 5,4	3,6	27,0
Tolueno (mg/L)	8,7 ± 4,6	3,5	22,3
Etilbenzeno (mg/L)	7,0 ± 4,5	1,3	19,3
(m+p)-xilenos (mg/L)	14,3 ± 8,7	2,6	37,7
o-xileno (mg/L)	8,0 ± 4,6	1,9	20,5
DQO _b (mg/L)	797 ± 54	719	911
AB (mg CaCO ₃ /L)	97 ± 40	49	173
AVT (mgHac/L)	64 ± 16	45	86
pH		6,5	7,6

Após 19 dias de operação com TDH de 13,5 horas, o reator atingiu condições estáveis e os valores médios dos parâmetros monitorados no efluente foram: concentração de BTEX menor que 0,3 mgBTEX/L, DQO_b de 161 ± 4 mg/L, AB em torno de 192 mg CaCO₃/L, AVT em torno de 27 mg Hac/L e pH variando de 7,7 a 8,0.

O reator foi, então, operado por 53 dias com TDH ajustado em 5,3 horas, a fim de verificar-se os limites do sistema. Nessa condição, a DQO_b efluente aumentou para 242 ± 29 mg/L e AB para 205 ± 9 mg CaCO₃/L. A concentração de AVT permaneceu em 23 ± 2 mg Hac/L, com 11 ± 8 mg/L de ácido acético e 5 ± 3 mg/L de ácido propiônico. O pH variou de 7,6 a 8,0. A concentração de BTEX aumentou em relação à fase de operação com TDH de 13,5 horas, com concentrações médias de 136 µg benzeno/L, 110 µg tolueno/L, 160 µg etilbenzeno/L, 140 µg (m+p)-xilenos/L e 48 µg o-xileno/L. A Figura 5.7 apresenta os resultados obtidos durante a operação do RAHLF com TDH de 5,3 horas.

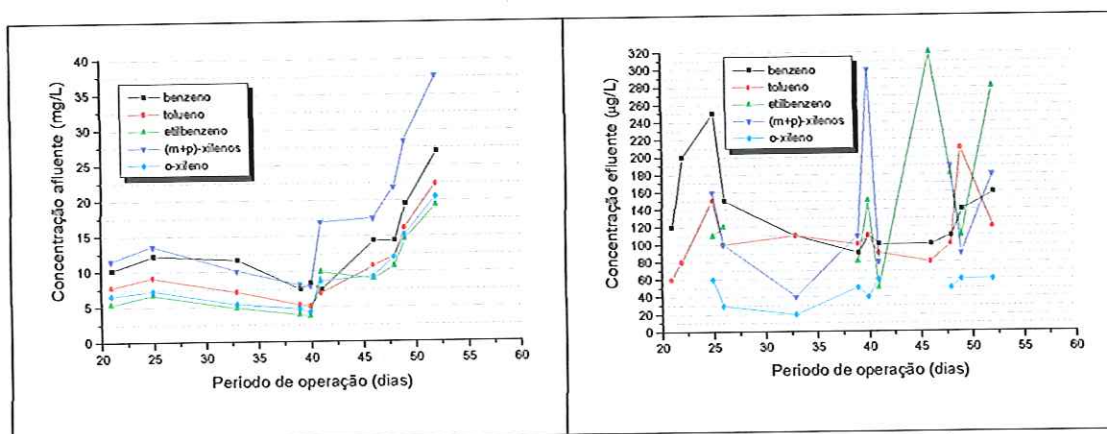


Figura 5.7: Concentrações de BTEX afluente e efluente ao reator controle com TDH de 5,3 horas na presença de detergente comercial.

Ao final do período de operação, a concentração de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) nas matrizes de poliuretano foram 0,82 g/g espuma e 0,46 g/g espuma, respectivamente.

Morfologias dos organismos presentes no biofilme

A Tabela 5.8 e a Figura 5.8 mostram as morfologias observadas no biofilme amostradas no primeiro (PSR) e último (USR) segmento do reator. As amostras de biomassa foram coletadas do biofilme através de compressões do suporte com pinça.

Tabela 5.8: Morfologias microbianas em amostras ao final de cada fase de operação do reator controle.

Morfologias	Fase de adaptação		Primeira fase		Segunda fase	
	PSR	USR	PSR*	USR	PSR	USR
Domínio Bactéria						
Cocos (1,5 – 1,7 µm de diâmetro)	++	+++	-	+++	+	-
Cocos em cadeia	+	+	-	+	-	-
Coco-bacilos	-	-	-	+++	++	+++
Bacilos em pares	-	+	-	+	+++	+++
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	++	+++	-	++	-
Bacilos retos	+++	+	+++	++	+++	++
Filamentos finos	++	+++	-	+	+++	+
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 µm de comprimento)	+++	+	+	+	+++	++
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	++	+	+	+	+++	++
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	++	++	++	++	-	+
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	++	-	+	++	+
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	-	++	+	+
Cistos	++	-	++	-	+	-

PSR – primeiro segmento do reator, USR – último segmento do reator.

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

*Análise microbiológica da biomassa esbranquiçada suspensa formada na entrada do reator durante operação com etanol.

No inóculo proveniente de diferentes origens foi observado o predomínio de bacilos, cocos, cocos em tetrades, filamentos e vibrios. Entre as arqueas metanogênicas, foram visualizadas principalmente bacilos fluorescentes e *Methanosaeta* sp.. Os tipos morfológicos observados, ao longo do experimento, estavam presentes no inóculo e cresceram no biofilme de acordo com o favorecimento de suas capacidades metabólicas. Dessa forma, o processo de adaptação dos diferentes organismos ocorreu durante todo o tempo de ensaio.

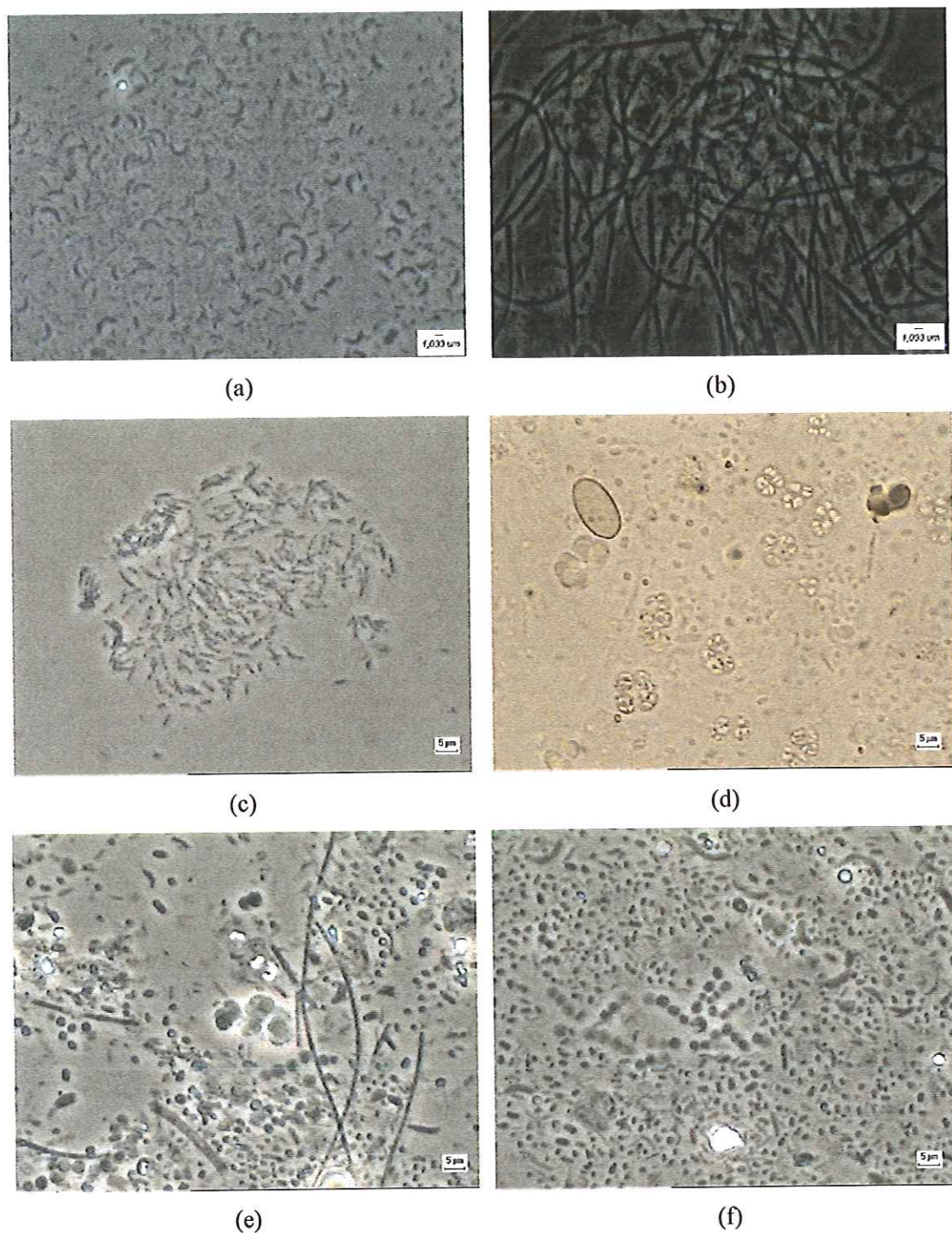


Figura 5.8: Fotomicrografias em contraste de fase de bactérias e arqueas metanogênicas presentes no biofilme do reator controle. (a) vibrios, fase de adaptação. (b) arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosaeta*, fase de adaptação (c) bacilos com pontuações nas extremidades, primeira fase. (d) arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina*, primeira fase. (e) cocos, primeira fase. (f) coco-bacilos, primeira fase.

Na presença de etanol na 1ª fase, houve a formação de biomassa esbranquiçada suspensa no primeiro segmento do reator, onde cresceram bacilos relacionados, provavelmente, à etapa de fermentação. Cocos, coco-bacilos e arqueas metanogênicas cresceram preferencialmente no biofilme. Arqueas acetoclásticas semelhantes a *Methanosarcina* sp. foram favorecidas pela presença de acetato, em relação a *Methanosaeta* sp. e bacilos fluorescentes hidrogenotróficos. A presença de *Methanosarcina* sp. nesta fase foi devido à elevada concentração de acetato, em torno de 750 mg/L, proveniente da carga de choque orgânica. Em geral, o mesmo consórcio enriquecido ativo foi observado após a suplementação com BTEX.

Na 2ª fase experimental, a metanogênese foi provavelmente inibida pelo detergente comercial que contém o princípio ativo benzeno sulfonato de alquila (BSA). Essa hipótese foi confirmada pelas diluições seriadas no método do número mais provável (NMP). O metano não foi detectado nos frascos e a quantificação celular foi realizada através da visualização de organismos por microscopia de contraste de fase e de fluorescência. Wagener & Schink (1987) observaram que o BSA não foi mineralizado sob condições anaeróbias, ocorrendo acúmulo de acetato e inibição da metanogênese acetoclástica. Segundo os autores, a metanogênese hidrogenotrófica foi também inibida e os anaeróbios homoacetogênicos passaram a controlar a degradação. Neste trabalho, nos ensaios de NMP, foram observados bacilos fluorescentes, relacionados com as arqueas hidrogenotróficas até a diluição de 10^{-1} (Tabela 5.11). No entanto, não foi possível detectar a produção de metano nos frascos. Sabe-se que a metanogênese acetoclástica é responsável por aproximadamente 72 % do metano produzido durante a digestão anaeróbia enquanto a metanogênese hidrogenotrófica corresponde a 28 % (Speece, 1996). No entanto, essa relação é válida para resíduos com proteínas, carboidratos e lipídios e não se aplica para metanol, metilaminas e grupos metila presentes em aromáticos. O predomínio de coco-bacilos, bacilos e vibrios semelhantes a redutoras de sulfato foi também observado ao longo do reator.

A quantificação celular mostrou que a concentração de bactérias anaeróbias foi mantida no biofilme durante a fase de adaptação e no primeiro segmento do reator durante a segunda fase ($2,4 \times 10^8$ organismos/mL). Foi observado o decréscimo de biomassa no último segmento do reator ao final do experimento ($6,1 \times 10^6$ organismos/mL). O decréscimo de arqueas metanogênicas foi significativo quando comparado à biomassa total. Esses organismos representaram menos que 0,5 % dos organismos anaeróbios totais no biofilme no reator (Tabela 5.9).

A concentração de organismos nas amostras do último segmento do reator, apresentou decréscimo de 97 % de bactérias anaeróbias. Provavelmente, o método do NMP

que utilizou água residuária sintética afluyente não correspondeu à dinâmica no reator nesse ponto, pois a relação matéria orgânica / biomassa utilizada nas diluições foi maior que a existente no sistema. Nesse trecho, havia a presença de comunidade microbiana provavelmente com metabolismo nutricional direcionado para utilização de compostos orgânicos menores, localizados numa segunda ou terceira etapa da cadeia trófica alimentar. Contudo, o método do NMP pode ser considerado, pois Bolños (2001) e Oliveira (2001) tratando fenol e formaldeído, respectivamente, em RAHLF, observaram, através de estudos cinéticos que a degradação do substrato ocorria significativamente na primeira metade do reator, sendo mínima após a metade do reator, confirmando a maior concentração de organismos no primeiro segmento do reator.

Apesar da concentração de organismos ter decrescido ao longo da fase experimental, o biofilme ofereceu condições para os microrganismos sobreviverem em condições inóspitas no reator.

Tabela 5.9: NMP durante o período de operação do reator controle.

Concentração (NMP organismos/mL)	Final da fase de adaptação		Final de segunda fase	
	PSR	USR	PSR	USR
Bactérias anaeróbias	$2,4 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$6,1 \times 10^6$
Arqueas metanogênicas	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$

PSR – primeiro segmento do reator, USR – último segmento do reator.

As Tabelas 5.10 e 5.11 apresentam as morfologias microbianas observadas em amostras de NMP ao final da fase de adaptação e da segunda fase. As análises de microscopia de contraste de fase e fluorescência mostraram, de modo geral, a presença dos mesmos tipos morfológicos salientados anteriormente, destacando-se a presença de bacilos, vibrios e bacilos fluorescentes.

Na ausência de aceptores de elétrons, várias espécies de bactérias redutoras de sulfato (BRS) são capazes de crescer pela fermentação ou acetogênese de piruvato, lactato e etanol. *Desulfovibrio* sp. que não fermentam lactato ou etanol podem crescer com estes compostos, na ausência de sulfato, em co-culturas com arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (bacilos fluorescentes). Nessas associações sintróficas, BRS atuam como bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio e arqueas metanogênicas hidrogenotróficas utilizam o hidrogênio proveniente da reação (Widdel, 1988).

Tabela 5.10: Morfologias microbianas observadas no NMP
na fase de adaptação do reator controle.

Morfologias	10^{-1}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Primeiro segmento do reator							
Domínio Bactéria							
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	++	+++	-	+	-	-
Bacilos retos	++	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 μm de comprimento)	++	++	-	+	+	+	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 μm de comprimento)	++	++	++	++	++	++	-
Domínio Archaea							
Bacilos fluorescentes	+++	++	++	++	++	+	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	++	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-
Último segmento do reator							
Domínio Bactéria							
Cocos (1,5 – 1,7 μm de diâmetro)	++	+++	-	-	-	-	-
Bacilos com pontuações nas extremidades	++	++	+++	+++	+++	-	+++
Bacilos retos	++	++	++	-	-	-	-
Filamentos finos	+++	++	++	-	-	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 μm de comprimento)	+++	++	+++	-	+	-	+
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 μm de comprimento)	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Domínio Archaea							
Bacilos fluorescentes	++	++	++	++	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	+	-	-	-	-	-

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

Tabela 5.11: Morfologias microbianas observadas no NMP na 2ª fase do reator controle.

Morfologias	10^{-1}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-8}
Primeiro segmento do reator						
Domínio Bactéria						
Cocos (1,5 – 1,7 μm de diâmetro)	-	+++	++	-	-	-
Bacilos com pontuações nas extremidades	+++	++	-	-	-	-
Bacilos retos	+++	++	+++	+++	+++	++
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 μm de comprimento)	-	+	+++	+++	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 μm de comprimento)	+++	+++	++	+++	++	-
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	++	+++	++	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	++	-	-	-	-	-
Morfologias	10^{-1}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Último segmento do reator						
Domínio Bactéria						
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	-	-	-	++	+++
Bacilos retos	+++	+++	++	++	+++	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 μm de comprimento)	-	-	+++	-	+	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 μm de comprimento)	+++	+++	+++	-	-	-
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	++	++	+++	-	-	-

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

Ao final da operação, foi observada grande quantidade de precipitado no biofilme, em cuja composição predominava ferro e enxofre, que também foi encontrado nos reatores operados com nitrato e sulfato. A Figura 5.9 apresenta o precipitado observado em microscopia eletrônica de varredura e submetido à análise por raio-X através do EDX (Energy Dispersive X-ray Spectrometer).

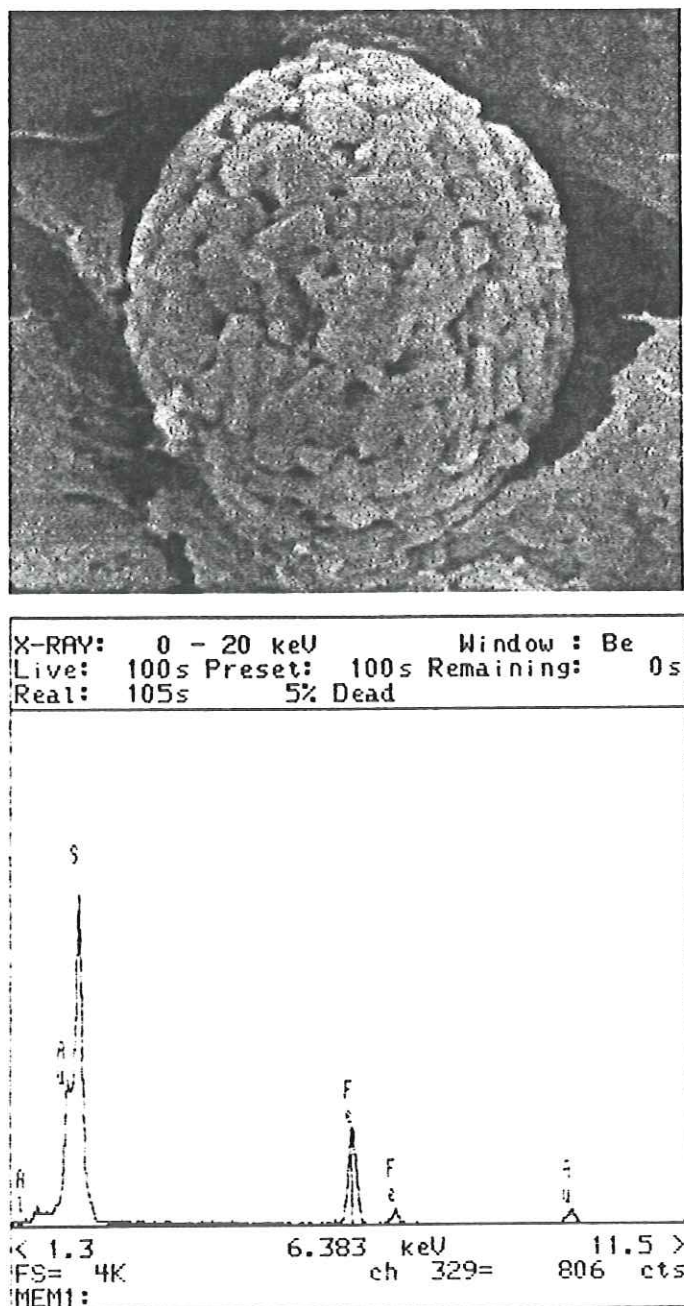


Figura 5.9: Precipitado composto de ferro e enxofre observado por microscopia eletrônica de varredura ao final do experimento e espectro de energia realizado por EDX mostrando os elementos constituintes da amostra.

5.2.2 Reator com adição de nitrato

A biomassa imobilizada foi adaptada à água residuária sintética (Tabela 4.1) com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 5,0 horas, por 30 dias. Nitrato de sódio foi adicionado à água residuária sintética na relação DQO / NO_3^- igual a 5, por cinco meses. A Tabela 5.12 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluente e efluente ao reator após adição de nitrato.

Tabela 5.12: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluente e efluente durante a fase de adaptação do reator com adição de nitrato.

Parâmetros	Afluente			Efluente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
DQO _b (mg/L)	501 ± 157	221	940	92 ± 15	57	133
DQO _r (mg/L)	370 ± 98	134	497	73 ± 13	51	110
AB (mg CaCO ₃ /L)	159 ± 42	90	267	244 ± 21	189	275
AVT (mgHac/L)	42 ± 15	19	74	18 ± 4	9	25
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)	24 ± 5	13	32	6 ± 1	3	8
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ /L)				6 ± 2	1	10
pH		6,1	8,4		7,0	8,4

A remoção de DQO_b foi em torno de 82 % e a desnitrificação não foi completa (concentração de nitrato afluente de 24 ± 5 mgN-NO₃⁻/L) permanecendo, no efluente, a concentração média de 6 ± 1 mgN-NO₃⁻/L e formando nitrito na concentração média de 6 ± 2 mgN-NO₂⁻/L.

O TDH foi aumentado para aproximadamente 13,5 horas, a fonte de lipídios foi retirada e solução de BTEX foi adicionada ao substrato sintético. Na 1ª fase, o reator foi operado com etanol como co-solvente por 75 dias. Inicialmente, foi adicionada solução etanólica de BTEX com concentrações em torno de 1,5 mg/L de cada composto (1ª sub-fase). A concentração de BTEX foi aumentada em torno de 5,0 mg/L de cada composto (2ª sub-fase). A Tabela 5.13 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluente e do efluente ao reator após atingir o equilíbrio dinâmico aparente.

Tabela 5.13: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente ao reator com adição de nitrato durante a 1ª fase de operação com etanol como co-solvente.

Parâmetros	Afluente			Efluente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
1ª Sub-fase						
Benzeno (mg/L)	1,4 ± 0,6	0,1	2,2	< LD	-	-
Tolueno (mg/L)	1,6 ± 0,6	0,1	2,1	< LD	-	-
Etilbenzeno (mg/L)	1,6 ± 0,6	0,7	2,3	< LD	-	-
(m+p)-xilenos (mg/L)	2,6 ± 1,2	0,1	3,5	-	-	-
o-xileno (mg/L)	1,4 ± 0,3	0,7	1,7	-	-	-
DQO _b (mg/L)	590 ± 155	516	866	81 ± 17	66	114
AB (mg CaCO ₃ /L)	205 ± 32	177	236	224 ± 7	216	230
AVT (mgHac/L)	45 ± 9	34	54	21 ± 2	18	22
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)	30 ± 11	21	42	6	3	8
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ /L)				8 ± 3	6	12
pH		7,4	7,6		7,7	8,0
2ª Sub-fase						
Benzeno (mg/L)	6,7 ± 1,6	4,4	8,3	< LD	-	-
Tolueno (mg/L)	4,9 ± 0,9	3,8	6,0	< LD	-	-
Etilbenzeno (mg/L)	3,7 ± 1,1	2,3	5,2	< LD	-	-
(m+p)-xilenos (mg/L)	7,2 ± 1,8	4,9	9,3	-	-	-
o-xileno (mg/L)	4,2 ± 0,9	2,9	5,2	-	-	-
DQO _b (mg/L)	1827 ± 383	1020	2434	121 ± 16	93	135
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)	60 ± 7	51	66	-	-	-
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ /L)				-	-	-
pH		7,1	8,6		6,8	8,7

LD é o limite de detecção.

Nessa fase, a concentração de benzeno, de tolueno e de etilbenzeno no efluente foi menor que 0,1 mg/L e não foram detectados isômeros do xileno ao longo de todo o experimento. O limite de detecção foi considerado igual a 0,1 mg/L, pois ainda não havia sido feita reta de calibração para concentrações menores.

Carga de choque orgânica devido ao etanol também ocorreu no reator no 34º dia de operação devido ao aumento da concentração de BTEX e etanol, elevando a DQO_b média afluyente de 590 ± 155 mg/L para 1827 ± 383 mg/L. Para manter a relação DQO / NO₃⁻ igual a 5, a concentração de nitrato foi aumentada para 60 ± 7 mg/L. O efeito da carga orgânica foi mais ameno, não tendo sido observada queda do pH no efluente, que pode ser atribuído, em parte, à geração de alcalinidade durante o processo de desnitrificação, melhorando as condições de tamponamento do sistema. Para cada mg de N-NO₃⁻ reduzido, produz-se 3 mg de alcalinidade como CaCO₃ (Metcalf & Eddy, Inc., 1991). O acúmulo de ácido acético atingiu valor máximo de 622 mg/L no 9º dia, após aumento de DQO_b afluyente, caindo, em seguida, recuperando por completo a capacidade de degradação em 28 dias. Outros ácidos formados apresentaram concentrações menores que 18 mg/L de ácido propiônico, 8 mg/L de



ácido butírico, 7 mg/L de ácido iso-butírico e 11 mg/L de ácido iso-valérico. Foi adicionado bicarbonato de sódio (3,0 g/L) ao substrato sintético, no mesmo período em que foi adicionado ao substrato do reator controle, para evitar que o acúmulo de ácidos afetasse o sistema. A Figura 5.10 apresenta os dados de concentração dos ácidos voláteis e DQO_b efluente durante a carga orgânica.

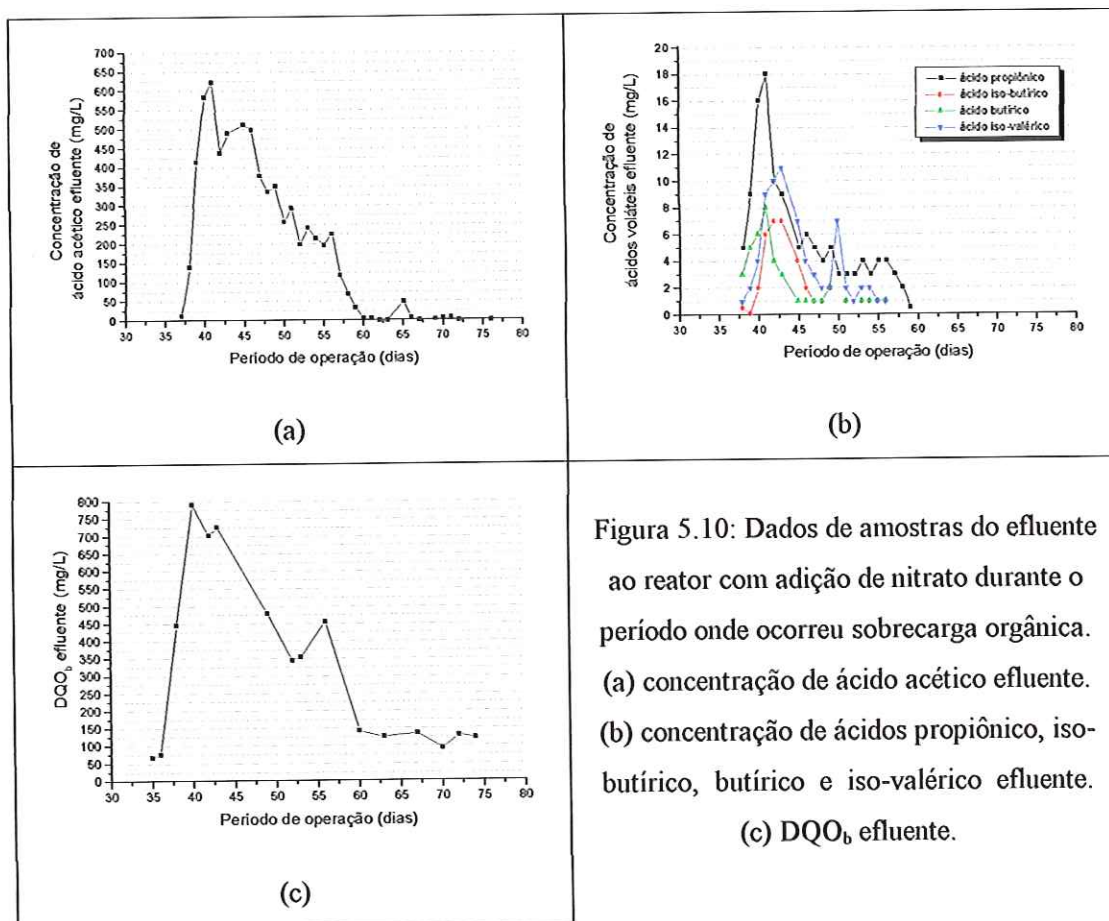


Figura 5.10: Dados de amostras do efluente ao reator com adição de nitrato durante o período onde ocorreu sobrecarga orgânica. (a) concentração de ácido acético efluente. (b) concentração de ácidos propiônico, iso-butírico, butírico e iso-valérico efluente. (c) DQO_b efluente.

A desnitrificação foi completa e não foram detectados nitrato e nitrito em amostras do efluente. As bactérias responsáveis pela desnitrificação utilizam matéria orgânica como fonte de carbono e de energia. Dessa forma, a eficiência da desnitrificação está também relacionada ao doador de elétrons. Metanol (Her & Huang, 1995; Zhao *et al.*, 1999), etanol (Nyberg *et al.*, 1996) e acetato (Bandpi *et al.*, 1999) têm sido utilizados como fonte de carbono, pois sua eficiência na desnitrificação é comprovada. Portanto, a completa desnitrificação nesta fase pode ser também atribuída a presença de etanol no substrato, enquanto na fase de adaptação a remoção de nitrato foi em torno de 75 % com 6 ± 2 mgN-NO₂/L de nitrito permanecendo no efluente.

Na 2ª fase, o etanol foi substituído por detergente comercial, que aumentou a dissolução de BTEX, resultando em concentrações afluentes maiores que as obtidas na 1ª fase. A Tabela 5.14 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluente.

Tabela 5.14: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluente ao reator com adição de nitrato da 2ª fase de operação com detergente comercial como co-solvente.

Parâmetros	Afluente		
	Média	Mínimo	Máximo
Benzeno (mg/L)	13,1 ± 5,1	6,6	27,9
Tolueno (mg/L)	9,5 ± 4,9	3,9	23,4
Etilbenzeno (mg/L)	7,4 ± 5,0	1,7	21,1
(m+p)-xilenos (mg/L)	14,5 ± 9,9	1,5	40,4
o-xileno (mg/L)	8,3 ± 4,9	1,7	21,4
DQO _b (mg/L)	731 ± 58	692	850
AB (mg CaCO ₃ /L)	180 ± 47	142	269
AVT (mgHac/L)	46 ± 12	25	58
Nitrato (mgN-NO ₃ /L)	30 ± 3	26	34
pH		6,8	7,6

Os valores médios dos parâmetros monitorados no efluente foram: concentração de BTEX menor que 0,32 mgBTEX/L, DQO_b de 119 ± 12 mg/L, AB em torno de 272 mg CaCO₃/L, AVT em torno de 19 mg Hac/L e pH variando de 8,2 a 8,4.

Durante essa fase, o reator foi operado por 53 dias com TDH ajustado em 5,3 horas. Nessa condição, a DQO_b efluente aumentou para 211 ± 13 mg/L. AB permaneceu em torno de 266 mg CaCO₃/L e AVT em 18 mg Hac/L, com 7 mg/L de ácido acético. O pH variou de 7,9 a 8,0. A concentração de BTEX aumentou em relação à operação com TDH de 13,5 horas, com concentrações de BTEX médias no efluente de 84 µg benzeno/L, 66 µg tolueno/L, 80 µg etilbenzeno/L, 195 µg (m+p)-xilenos/L e 38 µg o-xileno/L. A concentração de nitrato no efluente foi de 4 ± 1 mgN-NO₃/L, remoção de 87 %, e não foi detectado nitrito. Almendariz *et al.* (2000) estudaram a degradação de benzeno sulfonato de alquila (BSA) na presença de nitrato, em sistema anaeróbio de duas fases, em que BSA foi degradado no reator acidogênico, sendo o nitrato afluente consumido completamente, enquanto no reator metanogênico não houve degradação. Assim, no tratamento de águas residuárias contendo BTEX e BSA talvez seja melhor adicionar nitrato para promover a degradação de ambos.

Ao final do período de operação, as concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) nas matrizes de poliuretano foram 1,08 g/g espuma e 0,57 g/g espuma, respectivamente.

Morfologias dos organismos presentes no biofilme

A Tabela 5.15 e a Figura 5.11 mostram as morfologias observadas no biofilme amostradas no primeiro (PSR) e último (USR) segmento do reator.

Na fase de adaptação, observou-se no biofilme, a presença de arqueas metanogênicas acetoclásticas (*Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.) e hidrogenotróficas (bacilos fluorescentes). Os organismos do domínio *Bacteria* presentes foram cocos, bacilos, filamentos e vibrios.

Tabela 5.15: Morfologias microbianas em amostras ao final de cada fase de operação do reator com adição de nitrato.

Morfologias	Fase de adaptação		Primeira fase		Segunda fase	
	PSR	USR	PSR*	USR	PSR	USR
Domínio <i>Bactéria</i>						
Cocos (1,5 – 1,7 µm de diâmetro)	++	++	++	+++	-	+
Coco-bacilos	+	+	+	++	++	+
Bacilos em pares	+	+	-	-	+++	+
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	-	++	-	-	-
Bacilos retos	+++	+++	+++	++	++	++
Filamentos finos	++	+++	++	+	+	++
Filamentos	+++	+	-	-	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 µm de comprimento)	+++	++	+++	+	++	+
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	+	-	+++	+	+++	+++
Domínio <i>Archaea</i>						
Bacilos fluorescentes	++	+++	+++	++	+	-
Cocos fluorescentes	-	-	-	-	++	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	++	-	++	+++	+
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	+	+	+	+	+
Protozoários	-	++	-	-	+	+
Cistos	+	-	-	++	+++	-

PSR – primeiro segmento do reator, USR – último segmento do reator.

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

*Análise microbiológica da biomassa esbranquiçada suspensa formada na entrada do reator durante operação com etanol.

Os tipos morfológicos foram praticamente mantidos em ambas as fases do experimento, com presença de coco-bacilos, bacilos, filamentos finos, vibrios, bacilos fluorescentes e *Methanosaeta* sp..

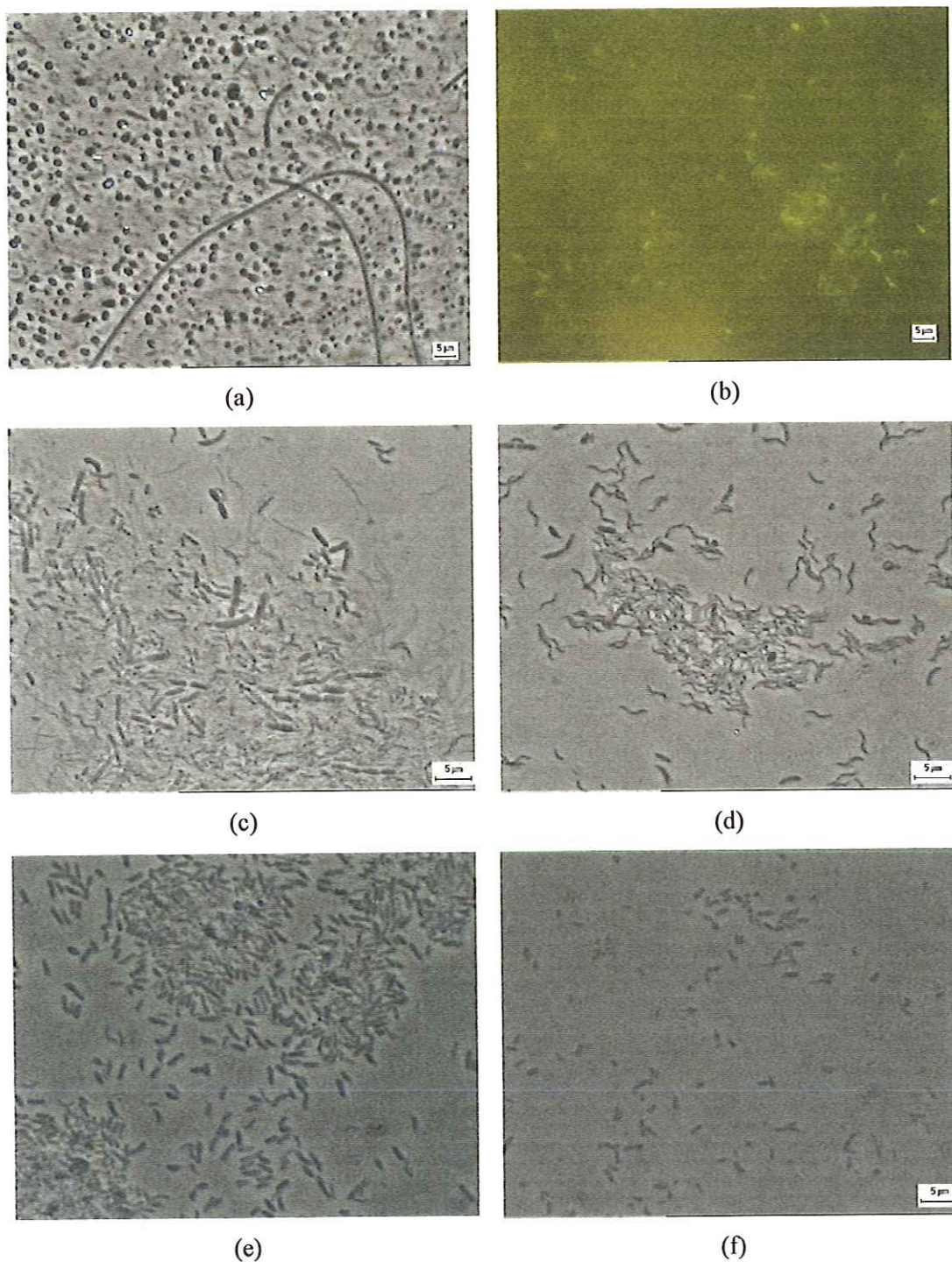


Figura 5.11: Fotomicrografias em contraste de fase de bactérias e arqueas metanogênicas presentes no biofilme do reator com adição de nitrato. (a) cocos e coco-bacilos, primeira fase. (b) bacilos fluorescentes, primeira fase (c) filamentos finos, segunda fase. (d) vibrios, segunda fase. (e) bacilos retos, segunda fase - NMP diluição 10^{-1} . (f) bacilos em pares, segunda fase - NMP diluição 10^{-4} .

O predomínio de bactérias redutoras de sulfato (BRS), durante a operação do reator, mostra a versatilidade nutricional e metabólica desses organismos. Na ausência de sulfato ou outros aceptores de elétrons inorgânicos, vários tipos de BRS podem crescer pela fermentação de compostos orgânicos levando a succinato, acetato, dióxido de carbono e em alguns casos, propionato. As BRS podem, facultativamente, reduzir nitrato, levando-o ao íon amônio e não a nitrogênio molecular (Widdel, 1988). Dessa forma, acredita-se que as bactérias *Desulfovibrio* sp. tenham apresentado metabolismos distintos durante a operação dos reatores; fermentação de compostos orgânicos e, neste caso, principalmente, redução de nitrato utilizando uma variedade de doadores de elétrons, com a possível formação de amônia.

A quantificação celular mostrou que a concentração de bactérias anaeróbias decresceu ao longo do período experimental, bem como ao longo do reator. Porém, a concentração de arqueas metanogênicas manteve-se estável no reator, ao final da segunda fase. O decréscimo de arqueas metanogênicas foi significativo quando comparado à biomassa total. Esses organismos representaram menos que 0,2 % dos organismos anaeróbios totais no biofilme no reator (Tabela 5.16).

Tabela 5.16: NMP durante o período de operação do reator com adição de nitrato.

Concentração (NMP organismos/mL)	Final da fase de adaptação		Final de segunda fase	
	PSR	USR	PSR	USR
Bactérias anaeróbias	$2,4 \times 10^9$	$2,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^6$
Arqueas metanogênicas	7×10^5	5×10^5	$1,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$

PSR – primeiro segmento do reator, USR – último segmento do reator.

As Tabelas 5.17 e 5.18 apresentam as morfologias microbianas observadas em amostras de NMP ao final da fase de adaptação e da segunda fase. As análises de microscopia de contraste de fase e fluorescência mostraram, de modo geral, a presença de bacilos, vibrios, bacilos fluorescentes e *Methanosaeta* sp..

Tabela 5.17: Morfologias microbianas observadas no NMP na fase de adaptação do reator com adição de nitrato.

Morfologias	10^{-1}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-9}
Primeiro segmento do reator						
Domínio Bactéria						
Cocos (1,5 – 1,7 μm de diâmetro)	++	-	-	-	-	-
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	++	++	-	-	-
Bacilos retos	+++	+	+++	+	+	+++
Filamentos finos	++	+	+	-	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 μm de comprimento)	+	+	+	+	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 μm de comprimento)	+	+++	+++	+++	+++	-
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	+++	++	++	++	+	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	-	-	-	-	-
Morfologias	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Último segmento do reator						
Domínio Bactéria						
Bacilos com pontuações nas extremidades	++	-	-	-	++	-
Bacilos retos	++	-	+++	+++	+++	++
Filamentos finos	-	-	++	-	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 μm de comprimento)	++	++	++	++	+++	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 μm de comprimento)	++	+++	++	++	+++	+++
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	+++	+++	++	++	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	+	-	-	-	-

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

Tabela 5.18: Morfologias microbianas no NMP na 2ª fase do reator com adição de nitrato.

Morfologias	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Primeiro segmento do reator						
Domínio Bactéria						
Cocos (1,5 – 1,7 µm de diâmetro)	++	-	-	-	-	-
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	-	-	+++	+++	+++
Bacilos retos	+++	++	+++	+++	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 µm de comprimento)	+	++	+	+	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	+++	+++	+++	++	-	-
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	+	+++	++	-	-	-
Cocos fluorescentes	+++	+++	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	+	-	-	-	-	-
Morfologias	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
Último segmento do reator						
Domínio Bactéria						
Bacilos em pares	-	-	+++	+++	++	
Bacilos com pontuações nas extremidades	++	-	-	-	+++	
Bacilos retos	++	++	+++	+++	+++	
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 µm de comprimento)	-	+++	+	+	+	
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	+++	+++	+	+	+	
Domínio Archaea						
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	++	++	-	-	
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	+	-	-	-	

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

5.2.3 Reator com adição de sulfato

Primeiramente, adaptou-se a biomassa à água residuária sintética (Tabela 4.1) com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 5,0 horas. Após 30 dias de operação, foi adicionado sulfato à água residuária sintética na relação DQO / SO₄²⁻ igual a 5, durante os cinco meses posteriores. A Tabela 5.19 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluyente ao reator após atingir o equilíbrio dinâmico aparente.

Tabela 5.19: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluyente durante a fase de adaptação do reator com adição de sulfato.

Parâmetros	Afluyente			Efluyente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
DQO _b (mg/L)	499 ± 117	262	847	93 ± 24	58	169
DQO _f (mg/L)	377 ± 101	150	498	69 ± 10	51	94
AB (mg CaCO ₃ /L)	117 ± 39	49	168	197 ± 47	119	273
AVT (mgHac/L)	46 ± 11	25	73	19 ± 5	8	35
Sulfato (mgSO ₄ ²⁻ /L)	114 ± 23	87	158	82 ± 18	52	104
pH		6,4	8,4		7,4	8,3

A remoção de DQO_b foi em torno de 81 % e a redução de sulfato manteve-se em aproximadamente 28 %.

O TDH foi aumentado para aproximadamente 13,5 horas, a fonte de lipídios foi retirada e a solução de BTEX foi adicionada ao substrato sintético. Na 1ª fase, o reator foi operado com etanol como co-solvente por 75 dias, com concentrações médias de BTEX de 1,9 mg/L (1ª sub-fase) e 6,0 mg/L (2ª sub-fase) de cada composto. A Tabela 5.20 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente ao reator após atingir o equilíbrio dinâmico aparente nas duas concentrações utilizadas.

Tabela 5.20: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluyente e efluente ao reator com adição de sulfato durante a 1ª fase de operação com etanol como co-solvente.

Parâmetros	Afluyente			Efluente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
1ª Sub-fase						
Benzeno (mg/L)	1,9 ± 0,8	1,1	3,2	< LD	-	-
Tolueno (mg/L)	2,1 ± 0,8	0,9	3,4	< LD	-	-
Etilbenzeno (mg/L)	1,9 ± 1,0	0,3	3,5	< LD	-	-
(m+p)-xilenos (mg/L)	3,6 ± 1,5	1,1	5,9	-	-	-
o-xileno (mg/L)	1,8 ± 0,8	0,5	3,1	-	-	-
DQO _b (mg/L)	588 ± 52	518	668	72 ± 10	59	85
AB (mg CaCO ₃ /L)	127 ± 20	100	146			
AVT (mgHac/L)	56 ± 2	54	58			
Sulfato (mgSO ₄ ⁼ /L)	129 ± 13	115	150	120 ± 29	90	150
pH		6,8	8,6		7,7	8,1
2ª Sub-fase						
Benzeno (mg/L)	9,3 ± 1,6	6,9	11,7	< LD	-	-
Tolueno (mg/L)	7,0 ± 1,6	5,1	9,0	< LD	-	-
Etilbenzeno (mg/L)	5,2 ± 0,9	4,3	6,6	< LD	-	-
(m+p)-xilenos (mg/L)	10,3 ± 2,3	7,8	13,3	-	-	-
o-xileno (mg/L)	6,0 ± 1,4	4,3	7,8	-	-	-
DQO _b (mg/L)	2020 ± 377	1016	2504	Variável		
Sulfato (mgSO ₄ ⁼ /L)	470 ± 68	320	560	Variável		
pH		7,1	8,7			

LD é o limite de detecção.

As concentrações de benzeno, de tolueno e de etilbenzeno no efluente foram menores que 0,1 mg/L e não foram detectados isômeros do xileno ao longo de todo o experimento. O limite de detecção foi considerado igual a 0,1 mg/L, pois ainda não havia sido feito reta de calibração para concentrações menores.

A carga de choque orgânica devido ao aumento na concentração de etanol também ocorreu no reator no 34º dia de operação devido ao aumento da concentração de BTEX e etanol, elevando a DQO_b média afluyente de 588 ± 52 mg/L para 2020 ± 377 mg/L. Para manter a relação DQO / SO₄⁼ igual a 5, a concentração de sulfato foi aumentada para 470 ± 68 mg/L.

O efeito da carga orgânica, também, foi prontamente observada com queda do pH no efluente para 5,4, devido ao elevado acúmulo de ácido acético, atingindo concentração de 1023 mg/L. Outros ácidos formados apresentaram baixas concentrações, menores que 29 mg/L de ácido propiônico, 5 mg/L de ácido butírico, 6 mg/L de ácido iso-butírico e 7 mg/L de ácido iso-valérico. Foi adicionado bicarbonato de sódio (3,0 g/L) ao substrato sintético para correção do pH no 39º dia de operação. A concentração de ácido acético efluente não decresceu substancialmente, permanecendo em torno de 763 mg/L e a DQO_b média efluente de 867 ± 233 mg/L. O sulfato, cuja remoção era modesta (28 %), foi completamente removido nesse período, provavelmente devido a oxidação incompleta do etanol a acetato e sulfeto de hidrogênio (H₂S) pelas bactérias redutoras de sulfato.

Após o 42º dia do aumento na concentração de DQO_b (76º dia de operação), o etanol foi retirado da água residuária sintética e o sistema recuperou sua condição prévia com relação aos parâmetros monitorados após 12 dias da retirada do etanol do substrato. A concentração de ácido acético efluente caiu para 3 mg/L, o pH foi re-estabelecido em 8,2, já sem excesso de bicarbonato de sódio, a DQO_b efluente estabilizou em 95 mg/L e a remoção de sulfato retornou aos níveis anteriores de 28 %. A Figura 5.12 apresenta os dados de concentração dos ácidos voláteis e DQO_b efluente durante a carga de choque orgânica.

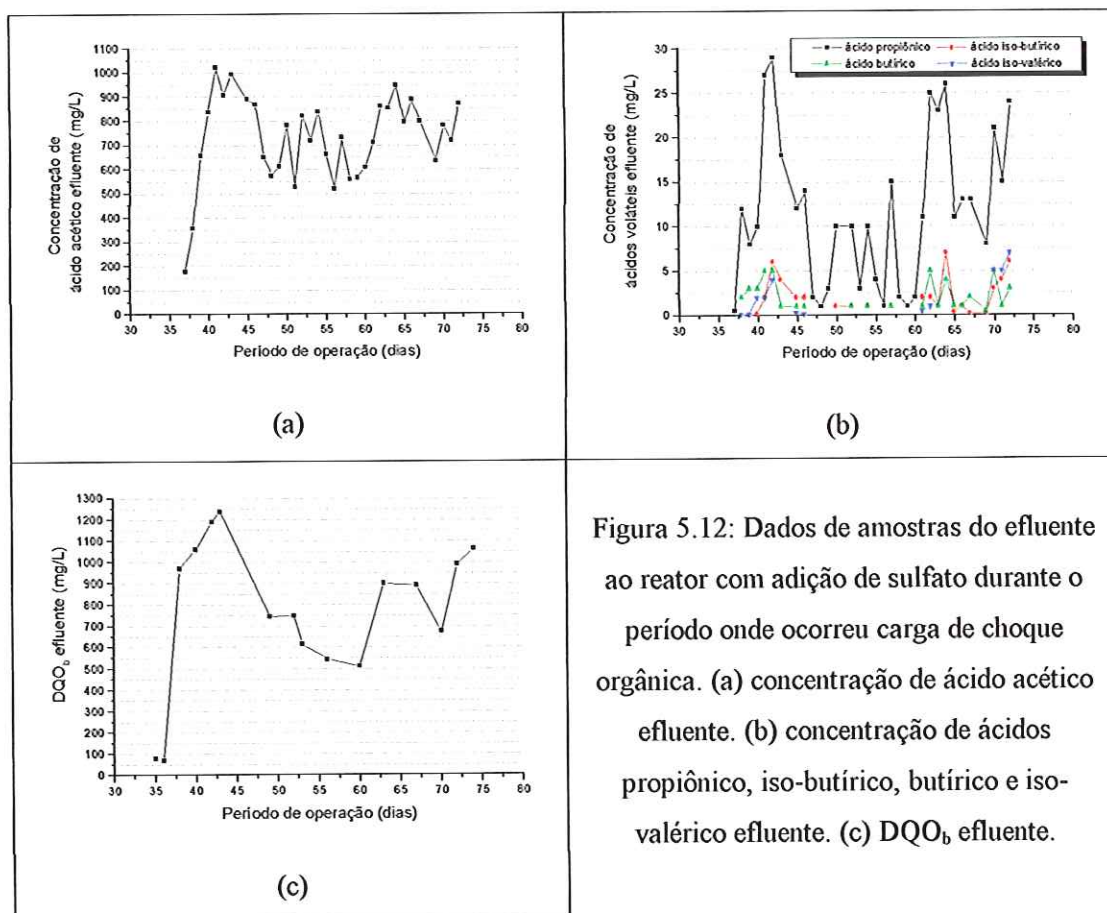


Figura 5.12: Dados de amostras do efluente ao reator com adição de sulfato durante o período onde ocorreu carga de choque orgânica. (a) concentração de ácido acético efluente. (b) concentração de ácidos propiônico, iso-butírico, butírico e iso-valérico efluente. (c) DQO_b efluente.

Na 2ª fase, etanol foi substituído por detergente comercial. A Tabela 5.21 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluente. O reator atingiu condições estáveis com o efluente apresentando concentração média de BTEX menor que 0,23 mgBTEX/L, DQO_b de 126 ± 11 mg/L, AB de 151 mg CaCO₃/L, AVT de 20 mg Hac/L e pH igual a 8,2.

Tabela 5.21: Parâmetros físico-químicos da água residuária sintética afluente ao reator com adição de sulfato da 2ª fase de operação com detergente comercial como co-solvente.

Parâmetros	Afluente		
	Média	Mínimo	Máximo
Benzeno (mg/L)	$13,1 \pm 5,8$	7,0	28,4
Tolueno (mg/L)	$9,1 \pm 5,3$	2,6	23,8
Etilbenzeno (mg/L)	$6,9 \pm 5,1$	1,1	20,9
(m+p)-xilenos (mg/L)	$13,9 \pm 9,8$	1,8	40,5
o-xileno (mg/L)	$7,7 \pm 5,0$	1,0	21,2
DQO _b (mg/L)	759 ± 55	667	832
AB (mg CaCO ₃ /L)	92 ± 27	57	125
AVT (mgHac/L)	63 ± 12	43	77
Sulfato (mgSO ₄ ⁼ /L)	195 ± 35	170	265
pH		6,5	7,6

Posteriormente, alterou-se o TDH para 5,3 horas e o reator foi operado por 53 dias. A DQO_b efluente estabilizou em 207 ± 39 mg/L e a AB em 245 mg CaCO₃/L. A concentração de AVT permaneceu em 21 mg Hac/L e pH em 8,0. A redução de sulfato se manteve em aproximadamente 20 %. As concentrações de BTEX médias no efluente foram de 93 µg benzeno/L, 79 µg tolueno/L, 139 µg etilbenzeno/L, 113 µg (m+p)-xilenos/L e 32 µg o-xileno/L.

Ao final do período de operação, as concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) nas matrizes de poliuretano foram 1,02 g/g espuma e 0,64 g/g espuma, respectivamente, no primeiro segmento do reator e 1,02 g/g espuma e 0,55 g/g espuma, respectivamente, no último segmento do reator.

Morfologias dos organismos presentes no biofilme

A Tabela 5.22 e a Figura 5.13 mostram as morfologias observadas no biofilme amostradas no primeiro (PSR) e último (USR) segmento do reator.

Tabela 5.22: Morfologias microbianas em amostras ao final de cada fase de operação do reator com adição de sulfato.

Morfologias	Fase de adaptação		Primeira fase		Segunda fase	
	PSR	USR	PSR*	USR	PSR	USR
Domínio Bactéria						
Cocos (1,5 – 1,7 µm de diâmetro)	++	+	-	+	-	-
Cocos em cadeia	+++	+++	-	-	-	-
Coco-bacilos	++	+	-	+++	-	+
Bacilos em pares	-	-	-	-	++	-
Bacilos retos	+++	++	++	++	+++	+++
Filamentos finos	++	+	+	+	++	++
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 µm de comprimento)	++	+++	++	++	-	+
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	+	+	+	-	+++	+++
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	+	+	+++	+	++	+
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	+++	-	-	+++	+
<i>Methanosarcina</i> sp.	++	+	-	-	++	++
Protozoários	-	+	-	-	-	-
Cistos	++	+	-	-	+	-

PSR – primeiro segmento do reator, USR – último segmento do reator.

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

*Análise microbiológica da biomassa esbranquiçada suspensa formada na entrada do reator durante operação com etanol.

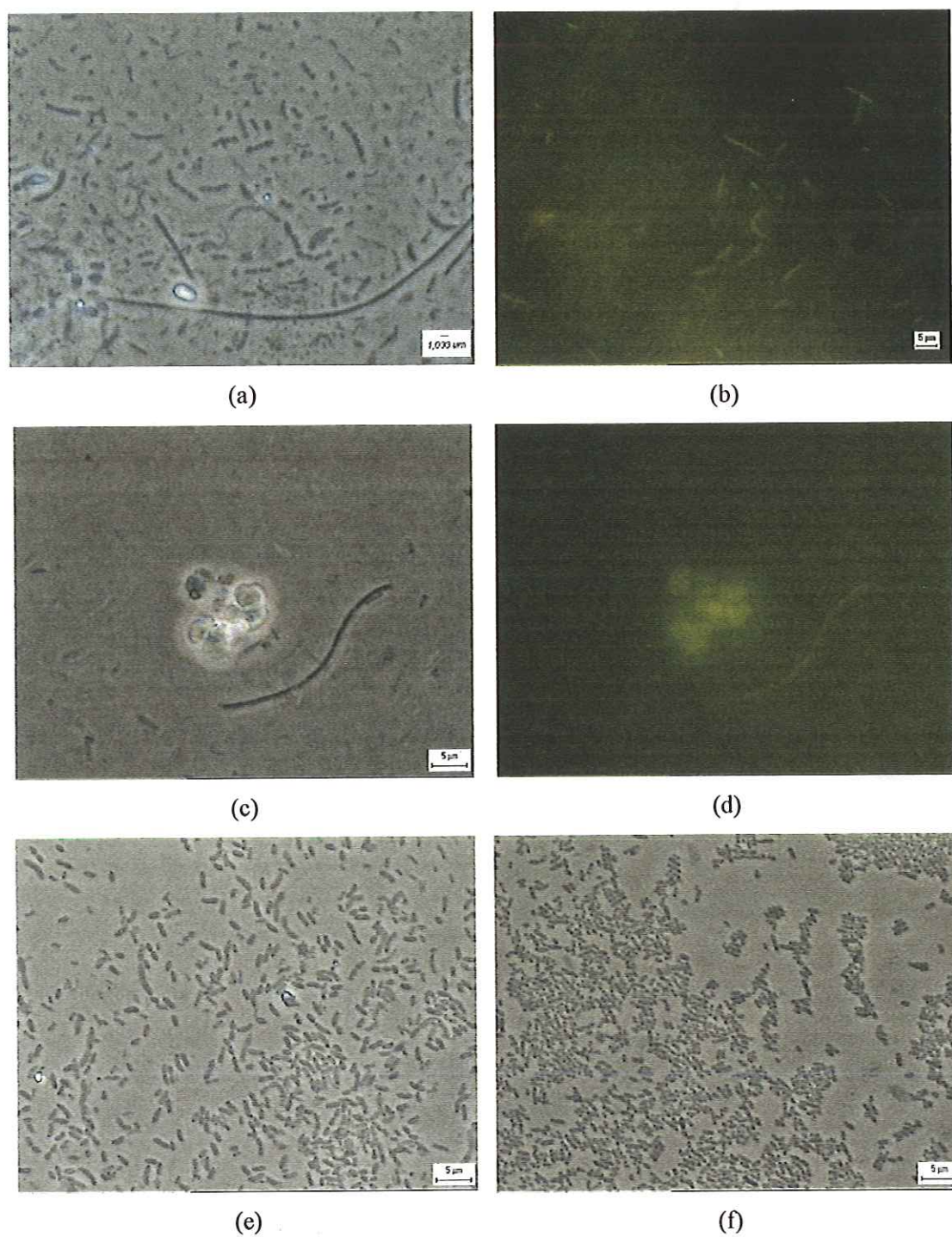


Figura 5.13: Fotomicrografias em contraste de fase de bactérias e arqueas metanogênicas presentes no biofilme do reator com adição de sulfato. (a) cocos em cadeia, fase de adaptação. (b) bacilos fluorescentes, primeira fase (c) e (d) arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina*, segunda fase. (e) bacilos retos e em pares, segunda fase – NMP diluição 10^{-5} . (f) bacilos com pontuações nas extremidades, segunda fase - NMP diluição 10^{-7} .

Na fase de adaptação, a presença de arqueas metanogênicas acetoclásticas (*Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.) no biofilme foi significativa. Outras morfologias, cocos, bacilos, filamentos finos, relacionadas com bactérias anaeróbias foram observadas, incluindo-se bactérias redutoras de sulfato (BRS), *Desulfovibrio* sp..

Os tipos morfológicos foram praticamente mantidos na 1ª fase experimental, com predomínio de coco-bacilos, bacilos, filamentos finos e vibrios.

Na presença de sulfato, BRS são capazes de oxidar completamente vários intermediários gerados no processo de degradação anaeróbia, como compostos aromáticos, malato, succinato, fumarato, álcoois, lactato, ácidos graxos, butirato, propionato, acetato, hidrogênio molecular, em dióxido de carbono (CO₂) e sulfeto de hidrogênio (H₂S). Há espécies de BRS que não apresentam o ciclo do ácido tricarboxílico e realizam a oxidação incompleta, levando a acetato e H₂S (Lens *et al.*, 1998). Embora o sulfato tenha sido completamente convertido por BRS na presença de etanol, a oxidação incompleta do substrato prevaleceu com formação de acetato (763 mg/L), o qual não foi utilizado posteriormente. Apesar da intensa acetogênese nessa fase, não foram observadas arqueas metanogênicas acetoclásticas nas amostras do biofilme, mas somente bacilos fluorescentes, que são, em geral, associados à atividade metanogênica hidrogenotrófica. A presença dessas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas juntas com BRS foi inesperada, pois, na competição por hidrogênio, as BRS são favorecidas. Lens *et al.* (1998) citam que em reatores anaeróbios, BRS competem e excluem arqueas metanogênicas hidrogenotróficas na presença de sulfato, pois o ganho energético com o consumo de hidrogênio molecular é maior, bem como a afinidade pelo substrato, a velocidade de crescimento e a produção celular.

A ausência de arqueas metanogênicas acetoclásticas foi também inesperada, devido à disponibilidade de acetato. Provavelmente a produção de sulfeto proveniente da redução de sulfato inibiu seu crescimento. O sulfeto de hidrogênio é tóxico para as bactérias acetogênicas, para as BRS, mas principalmente para as arqueas metanogênicas. As concentrações de sulfeto que podem inibir os organismos variam de acordo com as características do sistema (células suspensas ou imobilizadas, pH, relação DQO / SO₄²⁻) e tem-se estabelecido que concentrações maiores que 150 mgH₂S/L podem causar falhas no processo de degradação anaeróbia (Lens *et al.*, 1998). Como todo o sulfato afluente (470 ± 68 mgSO₄²⁻/L) foi convertido no reator, a concentração de H₂S formado, sem considerar sua dissociação (H₂S_(l) ↔ HS⁻ + H⁺) na faixa de pH entre 6 e 8, seria de aproximadamente 166 mgH₂S/L, extremamente tóxico para as arqueas metanogênicas mesmo imobilizadas.

Na 2ª fase experimental, houve crescimento favorável de bacilos em pares e vibrios, os quais apresentaram metabolismo fermentativo, pois a redução de sulfato se manteve em 30 %. Além do mais, arqueas metanogênicas foram re-estabelecidas no reator.

Semelhante aos resultados obtidos nos outros reatores, a quantificação celular mostrou o decréscimo na concentração de bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas no biofilme ao final do período operacional. As arqueas metanogênicas representaram menos que 0,02 % dos organismos anaeróbios totais no biofilme no reator (Tabela 5.23).

Tabela 5.23: NMP durante o período de operação do reator com adição de sulfato.

Concentração (NMP organismos/mL)	Final da fase de adaptação		Final de segunda fase	
	PSR	USR	PSR	USR
Bactérias anaeróbias	$2,4 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^7$
Arqueas metanogênicas	$7,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$

PSR – primeiro segmento do reator, USR – último segmento do reator.

As Tabelas 5.24 e 5.25 apresentam as morfologias microbianas observadas em amostras de NMP ao final da fase de adaptação e da segunda fase. As análises de microscopia de contraste de fase e fluorescência destacam a presença de cocos, bacilos, vibrios e *Methanosaeta* sp..

Tabela 5.24: Morfologias microbianas observadas no NMP na fase de adaptação do reator com adição de sulfato.

Morfologias	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-8}	10^{-11}
Primeiro segmento do reator					
Domínio Bactéria					
Cocos (1,5 – 1,7 μm de diâmetro)	-	-	-	-	++
Cocos em cadeia	-	-	-	+	++
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	++	+	-	-
Bacilos retos	++	+++	++	++	++
Filamentos	+	-	-	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 μm de comprimento)	++	+	+	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 μm de comprimento)	+	++	+	-	-
Domínio Archaea					
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	++	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	+	-	+	-	-
Cistos	-	++	-	-	-
Morfologias	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-8}	
Último segmento do reator					
Domínio Bactéria					
Cocos (1,5 – 1,7 μm de diâmetro)	+	+	-	++	
Coco-bacilos	-	-	-	++	
Bacilos com pontuações nas extremidades	+	+	-	-	
Bacilos retos	+++	++	++	+++	
Filamentos	-	+	-	-	
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 μm de comprimento)	-	+	++	-	
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 μm de comprimento)	+	+++	++	-	
Domínio Archaea					
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	++	+	-	

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

Tabela 5.25: Morfologias microbianas observadas no NMP na 2ª fase do reator com adição de sulfato.

Morfologias	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰
Primeiro segmento do reator						
Domínio Bactéria						
Bacilos em pares	-	+	+++	+++	+	+
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	-	++	+++	+++	+++
Bacilos retos	+++	+++	+	++	+++	+++
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	+++	++	+++	++	-	-
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	++	+++	+	+	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	-	-	-	-	-
Morfologias	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Último segmento do reator						
Domínio Bacteria						
Bacilos em pares	-	-	+++	+++	-	-
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	+++	++	+++	+++	+++
Bacilos retos	+++	++	+	+++	++	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 µm de comprimento)	-	-	-	+	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	++	++	+	++	+	-
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	++	-	-	+	+	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	++	+	-	-	-

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

5.2.4 Comparação dos reatores

Os reatores foram capazes de remover BTEX nas concentrações testadas (1,5 mg/L a 8,8 mg/L) com tempo de detenção hidráulica de 13,5 horas. As concentrações de BTEX utilizadas não foram tóxicas aos organismos presentes no biofilme. Sierra-Alvarez & Lettinga (1991) obtiveram valores de IC₅₀ (concentração de composto que causa inibição de 50 % da atividade metanogênica) para metanogênese acetoclástica de 449,0 mg/L para o o-xileno a 1477,1 mg/L para o benzeno. Edwards & Grbic-Galic (1994) observaram que tolueno e o-xileno foram tóxicos para cultura enriquecida metanogênica em concentrações acima de 165 mg/L e 74 mg/L, respectivamente. Elmen *et al.* (1997) estimaram a constante de inibição pelo tolueno de 92,1 mg/L sob condições de redução de nitrato. Segundo Shim & Yang (1999) células imobilizadas toleraram concentrações maiores de BTEX do que células suspensas.

Para facilidade de comparação dos resultados de operação dos três reatores são apresentados na Tabela 5.26 os valores médios de alguns parâmetros analisados.

Tabela 5.26: Valores médios de parâmetros analisados dos três reatores.

Parâmetros	Afluente			Efluente		
	Reator controle	Reator nitrato	Reator sulfato	Reator controle	Reator nitrato	Reator sulfato
Fase de adaptação (sem BTEX)						
TDH = 5,0 h						
DQO _b (mg/L)	492	501	499	95	92	93
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)		24			6	
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ /L)					6	
Sulfato (mgSO ₄ ⁼ /L)			114			82
1ª fase (água residuária sintética + solução etanólica de BTEX)						
TDH = 13,5 h						
1ª sub-fase						
DQO _b (mg/L)	612	590	588	67	81	72
BTEX (mg/L)	1,5	1,5	1,9	< 0,10	< 0,10	< 0,10
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)		30			6	
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ /L)					8	
Sulfato (mgSO ₄ ⁼ /L)			129			120
2ª sub-fase						
DQO _b (mg/L)	1968	1827	2020(524)*	131	121	867 (95)*
BTEX (mg/L)	6,0	5,0	6,0	< 0,10	< 0,10	< 0,10
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)		60			-	
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ /L)					-	
Sulfato (mgSO ₄ ⁼ /L)			470(320)*			-(240)*
2ª fase (água residuária sintética + solução de BTEX em detergente comercial)						
TDH = 13,5 h						
DQO _b (mg/L)	797	731	759	161	119	126
BTEX (mgBTEX/L)	8,0	8,8	8,4	< 0,30	< 0,32	< 0,23
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)		30			-	
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ /L)					-	
Sulfato (mgSO ₄ ⁼ /L)			195			140
2ª fase (água residuária sintética + solução de BTEX em detergente comercial)						
TDH = 5,3 h						
DQO _b (mg/L)	797	731	759	242	211	207
BTEX (mgBTEX/L)	8,0	8,8	8,4	0,59	0,46	0,45
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ /L)		30			4	
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ /L)					-	
Sulfato (mgSO ₄ ⁼ /L)			195			156

*O valor entre parênteses refere-se a operação após a retirada do etanol do substrato.

Em relação ao reator controle, a adição de nitrato estimulou a degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno em mais de 40 % e estimulou a degradação de o-xileno em 20 %. A degradação de (m+p)-xilenos não foi estimulada. Alguns estudos (Kuhn *et al.*, 1988; Schocher *et al.*, 1991) relatam que o nitrito formado poderia ser tóxico para a biomassa que degrada BTEX. Élmen *et al.* (1997) obtiveram constantes de inibição pelo nitrato e pelo nitrito de 582,8 mg/L e 552,0 mg/L, respectivamente, na degradação do tolueno. A maior concentração de nitrato adicionada durante o período experimental foi de

60 ± 7 mgN-NO₃⁻/L, sendo a desnitrificação completa na 1ª fase e quase completa (87 %) na 2ª fase, e não foi observado nitrito nas amostras do efluente. Dessa forma, não houve toxicidade devido ao nitrato ou nitrito. Como outras fontes de carbono foram usadas como doadores de elétrons, a interpretação do papel do nitrato na degradação específica de BTEX foi dificultada.

De forma semelhante, comparando-se com o reator controle, a adição de sulfato estimulou a degradação de benzeno, tolueno e o-xileno em 30 %. Etilbenzeno e (m+p)-xilenos foram estimulados em 16 %. A redução incompleta de sulfato observada, permanecendo em 30 %, aproximadamente, não permite inferir sobre o papel do sulfato no processo. Provavelmente, há também uma relação ótima BTEX / sulfato para degradação de BTEX na presença de sulfato. Weiner *et al.* (1998) também observaram que a adição de sulfato, em microcosmos contendo sedimento metanogênico e água subterrânea provenientes de aquífero que já degradava benzeno, estimulou a degradação de benzeno com produção de CO₂ somente. Os autores concluíram que a adição de sulfato estimulou a degradação de benzeno devido às pequenas quantidades de sulfato presentes no sedimento, que permitiram a manutenção de comunidades microbianas redutoras de sulfato cuja atividade foi estimulada com o aumento da disponibilidade de sulfato.

Benzeno tem sido reportado como o menos biodegradável dos compostos BTEX ou mesmo não degradável por organismos nativos de aquíferos sob condições anaeróbias (Langenhoff *et al.*, 1996; Kao & Borden, 1997). Em alguns trabalhos, a degradação de benzeno foi mais lenta na presença de compostos mais facilmente degradáveis, como tolueno (Edwards & Grbic-Galic, 1992; Nales *et al.*, 1998). Segundo Alvarez & Vogel (1991) compostos individuais poderiam estimular ou inibir a degradação de outros compostos de BTEX. A presença de um dado composto poderia estimular a degradação de outro, pela indução de enzimas, ou atuando como substrato primário e estimulando o crescimento microbiano que aumentaria o cometabolismo de um outro composto. Por outro lado, poderia inibir devido à toxicidade, repressão catabólica, inibição competitiva por enzimas ou depleção de aceptores de elétrons. Neste estudo, todos os compostos BTEX foram degradados simultaneamente.

Em vários trabalhos utilizando nitrato (Davis *et al.*, 1994; Häner *et al.*, 1995; Kazumi *et al.*, 1997) não foi observado o metabolismo do benzeno, com conclusões especulativas de que culturas desnitrificantes não possuíam habilidade em degradá-lo. Nales *et al.* (1998) mostraram que comunidades microbianas nativas provenientes de vários locais foram capazes de degradar benzeno anaerobiamente, mesmo em ambiente nunca exposto. Dos seis sítios estudados em quatro foi observada degradação de benzeno sob condições de

redução de sulfato, de nitrato e de Fe (III). Em média, 80 % de benzeno marcado foi recuperado como $^{14}\text{CO}_2$. Burland & Edwards (1999) observaram a oxidação de benzeno a CO_2 ligada à redução de nitrato, em culturas enriquecidas. Ensaio com carbono marcado mostraram que 92 % a 95 % do ^{14}C -benzeno foi recuperado como $^{14}\text{CO}_2$ e que o restante 5 % a 8%, na fração não volátil, presumidamente como biomassa. A degradação de benzeno ocorreu simultaneamente à redução de nitrato, sendo 10 mols de nitrato consumido por mol de benzeno degradado. Coates *et al.* (2001) isolaram duas linhagens de *Dechloromonas* que oxidam benzeno a CO_2 , na presença de nitrato. As linhagens RCB e JJ apresentam 98,1 % de similaridade na seqüência filogenética e ambas são membros da subdivisão β da *Proteobacteria*.

Bioreatores tratando águas residuárias são ecossistemas complexos que contém muitas espécies de organismos. Em tais culturas mistas, várias associações sintróficas ou competições microbianas podem ocorrer de acordo com a dinâmica do sistema, apresentando resultados completamente distintos dos observados em frascos de soro. Infelizmente, há poucos trabalhos na literatura sobre a degradação de BTEX em reatores. Chaudhuri & Wiesmann (1996) operaram reator metanogênico, com biomassa suspensa e escoamento contínuo, para degradação de tolueno (150 mg/L). Para TDH de 12 horas, a remoção de tolueno foi de 83 %. Shim & Yang (1999) operaram reator em batelada com células imobilizadas de co-cultura de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*, sob condições hipóxicas, onde a degradação anaeróbia desempenhou um papel importante no reator. A degradação de 90 % de benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno (150 mg/L cada) foi obtida em 20 horas.

Frente à sobrecarga de choque orgânica, os reatores controle e com adição de nitrato foram capazes de absorver os efeitos da carga orgânica, restaurando a eficiência inicial após um mês. No reator com adição de nitrato, não houve queda de pH no efluente, como foi observado nos reatores controle e com adição de sulfato, e o melhor desempenho foi atribuído, em parte, à geração de alcalinidade durante o processo de desnitrificação, melhorando as condições de tamponamento do sistema. Para cada mg de N-NO_3^- reduzido, produz-se 3 mg de alcalinidade como CaCO_3 (Metcalf & Eddy, Inc., 1991). O reator com adição de sulfato atingiu outro estado de equilíbrio dinâmico aparente, apresentando elevados valores de ácido acético e DQO efluente, mas com elevada remoção de BTEX.

A quantificação celular mostrou queda da concentração de organismos anaeróbios ao longo dos reatores. O reator operado com sulfato apresentou a maior concentração de bactérias anaeróbias ($2,4 \times 10^7$ organismos/mL – $2,4 \times 10^{11}$ organismos/mL) porém as arqueas metanogênicas ($4,0 \times 10^3$ organismos/mL – $7,0 \times 10^4$ organismos/mL) representaram menos de

0,02 % dos organismos anaeróbios totais. O reator controle apresentou valor intermediário de concentração de bactérias anaeróbias ($6,1 \times 10^6$ organismos/mL – $2,4 \times 10^8$ organismos/mL) mas com maior concentração de arqueas metanogênicas ($9,5 \times 10^3$ organismos/mL – $1,3 \times 10^6$ organismos/mL) que representaram menos de 0,5 % dos organismos totais nesse reator. O reator onde se adicionou nitrato apresentou a menor concentração de bactérias anaeróbias ($2,4 \times 10^6$ organismos/mL – $2,4 \times 10^9$ organismos/mL) e arqueas metanogênicas ($1,7 \times 10^3$ organismos/mL – $7,0 \times 10^5$ organismos/mL), que representaram menos de 0,2 % dos organismos totais.

A partir dos resultados obtidos, optou-se em prosseguir o trabalho, estudando a degradação de BTEX em condições fermentativa e metanogênica, pois apesar do nitrato e sulfato terem estimulado a degradação de BTEX, o desempenho geral observado não apresentou diferenças significativas.

5.3 Segunda etapa experimental

Nessa etapa, dois reatores RAHLF em escala maior (100 cm de comprimento e 5,04 cm de diâmetro) foram operados, sob condições fermentativa e metanogênica, utilizando-se água residuária sintética (Tabela 4.1) e solução etanólica de BTEX em um reator e solução de BTEX em detergente comercial em outro. O objetivo desta etapa foi obter parâmetros cinéticos de degradação de BTEX.

5.3.1 Reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX

O reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 11,4 horas, foi operado inicialmente utilizando-se, como substrato, somente água residuária sintética (Tabela 4.1). O sistema atingiu o equilíbrio dinâmico aparente em 10 dias de operação, sendo operado por 50 dias nessas condições. Óleo de soja e detergente comercial foram retirados da água residuária.

Passou-se, então, a adicionar solução etanólica de BTEX à água residuária sintética por 65 dias, com aumento progressivo de concentrações de BTEX: 3,0 mg/L, 7,0 mg/L e 10,0 mg/L, após estabilização de cada fase do sistema. A Tabela 5.27 apresenta os valores dos parâmetros monitorados no afluente e no efluente do reator durante toda a 2ª etapa. Os dados do efluente foram considerados após o sistema ter alcançado o equilíbrio dinâmico aparente.

Tabela 5.27: Parâmetros físico-químicos do afluente e efluente ao reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

Parâmetros	Afluente			Efluente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
Fase de adaptação (sem BTEX)						
DQO _b	573 ± 34	505	615	41 ± 9	33	52
DQO _r	399 ± 13	376	412	34 ± 6	25	45
AB (mgCaCO ₃ /L)	80 ± 12	67	101	234 ± 10	216	246
AVT (mgHac/L)	62 ± 10	48	79	13 ± 2	10	17
pH		6,3	7,0		7,0	7,2
2ª etapa						
Benzeno (mg/L)	3,3 ± 1,0	1,8	5,3	0,6 ± 0,2	0,3	0,8
Tolueno (mg/L)	3,2 ± 1,0	1,8	5,3	0,4 ± 0,2	0,3	0,6
Etilbenzeno (mg/L)	2,9 ± 1,1	1,5	5,2	0,3 ± 0,1	0,2	0,5
(m+p)-xilenos	5,9 ± 2,2	3,1	10,6	0,4 ± 0,2	0,1	0,7
o-xileno	3,1 ± 1,0	1,7	5,2	0,3 ± 0,1	0,2	0,4
DQO _b	733 ± 25	698	764	31 ± 4	26	38
AB (mgCaCO ₃ /L)	99 ± 30	68	137	218 ± 5	213	227
AVT (mgHac/L)	42 ± 15	25	59	12 ± 4	7	17
pH		6,3	7,0		7,0	7,2
Benzeno (mg/L)	7,2	6,3	8,2	0,7	0,5	0,9
Tolueno (mg/L)	6,8	5,9	7,7	0,5	0,4	0,6
Etilbenzeno (mg/L)	6,8	5,8	7,9	0,2	0,1	0,4
(m+p)-xilenos	13,7	11,4	16,0	0,3	0,3	0,4
o-xileno	6,8	5,7	7,9	0,3	0,3	0,5
DQO _b	1243	1243	1244	36	35	37
AB (mgCaCO ₃ /L)	99			224		
AVT (mgHac/L)	54	42	66	11	8	14
pH		6,3	7,2		6,9	7,0
Benzeno (mg/L)	9,4 ± 1,9	5,6	12,4	1,8 ± 0,2	1,5	1,9
Tolueno (mg/L)	9,7 ± 3,0	4,6	16,7	1,4 ± 0,2	1,2	1,7
Etilbenzeno (mg/L)	9,9 ± 4,1	3,9	19,9	0,9 ± 0,2	0,6	1,1
(m+p)-xilenos	18,9 ± 5,8	8,3	29,9	1,9 ± 0,4	1,5	2,4
o-xileno	10,1 ± 2,9	5,1	15,9	1,3 ± 0,2	1,1	1,6
DQO _b	1544 ± 55	1478	1620	63 ± 9	53	74
AB (mgCaCO ₃ /L)	576 ± 8	569	585	671 ± 13	656	682
AVT (mgHac/L)	26 ± 7	17	40	12 ± 3	9	17
pH		7,7	7,8		7,3	7,4

Remoção de DQO e de BTEX

A Figura 5.14 apresenta os dados de DQO_b afluente e efluente ao longo da etapa de operação.

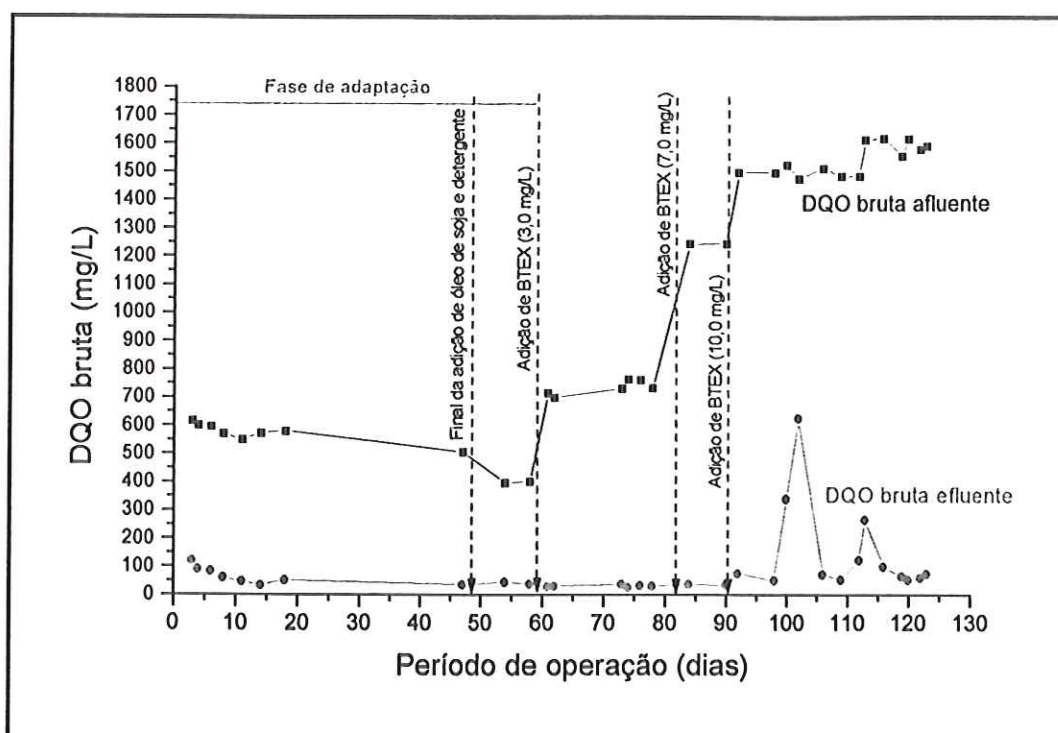


Figura 5.14: Variação temporal da concentração de DQO afluente e efluente ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

Após inoculação da biomassa nas espumas de poliuretano e partida do reator com água residuária sintética sem solução etanólica de BTEX (fase de adaptação), o sistema reduziu a DQO_b afluente de 573 ± 34 mg/L para 41 ± 9 mg/L. A diferença da DQO_b efluente em relação à da etapa anterior do reator controle (DQO_b de 95 ± 18 mg/L) foi devida à utilização de extrato de carne liofilizado nesta etapa, que contém menos impurezas e é menos complexo que o extrato de carne concentrado utilizado na 1ª etapa.

Após adição de solução etanólica de BTEX (3,0 mg/L de cada composto), a DQO_b efluente (31 ± 4 mg/L) apresentou um ligeiro decréscimo em relação à fase de adaptação (DQO_b de 41 ± 9 mg/L). Essa tendência se manteve, também, após aumento das concentrações de BTEX para 7,0 mg/L. Quando as concentrações de BTEX foram aumentadas para 10,0 mg/L, ocorreu um desequilíbrio no sistema, possivelmente devido à adaptação à nova condição, elevando a DQO_b efluente para 626 mg/L no 102º dia de operação. Após esse desbalanceamento, o reator tornou-se estável, apresentando 63 ± 9 mg/L de DQO_b efluente, após 20 dias.

A Figura 5.15 apresenta as concentrações de BTEX afluentes e efluentes ao longo da etapa de operação. Para concentrações de BTEX afluentes de 3,0 mg/L e 7,0 mg/L, as

concentrações efluentes não se alteraram. Porém quando as concentrações foram elevadas para 10,0 mg/L, as concentrações de BTEX no efluente foram cerca de 3,7 vezes maiores.

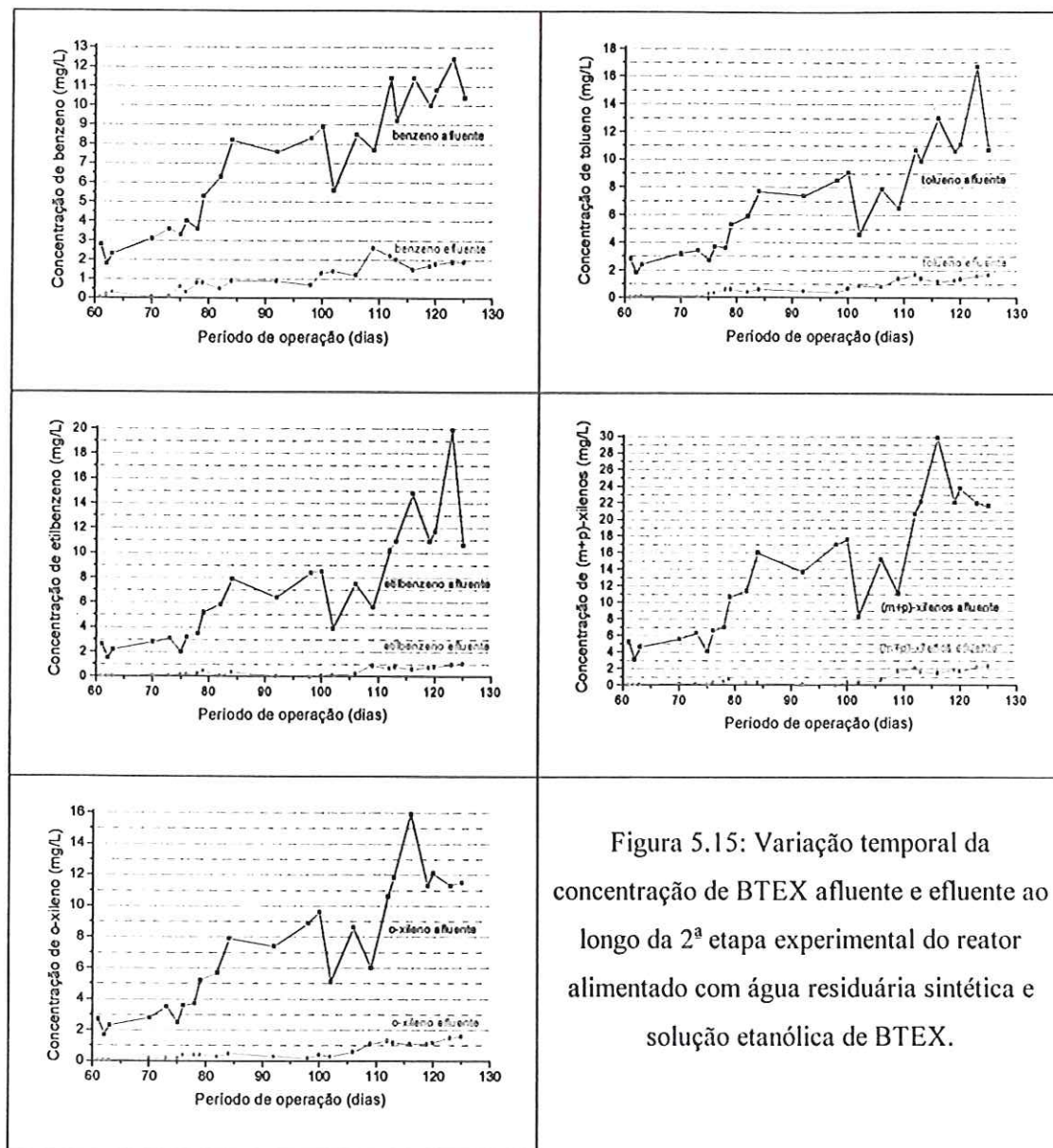


Figura 5.15: Variação temporal da concentração de BTEX afluente e efluente ao longo da 2^a etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

A Figura 5.16 mostra a variação da eficiência de remoção de DQO_b e de BTEX ao longo do tempo. Na fase de adaptação, a eficiência de remoção de DQO_b após a partida do sistema, permaneceu em torno de 91 %. No período de operação com concentrações de BTEX de 3,0 mg/L e 7,0 mg/L, a eficiência de remoção aumentou para 96 %. Vale ressaltar que, apesar da DQO_b afluente ter aumentado, a DQO_b efluente foi menor que na fase de adaptação. Para concentrações de BTEX de 10,0 mg/L, a eficiência permaneceu em 96 %, após o desequilíbrio do sistema, no 102^o dia de operação. Porém a DQO_b efluente foi duas vezes maior que nas condições anteriores.

A eficiência de remoção de BTEX variou de 75 % a 99 % ao longo do período experimental.

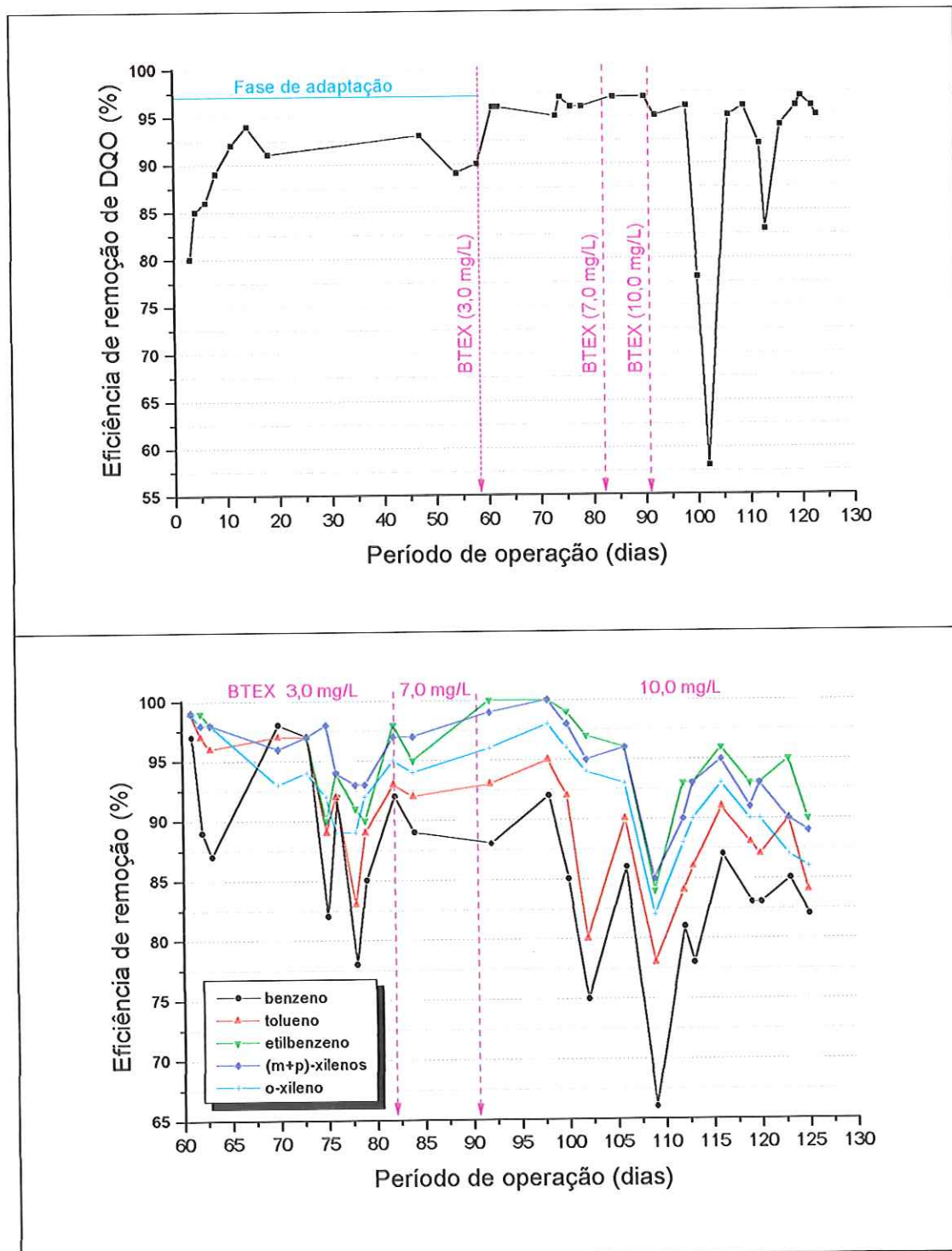


Figura 5.16: Variação temporal da eficiência de remoção de DQO₆ e de BTEX ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

A Figura 5.17 relaciona a carga orgânica removida expressa como carga orgânica de DQO e de BTEX em função da carga orgânica aplicada. Ambos os parâmetros apresentaram relação linear. O sistema não atingiu a capacidade limite de remoção de matéria orgânica na faixa estudada.

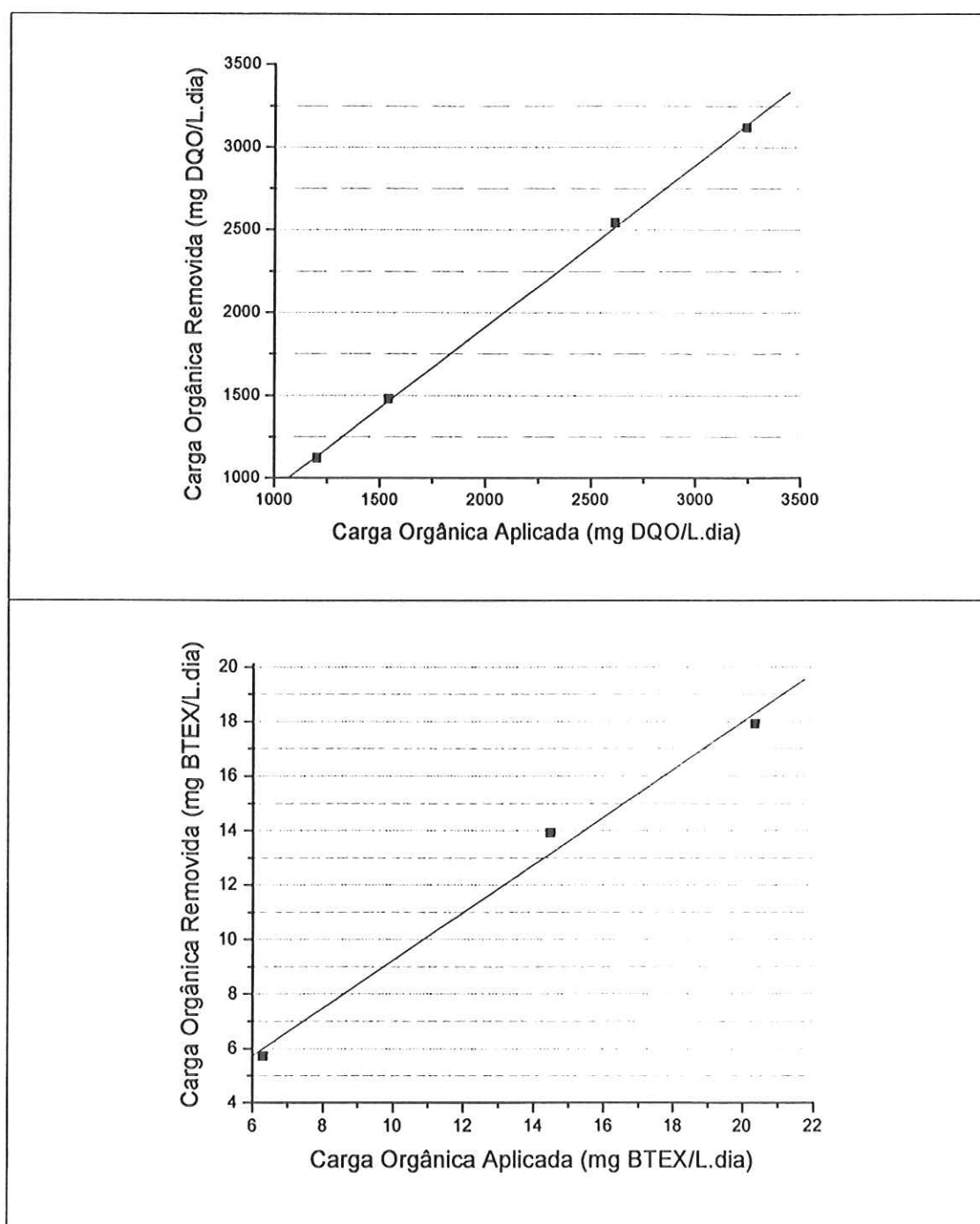


Figura 5.17: Variação temporal da carga orgânica removida de DQO e BTEX em função da carga orgânica aplicada ao reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

Alcalinidade e ácidos voláteis totais

A relação entre alcalinidade intermediária e parcial, proposta por Ripley *et al.* (1986), que descreve a estabilidade do processo anaeróbico, variou entre 0,2 e 0,3 indicando que o processo era estável. No 102º dia de operação, durante o desequilíbrio do sistema, esta relação subiu para 5,2 (Figura 5.18).

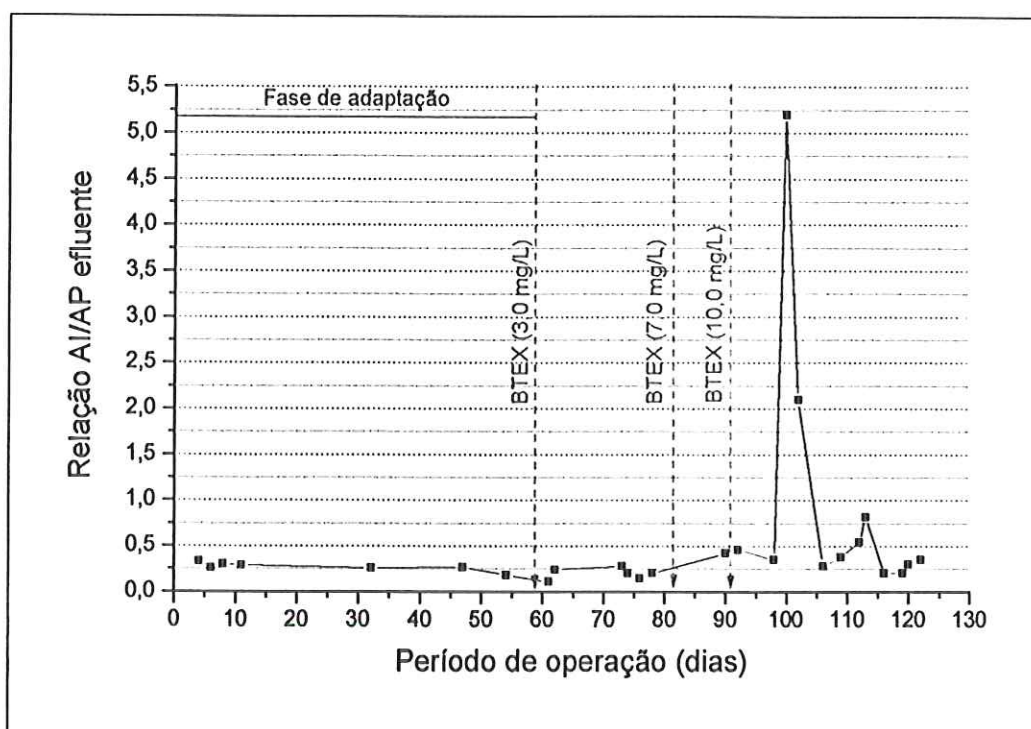


Figura 5.18: Variação temporal da relação alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial do efluente ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

Durante a fase de adaptação e adição de concentrações de BTEX de 3,0 mg/L e 7,0 mg/L, foi gerada alcalinidade a bicarbonato (AB) no sistema e praticamente não sofreu variação. Os ácidos voláteis totais (AVT) foram consumidos e, da mesma forma, praticamente não sofreram variações. Quando as concentrações de BTEX foram de 10,0 mg/L, o desequilíbrio no sistema, ocorrido no 102º dia de operação, foi devido ao acúmulo de AVT, principalmente ácido acético (478 mg/L) e propiônico (45 mg/L). O pH caiu para 5,4 e foi necessário tamponar o sistema (1,5 g/L a 3,0 g/L de bicarbonato de sódio), até o final da operação, para evitar que o acúmulo de ácidos voláteis afetasse o processo. A Figura 5.19 apresenta o dados de AB e de AVT afluente e efluente ao longo do período operacional.

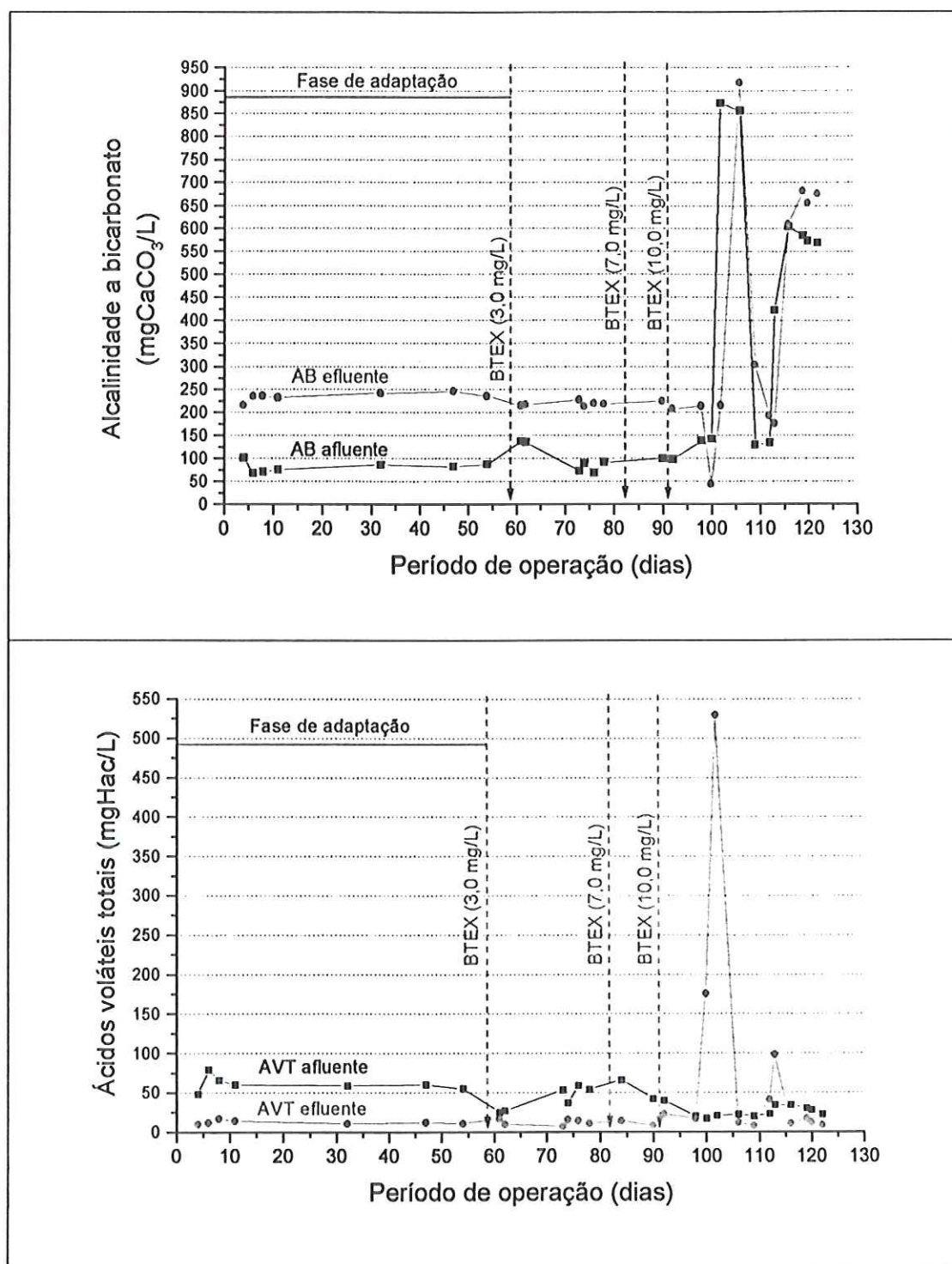


Figura 5.19: Variação temporal da alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

Biogás

As concentrações de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) no biogás aumentaram de acordo com o aumento da carga orgânica aplicada. As oscilações nas

concentrações de CH_4 e de CO_2 foram atribuídas à forma de coleta e não necessariamente a possíveis instabilidades do sistema. As proporções de CH_4 e de CO_2 , no biogás gerado, permaneceram em torno de 87 % e 13 %, respectivamente (Figura 5.20).

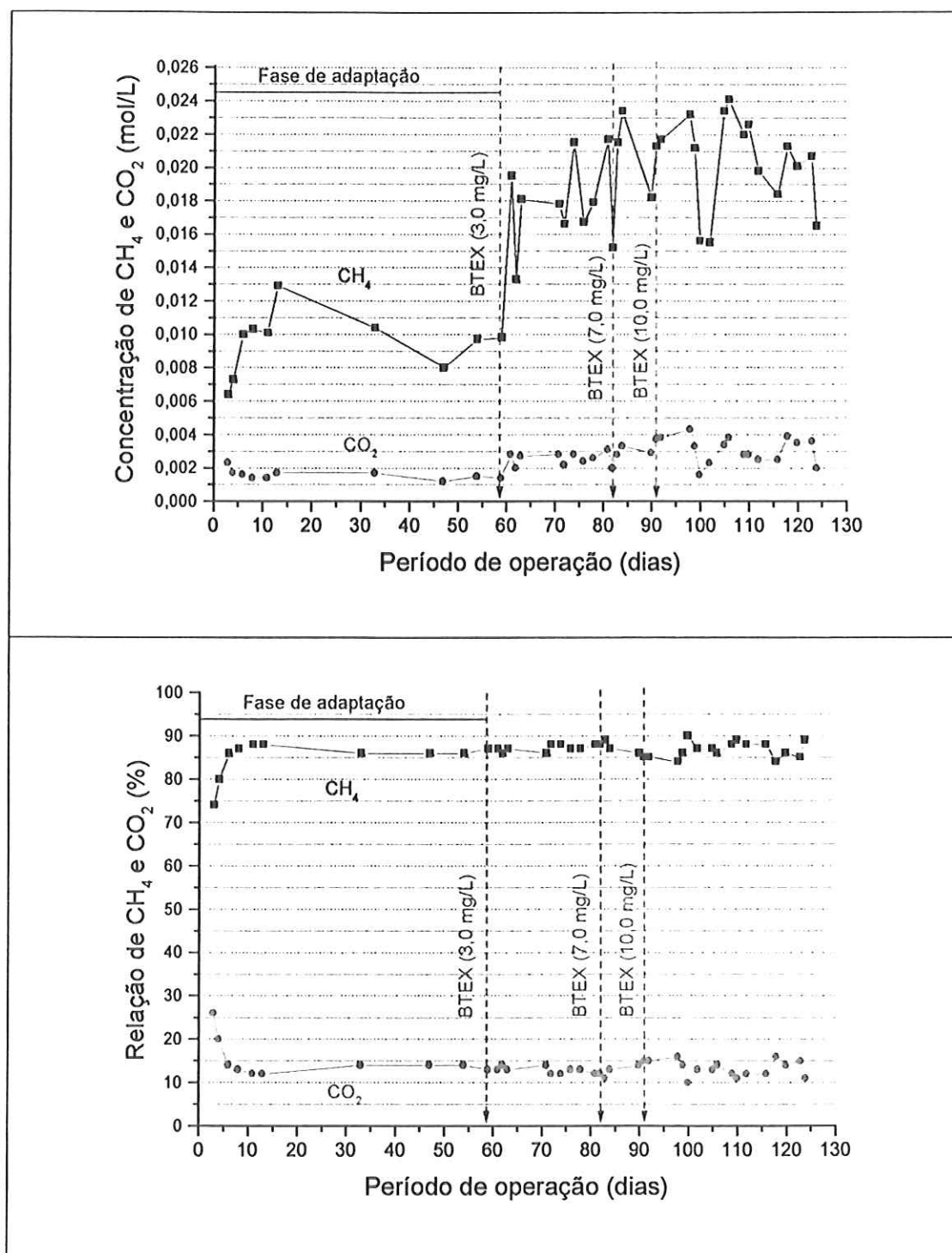


Figura 5.20: Variação temporal da concentração de CH_4 e de CO_2 e porcentagem de CH_4 e de CO_2 ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

Variação espacial de DQO_f, BTEX e ácidos voláteis ao longo do reator

A Tabela 5.28 apresenta os resultados dos perfis de DQO_f, BTEX e ácidos voláteis, nas diferentes fases do experimento, em amostras do afluente (L/D de 0), dos pontos intermediários (L/D de 4, 8, 12 e 16) e do efluente (L/D de 20). Os valores são médias de réplicas de perfis.

Tabela 5.28: Variação espacial de DQO_f, de concentrações de BTEX e de ácidos voláteis, nas diferentes fases de operação do reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX, obtidas em posições de L/D de 0 a 20.

	L/D = 0	L/D = 4	L/D = 8	L/D = 12	L/D = 16	L/D = 20
Fase de adaptação						
DQO _f (mg/L)	340	69	70	54	57	38
Ácido acético (mg/L)		5	2			
Ácido propiônico (mg/L)		4	3	1		
1º Ensaio						
Benzeno (mg/L)	5,6	2,6	2,4	2,1	1,8	0,7
Tolueno (mg/L)	5,1	2,0	1,8	1,7	1,5	0,5
Etilbenzeno (mg/L)	4,9	1,6	1,5	1,3	1,3	0,3
(m+p)-xilenos (mg/L)	9,7	3,1	2,9	2,6	2,3	0,5
o-xileno (mg/L)	4,9	1,8	1,7	1,5	1,5	0,4
Ácido acético (mg/L)		87	36	20	6	
Ácido propiônico (mg/L)		19	10	5	2	
2º Ensaio						
Benzeno (mg/L)	10,6	4,9	4,5	4,4	4,1	1,9
Tolueno (mg/L)	10,4	4,3	3,9	3,9	3,6	1,6
Etilbenzeno (mg/L)	10,0	3,6	3,1	3,1	2,7	1,0
(m+p)-xilenos (mg/L)	20,4	7,4	6,4	6,2	5,7	2,3
o-xileno (mg/L)	10,9	4,1	3,7	3,7	3,5	1,5
Ácido acético (mg/L)		466	97	50	7	
Ácido propiônico (mg/L)		37	11,0	6,6	2,2	
Ácido butírico (mg/L)		6	1	1	1	

Os perfis de DQO_f foram realizados somente na fase de adaptação, pois a filtração a vácuo da amostra reduz as concentrações de BTEX devido à volatilização.

As remoções de DQO_f e BTEX foram efetivas ao longo do comprimento do reator. Os ácidos acético e propiônico foram acumulados no primeiro segmento do reator (L/D de 4) e foram consumidos nos segmentos posteriores.

Vale ressaltar que a forma de amostragem nos pontos L/D de 0 (entrada) e L/D de 20 (saída) é diferente da forma de amostragem nos pontos intermediários. Na entrada e saída a amostragem é composta de todas as correntes de escoamento. Já nos pontos intermediários a amostragem é feita pontualmente, selecionando-se correntes de escoamento no reator. Como

o reator não foi completamente preenchido pelo material suporte, a hidrodinâmica foi afetada com zonas livres de passagem de correntes de escoamento, podendo ter influenciado na amostragem. Nessas regiões ocorreu o crescimento de biomassa suspensa. A Figura 5.21 apresenta a arranjo das biopartículas no RAHLF.

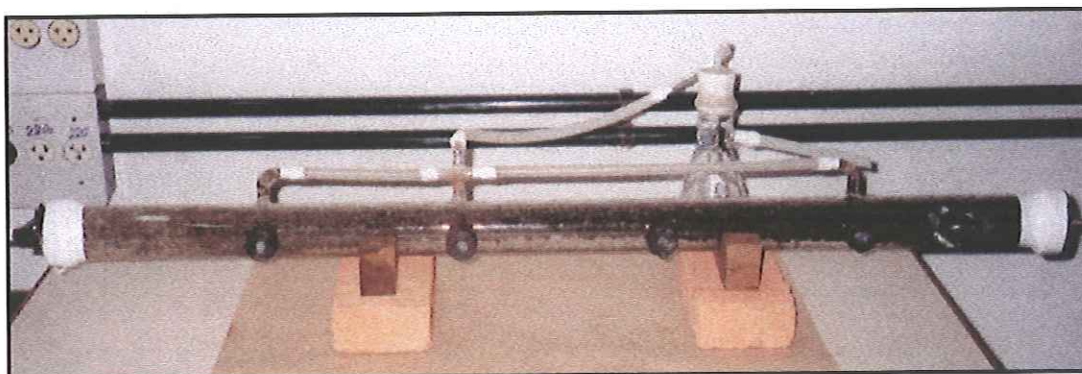


Figura 5.21: Fotos do RAHLF mostrando a distribuição do material suporte.

Sólidos totais e sólidos totais voláteis na biopartícula

A Tabela 5.29 apresenta a concentração de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) nas matrizes de espuma de poliuretano. A relação STV / ST decresceu com o comprimento do reator confirmando os resultados obtidos de quantificação celular, na 1ª etapa experimental, em que se observou queda da concentração de organismos anaeróbios ao longo dos reatores.

Tabela 5.29: Concentração de sólidos totais e sólidos totais voláteis nas matrizes de espuma de poliuretano e suspensos no reator alimentado com água residuária sintética e solução etanólica de BTEX.

	ST		STV	
	L/D = 4	L/D = 16	L/D = 4	L/D = 16
Final da fase de adaptação (g/g espuma)	0,6361	0,5538	0,5052	0,3735
Final da 2ª etapa de operação (g/g espuma)	1,1145	0,4867	0,5554	0,1892
Biomassa suspensa no reator (g/L)	1,1520		0,3420	

5.3.2 Reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial

Durante a fase de adaptação, o RAHLF foi operado de forma semelhante ao RAHLF alimentado com solução etanólica de BTEX e apresentou os mesmos resultados. O óleo de soja foi retirado da água residuária e em seguida, soluções de BTEX em detergente comercial, com concentrações de 3,0 mg/L e 14,0 mg/L foram, então, adicionadas à água residuária sintética por 58 dias. A Tabela 5.30 apresenta os valores dos parâmetros monitorados. Os dados do efluente foram considerados após o sistema ter alcançado o equilíbrio dinâmico aparente em cada fase.

Tabela 5.30: Parâmetros físico-químicos afluente e efluente ao reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

Parâmetros	Afluente			Efluente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
Fase de adaptação (sem BTEX)						
DQO _b	573 ± 34	505	615	46 ± 8	39	56
DQO _r	399 ± 13	376	412	34 ± 8	24	46
AB (mgCaCO ₃ /L)	68 ± 7	57	74	239 ± 10	226	251
AVT (mgHac/L)	59 ± 6	48	66	12 ± 3	10	18
pH		6,3	7,0		6,9	7,2
2ª etapa						
Benzeno (mg/L)	3,5 ± 1,2	1,9	6,3	0,6 ± 0,2	0,2	1,0
Tolueno (mg/L)	2,9 ± 0,8	1,1	4,3	0,4 ± 0,2	0,1	0,9
Etilbenzeno (mg/L)	2,9 ± 1,0	1,1	4,8	0,4 ± 0,2	0,2	1,0
(m+p)-xilenos	5,3 ± 1,6	2,2	7,4	0,8 ± 0,3	0,3	1,2
o-xileno	2,8 ± 0,8	1,2	3,7	0,4 ± 0,2	0,2	0,7
DQO _b	576 ± 24	527	605	325 ± 28	281	357
AB (mgCaCO ₃ /L)	107 ± 29	71	148	130 ± 7	123	139
AVT (mgHac/L)	37 ± 13	17	57	103 ± 6	96	109
Ácido acético (mg/L)	-	-	-	129 ± 16	98	149
Ácido propiônico(mg/L)	-	-	-	34 ± 3	30	38
pH		6,3	7,4		6,7	7,0
Benzeno (mg/L)	15,7 ± 2,5	12,2	19,9	4,4 ± 0,7	3,5	5,5
Tolueno (mg/L)	14,2 ± 3,1	10,1	19,8	2,8 ± 0,6	2,1	3,8
Etilbenzeno (mg/L)	12,8 ± 3,8	7,6	19,2	1,5 ± 0,5	1,0	2,3
(m+p)-xilenos	25,7 ± 7,8	15,1	38,7	2,0 ± 1,0	0,9	3,6
o-xileno	14,0 ± 3,8	9,2	19,8	1,1 ± 0,5	0,6	1,9
DQO _b	833 ± 38	787	891	334 ± 13	320	354
AB (mgCaCO ₃ /L)	143 ± 7	133	156	143 ± 13	120	160
AVT (mgHac/L)	20 ± 2	18	25	Variável		
Ácido acético (mg/L)	-	-	-	Variável		
Ácido propiônico(mg/L)	-	-	-	38 ± 2	36	43
pH		7,3	7,6		6,7	7,0

Remoção de DQO e de BTEX

A Figura 5.22 apresenta os dados de DQO_b afluyente e efluente ao longo do tempo de operação.

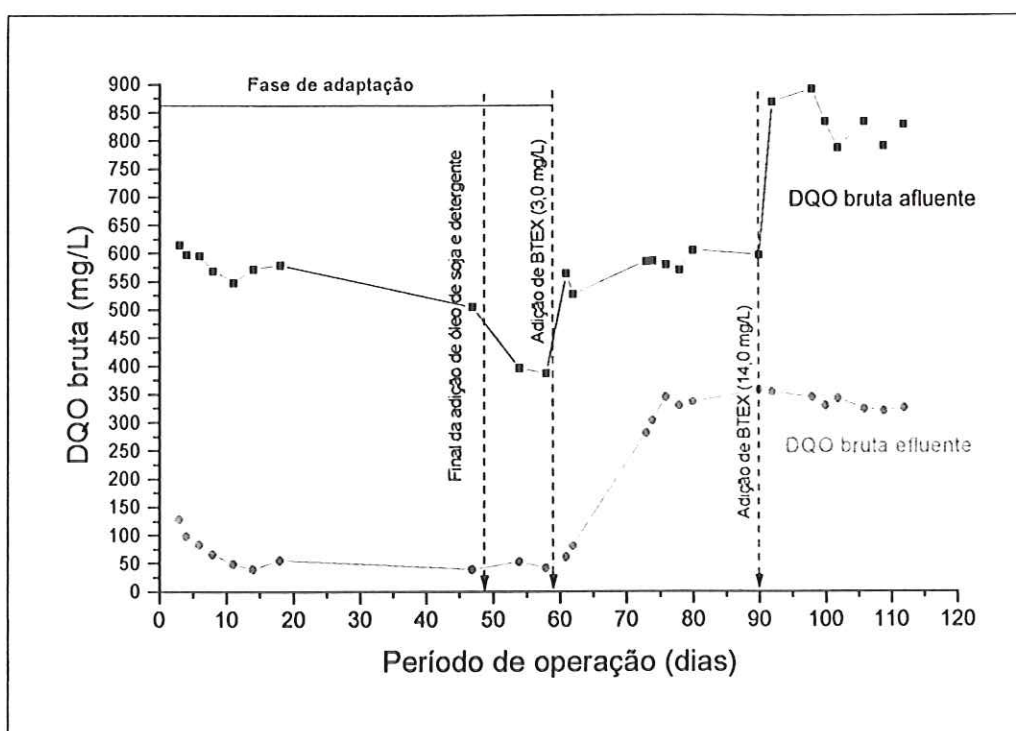


Figura 5.22: Variação temporal da concentração de DQO afluyente e efluente ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

Após 10 dias de operação, com água residuária sintética (Tabela 4.1), os parâmetros analisados no efluente apresentaram valores estabilizados, o que permitiu admitir que a partida do sistema estava concluída. A DQO_b afluyente de 573 ± 34 mg/L caiu para 46 ± 8 mg/L. A diferença da DQO_b efluente em relação a da etapa anterior do reator controle (DQO_b de 95 ± 18 mg/L) deveu-se, também, à utilização de extrato de carne liofilizado nesta etapa.

No 59º dia de operação, foi adicionada solução de BTEX em detergente comercial, com concentrações de BTEX de 3,0 mg/L, no afluyente. Após 15 dias, o sistema atingiu novo estado de equilíbrio dinâmico aparente, com DQO_b efluente média de 325 ± 28 mg/L que praticamente se manteve até o final dessa etapa, mesmo após o aumento da DQO_b afluyente (833 ± 38 mg/L) para concentrações de BTEX de 14,0 mg/L.

A Figura 5.23 mostra os valores das concentrações de BTEX ao longo da etapa de operação. Para concentrações de BTEX afluentes de 3,0 mg/L, as concentrações efluentes permaneceram em torno de 0,4 mg/L e quando foram elevadas para 14,0 mg/L, estabilizaram-se em valores distintos para cada composto; xilenos ($1,1 \pm 0,5$ mg/L) e etilbenzeno ($1,5 \pm 0,5$ mg/L) apresentaram os menores valores, seguidos do tolueno ($2,8 \pm 0,6$ mg/L) e benzeno ($4,4 \pm 0,7$ mg/L).

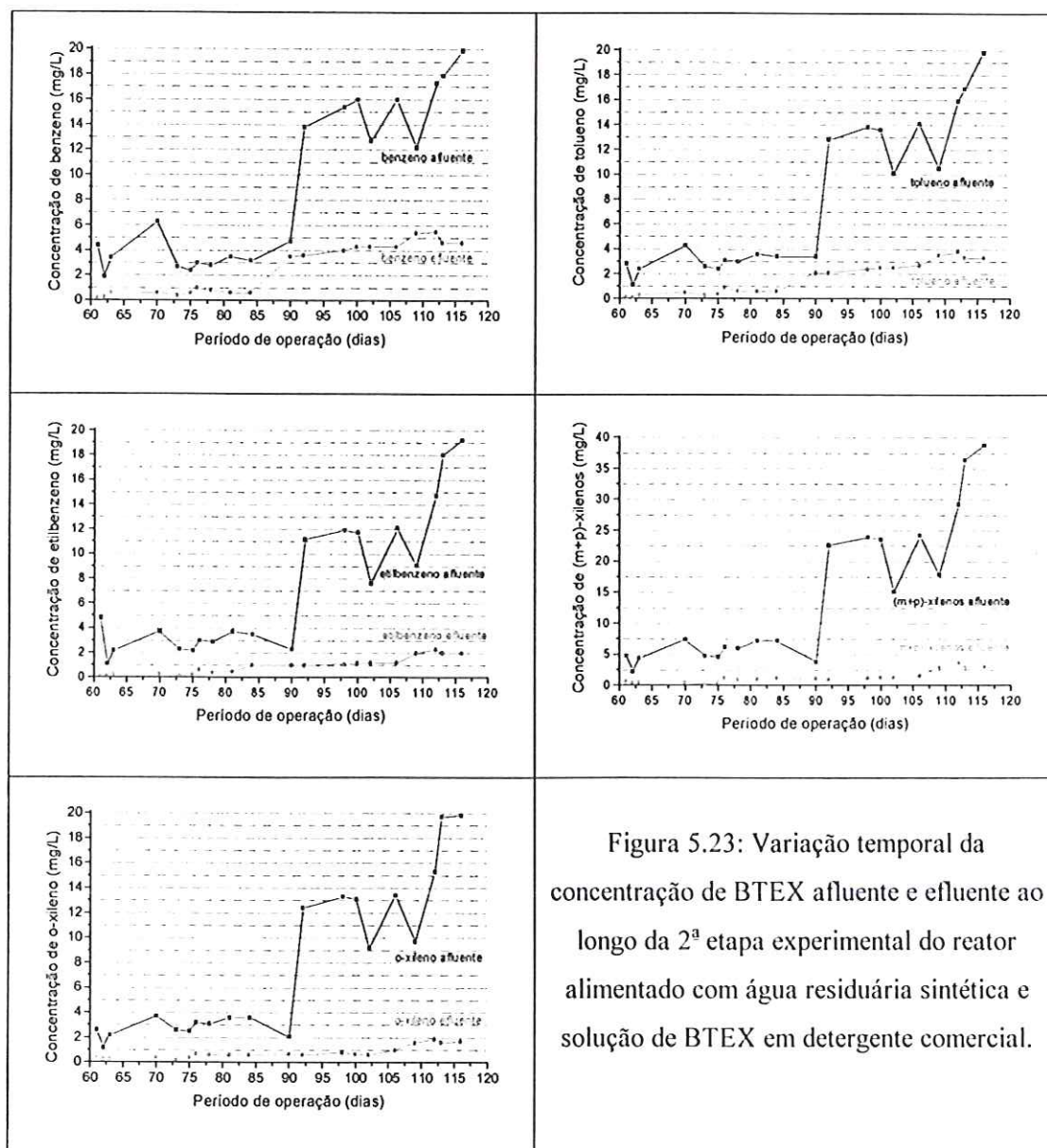


Figura 5.23: Variação temporal da concentração de BTEX afluente e efluente ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

A Figura 5.24 mostra a variação da eficiência de remoção de DQO_b e de BTEX ao longo do tempo. Na fase de adaptação, a eficiência de remoção de DQO_b após a partida do sistema, permaneceu em torno de 91 %. Quando solução de BTEX em detergente comercial foi adicionada à água residuária, a eficiência de remoção decresceu para 40 % devido ao aumento na DQO_b efluente (325 ± 28 mg/L). Para concentrações de BTEX de 14,0 mg/L, a eficiência aumentou para 60 %, devido ao aumento da DQO_b afluente.

A eficiência de remoção de BTEX variou de 65 % a 95% ao longo do período experimental. O dia 90 foi considerado um ponto atípico.

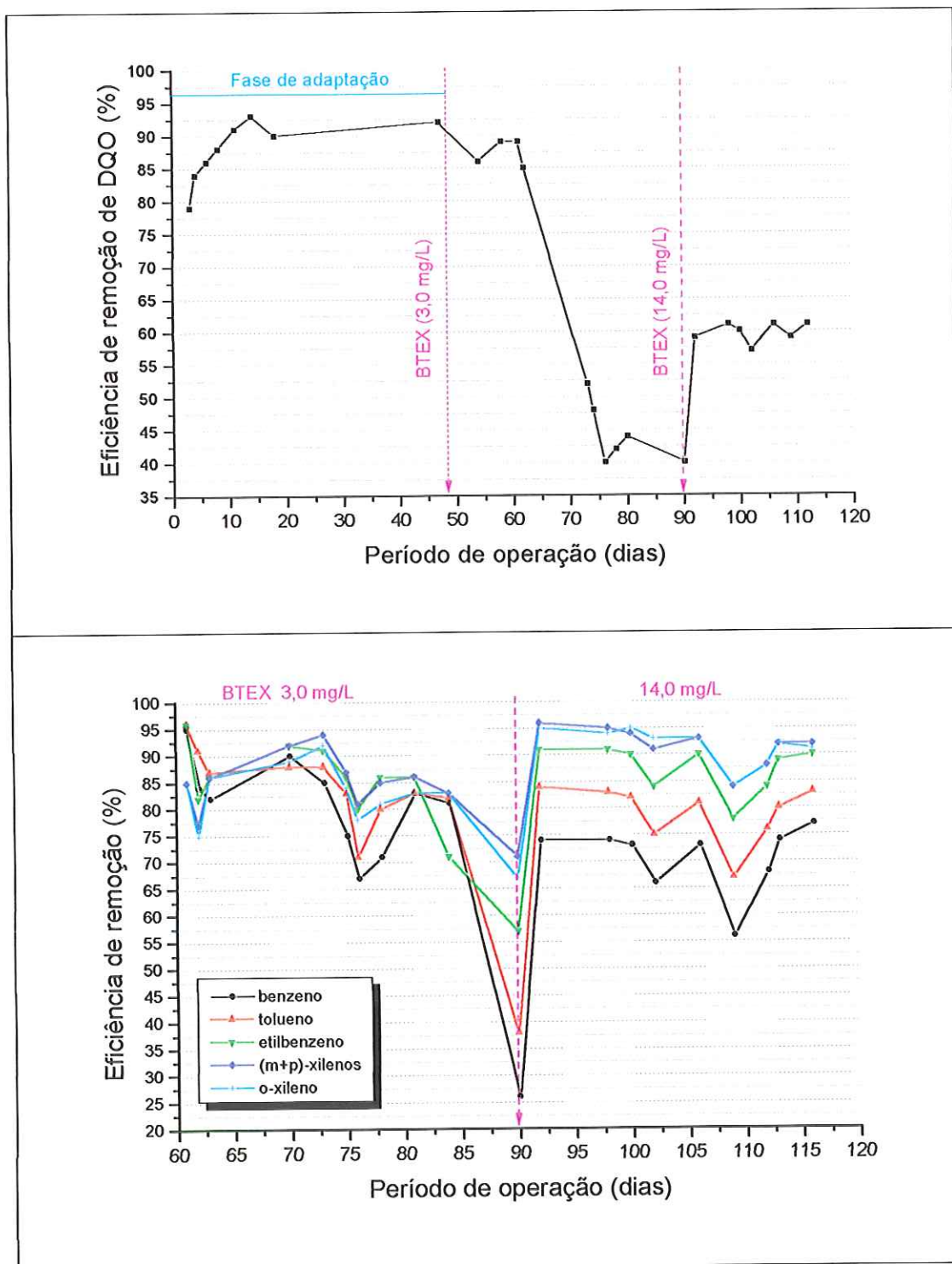


Figura 5.24: Variação temporal da eficiência de remoção de DQO_b e de BTEX ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

Alcalinidade e ácidos voláteis totais

A relação entre alcalinidade intermediária e parcial (Ripley *et al.*, 1986), permaneceu estável somente na fase de adaptação, oscilando após adição de BTEX. Isso indica que o processo anaeróbio apresentava-se instável (Figura 5.25).

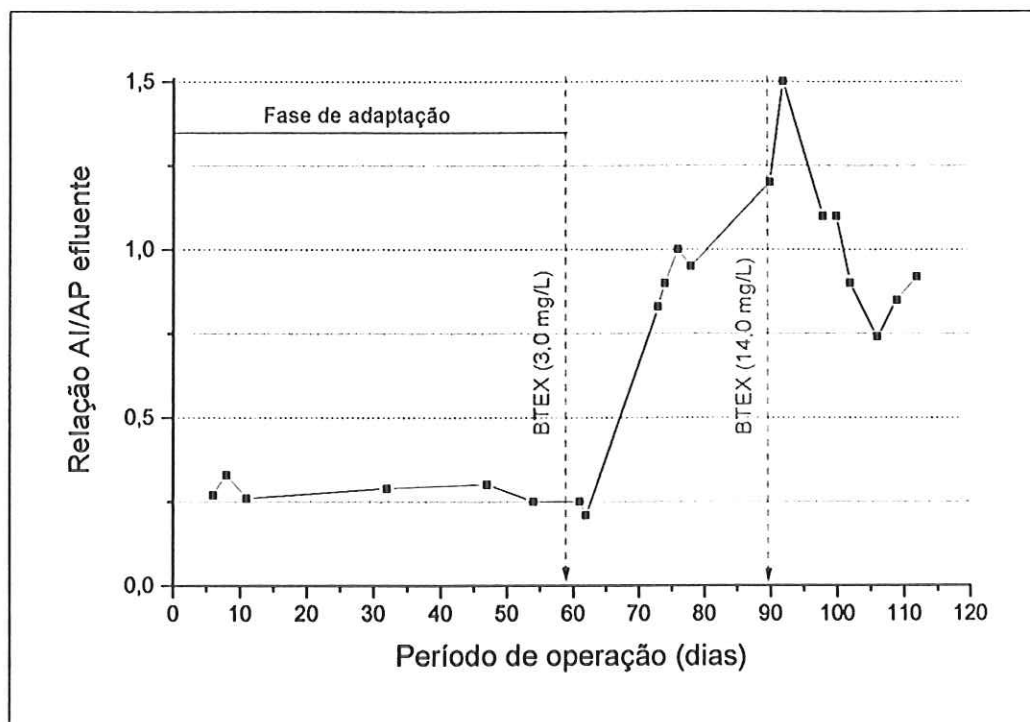


Figura 5.25: Variação temporal da relação alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial do efluente ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

Durante a fase de adaptação, foi gerada AB nos processos anaeróbios de degradação (239 ± 10 mg CaCO_3/L) e AVT foram consumidos (12 ± 3 mgHac/L), praticamente sem sofrerem variações. Quando solução de BTEX em detergente comercial (3,0 mg/L) foi adicionada à água residuária, a AB no efluente decresceu para 130 ± 7 mg CaCO_3/L e AVT subiu para 103 ± 6 mgHac/L. As concentrações de ácido acético e propiônico no efluente permaneceram em torno de 129 ± 16 mg/L e 34 ± 3 mg/L, respectivamente. O pH efluente variou de 6,7 a 7,0. Nas concentrações de BTEX de 14,0 mg/L, a concentração efluente de ácido acético caiu, mas a concentração de ácido propiônico permaneceu estável. A Figura 5.26 apresenta os dados de AB e de AVT afluente e efluente ao longo do período operacional.

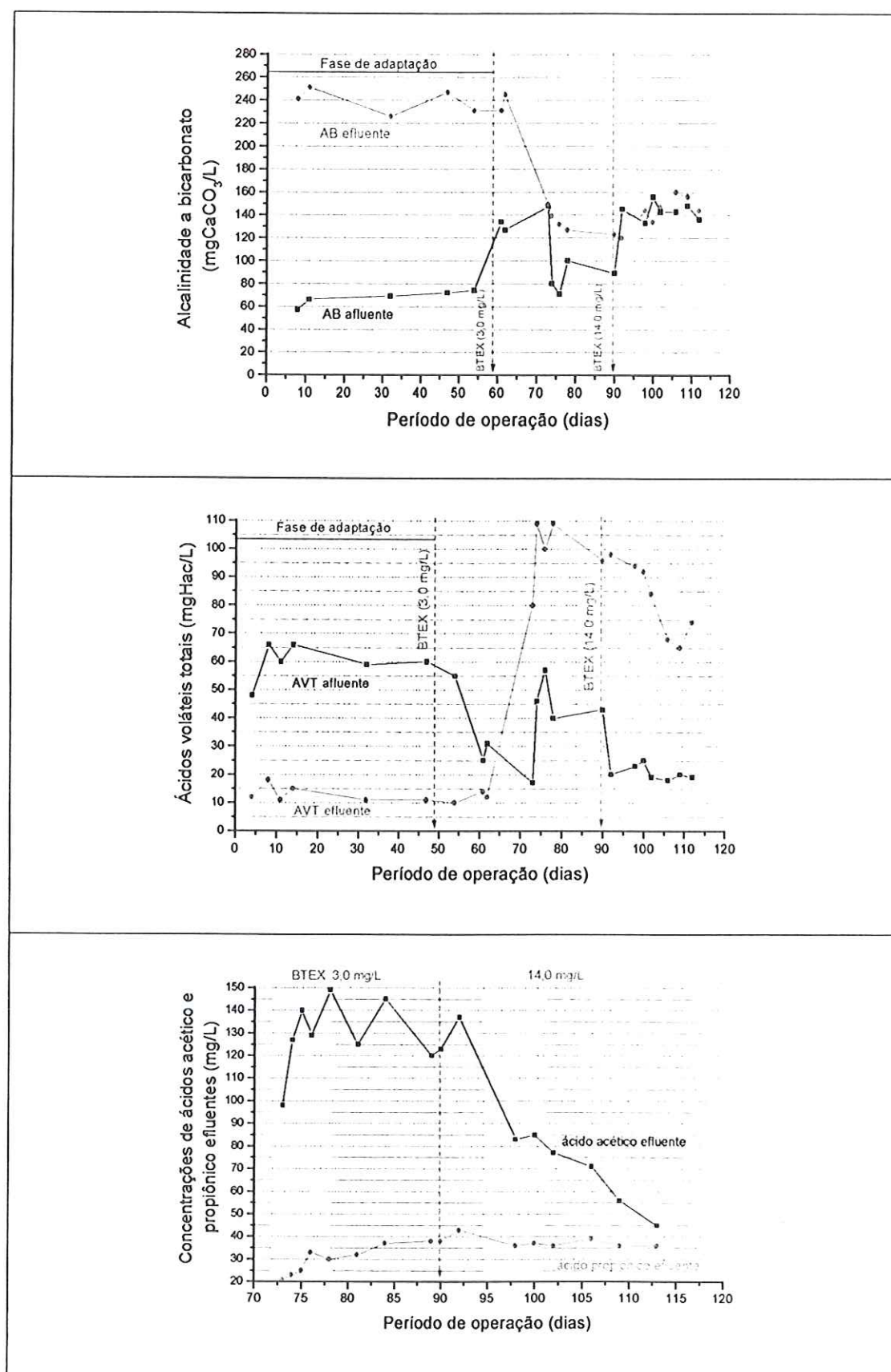


Figura 5.26: Variação temporal da AB e AVT ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

Biogás

O conteúdo de metano (CH_4) no biogás foi inibido após adição de solução de BTEX em detergente comercial. Já a produção de dióxido de carbono (CO_2) manteve-se muito baixa (0,001 mol/L) (Figura 5.27).

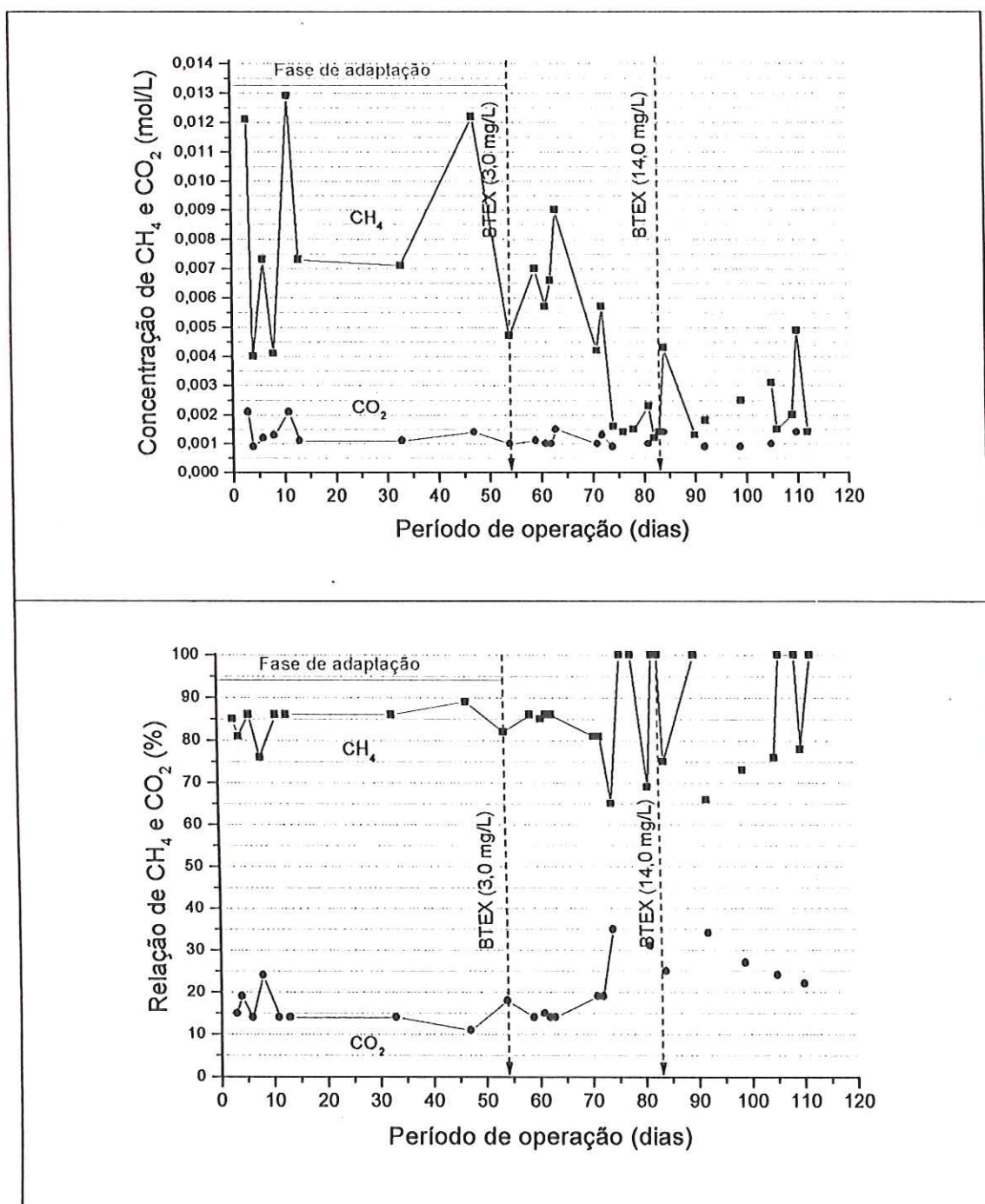


Figura 5.27: Variação temporal da concentração de CH_4 e de CO_2 e porcentagem de CH_4 e de CO_2 ao longo da 2ª etapa experimental do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

Sólidos totais e sólidos totais voláteis na biopartícula

A Tabela 5.31 apresenta a concentração de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) nas matrizes de espuma de poliuretano. A concentração de biomassa, medida como STV, decresceu ao longo do período operacional devido às condições inóspitas no reator. Porém, a relação STV / ST manteve-se constante ao longo do comprimento do reator, indicando que todo o sistema foi afetado pelas condições operacionais impostas.

Tabela 5.31: Concentração de sólidos totais e sólidos totais voláteis nas matrizes de espuma de poliuretano e suspensos no reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

	ST		STV	
	L/D = 4	L/D = 16	L/D = 4	L/D = 16
Final da fase de adaptação (g/g espuma)	1,1218	0,8475	0,9843	0,7582
Final da 2ª etapa de operação (g/g espuma)	0,8515	0,6765	0,6120	0,4840
Biomassa suspensa no reator (g/L)	1,3180		0,4680	

Morfologias dos organismos presentes no biofilme

Na 2ª etapa, observou-se o empobrecimento de culturas, devido às condições operacionais. Apesar da metanogênese ter sido inibida, foi observada a presença de bacilos fluorescentes e *Methanosarcina* sp..

A biomassa suspensa no reator era composta, principalmente, de bacilos não fluorescentes e fluorescentes, coco-bacilos e *Methanosarcina* sp.. A Tabela 5.32 mostra as morfologias observadas no biofilme de biopartículas amostradas nos pontos L/D de 4 e 16.

Tabela 5.32: Morfologias microbianas em amostras de cada fase de operação do reator alimentado com água residuária sintética e solução de BTEX em detergente comercial.

Morfologias	Fase de adaptação		Segunda Etapa	
	4	16	4	16
Ponto de amostragem L/D				
Domínio <i>Bactéria</i>				
Cocos	++	-	+	+
Coco-bacilos	++	-	++	++
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	-	-	-
Bacilos retos	+++	++	++	+++
Filamentos finos	++	++	+	+
Espiroqueta	++	++	-	-
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 µm de comprimento)	+++	++	+	+
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	-	+	-	-
Domínio <i>Archaea</i>				
Bacilos fluorescentes	+	+++	+++	++
Cocos fluorescentes	++	+++	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	+++	+	+
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	++	+++
Fungos	-	-	++	+
Cistos	-	-	+	-

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

Deficiências de funcionamento do reator

Inicialmente, para concentrações de BTEX de 3,0 mg/L, a metanogênese foi inibida conforme pode ser deduzido pelo decaimento da produção de metano no biogás e acúmulo de ácidos acético (129 ± 16 mg/L) e propiônico (34 ± 3 mg/L) no efluente, que correspondeu a metade da DQO_b efluente (325 ± 28 mg/L). A inibição da metanogênese também foi observada durante operação do reator controle, na 1ª etapa do trabalho. Posteriormente, para concentrações de BTEX de 14,0 mg/L, possivelmente a acetogênese também tenha sido inibida, como evidenciado pelo decaimento de ácido acético efluente. A elevada DQO_b efluente (334 ± 13 mg/L) não foi devida à produção de ácidos voláteis, mas provavelmente, em parte, a algum composto intermediário proveniente da fermentação parcial do substrato.

A metanogênese foi inibida e posteriormente a acetogênese pelo detergente comercial que contém o princípio ativo benzeno sulfonato de alquila (BSA). Tem-se demonstrado que este composto não é mineralizado sob condições anaeróbicas pois inibe a metanogênese (Wagener & Shink, 1987; Federle & Shwab, 1992; Krueger *et al.*, 1998).

Degradações de BTEX superiores a 65 % foram observadas na presença de detergente comercial e maiores que 75 % na presença de etanol. Enquanto o etanol favoreceu a manutenção de biomassa metanogênica ativa no reator, o detergente comercial inibiu a

atividade metanogênica. Contudo, tal atividade não foi considerada determinante na etapa inicial de degradação de BTEX na presença de detergente comercial.

5.4 Terceira etapa experimental: reator alimentado com solução etanólica de BTEX

O reator da segunda etapa, alimentado com água residuária sintética (Tabela 4.1) e solução etanólica de BTEX, foi operado, por 20 dias, com solução etanólica de BTEX, como única fonte de carbono para o consórcio fermentativo metanogênico, complementada com meio apresentado na Tabela 4.2. O objetivo desta etapa foi enquadrar o trabalho na área de bioremediação.

A Tabela 5.33 apresenta os valores dos parâmetros monitorados no afluente e no efluente do reator durante a 3ª etapa. O sistema atingiu novo estado de equilíbrio dinâmico aparente com relação à etapa anterior.

Tabela 5.33: Parâmetros físico-químicos monitorados do reator alimentado com solução etanólica de BTEX durante a 3ª etapa experimental.

Parâmetros	Afluente			Efluente		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
Benzeno (mg/L)	14,3 ± 3,0	10,2	17,8	2,2 ± 0,6	1,1	2,9
Tolueno (mg/L)	12,8 ± 3,0	8,7	15,9	1,8 ± 0,5	0,8	2,3
Etilbenzeno (mg/L)	11,6 ± 2,8	8,0	15,3	1,6 ± 0,4	0,8	2,0
(m+p)-xilenos	23,0 ± 5,4	16,2	30,4	3,4 ± 1,0	1,6	4,2
o-xileno	11,9 ± 2,7	8,5	15,4	1,9 ± 0,6	0,9	2,4
DQO _b	1135 ± 24	1107	1151	48 ± 7	41	55
AB (mgCaCO ₃ /L)	592 ± 6	588	598	670 ± 17	652	686
AVT (mgHac/L)	30 ± 4	26	34	28 ± 5	23	34
PH		7,9	8,0		7,5	7,7
CH ₄ (mol/L)				0,016 ± 0,002	0,015	0,019
CO ₂ (mol/L)				0,002 ± 0,001	0,002	0,003
Relação CH ₄ , CO ₂ (%)				CH ₄ : 88	CO ₂ : 12	

Remoção de DQO e de BTEX

A eficiência de remoção de DQO_b foi em torno de 96 %, com redução da DQO_b afluente de 1135 ± 24 mg/L para 48 ± 7 mg/L. Este valor é inferior ao obtido na etapa anterior (DQO_b efluente de 63 ± 9 mg/L). Porém, as concentrações de BTEX no efluente foram maiores. O etilbenzeno e os xilenos apresentaram aumento de aproximadamente 40 % no valor da concentração, enquanto o benzeno e o tolueno apresentaram valores 20 % maiores. Vale ressaltar, que a concentração de BTEX afluente foi aproximadamente 20 % maior. Assim, se comparadas às eficiências de remoção de BTEX com e sem a água

residuária sintética, a remoção de benzeno foi ligeiramente melhor sem a adição de outras fontes de carbono enquanto os outros compostos não apresentaram diferenças significativas. Dessa forma, é possível concluir que a adição de outras fontes de carbono não estimulou a degradação de BTEX.

Alcalinidade e ácidos voláteis totais

A relação entre alcalinidade intermediária e parcial, proposta por Ripley *et al.* (1986), permaneceu em torno de 0,26, indicando estabilidade do processo. Os valores de alcalinidade a bicarbonato (AB) do efluente (670 ± 17 mgCaCO₃/L) foram maiores que os valores do afluente (592 ± 6 mg/L). AB foi gerada no sistema mesmo com a alta concentração de bicarbonato de sódio (1,0 g/L) do afluente. Os ácidos voláteis totais (AVT) afluente (30 ± 4 mgHac/L) e efluente (28 ± 5 mgHac/L) praticamente não sofreram variações.

Biogás

As concentrações de metano ($0,016 \pm 0,002$ mol/L) e dióxido de carbono ($0,002 \pm 0,001$ mol/L) no biogás decresceram cerca de 20 %, pois a carga orgânica aplicada foi menor (2390 mg/L.d). As proporções de CH₄ e de CO₂, no biogás gerado, foram mantidas também nessa etapa, em torno de 88 % e 12 %, respectivamente.

Variação espacial de BTEX e ácidos voláteis ao longo do reator

A Tabela 5.34 apresenta os resultados do perfil de concentração de BTEX e ácidos voláteis em amostras do afluente (L/D de 0), dos pontos intermediários (L/D de 4, 8,12 e 16) e do efluente (L/D de 20). Os valores são médias de réplicas de perfil.

As remoções de BTEX foram efetivas ao longo do comprimento do reator. Os ácidos acético e propiônico foram acumulados no primeiro segmento do reator (L/D de 4) e foram consumidos nos segmentos posteriores.

Tabela 5.34: Variação espacial de concentrações de BTEX e de ácidos voláteis, na operação do reator alimentado com solução etanólica de BTEX, obtidas em posições de L/D de 0 a 20.

	L/D = 0	L/D = 4	L/D = 8	L/D = 12	L/D = 16	L/D = 20
Benzeno (mg/L)	14,7	6,8	6,1	6,0	5,8	2,8
Tolueno (mg/L)	12,9	5,1	4,6	4,5	4,4	2,0
Etilbenzeno (mg/L)	11,8	4,2	4,1	3,9	3,7	1,8
(m+p)-xilenos (mg/L)	23,4	8,7	8,3	8,0	7,7	4,0
o-xileno (mg/L)	12,2	4,8	4,7	4,4	4,3	2,2
Ácido acético (mg/L)		148	31			
Ácido propiônico (mg/L)		47	14	5	4	
Ácido butírico (mg/L)				5		

Vale ressaltar que a forma de amostragem nos pontos L/D de 0 (entrada) e L/D de 20 (saída) é diferente da forma de amostragem nos pontos intermediários, como mencionado anteriormente. Como o reator não foi completamente preenchido pelo material suporte, a hidrodinâmica foi alterada com zonas livres de passagem de correntes de escoamento, fato este que deve ter influenciado na amostragem.

Sólidos totais e sólidos totais voláteis na biopartícula

A Tabela 5.35 apresenta as concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) nas matrizes de espuma de poliuretano ao final do período de operação. A relação STV / ST decresceu ao longo do reator confirmando os resultados obtidos de quantificação celular, na 1ª etapa experimental, em que se observou queda da concentração de organismos anaeróbios ao longo dos reatores. Com relação à 2ª etapa, não houve aumento considerável na concentração de biomassa, medida como STV.

Tabela 5.35: Concentração de sólidos totais e sólidos totais voláteis nas matrizes de espuma de poliuretano, ao final do período de operação do reator alimentado com solução etanólica de BTEX.

Ponto de amostragem	ST (g/g espuma)	STV (g/g espuma)	Relação STV / ST
L/D = 4	0,7407	0,5669	0,76
L/D = 8	0,6861	0,5768	0,84
L/D = 12	0,4704	0,2686	0,57
L/D = 16	0,4198	0,2585	0,61

5.5 Morfologias dos organismos presentes no biofilme durante a operação do reator alimentado com solução etanólica de BTEX nas segunda e terceira etapas experimentais

A Tabela 5.36 mostra as morfologias observadas no biofilme de biopartículas amostradas nos pontos L/D de 4 e 16.

Tabela 5.36: Morfologias microbianas em amostras das 2^a e 3^a etapas experimentais do reator alimentado com solução etanólica de BTEX.

Morfologias	Fase de adaptação		Segunda etapa		Terceira etapa	
	4	16	4	16	4	16
Domínio Bactéria						
Cocos	++	-	-	++	++	++
Cocos em cadeia	-	-	++	-	-	-
Coco-bacilos	++	-	+++	-	+++	+++
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	-	-	++	-	-
Bacilos retos	+++	++	+++	+++	+++	+++
Filamentos finos	++	++	-	-	++	++
Espiroqueta	++	++	-	+	+	+
<i>Desulfovibrio</i> sp. (3,5 – 3,8 µm de comprimento)	+++	++	++	-	++	++
<i>Desulfovibrio</i> sp. (1,7 – 2,0 µm de comprimento)	-	+	+++	-	-	++
Domínio Archaea						
Bacilos fluorescentes	+	+++	+++	+++	+++	+++
Cocos fluorescentes	++	+++	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	+	++	++	++
Cistos	-	-	++	-	-	-

+++ predominantes, ++ freqüentes, + raros, - ausentes.

Em geral, o mesmo consórcio enriquecido ativo foi observado, em ambos os reatores, operados na 1^a etapa (reator controle) e na 2^a etapa. Contudo, nesta última etapa, arqueas acetoclásticas semelhantes a *Methanosaeta* sp. foram predominantes em relação a *Methanosarcina* sp.. *Methanosaeta* sp. apresentam elevada afinidade pelo acetato e baixa velocidade específica máxima de consumo ($K_s = 20\text{mg/L}$ e $U_{\text{max}} = 2$ a 4 g DQO/g SSV.d), enquanto *Methanosarcina* sp. possuem afinidade menor e elevada velocidade específica máxima de consumo ($K_s = 400\text{mg/L}$ e $U_{\text{max}} = 6$ a 10 g DQO/g SSV.d) (Speece, 1996). Como na 2^a etapa o acúmulo de ácidos no decorrer da degradação foi melhor controlado e não afetou o sistema, o predomínio de *Methanosaeta* sp. foi favorecido pelas baixas concentrações de acetato no meio.

Na 3ª etapa, foi evidenciada a presença de possíveis organismos degradadores de BTEX no biofilme, na presença de etanol. Houve crescimento favorável de cocos, cocobacilos e bacilos, que são as morfologias de organismos degradadores de BTEX apresentadas na literatura (Tabela 3.9).

A biomassa suspensa no reator era composta, principalmente, de *Methanosaeta* sp., que suportava o arranjo celular, bacilos não fluorescentes e fluorescentes.

A observação microbiológica do biofilme, na degradação de BTEX, revelou a predominância de grupos morfológicos distintos; ou seja, organismos degradadores de BTEX, acetogênicos, acetoclásticos e hidrogenotróficos.

5.6 Avaliação de adsorção de BTEX na espuma de poliuretano e na biopartícula

A capacidade de adsorção de BTEX pelo meio suporte, espuma de poliuretano e biopartícula (biomassa imobilizada na espuma de poliuretano), foi avaliada com a finalidade de se verificar a influência desse fenômeno na remoção de BTEX nos reatores.

A concentração inicial de cada composto (25 mg/L) na água residuária sintética foi corrigida considerando-se o volume ocupado pelo suporte no frasco, como:

Volume do frasco: 39 mL

Volume ocupado pelo suporte no frasco:

Volume de 1 espuma: 0,125 cm³ (5 mm de aresta)

Volume de 40 espumas: 5 cm³ = 5 mL

A concentração de BTEX inicial (C₀) é dada por:

$$C_{\text{BTEX na solução}} \times V_{\text{solução}} = C_0 \times V_{\text{frasco}}$$

$$25 \text{ mg/L} \times 34 \text{ mL} = C_0 \times 39 \text{ mL}$$

$$C_0 = 21,80 \text{ mg/L}$$

Este valor é similar aos valores obtidos no branco.

Apesar de m-xileno e p-xileno estarem presentes na água residuária sintética, o potencial de adsorção desses compostos pelo suporte não foi avaliado pois não era possível separá-los através do método analítico utilizado.

A Figura 5.28 mostra os perfis de adsorção dinâmicos de BTEX na espuma de poliuretano e na biopartícula. A Tabela 5.37 apresenta os parâmetros ajustados da expressão hiperbólica (4.3) para cada composto com seus respectivos coeficientes de correlação.

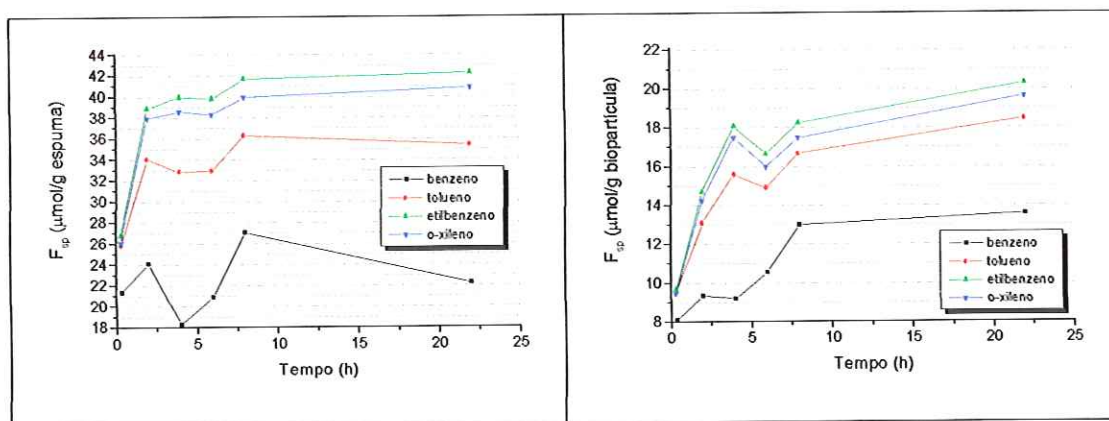


Figura 5.28: Perfis de adsorção dinâmicos de BTEX em espuma de poliuretano e biopartícula.

Tabela 5.37: Parâmetros das expressões hiperbólicas de BTEX na espuma de poliuretano e biopartícula.

Composto	F_{sp}^{max} ($\mu\text{mol/g}$ suporte)	τ (h)	R^2
Espuma de poliuretano			
Tolueno	$35,18 \pm 0,72$	$0,119 \pm 0,027$	0,8891
Etilbenzeno	$42,16 \pm 0,36$	$0,189 \pm 0,014$	0,9891
o-xileno	$40,62 \pm 0,40$	$0,182 \pm 0,016$	0,9850
Biopartícula			
Benzeno	$12,81 \pm 1,21$	$0,245 \pm 0,152$	0,7285
Tolueno	$16,93 \pm 0,81$	$0,316 \pm 0,112$	0,9185
Etilbenzeno	$19,10 \pm 0,80$	$0,375 \pm 0,111$	0,9009
o-xileno	$18,36 \pm 0,79$	$0,359 \pm 0,110$	0,8916

F_{sp}^{max} indica o valor máximo da capacidade de adsorção (F_{sp}).

τ representa o tempo necessário para adsorver metade da quantidade máxima.

O ajuste da expressão hiperbólica aos pontos experimentais apresentou coeficientes de correlação maiores que 0,8891, com exceção do benzeno que apresentou o pior coeficiente de correlação (0,7285), no ensaio com biopartícula e não apresentou ajuste no ensaio com espumas de poliuretano.

O valor de τ mostrou pequena variação de um composto para outro, indicando que o tempo necessário para adsorção é praticamente o mesmo para todos os compostos. O valor de τ foi menor somente para benzeno, mas o perfil dinâmico obtido apresentou o pior ajuste hiperbólico.

A capacidade de adsorção de BTEX pela espuma foi o dobro da determinada para a biopartícula. A menor capacidade de adsorção, medida por F_{sp}^{max} , foi a do benzeno, seguida pelo tolueno. Etilbenzeno e o-xileno apresentaram valores similares.

A capacidade de adsorção de BTEX pelo meio suporte, espuma de poliuretano e biopartícula, foi desprezível, quando comparada com a quantidade de BTEX removida nos

sistemas. De modo que os valores muito baixos de F_{sp}^{max} para biopartícula indicam que a biodegradação foi o principal fenômeno responsável pelo bom desempenho observado nos ensaios com RAHLF.

5.7 Análise de BTEX nos pontos de coleta de biogás

A presença de BTEX nos pontos de coleta do biogás produzido foi analisada para identificar possíveis volatilizações dos compostos. Não foi detectada, a presença de BTEX na atmosfera dos reatores. A Figura 5.29 apresenta cromatograma da análise de BTEX no biogás.

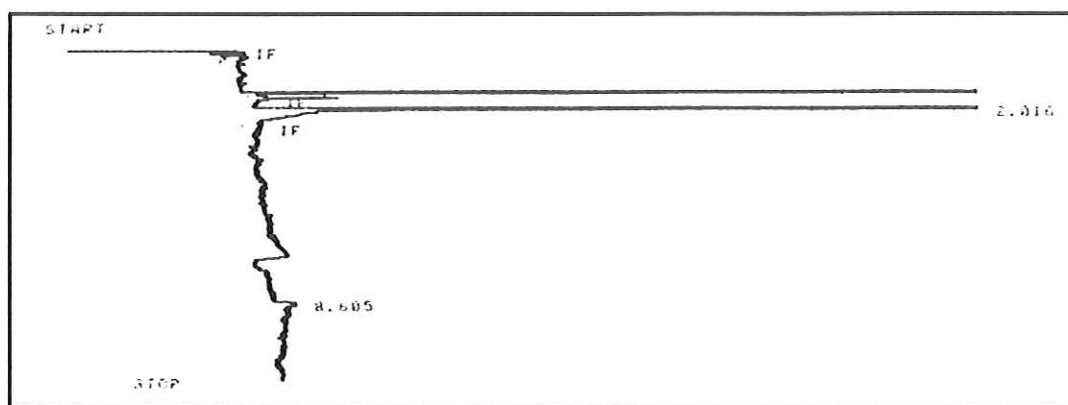


Figura 5.29: Análise cromatográfica de BTEX em ponto de coleta de biogás.

5.8 Determinações das constantes cinéticas aparentes de primeira ordem de degradação de BTEX

Os parâmetros cinéticos foram determinados, utilizando-se RAHLF tratando solução etanólica de BTEX nas 2ª e 3ª etapas do trabalho. O escoamento no reator foi considerado como tubular ideal baseado em estudos hidrodinâmicos realizados por Cabral (1995) e de Nardi (1999).

Foi considerado também modelo cinético de primeira ordem com residual. Speece (1996) cita que o metabolismo microbiano não pode ser normalmente mantido abaixo de uma concentração mínima de substrato, na qual microrganismos não mais obtêm energia para sustentar sua utilização. A natureza do limiar da concentração residual não foi, ainda, completamente elucidada, sendo relacionada com condições termodinâmicas de reação e com espécies microbianas e suas condições fisiológicas. Dessa forma, o balanço de massa em regime permanente resultou em:

$$R_{\text{obs}} = k_1^{\text{app}} \cdot (C - C_r) = \frac{-\varepsilon \cdot v_s}{D} \frac{d(C - C_r)}{d(L/D)} \quad (5.1)$$

Nessa expressão, R_{obs} é a velocidade global de reação ($\text{M.L}^{-1}.\text{T}^{-1}$), k_1^{app} é a constante cinética aparente de primeira ordem (T^{-1}), ε é a porosidade do leito, v_s é a velocidade superficial de líquido (L.T^{-1}), D é o diâmetro do RAHLF (L), C é a concentração de BTEX na fase líquida numa determinada posição longitudinal L/D (M.L^{-3}) e C_r é a concentração de BTEX residual (M.L^{-3}).

A velocidade superficial de líquido (v_s) é calculada pela expressão:

$$v_s = \frac{Q}{\varepsilon \cdot A_{\text{RAHLF}}} \quad (5.2)$$

Nessa expressão, Q é a vazão de líquido ($\text{L}^3.\text{T}^{-1}$) e A_{RAHLF} é a área da seção transversal do reator (L^2).

A velocidade superficial de líquido (v_s) no leito foi mantida constante durante toda a operação em 8,8 cm/s, sendo a área seccional do reator de 19,95 cm^2 e a porosidade do leito estimada em trabalhos anteriores de 0,4 (Zaiat *et al.*, 2000).

Integrando-se a expressão (5.1), obtêm-se:

$$(C - C_r) = (C_o - C_r) \cdot e^{\frac{-k_1^{\text{app}} \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} (L/D)} \quad (5.3)$$

Os valores de k_1^{app} foram obtidos pela equação (5.3), utilizando-se método de regressão não linear de Levenberg-Marquardt (Microcal Origin 5.0[®]). O ajuste da expressão cinética aos pontos experimentais apresentou coeficientes de correlação maiores que 0,994. A Tabela 5.38 apresenta os parâmetros obtidos do modelo, utilizando os valores dos perfis de BTEX em replicata. Não foram considerados (m+p)-xilenos, por ser difícil a interpretação desses compostos, não separados na análise cromatográfica. O modelo superestimou os valores das concentrações residuais.

Tabela 5.38: Valores dos parâmetros obtidos pela expressão cinética (5.3).

C_o foi fixo no modelo.

Composto	C_o (mg/L)	C_r (mg/L)	$k_1^{app} \cdot D/\epsilon \cdot v_s$
2ª etapa: água residuária sintética + solução etanólica de BTEX (3,0 mg/L)			
Benzeno	5,6	2,1	0,441
Tolueno	5,1	1,7	0,557
Etilbenzeno	4,9	1,4	0,608
o-xileno	4,9	1,6	0,608
2ª etapa: água residuária sintética + solução etanólica de BTEX (10,0 mg/L)			
Benzeno	10,6	4,3	0,566
Tolueno	10,4	3,8	0,606
Etilbenzeno	10,0	2,9	0,560
o-xileno	10,9	3,6	0,664
3ª etapa: solução etanólica de BTEX (12,0 mg/L)			
Benzeno	14,7	5,9	0,600
Tolueno	12,9	4,5	0,677
Etilbenzeno	11,8	3,9	0,759
o-xileno	12,2	4,5	0,779

Os valores médios das constantes cinéticas aparentes de primeira ordem k_1^{app} , obtidos na 2ª etapa de operação, foram calculados considerando todos os perfis realizados. A Tabela 5.39 mostra os valores de k_1^{app} nas duas etapas de operação.

Tabela 5.39: Valores das constantes cinéticas aparente de primeira ordem (k_1^{app}).

	2ª etapa: água residuária sintética + solução etanólica de BTEX	3ª etapa: solução etanólica de BTEX
Benzeno (d^{-1})	$8,4 \pm 1,5$	10,0
Tolueno (d^{-1})	$9,7 \pm 1,1$	11,3
Etilbenzeno (d^{-1})	$9,8 \pm 1,2$	12,7
o-xileno (d^{-1})	$10,7 \pm 1,4$	13,0

As constantes cinéticas aparentes de BTEX obtidas na 3ª etapa de operação, tendo como únicas fontes de carbono BTEX e etanol, foram cerca de 18 % maiores que as obtidas na presença de outras fontes de carbono. Isso seria esperado, pois a biomassa passaria a utilizar mais efetivamente BTEX.

Em ambas as etapas, o-xileno apresentou a maior velocidade de degradação e benzeno foi o mais lentamente degradado. As velocidades de degradação de tolueno e etilbenzeno foram iguais na 2ª etapa mas a degradação de etilbenzeno foi mais rápida que a do tolueno na 3ª etapa.

A grande maioria dos estudos cinéticos de degradações de BTEX, encontrados na literatura (Tabela 3.7), foram realizados em microcosmos contendo sedimento ou água

subterrânea como fonte de biomassa e temperaturas entre 12°C e 24°C. Nessas condições, as velocidades de degradações são muito lentas. O uso de água subterrânea para determinar o potencial de degradação pode levar a resultados enganosos pois microrganismos não ativos estão freqüentemente associados a poços (Thomas & Ward, 1989). As velocidades de degradações de BTEX, estimadas neste trabalho, a 30°C, foram cerca de 10 a 94 vezes maiores que as encontradas na literatura, em microcosmos contendo sedimento de aquíferos normalmente contaminados (Hutchins *et al.*, 1991a; Lovley *et al.*, 1994; Ball & Reinhard, 1996; Salanitro *et al.*, 1997). As velocidades de degradações de BTEX foram ainda maiores (125 a 450 vezes), quando comparadas com estudos em microcosmos contendo água de aquíferos (Morgan *et al.*, 1993; Salanitro *et al.*, 1997). Já Patterson *et al.* (1993) operando coluna com solo, obtiveram constantes cinéticas de primeira ordem de 3,4 dia⁻¹ para o tolueno e para o etilbenzeno, valores relativamente próximos aos apresentados na Tabela 5.39. Shim & Yang (1999) observaram que células imobilizadas em bioreatores apresentaram velocidades de degradações de BTEX de 9 a 75 vezes maiores que a mesma cultura de células suspensas em frascos de soro.

Reatores de leito fixo operados continuamente apresentam resultados muito superiores aos obtidos em microcosmos devido a vários fatores, tais como: elevada densidade celular, melhoramentos das culturas no reator (Shim & Yang, 1999), minimização da resistência à transferência de massa na fase líquida (Sarti *et al.*, 2001) e favoráveis condições hidrodinâmicas (Zaiat *et al.*, 1997).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo da degradação de BTEX em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) permitem concluir que:

- A análise de BTEX, por headspace estático / cromatografia gasosa, em amostras ambientais apresentou bom desempenho e simplicidade analítica. O método apresentou as seguintes características: pequeno volume de amostra utilizado (2 a 10 mL); linearidade na faixa estudada de 5,0 µg/L a 40,0 mg/L, com coeficiente de correlação maior que 0,997; limite de detecção de 10 µg/L para o benzeno, de 15 µg/L para o tolueno, de 27 µg/L para o etilbenzeno, de 47 µg/L para o (m+p)-xilenos e de 26 µg/L para o o-xileno; boa reprodutibilidade (coeficiente de variação das réplicas menor que 10,00 %) e eficiências satisfatórias do método de extração de 60,73 % a 111,49 %;
- Os reatores RAHLF foram capazes de remover benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos simultaneamente, com eficiências de remoção variando entre 65 % e 99 %, na faixa de concentrações médias de cada composto de 1,5 mg/L a 15,0 mg/L, com tempos de detenção hidráulica de 11,4 horas e 13,5 horas;
- A aplicação do RAHLF no tratamento de águas residuárias contendo BTEX deve ser criteriosa, pois outros compostos presentes poderiam estimular ou prejudicar os processos de degradação, como etanol e detergente comercial, respectivamente;
- Apesar do bom desempenho do RAHLF, quando operado com solução etanólica de BTEX como única fonte de carbono, a aplicação desse sistema na bioremediação merece estudos mais aprofundados e de otimização da degradação de BTEX, pois as concentrações efluentes devem alcançar os padrões de potabilidade, em µg/L, muito mais restritivos que os normalmente fixados para os padrões estabelecidos para sistemas de tratamento de águas residuárias, expressos em mg/L;

- A adição de nitrato estimulou a degradação de benzeno, tolueno e etilbenzeno em mais de 40 % e praticamente não estimulou a degradação de xilenos. Já a adição de sulfato estimulou a degradação de benzeno, tolueno e o-xileno em 30 %. Etilbenzeno e (m+p)-xilenos foram pouco estimulados (16 %);
- Frente à sobrecarga de choque orgânica, os reatores operados sob condições metanogênicas e com adição de nitrato foram capazes de absorver os efeitos da carga orgânica, restaurando a eficiência inicial após um mês. O reator com adição de sulfato atingiu outro estado de equilíbrio dinâmico aparente, apresentando elevados valores de ácido acético (763 mg/L) e DQO₅ (867 mg/L) efluente;
- Bioreatores tratando águas residuárias são ecossistemas que abrangem muitas espécies de organismos. O RAHLF forneceu condições excelentes para o desenvolvimento de biofilme complexo na fase de adaptação (sem BTEX), em termos de composição microbiana. Mesmo sendo formado na ausência de BTEX, tal ecossistema foi capaz de degradar BTEX nas fases seguintes. Em geral, foram observadas morfologias relacionadas a organismos fermentativos (cocos, coco-bacilos, bacilos, vibrios), acetoclásticos (*Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.) e hidrogenotróficos (bacilos fluorescentes);
- Além deste trabalho, várias pesquisas no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos / Universidade de São Paulo têm relatado a presença de bactérias redutoras de sulfato juntamente com bacilos fluorescentes, que são, em geral, associados à atividade metanogênica hidrogenotrófica, na presença de sulfato. Até o presente, não há explicações fundamentadas nos aspectos energéticos e cinéticos que permitam relacionar esse aspecto do processo;
- A capacidade de adsorção de BTEX pelo meio suporte, espuma de poliuretano e biopartícula, foi considerada desprezível, quando comparada com a quantidade de BTEX removida nos sistemas. Também não foi observada volatilização de BTEX nos reatores. Dessa forma, o principal fenômeno responsável pelo bom desempenho observado nos ensaios foi a biodegradação;

- As constantes cinéticas aparentes de primeira ordem com residual foram estimadas em $8,4 \pm 1,5 \text{ dia}^{-1}$ para o benzeno, $9,7 \pm 1,1 \text{ dia}^{-1}$ para o tolueno, $9,8 \pm 1,2 \text{ dia}^{-1}$ para o etilbenzeno e $10,7 \pm 1,4 \text{ dia}^{-1}$ para o o-xileno quando em solução etanólica de BTEX na presença de água residuária sintética; e em $10,0 \text{ dia}^{-1}$ para o benzeno, $11,3 \text{ dia}^{-1}$ para o tolueno, $12,7 \text{ dia}^{-1}$ para o etilbenzeno e $13,0 \text{ dia}^{-1}$ para o o-xileno quando em solução etanólica como única fonte de carbono.

7. SUGESTÕES

As sugestões para trabalhos futuros visando à continuidade da investigação da degradação de BTEX são as seguintes:

- Estudar detalhadamente a degradação anaeróbia de benzeno por ser o mais importante dos compostos BTEX devido a sua toxicidade;
- Verificar o comportamento da degradação anaeróbia de BTEX sem a presença de solventes ou outras fontes de carbono, para avaliar e otimizar os processo de degradação;
- Avaliar melhor o papel de outros aceptores de elétrons presentes em águas residuárias, como nitrato e sulfato, no processo de degradação de BTEX;
- Utilizar reatores anaeróbios horizontais de leito fixo no tratamento de águas residuárias industriais que contenham BTEX ou em águas de aquíferos contaminados visando a aplicação dessa tecnologia na área de bioremediação;
- Estudar as rotas de degradação de BTEX objetivando identificar produtos intermediários;
- Caracterizar os organismos, através de técnicas de biologia molecular, para avaliação dos organismos envolvidos diretamente na degradação de BTEX e obter culturas puras para determinar suas características fisiológicas e nutricionais;
- Investigar detalhadamente a cinética de degradação de BTEX para obtenção de dados de inibição por substrato e de inibição por produto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acton D. W., Barker J. F. (1992) *In situ* biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *Journal of Contaminant Hydrology*. **9**:325-352.
- Almendariz F. J., Meráz M., Soberón G., Monroy O. (2000) Degradation of lineal alkylbenzene sulphonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugmented with a *Pseudomonas Aeruginosa* (M113) strain. In: Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, 6, Recife-PE, 2000. *Anais*. Editora Universitária da UFPE, Recife. 1:278-284.
- Altenschmidt U., Fuchs G. (1991) Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Archives of Microbiology*. **156**:152-158.
- Altenschmidt U., Fuchs G. (1992) Anaerobic toluene oxidation to benzyl alcohol and benzaldehyde in a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Journal of Bacteriology*. **174**(14):4860-4862.
- Alvarez P. J. J., Vogel T. M. (1991) Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**(10):2981-2985.
- Alvarez P. J. J., Anid P. J., Vogel T. M. (1994) Kinetics of toluene degradation by denitrifying aquifer microorganisms. *Journal of Environmental Engineering*. **120**(5):1327-1336.
- Alvarez P. J. J., Cronkhite L. A., Hunt C. S. (1998) Use of benzoate to establish reactive buffer zones for enhanced attenuation of BTX migration: aquifer column experiments. *Environmental Science and Technology*. **32**(4):509-515.
- Anders H. J., Kaetzke A., Kämpfer P., Ludwig W., Fuchs G. (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **45**(2):327-333.
- Anderson R. T., Lovley D. R. (1997) Ecology and biogeochemistry of *in situ* groundwater bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*. **15**:289-350.
- Anderson R. T., Rooney-Varga J. N., Gaw C. V., Lovley D. R. (1998) Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environmental Science and Technology*. **32**(9):1222-1229.

- Anderson R. T., Lovley D. R. (1999) Naphthalene and benzene degradation under Fe (III) – reducing conditions in petroleum-contaminated aquifers. *Bioremediation Journal*. **3**(2):121-135.
- Anderson R. T., Lovley D. R. (2000) Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environmental Science and Technology*. **34**(11):2261-2266.
- Anid P. J., Alvarez P. J. J., Vogel T. M. (1993) Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen peroxide and nitrate. *Water Research*. **27**(4):685-691.
- Bailey J.E., Ollis D.F. (1986) **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2nd edition. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Ball H. A., Johnson H. A., Reinhard M, Spormann A. M. (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *Journal of Bacteriology*. **178**(19):5755-5761.
- Ball H. A., Reinhard M. (1996) Monoaromatic hydrocarbon transformation under anaerobic conditions at seal beach, California: laboratory studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **15**(2):114-122.
- Bandpi A. M., Elliott D. J., Mazdeh A. M. (1999) Denitrification of groundwater using acetic acid as a carbon source. *Water Science and Technology*. **40**(2):53-59.
- Barbaro J. R., Barker J. F., Lemon L. A., Mayfield C. I. (1992) Biotransformation of BTEX under anaerobic, denitrifying conditions: field and laboratory observations. *Journal of Contaminant Hydrology*. **11**:245-272.
- Barker J. F., Patrick G. C., Major D. (1987) Natural attenuation of aromatic hydrocarbons in a shallow sand aquifer. *Ground Water Monitoring Review*. **7**:64-71.
- Battersby N. S., Wilson V. (1989) Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**(2):433-439.
- Beller H. R., Grbic-Galic, D., Reinhard M. (1992a) Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(3):786-793.
- Beller H. R., Reinhard M., Grbic-Galic, D. (1992b) Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(9):3192-3195.
- Beller H. R., Ding W. H., Reinhard M. (1995) Byproducts of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of *in situ* bioremediation. *Environmental Science and Technology*. **29**(11):2864-2870.
- Beller H. R., Spormann A. M., Sharma P. K., Cole J. R., Reinhard M. (1996) Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(4):1188-1196.

- Beller H. R., Spormann A. M. (1997a) Anaerobic activation of toluene and o-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *Journal of Bacteriology*. **179**(3):670-676.
- Beller H. R., Spormann A. M. (1997b) Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(9):3729-3731.
- Beller H. R., Edwards E. A. (2000) Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in a highly enriched methanogenic culture. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(12):5503-5505.
- Biegert T., Fuchs G. (1995) Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp.. *Archives of Microbiology*. **163**:407-417.
- Biegert T., Fuchs G., Heider J. (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *European Journal of Biochemistry*. **238**:661-668.
- Bolaños Rojas M. L. (2001) *Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas*. São Carlos. 118p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Borden R. C., Daniel R. A., LeBrun IV L. E., Davis C. W. (1997) Intrinsic biodegradation of MTBE and BTEX in a gasoline-contaminated aquifer. *Water Resources Research*. **33**:1105-1115.
- Bowlen G. F., Kosson D. S. (1995) *In situ* processes for bioremediation of BTEX and petroleum fuel products, 515-542. In: Young L. Y. e Cerniglia C. E. (ed), **Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals**. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Bregnard T. P. A., Höhener P., Häner A., Zeyer J. (1996) Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **15**(3):299-307.
- Burland S. M., Edwards E. A. (1999) Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(2):529-533.
- Cabral A. K. A. (1995) *Caracterização hidrodinâmica de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Carroquino M. J., Gersberg R. M., Dawsey W. J., Bradley M. D. (1992) Toxicity reduction associated with bioremediation of gasoline-contaminated groundwaters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **49**:224-231.
- Casarini D. C. P., Dias C. L., Lemos M. M. G. (2001) *Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo*. São Paulo. /Relatório técnico CETESB/
- Cass Q. B., Degani A. L. G. (2001) **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. Editora da UFSCar, São Carlos.

- Chaudhuri B. K., Wiesmann U. (1995) Enhanced anaerobic degradation of benzene by enrichment of mixed microbial culture and optimization of the culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **43**:178-187
- Chaudhuri B. K., Wiesmann U. (1996) Kinetic study of the anaerobic degradation of toluene by a mixed culture. *Acta Biotechnology*. **16**(1):31-41.
- Chee-Sanford J. C., Frost J. W., Fries M. R., Zhou J., Tiedje J. M. (1996) Evidence for acetyl coenzyme A and cinnamoyl coenzyme A in the anaerobic toluene mineralization pathway in *Azoarcus toluolyticus* Tol-4. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(3):964-973.
- Chen C. I., Taylor R. T. (1997) Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **48**:121-128.
- Coates J. D., Anderson R. T., Lovley D. R. (1996a) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(3):1099-1101.
- Coates J. D., Phillips E. J. P., Lonergan D. J., Jenter H., Lovley D. R. (1996b) Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(5):1531-1536.
- Coates J. D., Anderson R. T., Woodward J. C., Phillips E. J. P., Lovley D. R. (1996c) Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environmental Science and Technology*. **30**(9):2784-2789.
- Coates J. D., Woodward J., Allen J., Philp P., Lovley D. R. (1997) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(9):3589-3593.
- Coates J. D., Anderson R. T. (2000) Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends in Biotechnology*. **18**(10):408-412.
- Coates J. D., Chakraborty R., Lack J. G., O'Connor S. M., Cole K. A., Bender K. S., Achenbach L. A. (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature*. **411**:1039-1043.
- Cohen Y. (2001) Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*. **77**:257-274.
- Colberg P. J. S., Young L. Y. (1995) Anaerobic degradation of nonhalogenated homocyclic aromatic compounds coupled with nitrate, iron or sulfate reduction, 307-330. In: Young L. Y. e Cerniglia C. E. (ed), **Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals**. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Collins C. H., Braga G. L., Bonato P. S. (1997) **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7 ed. Editora da UNICAMP, Campinas.
- Corrêa C. L., Pedroso R. C. (1997) Headspace gas chromatography with capillary column for urine alcohol determination. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **704**(1-2):365-368.

- Corseuil H. X., Weber Jr. W. J. (1994) Potential biomass limitations on rates of degradation of monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. *Water Research*. **28**(6):1415-1423.
- Corseuil H. X., Alvarez P. J. J. (1996) Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. *Water Science and Technology*. **34**(7-8):311-318.
- Corseuil H. X., Hunt C. S., Santos R. C. F., Alvarez P. J. J. (1998) The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Water Research*. **32**(7):2065-2072.
- Coschigano P. W., Young L. Y. (1997) Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(2):652-660.
- Coschigano P. W., Wehrman T. S., Young L. Y. (1998) Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(5):1650-1656.
- Costa Neto, P. L. O. (1977) **Estatística**. Edgard Blücher, São Paulo.
- Cozzarelli I. M., Eganhouse R. P., Baedecker M. J. (1990) Transformation of monoaromatic hydrocarbons to organic acids in anoxic groundwater environment. *Environmental Geological Water Science*. **16**(2):135-141.
- Cunningham J. A., Rahme H., Hopkins G. D., Lebron C., Reinhard M. (2001) Enhanced *in situ* bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. *Environmental Science and Technology*. **35**(8):1663-1670.
- Curtis F., Lammey J. (1998) Intrinsic remediation of a diesel fuel plume in Goose Bay, Labrador, Canada. *Environmental Pollution*. **103**:203-210.
- Da Silveira, B.I. (1996) **Cinética Química das Reações Homogêneas**. Edgard Blücher, São Paulo.
- Damianovic M. H. R. Z. (1997) *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 176p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Davis J. W., Klier N. J., Carpenter C. L. (1994) Natural biological attenuation of benzene in ground water beneath a manufacturing facility. *Ground Water*. **32**(2):215-226.
- Davis G. B., Barber C., Power T. R., Thierrin J., Patterson B. M., Rayner J. L., Wu Q. (1999) The variability and intrinsic remediation of a BTEX plume in anaerobic sulphate-rich groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*. **36**:265-290.
- de Nardi I. R., Zaiat M., Foresti E. (1999) Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors. *Bioprocess Engineering*. **21**(5):469-476.

- Del Nery V. (1987) *Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. São Carlos. 187p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Dillalo R., Albertson O. E. (1961) Volatile acids by direct titration. *Journal of Water Pollution Control Federation*. **33**(4):356-365.
- Dolfing J., Zeyer J., Binder-Eicher P., Schwarzenbach R. P. (1990) Isolation and characterization of bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Archives of Microbiology*. **154**:336-341.
- Edwards E. A., Grbic-Galic D. (1992) Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(8):2663-2666.
- Edwards E. A., Wills L. E., Reinhard M., Grbic-Galic D. (1992) Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(3):794-800.
- Edwards E. A., Grbic-Galic D. (1994) Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(1):313-322.
- Edwards E. A., Edwards A. M., Grbic-Galic D. (1994) A method for detection of aromatic metabolites at very low concentrations: application to detection of metabolites of anaerobic toluene degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(1):323-327.
- Elmén J., Pan W., Leung S. Y., Magyarosy A., Keasling J. D. (1997) Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnology and Bioengineering*. **55**(1):82-90.
- Enkiri F., Hulen C., Legault-Demare J. (1995) Hydrophobic adsorption of aromatic compounds on polyurethane foam as carbon source for *Pseudomonas* growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **44**:539-545.
- Evans P. J., Mang D. T., Young L. Y. (1991a) Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**(2):450-454.
- Evans P. J., Mang D. T., Kim K. S., Young L. Y. (1991b) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**(4):1139-1145.
- Evans P. J., Ling W., Goldschmidt B., Ritter E. R., Young L. Y. (1992) Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(2):496-501.
- Fang H. H. P., Liu Y., Chen T. (1997) Effect of sulfate on anaerobic degradation of benzoate in UASB reactors. *Journal of Environmental Engineering*. **123**(4):320-328.
- Federle T. W., Schwab B. S. (1992) Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a laundromat wastewater pond. *Water Research*. **26**(1):123-127.

- Ficker M., Krastel K., Orlicky S., Edwards E. (1999) Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(12):5576-5585.
- Field J. A. (2001) Limits of anaerobic biodegradation. In: World Congress Anaerobic Digestion 2001, 9, Antuérpia, Bélgica, 2001. *Anais*. Technological Institute, Antuérpia. **1**:45-52.
- Flyvbjerg J., Arvin E., Jensen B. K., Olsen S. K. (1993) Microbial degradation of phenols and aromatic hydrocarbons in creosote-contaminated groundwater under nitrate-reducing conditions. *Journal of Contaminant Hydrology*. **12**:133-150.
- Foo S. C. (1991) Benzene pollution from gasoline usage. *The Science of the Total Environment*. **103**:19-26.
- Frazer A. C., Ling W., Young L. Y. (1993) Substrate induction and metabolite accumulation during anaerobic toluene utilization by the denitrifying strain T1. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(9):3157-3160.
- Frazer A. C., Coschigano P. W., Young L. Y. (1995) Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*. **1**:293-303.
- Fries M. R., Zhou J., Chee-Sanford J., Tiedje J. M. (1994) Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(8):2802-2810.
- Fustinoni S., Giampiccolo R., Pulvirenti S., Buratti M., Colombi A. (1999) Headspace solid-phase microextraction for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in urine. *Journal of Chromatography B*. **723**:105-115.
- Gersberg R. M., Dawsey W. J., Bradley M. D. (1991) Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in groundwater under denitrifying conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **47**:230-237.
- Gersberg R. M., Carroquino M. J., Fischer D. E., Dawsey J. (1995a) Biomonitoring of toxicity reduction during *in situ* bioremediation of monoaromatic compounds in groundwater. *Water Research*. **29**(2):545-550.
- Gersberg R. M., Korth K. G., Rice L. E., Randall J. D., Bogardt A. H., Dawsey W. J., Hemmingsen B. B. (1995b) Chemical and microbial evaluation of *in-situ* bioremediation of hydrocarbons in anoxic groundwater enriched with nutrients and nitrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **11**:549-558.
- Gobato E. A. A. F. (1995) *Análise de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água e ar utilizando o acoplamento headspace dinâmico-cromatografia gasosa (DHS-HRGC)*. São Carlos. 89p. Dissertação (mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Granger D. A., Butler B. J., Barker J. F. (1999) A case of phosphorus limiting monoaromatic hydrocarbon biodegradation in groundwater. *Bioremediation Journal*. **3**(3):213-221.
- Grbic-Galic D., Vogel T. M. (1987) Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**(2):254-260.

- Grbic-Galic D. (1990) Anaerobic microbial transformation of nonoxygenated aromatic and alicyclic compounds in soil, subsurface and freshwater sediments, 117-189. In: Bollag J. M. e Stotzky G. (ed.), *Soil Biochemistry*. 6. Marcel Dekker Inc., New York.
- Haag F., Reinhard M., McCarty P. L. (1991) Degradation of toluene and p-xylene in anaerobic microcosms: evidence for sulfate as a terminal electron acceptor. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **10**:1379-1389.
- Häner A., Höhener P., Zeyer J. (1995) Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(8):3185-3188.
- Harms G., Zengler K., Rabus R., Aeckersberg F., Minz D., Rosselló-Mora R., Widdel F. (1999) Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(3):999-1004.
- Harwood C. S., Gibson J. (1997) Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *Journal of Bacteriology*. **179**(2):301-309.
- Heider J., Fuchs G. (1997a) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*. **243**:577-596.
- Heider J., Fuchs G. (1997b) Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe*. **3**:1-22.
- Heider J., Boll M., Breese K., Breinig S., Ebenau-Jehle C., Feil U., Gad'on N., Laempe D., Leuthner B., Mohamed M. S., Schneider S., Burchhardt G., Fuchs G. (1998) Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Archives of Microbiology*. **170**:120-131.
- Heider J., Spormann A. M., Beller H. R., Widdel F. (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*. **22**:459-473.
- Her J. J., Huang J. S. (1995) Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresource Technology*. **54**:45-51.
- Hess A., Höhener P., Hunkeler D., Zeyer J. (1996) Bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer: simulation studies in laboratory aquifer columns. *Journal of Contaminant Hydrology*. **23**:329-345.
- Hess A., Zarda B., Hahn D., Häner A., Stax D. (1997) *In situ* analysis of denitrifying toluene and m-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(6):2136-2141.
- Hunt M. J., Shafer M. B., Barlaz M. A., Borden R. C. (1997) Anaerobic biodegradation of alkylbenzenes in laboratory microcosms representing ambient conditions. *Bioremediation Journal*. **1**(1):53-64.
- Hunter K. S., Wang Y., van Cappellen P. (1998) Kinetic modeling of microbially-driven redox chemistry of subsurface environments: coupling transport, microbial metabolism and geochemistry. *Journal of Hydrology*. **209**:53-80.

- Hurek T., Reinhold-Hurek B. (1995) Identification of grass-associated and toluene-degrading diazotrophs, *Azoarcus* spp., by analyses of partial 16s ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(6):2257-2261.
- Hutchins S. R., Sewell G. W., Kovacs D. A., Smith G. A. (1991a) Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environmental Science and Technology*. **25**(1):68-76.
- Hutchins S. R., Downs W. C., Wilson J. T., Smith G. B., Kovacs D. A., Fine D. D., Douglass R. H., Hendrix D. J. (1991b) Effect of nitrate addition on bioremediation of fuel-contaminated aquifer: field demonstration. *Ground Water*. **29**(4):571-580.
- Hutchins S. R. (1991a) Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**(8):2403-2407.
- Hutchins S. R. (1991b) Optimizing BTEX biodegradation under denitrifying conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **10**:1437-1448.
- Hutchins S. R. (1992) Inhibition of alkylbenzene biodegradation under denitrifying conditions by using the acetylene block technique. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(10):3395-3398.
- Hutchins S. R., Moolenaar S. W., Rhodes D. E. (1992) Column studies on BTEX biodegradation under microaerophilic and denitrifying conditions. *Journal of Hazardous Materials*. **32**:195-214.
- Hutchins S. R. (1997) Effects of microcosm preparation on rates of toluene biodegradation under denitrifying conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **18**:170-176.
- Hutchins S. R., Miller D. E., Thomas A. (1998) Combined laboratory/field study on the use of nitrate for *in situ* bioremediation of a fuel-contaminated aquifer. *Environmental Science and Technology*. **32**(12):1832-1840.
- Ioffe B. V., Vitenberg A. G. (1984) **Head-space Analysis and Related Methods in Gas Chromatography**. John Wiley & Sons, New York.
- Isken S., Bont J. A. M. (1998) Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*. **2**:229-238.
- Johnson H. A., Spormann A. M. (1999) In vitro studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene mineralization. *Journal of Bacteriology*. **181**(18):5662-5668.
- Johnston J. J., Borden R. C., Barlaz M. A. (1996) Anaerobic biodegradation of alkylbenzenes and trichloroethylene in aquifer sediment down gradient of a sanitary landfill. *Journal of Contaminant Hydrology*. **23**:263-283.
- Johnston C. D., Rayner J. L., Patterson B. M., Davis G. B. (1998) Volatilisation and biodegradation during air sparging of dissolved BTEX-contaminated groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*. **33**:377-404.

- Jorgensen C., Nielsen B., Jensen B. K., Mortensen E. (1995a) Transformation of o-xylene to o-methyl benzoic acid by a denitrifying enrichment culture using toluene as the primary substrate. *Biodegradation*. **6**:141-146.
- Jorgensen C., Flyvbjerg J., Arvin E., Jensen B.K. (1995b) Stoichiometry and kinetics of microbial toluene degradation under denitrifying conditions. *Biodegradation*. **6**:147-156.
- Jüttner F., Henatsch J. J. (1986) Anoxic hypolimnion is a significant source of biogenic toluene. *Nature*. **323**:797-798.
- Jüttner F. (1988) Benzene in the anoxic hypolimnion of a freshwater lake. *Naturwissenschaften*. **75**:151-153.
- Kao C. M., Borden R. C. (1997) Site-specific variability in BTEX biodegradation under denitrifying conditions. *Ground Water*. **35**(2):305-311.
- Kao C. M., Wang C. C. (2000) Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. *Water Research*. **34**(13):3413-3423.
- Kao C. M., Prosser J. (2001) Evaluation of natural attenuation rate at a gasoline spill site. *Journal of Hazardous Materials*. **B82**:275-289.
- Kazumi J., Caldwell M. E., Suflita J. M., Lovley D. R., Young L. Y. (1997) Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. *Environmental Science and Technology*. **31**(3):813-818.
- Kelley C. A., Hammer B. T., Coffin R. B. (1997) Concentrations and stable isotope values of BTEX in gasoline-contaminated groundwater. *Environmental Science and Technology*. **31**(9):2469-2472.
- Ketola R. A., Virkki V. T., Ojala M., Komppa V., Kotiaho T. (1997) Comparison of different methods for the determination of volatile organic compounds in water samples. *Talanta*. **44**:373-382.
- Kolb B. (1999) Headspace sampling with capillary columns. *Journal of Chromatography A*. **842**:163-205.
- Krieger C. J., Beller H. R., Reinhard M., Spormann A. M. (1999) Initial reactions in anaerobic oxidation of m-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. *Journal of Bacteriology*. **181**(20):6403-6410.
- Krueger C. J., Radakovich K. M., Sawyer T. E., Barber L. B., Smith R. L., Field J. A. (1998) Biodegradation of surfactant linear alkylbenzenesulfonate in sewage-contaminated groundwater: a comparison of column experiments and field tracer tests. *Environmental Science and Technology*. **32**(24):3954-3961.
- Kuhn E. P., Colberg P. J., Schnoor J. L., Wanner O., Zehnder A. J. B., Schwarzenbach R. P. (1985) Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: Laboratory column studies. *Environmental Science and Technology*. **19**(10):961-968.

- Kuhn E. P., Zeyer J., Eicher P., Schwarzenbach R. P. (1988) Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**(2):490-496.
- Kumaran P., Paruchuri Y. L. (1997) Kinetics of phenol biotransformation. *Water Research*. **31**(1):11-22.
- Kurán P., Soják L. (1996) Environmental analysis of volatile organic compounds in water and sediment by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. **733**:119-141.
- Langenhoff A. A. M., Zehnder A. J. B., Schraa G. (1996) Behaviour of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment columns. *Biodegradation*. **7**:267-274.
- Langwaldt J. H., Puhakka J. A. (2000) On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environmental Pollution*. **107**:187-197.
- Lens P. N. L., Visser A., Janssen A. J. H., Hulshoff Pol L. W., Lettinga G. (1998) Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **28**(1):41-88.
- Levenspiel, O. (1999) **Chemical Reaction Engineering**. 3rd edition. John Wiley & Sons, New York.
- Lima C. A. A. (2001) *Tratamento de esgoto sanitário em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) – escala piloto*. São Carlos. 165p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Lodaya M., Lakhwala F., Rus E., Singh M., Lewandowski G., Sofer S. (1991) Biodegradation of benzene and a BTX mixture using immobilized activated sludge. *Journal of Environmental Science and Health*. **A26**(1):121-137.
- Lovley D. R., Phillips E. J. P. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**(6):1472-1480.
- Lovley D. R., Baedeker M. J., Lonergan D. J., Cozzarelli I. M., Phillips E. J. P., Siegel D. I. (1989) Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature*. **339**:297-299.
- Lovley D. R., Lonergan D. J. (1990) Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**(6):1858-1864.
- Lovley D. R., Giovannoni S. J., White D. C., Champine J. E., Phillips E. J. P., Gorby Y. A., Goodwin S. (1993) *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*. **159**:336-344.
- Lovley D. R., Woodward J. C., Chappelle F. H. (1994) Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature*. **370**:128-131.
- Lovley D. R., Coates J. D., Woodward J. C., Phillips E. J. P. (1995) Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(3):953-958.

- Lovley D. R., Woodward J. C., Chapelle F. H. (1996) Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(1):288-291.
- Lovley D. R. (1997) Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **18**:75-81.
- Luong J. H. T. (1987) Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*. **29**:242-248.
- Major D. W., Mayfield C. I., Barker J. F. (1988) Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand. *Ground Water*. **26**(1):8-14.
- Massol-Deyá A. A., Whallon J., Hickey R. F., Tiedje J. M. (1995) Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(2):769-777.
- Massol-Deyá A., Weller R., Ríos-Hernández L., Zhou J. Z., Hickey R. F., Tiedje J. M. (1997) Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(1):270-276.
- Meckenstock R. U. (1999) Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiology Letters*. **177**:67-73.
- Menéndez J. C. F., Sánchez M. L. F., Uría J. E. S., Martínez E. F., Sanz-Medel A. (2000) Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*. **415**:9-20.
- Metcalf & Eddy, Inc. (1991) **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse**. 3rd edition. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Migaud M. E., Chee-Sanford J. C., Tiedje J. M., Frost J. W. (1996) Benzylfumaric, benzylmaleic, and Z- and E-phenylitaconic acids: synthesis, characterization, and correlation with a metabolite generated by *Azoarcus toluolyticus* Tol-4 during anaerobic toluene degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(3):974-978.
- Moraes E. M, Adorno M. A. T., Zaiat M., Foresti E. (2000) Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, 6, Recife-PE, 2000. *Anais*. Editora Universitária da UFPE, Recife. **2**:235-238.
- Morasch B., Annweiler E., Warthmann R. J., Meckenstock R. U. (2001) The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: degradation of naphthalene, o-, and m-xylene by sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. **44**:183-191.
- Morgan P., Lewis S. T., Watkinson R. J. (1993) Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in gas-condensate-contaminated groundwater. *Environmental Pollution*. **82**:181-190.

- Morkin M., Devlin J. F., Barker J. F., Butler B. J. (2000) *In situ* sequential treatment of a mixed contaminant plume. *Journal of Contaminant Hydrology*. **45**:283-302.
- Nadim F., Hoag G. E., Liu S., Carley R. J., Zack P. (2000) Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. **26**:169-178.
- Nales M., Butler B. J., Edwards E. A. (1998) Anaerobic benzene biodegradation: a microcosm survey. *Bioremediation Journal*. **2**(2):125-144.
- Nation J. L. (1983) A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*. **58**:347-351.
- Nielsen H., Holm P. E., Christensen T. H. (1992) A field method for determination of groundwater and groundwater-sediment associated potentials for degradation of xenobiotic organic compounds. *Chemosphere*. **25**(4):449-462.
- Nyberg U., Anderson B., Aspegren H. (1996) Long-term experiences with external carbon sources for nitrogen removal. *Water Science and Technology*. **33**(12):109-116.
- Oliveira S. V. W. B (2001) *Avaliação da degradação e toxicidade de formaldeído em reator anaeróbio horizontal de leito fixo*. São Carlos. 95p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Patterson B. M., Pribac F., Barber C., Davis G. B., Gibbs R. (1993) Biodegradation and retardation of PCE and BTEX compounds in aquifer material from Western Australia using large-scale columns. *Journal of Contaminant Hydrology*. **14**:261-278.
- Phelps T. J., Niedzielski J. J., Malachowsky K. J., Schram R. M., Herbes S. E., White D. C. (1991) Biodegradation of mixed-organic wastes by microbial consortia in continuous-recycle expanded-bed bioreactors. *Environmental Science and Technology*. **25**(8):1461-1465.
- Phelps C. D., Kazumi J., Young L.Y. (1996) Anaerobic degradation of benzene in BTX mixtures dependent on sulfate reduction. *FEMS Microbiology Letters*. **145**:433-437.
- Phelps C. D., Young L. Y. (1999) Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation*. **10**:15-25.
- Phelps C. D., Young L. Y. (2001) Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Advances in Agronomy*. **70**:329-357.
- Rabus R., Nordhaus R., Ludwig W., Widdel F. (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(5):1444-1451.
- Rabus R., Widdel F. (1995a) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*. **163**:96-103.
- Rabus R., Widdel F. (1995b) Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Archives of Microbiology*. **164**:448-451.

- Rabus R., Widdel F. (1996) Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(4):1238-1241.
- Rabus R., Fukui M., Wilkes H., Widdel F. (1996) Degradative capacities and 16s rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Applied and Environmental Microbiology*: **62**(10):3605-3613.
- Rabus R., Heider J. (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*. **170**:377-384.
- Reinhard M., Goodman N. L. (1984) Occurrence and distribution of organic chemicals in two landfill leachate plumes. *Environmental Science and Technology*. **18**(12):953-961.
- Reinhard M., Shang S., Kitanidis P. K., Orwin E., Hopkins G. D., Lebron C. A. (1997) *In situ* BTEX biotransformation under enhanced nitrate- and sulfate-reducing conditions. *Environmental Science and Technology*. **31**(1):28-36.
- Ripley L. E., Boyle W. C., Converse J. C. (1986) Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*. **58**(5):406-411.
- Robertson W. J., Franzmann P. D., Mee B. J. (2000) Spore-forming, *Desulfosporosinus*-like sulphate-reducing bacteria from a shallow aquifer contaminated with gasoline. *Journal of Applied Microbiology*. **88**:248-259.
- Robertson W. J., Bowman J. P., Franzmann P. D., Mee B. J. (2001) *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulphate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**:133-140.
- Rooney-Varga J. N., Anderson R. T., Fraga J. L., Ringelberg D., Lovley D. R. (1999) Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(7):3056-3063.
- Rueter P., Rabus R., Wilkes H., Aeckersberg F., Rainey F. A., Jannasch H. W., Widdel F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature*. **372**:455-458.
- Rügge K., Bjerg P. L., Christensen T. H. (1995) Distribution of organic compounds from municipal solid waste in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environmental Science and Technology*. **29**(5):1395-1400.
- Salanitro J. P. (1993) The role of bioattenuation in the management of aromatic hydrocarbon plumes in aquifers. *Ground Water Monitoring and Remediation*. **13**(4):150-161.
- Salanitro J. P., Wisniewski H. L., Byers D. L., Neville C. C., Schroder R. A. (1997) Use of aerobic and anaerobic microcosms to assess BTEX biodegradation in aquifers. *Ground Water Monitoring and Remediation*. **17**(3):210-221.

- Sarti A., Vieira L. G. T., Foresti E., Zaiat M. (2001) Influence of the liquid-phase mass transfer on the performance of a packed-bed bioreactor for wastewater treatment. *Bioresource Technology*. **78**(3):231-238.
- Sauer T. C. (1981) Volatile liquid hydrocarbon characterization of underwater hydrocarbon vents and formation waters from offshore production operations. *Environmental Science and Technology*. **15**(8):917-923.
- Sayles G. D., Suidan M. T. (1993) Biological treatment of industrial and hazardous wastewater, 245-267. In: Levin M. A. e Gealt M. A. (ed), **Biotreatment of Industrial and Hazardous Waste**. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Schindler I., Friedl A. (1995) Degradation of toluene/heptane mixtures in a trickling-bed bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **44**:230-233.
- Schink B. (1988) Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects, 771-846. In: Zhender A. J. B. (ed), **Biology of Anaerobic Microorganisms**. John Wiley & Sons, New York.
- Schocher R. J., Seyfried B., Vazquez F., Zeyer J. (1991) Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*. **157**:7-12.
- Seabra P. N. (1999) Bioremediação intrínseca de aquíferos contaminados por gasolina. Anais do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Salvador, BA.
- Seyfried B., Glod G., Schocher R., Tschsch A., Zeyer J. (1994) Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and m-xylene by denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(11):4047-4052.
- Shim H., Yang S. T. (1999) Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Journal of Biotechnology*. **67**:99-112.
- Sierra-Alvarez R., Lettinga G. (1991) The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **34**:544-550.
- Song B., Young L. Y., Palleroni N. J. (1998) Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **48**:889-894.
- Späth R., Flemming H. C., Wuertz S. (1998) Sorption properties of biofilms. *Water Science and Technology*. **37**(4-5):207-210.
- Speece R. E. (1996) **Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters**. Archae Press, Nashville.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater** (1995) 19th edition. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington DC, USA.

- Stoner D. L. (1994) Hazardous organic waste amenable to biological treatment, 1-25. In: Stoner D. L. (ed), **Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste**. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Su J. J., Kafkewitz D. (1994) Utilization of toluene and xylenes by a nitrate-reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* under low oxygen and anoxic conditions. *FEMS Microbiology Ecology*. **15**:249-257.
- Szewzyk U., Pfenning N. (1987) Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov. *Archives of Microbiology*. **147**:163-168.
- THE MERCK INDEX (1996) **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 12 ed. Merck.
- Thierrin J., Davis G. B., Barber C., Patterson B. M., Pribac F., Power T. R., Lambert M. (1993) Natural degradation rates of BTEX compounds and naphthalene in a sulphate reducing groundwater environment. *Hydrological Sciences – Journal – des Sciences Hydrologiques*. **38**(4):309-322.
- Thomas J. M., Ward C. H. (1989) In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. *Environmental Science and Technology*. **23**(7):760-766.
- Torres P. (1992) *Desempenho de um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários*. São Carlos. 163p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Tschech A., Fuchs G. (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Archives of Microbiology*. **148**:213-217.
- van Beelen P., van Keulen F. (1990) The kinetics of the degradation of chloroform and benzene in anaerobic sediment from the river Rhine. *Hydrobiological Bulletin*. **24**(1):13-21.
- van der Hoek J. P., Urlings L. G. C. M., Grobber C. M. (1989) Biological removal of polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene, toluene, ethylbenzene, xylene and phenolic compounds from heavily contaminated ground water and soil. *Environmental Technology Letters*. **10**:185-194.
- van Langenhove H., Roelstraete K., Schamp N., Houtmeyers J. (1985) GC-MS identification of odorous volatiles in wastewater. *Water Research*. **19**(5):597-603.
- Varesche M. B. A., Zaiat M., Vieira L. G. T., Vazoller R. F., Foresti E. (1997) Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **48**(4):534-538.
- Vazzoler R. F. (1995) *Avaliação de ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. São Carlos. 259p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- Veningerová M., Prachar V., Kovacicová J., Uhnák J. (1997) Analytical methods for the determination of organochlorine compounds – Application to environmental samples in the Slovak Republic. *Journal of Chromatography A*: 774(1-2):333-347.
- Vogel T. M., Grbic-galic D. (1986) Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(1):200-202.
- Voice T. C., Kolb B. (1994) Comparison of european and american techniques for the analysis of volatile organic compounds in environmental matrices. *Journal of Chromatographic Science*. 32:306-311.
- Wagener S., Schink B. (1987) Anaerobic degradation of nonionic and anionic surfactants in enrichment cultures and fixed-bed reactors. *Water Research*. 21(5):615-622.
- Wang Z., Fingas M., Landriault M., Sigouin L., Xu N. (1995) Identification of alkylbenzenes and direct determination of BTEX and (BTEX + C₃-benzenes) in oils by GC/MS. *Analytical Chemistry*. 67:3491-3500.
- Weber W. J. Jr., Corseuil H. X. (1994) Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Water Research*. 28(6):1407-1414.
- Weiner J. M., Lovley D. R. (1998a) Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2):775-778.
- Weiner J. M., Lovley D. R. (1998b) Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(5):1937-1939.
- Weiner J. M., Lauck T. S., Lovley D. R. (1998) Enhanced anaerobic benzene degradation with the addition of sulfate. *Bioremediation Journal*. 2(3-4):159-173.
- Widdel F. (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria, 469-585. In: Zhender A. J. B. (ed), **Biology of Anaerobic Microorganisms**. John Wiley & Sons, New York.
- Wiedemeier T. H., Swanson M. A., Wilson J. T., Kampbell D. H., Mille R. N., Hansen J. E. (1996) Approximation of biodegradation rate constants for monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in ground water. *Ground Water Monitoring and Remediation*. 16(3):186-194.
- Wilkes H., Boreham C., Harms G., Zengler K., Rabus R. (2000) Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulphate-reducing bacteria. *Organic Geochemistry*. 31:101-115.
- Wilson B. H., Smith G. B., Rees J. F. (1986) Biotransformations of selected alkylbenzenes and halogenated aliphatic hydrocarbons in methanogenic aquifer material: a microcosm study. *Environmental Science and Technology*. 20(10):997-1002.
- Wilson L. P., Bouwer E. J. (1997) Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 18:116-130.

- Yeom S. H., Yoo Y. J. (1999) Removal of benzene in a hybrid bioreactor. *Process Biochemistry*. **34**:281-288.
- Zaiat M., Cabral A. K. A., Foresti E. (1994) Reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química*. **11**(2):33-42.
- Zaiat M., Vieira L. G. T., Cabral A. K. A., de Nardi I. R., Vela F. J., Foresti E. (1997) Rational basis for designing horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor for wastewater treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **14**(1):01-08.
- Zaiat M, Passig F. H., Foresti E. (2000) A mathematical model and criteria for designing horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology*. **71**:235-243.
- Zeyer J., Kuhn E. P., Schwarzenbach R. P. (1986) Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. **52**(4):944-947.
- Zhao H. W., Mavinic D. S., Oldham W. K., Koch F. A. (1999) Controlling factors for simultaneous nitrification and denitrification in two-stage intermittent aeration process treating domestic sewage. *Water Research*. **33**(4):961-970.
- Zhou J., Fries M. R., Chee-Sanford J. C., Tiedje J. M. (1995) Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus toluolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **45**(3):500-506.
- Zhou J., Palumbo A. V., Tiedje J. M. (1997) Sensitive detection of a novel class of toluene-degrading denitrifiers, *Azoarcus toluolyticus*, with small-subunit rRNA primers and probes. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(6):2384-2390.
- Zilverentant A. G. (1997) Pilot-testing, design and full-scale experience of a sequencing batch reactor system for the treatment of the potentially toxic waste water from a road and rail car cleaning site. *Water Science and Technology*. **35**(1):259-267.