

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS

**PROCESSOS MICROBIOLÓGICOS ASSOCIADOS À DEGRADAÇÃO DE
SOLVENTES ORGANOCLORADOS NA ÁGUA SUBTERRÂNEA – JURUBATUBA –
SÃO PAULO – SP**

SILVIA APARECIDA MOLINAS FERREIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Geociências da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Recursos Minerais
e Hidrogeologia

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Antônio
Bertolo

SÃO PAULO
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Serviço de Biblioteca e Documentação do IGc/USP

Ficha catalográfica gerada automaticamente com dados fornecidos pelo(a) autor(a)
via programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de catalogação da publicação:
Sonia Regina Yole Guerra - CRB-8/4208 | Anderson de Santana - CRB-8/6658

Ferreira, Silvia Aparecida Molinas
Processos Microbiológicos Associados à Degradação
de Solventes Organoclorados na Água Subterrânea/
Jurubatuba/ São Paulo/ SP / Silvia Aparecida
Molinas Ferreira; orientador Reginaldo Antônio
Bertolo. -- São Paulo, 2018.
133 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Recursos Minerais e Hidrogeologia) -- Instituto
de Geociências, Universidade de São Paulo, 2018.

1. biodegradação. 2. solventes organoclorados. 3.
ferramentas moleculares. 4. microcosmo. 5. água
subterrânea. I. Bertolo, Reginaldo Antônio, orient.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS

**PROCESSOS MICROBIOLÓGICOS ASSOCIADOS À
DEGRADAÇÃO DE SOLVENTES ORGANOCLORADOS NA ÁGUA
SUBTERRÂNEA - JURUBATUBA - SÃO PAULO - SP**

SILVIA APARECIDA MOLINAS FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Antonio Bertolo

Dissertação de Mestrado

Nº 794

COMISSÃO JULGADORA

Dr. Reginaldo Antonio Bertolo

Dra. Maria Inês Zanoli Sato

Dra. Marilda Mendonça Guazzelli Ramos Vianna

Dra. Alexandra Vieira Suhogusoff

SÃO PAULO
2018

Ao meu querido marido e amigo, Tiago De Conto,
pelo amor, conforto e compreensão durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. Reginaldo Bertolo, pelas ótimas conversas e por me acolher nesse mestrado, por me possibilitar um aprendizado que está muito além dessa pesquisa, por me permitir trabalhar com esse tema de extrema importância e com uma equipe fantástica.

Aos meus colegas do projeto Jurubatuba, fundamentais nas etapas de campo, Daphne, Vermelho (Paulo Lojkasek Lima), Marcos e Fábio, por tornar as atividades de campo mais animadas.

Aos colegas e funcionários do CEPAS, em especial à Ana, Higor, Mari, Rafa, Dani, Paulinho pela amizade, dicas e conversas reconfortantes.

Aos professores do CEPAS, pelas aulas inspiradoras e fundamentais para o desenvolvimento desse mestrado e formação profissional.

Ao prof. Dr. René Schneider, por me permitir livre acesso aos laboratórios da Engenharia Química da USP (GenBio e Semi-Industrial), e aos seus alunos de doutorado Julia, Luciana e Georges, que me auxiliarem nos testes necessários para a realização dos ensaios de bancada e compartilhem seus conhecimentos, e aos técnicos de laboratório, Rodrigo, Joel, Orlinda, sempre dispostos a orientar no uso dos equipamentos.

À prof. Dra. Vivian Pellizari e a doutoranda Natascha Bergo, do laboratório LECOM-IOUSP, que realizou os ensaios de citometria de fluxo, por compartilhar seus conhecimentos e suas sugestões para o projeto de pesquisa.

Ao Dr. Pablo Vásquez, do CTR IPEN/ CNEN – SP, pela prontidão na esterilização do material de campo no Irradiador Multipropósito de ^{60}Co . Ao Marcos, da Oficina Central do Instituto de Física – USP, por desenvolver o artefato de filtração com dedicação e qualidade.

À Ximena Druar e ao Phill Dennis, do laboratório SiREM, por sua disponibilidade nos esclarecimentos técnicos e pela atenção e cuidados dispensados durante a visita em sua sede, em Guelph, no Canadá.

Ao laboratório Analytical Technology, em especial a Camila, responsável pelo recebimento e análise das amostras de VOC, pelas explicações e rapidez no fornecimento dos resultados.

À minha família, pelo apoio e confiança ao longo desses anos, que me possibilitaram abraçar esse mestrado, em especial ao meu marido Tiago, pelo bom humor nos momentos difíceis.

Aos meus queridos amigos, que estão sempre no meu coração, Lu, Ivana, Elis, Maiara, Dani... Agradeço imensamente pelo apoio durante essa fase.

Ao IGc, ao programa de pós-graduação RMH e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao FINEP e à FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

FERREIRA, S. A. M., 2018. 133 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A urgência na remediação de aquíferos de importância comercial demanda o refinamento do modelo conceitual de fluxo e transporte de contaminantes em meios complexos. A biorremediação e a atenuação natural monitorada (MNA) estão entre as técnicas com melhor custo benefício, mas demandam conhecimentos sólidos dos processos de biodegradação de microrganismos. A pesquisa deste mestrado buscou avaliar o potencial de biodegradação de etenos clorados (tetracloroetano, tricloroetano, isômeros de dicloroetano e cloreto de vinila) na área crítica do Jurubatuba, zona sul do município de São Paulo, com o uso de microcosmos (ensaios de bancada) e identificação da presença de genes funcionais *vcrA*, *bvcA* e *tceA* em amostras ambientais. As etapas de campo incluíram o acompanhamento da instalação de sistemas multiníveis em alta resolução e a coleta de água subterrânea em um perfil vertical com 21 zonas de interesse, no aquífero poroso e fraturado, para análise de solventes organoclorados e condições geoquímicas. As etapas de laboratório envolveram o uso de ferramentas clássicas, com a montagem de ensaios de bancada para avaliação da degradação de etenos clorados, com microcosmos anaeróbios com e sem inibidor metabólico, e de ferramentas avançadas (análises moleculares) para a identificação de biomarcadores e entendimento das condições microbiológicas *in situ*. Os microcosmos anaeróbios são uma importante linha de evidência para avaliação de MNA e permitiram a identificação da degradação de etenos clorados, mesmo em baixas concentrações de carbono orgânico, onde há o predomínio de processos metanogênicos. Foi observada inibição, pela azida sódica, de organismos importantes na degradação de tetracloroetano, que afetou a degradação completa desta substância. Durante o ensaio de bancada não foi possível dissociar as taxas de degradação biótica e abiótica. As análises moleculares permitiram identificar genes de *Dehalococcoides* e genes funcionais *vcrA*, *bvcA* e *tceA* (biomarcadores) na zona de transição de dupla porosidade, onde havia o substrato biodegradável, ausente em condições naturais. Os resultados indicaram que é necessário incremento de nutrientes (bioestimulação) e/ou manutenção de condições metanogênicas para incentivar a biodegradação na área.

Palavras-chave: biodegradação, solventes organoclorados, microcosmo, ferramentas moleculares, água subterrânea, genes funcionais, *Dehalococcoides*

ABSTRACT

FERREIRA, S. A. M., 2018. 133 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The urgency for aquifers remediation of commercial importance requires refinement of flow and transport conceptual model in complex sites. Bioremediation and monitored natural attenuation (MNA) are among the most cost-effective alternatives techniques. However, it requires a deep knowledge of prevailing biodegradation process and microorganism. This Master Degree research aims to evaluate chlorinated ethenes (tetrachloroethene, trichloroethene, dichloroethene isomers, vinyl chloride) biodegradation potential at the Jurubatuba critical area, located in south of Sao Paulo city, along with assessment of biodegradation molecular biomarkers and degradation rates derived from batch test with environmental samples. Field steps include high-resolution multilevel systems installation based on site assessment and groundwater sampling events through 21 zones along a vertical profile in porous and fractured aquifer, for chlorinated ethenes and geochemistry assessment. Laboratory steps were carried out using classical and emergent tools, such as anaerobic microcosm experiments with and without inhibition (batch test) and molecular biological tools to assess biomarkers and to understand microbiological process ongoing in-situ. Anaerobic microcosm study is an important line of evidence of MNA. It demonstrated chlorinated ethane degradation with low organic carbon content and methanogenic conditions. Sodic azide inhibited important organisms which affected tetrachloroethene degradation. Due to bacterial activity during batch teste it was not possible to detach biotic from abiotic degradation rates. Molecular biological tools provided information of *Dehalococcoides* and functional genes *vcrA*, *bvcA* e *tceA* in the transition zone of porous and fractured aquifer. These genes were present at the transition zone with biodegradable substrate and absent on natural conditions, showing that biodegradation requires biostimulation and/or methanogenic conditions to occur.

Key words: biodegradation, chlorinated ethenes, microcosm, molecular tools, groundwater, functional gene

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|------------|
| 1 | Introdução | 14 |
| 2 | Objetivos | 17 |
| 3 | Revisão bibliográfica..... | 18 |
| 3.1 | Caracterização da área de estudo | 18 |
| 3.2 | Características dos solventes halogenados..... | 23 |
| 3.3 | Mecanismos de partição e transporte de solventes halogenados | 26 |
| 3.4 | Comportamento microbiológico associado a contaminações por solventes organoclorados | 29 |
| 3.5 | Microbiologia | 36 |
| 3.6 | Técnica para estudo microbiológico | 39 |
| 3.6.1 | PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i> | 39 |
| 3.6.2 | Contagem de células por citometria de fluxo | 40 |
| 3.6.3 | Ensaio de bancada -estudos com microcosmos | 41 |
| 3.7 | Atenuação natural monitorada - MNA | 45 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| 4.1 | Instalação de poços de monitoramento multiníveis | 47 |
| 4.2 | Metodologias de coleta e ensaios realizados em amostras de água subterrânea | |
| | 54 | |
| 4.2.1 | Ensaio realizado para caracterização da qualidade da água subterrânea..... | 57 |
| 4.2.2 | Ensaio moleculares de PCR em tempo real (qPCR)..... | 59 |
| 4.2.3 | Quantificação de células por citometria de fluxo | 61 |
| 4.2.4 | Estudos microbiológicos complementares | 64 |
| 4.3 | Ensaio de bancada - degradação de etenos clorados em microcosmos | 67 |
| 4.3.1 | Extração de VOC | 71 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 72 |
| 5.1 | Concentrações químicas e parâmetros físico-químicos nas amostras de água subterrânea..... | 72 |
| 5.2 | Caracterização Microbiológica - ensaios moleculares e quantificação por citometria de fluxo | 82 |
| 5.3 | Ensaio moleculares para extração de RNA e DNA..... | 92 |
| 5.4 | Microcosmos | 93 |
| 6 | CONCLUSÕES | 101 |
| | REFERÊNCIAS..... | 103 |

| | |
|---|------------|
| APÊNDICE A – Esquema de análise de TOC/ NPOC no equipamento shimadzu | 114 |
| APÊNDICE B – SQI, limites de quantificação e metodologias de análise | 116 |
| APÊNDICE C – Testes de filtração e coleta de amostras para ensaios biológicos | 117 |
| APÊNDICE D – Fotos de montagem dos microcosmos | 118 |
| APÊNDICE E – Perfis litológicos dos sistemas multiníveis CMT e WB..... | 119 |
| APÊNDICE F – Tabelas com Resultados de VOC e gases nas campanhas de amostragem, parâmetros físico-químicos estabilizados e concentraÇÕES nos microcosmos | 123 |
| APÊNDICE G – Processos redox – Planilhas Redox.Assignment.xls..... | 127 |
| APÊNDICE H – Fotos dos microcosmos A, B e C durante o experimento | 129 |
| APÊNDICE I – Fotos dos microcosmos com extrato de levedura..... | 130 |
| ANEXO A – Perfil construtivo dos poços de monitoramento convencionais | 131 |
| ANEXO B – Critérios e Classificação da Planilha Redox.Assignment.xls (Jurgens et al., 2009) | 132 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 – Crescimento no número de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. Em 2017, 53% das áreas cadastradas estão na UGHRI-AT (Alto Tietê) e 417 áreas constam na agência da CETESB de Santo Amaro, que abrange os casos do Jurubatuba..... | 15 |
| Figura 3.1 – Geologia geral da área do Jurubatuba com a indicação dos poços e pedreiras estudados por FIUME (2013) para elaboração do modelo geométrico de fraturas. | 19 |
| Figura 3.2 – Localização da unidade industrial, na área crítica do Jurubatuba, com sobreposição do traçado original do Rio Pinheiros e extensão de solos aluviais | 22 |
| Figura 3.3 – Modelos de distribuição microbiológica em subsuperfície (escala centimétrica)..... | 29 |
| Figura 3.4 – Modelos de distribuição microbiológica em subsuperfície (escala estratigráfica)..... | 30 |
| Figura 3.5 – Vias de degradação de etenos clorados e enzimas | 32 |
| Figura 3.6 – Número de enzimas dehalogenases redutoras e lista de bactérias halorespiradoras..... | 33 |
| Figura 3.7 – Degradação redutiva do PCEa eteno por bactérias <i>Dehalococcoides</i> (Dhc) e etapas de participação das enzimas redutases tceA, bvcA e vcrA..... | 35 |
| Figura 3.8 – Fatores que caracterizam o metabolismo de microrganismos. | 37 |
| Figura 3.9 – Esquema simplificado de síntese protéica. | 38 |
| Figura 3.10 – Sequência de aceptores de elétrons e subprodutos..... | 43 |
| Figura 4.1 – Disposição dos sistemas multiníveis instalados CMT-01 e MP-01 e proximidade aos trio de poços de monitoramento multiníveis convencionais PM-11, PM-11A e PM-11B, presentes na área. | 48 |
| Figura 4.2 – Instalação do poço CMT..... | 49 |
| Figura 4.3 – Esquema do perfil construtivo do poço CMT, com sete portas de monitoramento..... | 50 |
| Figura 4.4 – Instalação do poço Westbay® MP-01. | 51 |
| Figura 4.5 – Esquema do perfil construtivo do poço multinível MP-01, com 15 zonas de monitoramento..... | 52 |
| Figura 4.6 – Detalhe da porta de monitoramento do WB e sonda..... | 53 |
| Figura 4.7 – <i>Canisters</i> para amostragem do poço Westbay® MP-01..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.8 – Equipamentos utilizados na amostragem de água subterrânea: mini bomba inercial de inox, bomba peristáltica e bomba de bexiga | 56 |
| Figura 4.9 – Gráfico de densidade de fluorescência verde (FL1/BL1) versus vermelho (FL3/BL3), que exemplifica a região com seleção de bactérias em amostras de água de poço (com <i>gate</i> fixo - traçado vermelho). Comparação dos gráficos gerados no equipamento BD Accure C6 e Attune NxT. | 63 |
| Figura 4.10 – Seleção de bactérias (LNA e HNA) no histograma de fluorescência em verde (FL1/ BL1) com dados selecionados do <i>gate</i> | 64 |
| Figura 4.11 – Fluxograma esquemático da análise de ácidos nucleicos. Tracejado em azul indica as etapas realizadas em amostras de água subterrânea. | 66 |
| Figura 5.1 – Perfil vertical de concentrações de SQI a partir de amostras dos sistemas multiníveis de alta resolução CMT e MP-01 ($\mu\text{g/L}$). | 73 |
| Figura 5.2 – Perfil vertical de concentrações de SQI a partir de amostras dos sistemas multiníveis de alta resolução CMT e MP-01 ($\mu\text{g/L}$). | 74 |
| Figura 5.3 – Perfil de concentrações de SQI no poço multinível convencional (PM-11, PM-11A, PM-11B e CMT ($\mu\text{g/L}$). | 75 |
| Figura 5.4 – Parâmetros físico-químicos no trio multinível PM-11, PM-11A, PM-11B e CMT..... | 77 |
| Figura 5.5 – Parâmetros físico-químicos no CMT e MP-01..... | 78 |
| Figura 5.6 – Carbono e pares redox em amostras do aquífero poroso – 1ª campanha.79 | |
| Figura 5.7 – Comparação dos resultados de quantificação de células por citometria de fluxo nos equipamentos Attune e Accuri (IO USP) | 83 |
| Figura 5.8 – Cópias genômicas do gene 16S rRNA por PCR em tempo real (qPCR) nas amostras de água subterrânea (Sirem) | 84 |
| Figura 5.9 – Comparativo da variação de cópias genômicas (CG) e número de células ao longo da profundidade..... | 85 |
| Figura 5.10 – Comparativo dos resultados de qPCR para os genes 16S rRNA, Dhc, vceA, bvcA, tceA em amostras de água subterrânea..... | 89 |
| Figura 5.11 – Relação entre a soma de cópias genômicas de vceA+bvcA e Dhc plotados na ferramenta BioPIC, indicam que há potencial para degradação de cloreto de vinila <i>in-situ</i> | 90 |
| Figura 5.12 – Evolução das concentrações de etenos clorados nos microcosmos..... | 93 |
| Figura 5.13 – Fração molar de etenos clorados nos microcosmos | 97 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 – Propriedades físico-químicas e de etenos clorados | 24 |
| Tabela 3.2 – Sistemas afetados pela exposição a etenos clorados | 26 |
| Tabela 3.3 – Vantagens e limitações da atenuação natural com bioremediação intrínseca | 46 |
| Tabela 4.1 – Perfil construtivo do poço de monitoramento multinível CMT | 49 |
| Tabela 4.2 – <i>Primers</i> utilizados nas análises moleculares de Dhc e redutases | 61 |
| Tabela 5.1 – Processos redox predominantes ao longo da profundidade (<i>Redox assignment</i> , JURGENS <i>et al</i> , 2009) | 81 |
| Tabela 5.2 – Análise de genes de Bactéria total e <i>Dehalococcoides</i> sp. | 86 |
| Tabela 5.3 – Análises 16SrRNA, Dhc e genes funcionais | 88 |
| Tabela 5.4 – Comparação dos resultados de TOC, IC e TC no substrato do microcosmo com a bentonita revestida e bentonita pellet tradicional | 91 |
| Tabela 5.5 – Comparativo da concentração de etenos clorados - amostra original (PM-11B) e média das amostras dos microcosmos B e C | 94 |
| Tabela 5.6 – Razão entre produtos de degradação e compostos degradados | 96 |
| Tabela 5.7 – Acompanhamento do teste de viabilidade nos ensaios com extrato de levedura e alíquotas dos microcosmos B e C (aeróbio e anaeróbio) | 99 |

Lista de Siglas

| | | | |
|-----------------|---|--------|--|
| µg/L | micrograma por litro | IGc | Instituto de Geociências |
| µmol/L | micromol por litro | ITRC | <i>Interstate Technology & Regulatory Council (USA)</i> |
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas | kg | quilograma |
| BAT | Bacia do Alto Tietê | L | litro |
| BT | Bactéria Total | LNA | <i>low nucleic acid</i> - baixo conteúdo de ácidos nucleicos |
| bvcA | <i>BAV1 vinyl chloride reductase</i> - enzima redutase de cloreto de vinila da linhagem BAV1 | m | metro |
| C | <i>Condutividade elétrica</i> | MAGI | <i>MOSDAX Automated Groundwater Interface</i> - interface automática da sonda MOSDAX |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior | MBT | <i>Molecular Biological Tools</i> |
| CAS nº | <i>Chemical Abstracts Service</i> | MNA | <i>Monitored Natural Attenuation - Atenuação Natural Monitorada</i> |
| CEPAS USP | Centro de Pesquisas de Águas Subterrâneas da Universidade de São Paulo | NPOC | <i>Non Purgeable Organic Carbon</i> - Carbono Orgânico não purgável |
| CETESB | Companhia Ambiental do Estado de São Paulo | OD | <i>oxigênio dissolvido</i> |
| CMT | <i>Continuous Multichannel Tubing®</i> | OHR | <i>Organohalide Respiration</i> |
| COVISA | Coordenação de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo | ORP | <i>oxidation reduction potential</i> - potencial de óxido-redução |
| CSIA | <i>Compound Specific Isotope Analysis</i> | PCE | percloroetano/ tetracloroetano |
| CTR - IPEN/CNEN | Centro de Tecnologia das Radiações - Instituto de Pesquisas Nucleares/ Comissão Nacional de Energia Nuclear | PCR | <i>polymerase chain-reaction</i> - reação de polimerização em cadeia |
| CV | cloreto de vinila | pH | potencial hidrogeniônico |
| DAEE | Departamento de Águas e Energia Elétrica | PM | poço de monitoramento |
| DCE | Dicloroetano | PTFE | Politetrafluoretileno (teflon®) |
| Dhc | <i>Dehalococcoides</i> | qPCR | <i>quantitative polymerase chain reaction</i> - PCR quantitativo - PCR em tempo real |
| DFN | <i>Discrete Fracture Network</i> | RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> - ácido ribonucleico |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic Acid</i> - ácido desoxirribonucleico | rRNA | <i>ribosomal Ribonucleic Acid</i> - ácido ribonucleico ribossomal |
| DNAPL | <i>Dense Non-Aqueous Phase Liquid</i> - fase livre não aquosa de alta densidade | SABESP | Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo |
| EMD | <i>Environmental Molecular Diagnostic</i> | SAC | Sistema Aquífero Cristalino |
| EPA | <i>United States Environmental Protection Agency</i> | SAS | Sistema Aquífero Sedimentar |
| FINEP | Financiadora de Estudos e Projetos do Ministério da Ciência e Tecnologia | SQI | Substâncias Químicas de Interesse |
| FLUTe® | Flexible Liner Underground Technologies® | TC | <i>Total Carbon</i> - Carbono Total |
| GC/MS | <i>Gas Chromatography /Mass Spectrometry</i> - cromatografia a gás/ espectrometria de massa | TCE | tricloroetano |
| GenBio | Grupo de Engenharia de Bioprocessos (Engenharia Química da USP) | tceA | <i>trichloroethene reductase</i> - enzima redutase de tricloroetano |
| GESOL | Bases Técnicas para a gestão de áreas contaminadas por solventes clorados | TOC | <i>Total Organic Carbon</i> - Carbono Orgânico Total |
| HDPE | <i>High Density Polyethylene</i> - polietileno de alta densidade | UGRHI | Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos |
| HNA | <i>high nucleic acid</i> - alto conteúdo de ácidos nucleicos | vcrA | <i>vinyl chloride reductase</i> - enzima redutase de cloreto de vinila |
| IC | <i>Inorganic Carbon</i> - Carbono Inorgânico | VOC | <i>Volatile Organic Compounds</i> - Compostos Orgânicos Voláteis |
| IG | Instituto Geológico | WB | westbay |
| | | WOE | <i>weight of evidence</i> |
| | | ZDE | Zona de Desenvolvimento Econômico |
| | | ZUPI | Zona de Uso Predominantemente Industrial |

1 INTRODUÇÃO

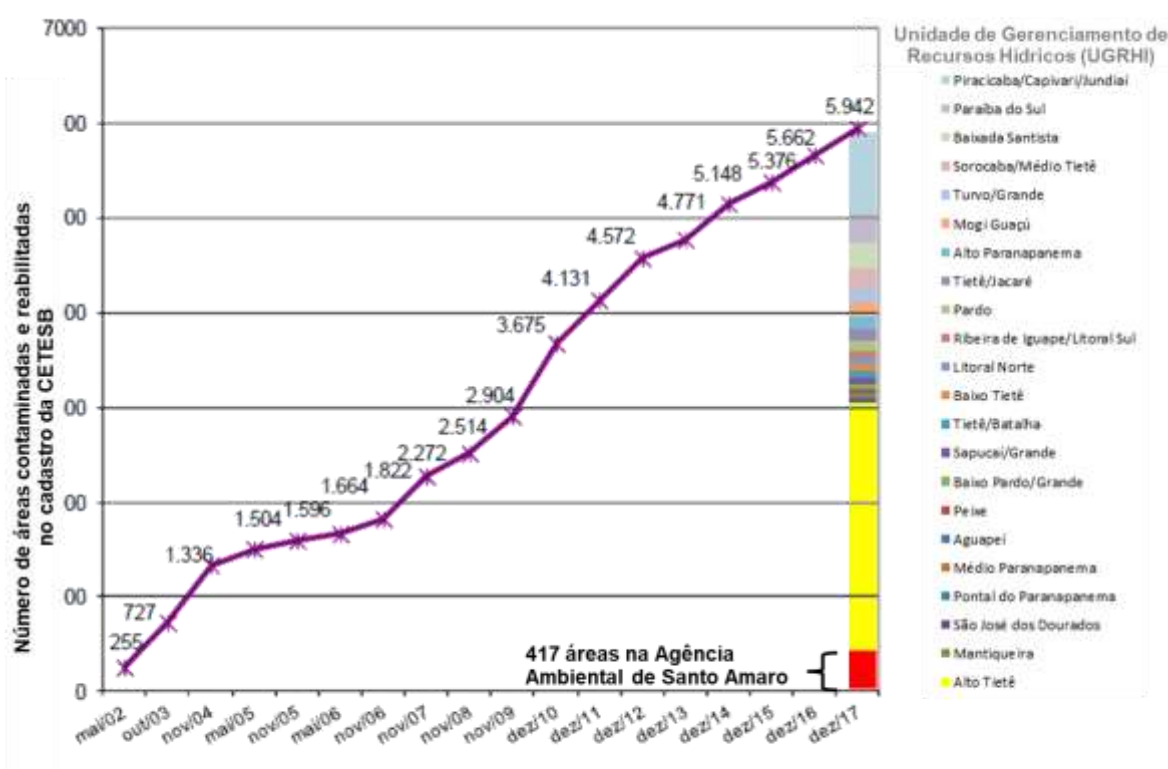
Os solventes halogenados (organoclorados) são compostos orgânicos amplamente utilizados em processos industriais devido às suas propriedades físico-química, especialmente como desengraxantes de peças metálicas, mas também nas atividades de lavagem a seco. Sua produção teve início na Alemanha, no final do século XIX, e nos Estados Unidos, no começo do século XX, com o crescimento de sua produção e consumo durante a Segunda Guerra Mundial (Pankow and Cherry, 1996). Entretanto, apenas no fim da década de 1970 houve a constatação do potencial de contaminação dessa classe de contaminantes, com a identificação dessas substâncias em águas destinadas ao consumo humano, em diversas cidades nos Estados Unidos, bem como a constatação da persistência de compostos clorados no meio ambiente, após estudos sobre o comportamento dessa classe de substâncias em subsuperfície (Pankow and Cherry, 1996).

Historicamente, o descarte de produtos químicos no solo era uma prática comum, tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos, e resultou em passivos ambientais identificados décadas após o fato, como foi o caso de Love Canal na região de Niagara, Nova Iorque (Pankow and Cherry, 1996). O desenvolvimento de ferramentas analíticas mais sensíveis, também na década de 70 e 80, permitiu a identificação dessas substâncias em fase dissolvida, na ordem de partes por milhão (ppm) e partes por bilhão (ppb), o que permitiu dimensionar a grande abrangência da contaminação e interrupção no uso dos recursos hídricos impactados, inclusive em aquíferos de importância comercial. Desta forma, a ausência de ferramentas regulatórias, a manipulação, o armazenamento, o transporte e a disposição inadequados destas substâncias, bem como o desconhecimento da resiliência no meio físico onde os compostos clorados eram enterrados e dos efeitos ao meio ambiente e à saúde humana, resultaram em passivos ambientais em diversas partes do mundo.

No Estado de São Paulo foram identificadas 5942 áreas contaminadas desde 2002, dentre as quais 53% estão localizadas na Bacia do Alto Tietê (BAT), 481 apresentam histórico de contaminação por solventes halogenados e 109 por solventes aromáticos halogenados (CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2017b). O número de passivos ambientais no cadastro da CETESB tende continuar aumentando (Figura 1.1), uma vez que a Decisão de Diretoria nº

038/2017/C (CETESB, 2017) amplia a exigência de investigação ambiental em áreas que abrigam ou abrigaram atividades potencialmente geradoras de áreas contaminadas, pelo uso de solventes halogenados, em especial nas áreas prioritárias definidas na Resolução da Secretaria do Meio Ambiente SMA nº 11/2017 (SMA - Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2017) .

A Figura 1.1 ilustra a evolução na inclusão de áreas contaminadas e reabilitadas no cadastro da CETESB (2017), indicando a distribuição por bacia hidrográfica e o número de casos cadastrados na Agência Ambiental de Santo Amaro, que abrange os casos na região do Jurubatuba.



Fonte: Adaptado de CETESB, 2017.

Figura 1.1 – Crescimento no número de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. Em 2017, 53% das áreas cadastradas estão na UGRHI-AT (Alto Tietê) e 417 áreas constam na agência da CETESB de Santo Amaro, que abrange os casos do Jurubatuba.

Entre as quatro regiões prioritárias para a identificação de áreas contaminadas, definidas na Resolução SMA nº 11/2017, está a área do Jurubatuba, cujo zoneamento era para uso predominantemente industrial (ZUPI-131) e atualmente possui ocupação mista (zona de desenvolvimento econômica, ZDE-2), passando por processo de transformação com uso e ocupação do solo. Nessa região foram

identificados solventes organoclorados em poços de produção de água profundos (aquífero fraturado), em 2001, resultando no fechamento destes pela Coordenação de Vigilância em Saúde – COVISA e no estabelecimento de uma área de 31,57 km² para restrição e controle temporário dos usos dos recursos hídricos subterrâneos (DAEE/ IG, 2009; L'Apicciarella, 2009).

A impossibilidade do uso sustentável dos recursos hídricos resulta em grandes prejuízos econômicos e sociais e requer o estudo de alternativas para a remediação eficaz das áreas impactadas.

Nesse contexto, desde 2011 o Centro de Pesquisas de Águas Subterrâneas – CEPAS USP atua no projeto cujo principal objetivo é estabelecer bases técnicas para gestão de áreas contaminadas por solventes clorados em aquíferos fraturados, por meio de pesquisas de iniciação científica, mestrados e doutorados, cujos dados são obtidos na região do Jurubatuba.

As pesquisas realizadas para o refinamento do modelo conceitual de fluxo e transporte de solventes organoclorados em áreas de alta complexidade geológica, tais como a zona de alteração entre o aquífero poroso e o cristalino (fraturado), que ocorre na região do Jurubatuba, subsidiam as ações de gerenciamento desta e de outras áreas críticas. Essas informações auxiliam na tomada de decisão dos órgãos reguladores na identificação de alternativas viáveis para o tratamento e uso da água subterrânea.

Entre as técnicas de remediação *in situ* existentes, a biorremediação apresenta-se com o melhor custo benefício, em comparação com técnicas que envolvem processos térmicos, como a dessorção térmica, e químicos, via processos oxidativos ou redutores avançados (Vidali, 2001; IPT/BNDES, 2014), pois o potencial de interação dos microrganismos torna-se uma vantagem adicional para a remediação de misturas complexas de contaminantes e seus produtos de degradação. A atenuação natural monitorada (MNA) também é uma técnica de remediação que sofre grande influência de processos de biodegradação (biorremediação intrínseca), bem como da degradação abiótica e de outros mecanismos não destrutivos de atenuação natural (Wiedemeier *et al.*, 1999). Um dos fatores determinantes para o sucesso dessas técnicas é que o tempo para a biodegradação seja mais rápido do que a velocidade de fluxo do contaminante na água subterrânea (Alvarez e Illman, 2006).

Conforme CETESB (2017), no Estado de São Paulo há 70 áreas utilizando a biorremediação e 700 utilizando a técnica de atenuação natural monitorada, sendo esta a quarta técnica mais citada no relatório. A viabilidade na aplicação dessas técnicas de remediação deve considerar, inicialmente, a existência de organismos com o metabolismo necessário para a biodegradação das substâncias químicas de interesse (SQI) na área de estudo, além da biodisponibilidade das SQI em fase dissolvida, em concentrações que induzam a produção das enzimas necessárias por esses organismos. Outros requisitos que favorecem a biodegradação são: a disponibilidade de aceptores e doadores de elétrons, pH na faixa de 6 a 9, condições adequadas de temperatura (em geral, acima de 10°C) e umidade (acima de 80%, na zona não saturada), ausência de substâncias que possam ser metabolizadas preferencialmente, em lugar da substância de interesse, e ausência de substâncias tóxicas no meio, pois altas concentrações de SQI podem ser inibidoras de atividade metabólica (Alvarez e Illman, 2006).

O sucesso da biorremediação e/ou da atenuação natural monitorada do solo e água subterrânea depende de uma investigação ambiental detalhada e em alta resolução, para caracterização hidrogeológica e definição da distribuição do contaminante adequadas.

Considerando a complexidade das interações entre os contaminantes organoclorados, o meio físico e o meio biótico, o projeto de pesquisa deste mestrado buscou o entendimento da componente biológica, com o uso de técnicas convencionais, com estudos em microcosmos (ensaios de bancada), e avançadas, como ferramentas de análises moleculares (*Molecular Biological Tools* – MBT) para o estudo de microrganismos de difícil cultivo em laboratório, a fim de fornecer informações para o melhor entendimento dos processos envolvidos na biodegradação e remediação de áreas contaminadas por solventes organoclorados.

2 OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa é caracterizar os processos microbiológicos responsáveis pela biodegradação de solventes organoclorados (etenos clorados) na água subterrânea, a partir de amostras ambientais de uma unidade industrial na área prioritária do Jurubatuba.

São objetivos específicos:

- Avaliar o componente biológico através de ensaios de bancada, com uso de microcosmos, e ferramentas moleculares;
- Identificar se na área de interesse há biodegradação de etenos clorados na água subterrânea, a partir das concentrações das SQI tetracloroeteno (PCE), tricloroeteno (TCE), cis e trans-dicloroeteno (DCE), cloreto de vinila (CV);
- Avaliar a presença de biomarcadores moleculares *Dhc*, *vcrA*, *bvcA* e *tceA* em amostras ambientais e tipos de microrganismos que participam no processo de biodegradação;
- Determinar as taxas de biodegradação do tetracloroeteno, se houver, com uso de microcosmos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

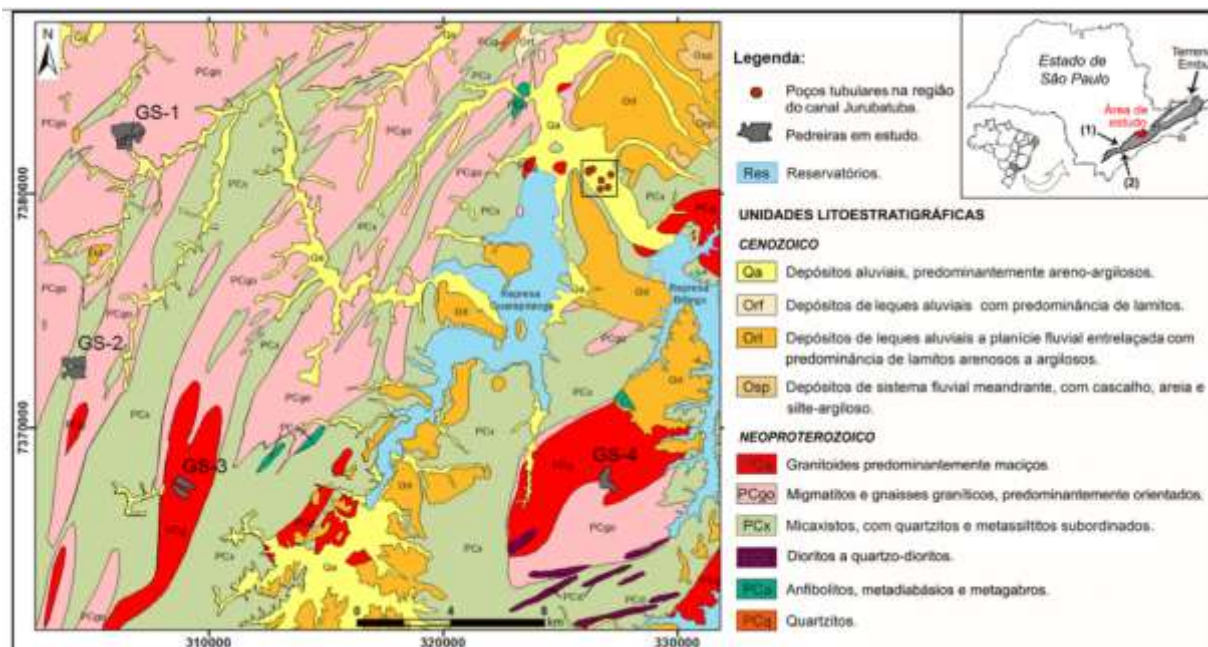
3.1 Caracterização da área de estudo

A área de estudo está localizada na cidade de São Paulo, inserida na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Alto Tietê (UGRHI 6) e caracterizada por clima tropical de altitude, Cwa pela classificação de Koeppen, com chuvas no verão e seca no inverno, temperatura média do mês mais quente superior a 22 C.

A cidade de São Paulo está inserida na Bacia Sedimentar de São Paulo, a qual está sobre o embasamento cristalino pré-cambriano (PC, Figura 3.1), constituído por grande diversidade de rochas magmáticas e metamórfica, destacando-se granitos, milonitos, gnaisses e xistos (Juliani, 1992). Na área de estudo, essas rochas pertencem ao Grupo Açungui, caracterizado por gnaisses graníticos, biotita-gnaisses e migmatitos do Complexo Embu e micaxistos do Complexo Pilar (DAEE/ IG, 2009).

O estudo detalhado da geologia estrutural realizado na região do Jurubatuba (Fiume, 2013; Fernandes *et al.*, 2016) permitiu a caracterização dos principais grupos de fraturas, quanto às suas direções, mergulhos, comprimentos. O grupo de direção NNE a NE e baixo ou médio ângulo apresentou maior importância para o fluxo da água subterrânea, em detrimento dos grupos de fraturas subverticais (E-W a ENE, NE e NW a NNW). Grupos E-W a WNW e mergulho médio apresentaram menor importância para o fluxo, em relação aos demais grupos.

Na Figura 3.1 está ilustrada a geologia geral da área do Jurubatuba, com indicação dos poços e pedreiras utilizados no estudo de geologia estrutural realizado por pesquisadores do CEPAS (Fiume, 2013; Fernandes *et al.*, 2016).



Fonte: SABESP/CEPAS-IGc-USP (1994) *apud* AMÉLIA JOÃO *et al.* (2016).

Figura 3.1 – Geologia geral da área do Jurubatuba com a indicação dos poços e pedreiras estudados por FIUME (2013) para elaboração do modelo geométrico de fraturas.

Estruturalmente, a Bacia de São Paulo corresponde a um hemi-graben limitado a noroeste por falhamentos e basculado para NNW, com falhas cenozóicas de direções NE e NW, que em parte reativaram zonas de cisalhamento dúctil (Riccomini, 1989). A Bacia de São Paulo é constituída, da base para o topo, por depósitos sedimentares caracterizados por lamitos, arenitos e conglomerados, da Formação Resende; folhelhos escuros lacustres, da Formação Tremembé; e cascalhos, areias fluviais e siltes argilosos, da Formação São Paulo; todas pertencentes ao Grupo Taubaté (Paleógeno). Estas camadas são recobertas pelos sedimentos fluviais da Formação Itaquaquecetuba (Neógeno), e em parte por sedimentos colúvio-aluvionares fluviais quaternários (Riccomini *et al.*, 1992, 2004).

Na região do Jurubatuba, as litofácies da Formação Resende (Orl e Orf, Figura 3.1) afloram na porção leste e, em uma porção restrita a nordeste, aflora a Formação São Paulo (Osp, Figura 3.1). As coberturas aluvionares fluviais afloram ao

longo do Rio Pinheiros e canais do Jurubatuba e Guarapiranga (Qa, Figura 3.1) (DAEE/ IG, 2009)

Esse contexto geológico define dois sistemas aquíferos na Bacia do Alto Tietê (BAT): o Sistema Aquífero Cristalino (SAC) e o Sistema Aquífero Sedimentar (SAS), os quais foram ainda subdivididos em outras quatro unidades (Hirata e Ferreira, 2001).

O SAC é formado pelos granitos e rochas metamórficas relacionadas ao Complexo Embu e aos Grupos São Roque e Serra do Itaberaba, e é constituído pelas unidades do Aquífero de Rochas Granitóides, e Aquífero de Rochas Metassedimentares. No manto de intemperismo, o aquífero de porosidade granular é heterogêneo e de natureza livre, sob o qual ocorre o aquífero cristalino, no qual a circulação ocorre pelas descontinuidades rúpteis da rocha, apresentando caráter livre a semi-livre, heterogêneo e anisotrópico (Hirata e Ferreira, 2001).

O SAS, por sua vez, é formado pelos sedimentos do Grupo Taubaté, pela Formação Itaquaquecetuba e pelos depósitos neocenozóicos. Trata-se de um sistema aquífero livre a semi-confinado, de porosidade primária, muito heterogêneo e anisotrópico (Hirata e Ferreira, 2001; Rebouças, 1992; DAEE, 1972 *apud* Bertolo, 1996).

A recarga dos sistemas aquíferos ocorre pela infiltração de águas provenientes da precipitação, até atingirem o aquífero, e também por águas provenientes das fugas da rede de água e esgoto e dos drenos pluviais (Hirata e Ferreira, 2001).

As áreas de descarga destes aquíferos correspondem ao fluxo de base de água subterrânea junto aos rios e córregos da região, assim como aos locais de bombeamento de poços de abastecimento profundos.

Localmente, a partir do desenvolvimento de um sistema de informação geográfica com os dados de estudos ambientais elaborados na área do Jurubatuba, na ZUPI-131, Barbosa (2015) caracterizou quatro compartimentos geológicos na área de estudo:

- *depósitos tecnogênicos (aterro), com espessura de até quatro metros e composição variada;*
- *depósitos aluvionares do Quaternário, cujo topo é constituído de sedimentos predominantemente de argilas orgânicas com intercalações de*

sedimentos arenosos, com espessura de dois a cinco m e granodecrescência ascendente;

- *sedimentos paleógenos, restritos às porções norte e nordeste da ZUPI-131 e, localmente, chegam a atingir até 65 m de espessura. São caracterizados por areia fina a média e horizontes com cascalho, podendo apresentar intercalações de sedimentos argilosos e argilo-arenosos;*
- *manto de alteração (saprólito), apresenta de 4 a 60 m de espessura, cujo topo é semelhante ao topo da rocha sã, composta por materiais argilo-arenoso a areno-argilosos como resultado do intemperismo dos minerais da matriz, bem como grânulos de quartzo e estruturas de foliação xistosa/gnáissica reliquiares da rocha sã (Barbosa, 2015).*

No mesmo estudo, a compilação de dados de hidrogeologia local indicou que os aquíferos locais são de natureza livre e, de forma geral, com o predomínio de fluxo descendente (Barbosa, 2015).

A unidade industrial onde foram realizados os estudos está situada em área de relevo plano, devido à predominância em subsuperfície de sedimentos aluvionares recentes, ao longo da antiga várzea do Rio Pinheiros, cujo traçado original (Kayo, 2016) está projetado na Figura 3.2.

A unidade industrial está na área crítica do Jurubatuba, onde há histórico de contaminação regional por solventes organoclorados e restrição ao uso de água subterrânea. Nessa área há poços de monitoramento convencionais instalados por consultorias ambientais, em cujas amostras de água subterrânea há histórico de concentrações de solventes organoclorados acima dos valores de intervenção da CETESB (2016), o que favoreceu sua escolha para a realização desta pesquisa.



Figura 3.2 – Localização da unidade industrial, na área crítica do Jurubatuba, com sobreposição do traçado original do Rio Pinheiros e extensão de solos aluviais

3.2 Características dos solventes halogenados

Os compostos orgânicos voláteis (VOC) são substâncias que participam em reações fotoquímicas na atmosfera, com pressão de vapor acima de 10 Pascal a 25°C (0,075 mmHg), ponto de ebulição de até 260°C e menos de 15 átomos de carbono (Williams e Koppmann, 2007). Entre os VOC há solventes halogenados alifáticos, que são compostos orgânicos formados por cadeias abertas de carbono e hidrogênio, onde há substituição de átomos de hidrogênio por átomos de cloro, flúor ou bromo.

O acréscimo de halogênios na cadeia carbônica resulta em compostos mais oxidados e na alteração nas propriedades físico-químicas das moléculas, como o aumento crescente de viscosidade, densidade e constante dielétrica e na diminuição de sua solubilidade, características estas que favoreceram seu amplo uso pela indústria. Também chamados de solventes organoclorados, são utilizados principalmente como desengraxantes metálicos, na lavagem a seco, em adesivos e como matéria prima para outros produtos químicos (Berkowitz *et al.*, 2008).

Conforme o histórico de análises químicas nas amostras de água subterrânea, coletadas nos poços de monitoramento convencionais (PM-11, PM-11A, PM-11B) na área de estudo, os etenos clorados representam a maior fração de compostos orgânicos voláteis (VOC) entre as substâncias químicas de interesse (SQI) identificadas (SERVMAR, 2013).

A Tabela 3.1 apresenta as propriedades físico-químicas e coeficientes de partição dos etenos clorados tetracloroetano, também conhecido como percloroetileno (PCE), tricloroetano (TCE), isômeros do 1,2-dicloroetano (cis-DCE e trans-DCE), 1,1-dicloroetano e cloreto de vinila (CV). O aumento da massa molar é acompanhado pelo aumento da densidade, redução da solubilidade e da pressão de vapor. Essas mudanças nas propriedades dos compostos, com a adição de cloro, resulta na alteração no equilíbrio químico com o meio físico refletidos nos coeficientes e constantes apresentadas na Tabela 3.1.

Os coeficientes e valores de propriedades físico-químicas são obtidos em laboratório, com o produto puro e em condições controladas. Mudanças das condições do meio podem alterar essas características, por exemplo, pela temperatura, altos níveis de salinidade, cosolvência, presença de ligantes orgânicos e surfactantes, que podem tornar a solubilidade aparente diferente da solubilidade teórica (Lyman, 1982 *apud* Cwiertny; Scherer, 2010)

Tabela 3.1 – Propriedades físico-químicas e de etenos clorados

| CAS Nº | SQI | Fórmula | Massa molar (g/mol) | Densidade (g/cm ³) | Solubilidade (mg/L) | H' ^(A) (mol.L/mol.L) | HLC ^(A) (atm-m ³ /mol) | Pressão de vapor (mmHg) ^(A) | Difusividade ar (Dia) (cm ² /s) | Difusividade água (Diw) (cm ² /s) | K _{oc} ^(A, B) (L/kg) | log K _{ow} ^(A, B) (adimensional) |
|----------|------------------------|---|---------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| 75-01-4 | Cloreto de Vinila | C ₂ H ₃ Cl | 62,50 | 0,91 | 8800,0 | 1,14E+00 | 2,78E-02 | 2980,00 | 1,07E-01 | 1,20E-05 | 21,73 | 1,38 |
| 156-59-2 | cis-1,2-Dicloroeteno | C ₂ H ₂ Cl ₂ | 96,944 | 1,284 | 6410,0 | 1,67E-01 | 4,08E-03 | 200,00 | 8,84E-02 | 1,13E-05 | 39,60 | 1,86 |
| 156-60-5 | trans-1,2-Dicloroeteno | C ₂ H ₂ Cl ₂ | 96,944 | 1,257 | 4520,0 | 3,83E-01 | 9,38E-03 | 331,00 | 8,76E-02 | 1,12E-05 | 39,60 | 2,09 |
| 75-35-4 | 1,1-Dicloroeteno | C ₂ H ₂ Cl ₂ | 96,944 | 1,213 | 2420,0 | 1,07E+00 | 2,61E-02 | 600,00 | 8,63E-02 | 1,10E-05 | 31,82 | 2,13 |
| 79-01-6 | Tricloroeteno | C ₂ HCl ₃ | 131,390 | 1,464 | 1280,0 | 4,03E-01 | 9,85E-03 | 69,00 | 6,87E-02 | 1,02E-05 | 60,70 | 2,42 |
| 127-18-4 | Tetracloroeteno | C ₂ Cl ₄ | 165,830 | 1,623 | 206,0 | 7,24E-01 | 1,77E-02 | 18,50 | 5,05E-02 | 9,46E-06 | 94,94 | 3,40 |

H' , HLC - constante de Henry; K_{oc} - coeficiente de partição de carbono orgânico entre solo e água; K_{ow} - coeficiente de partição octanol/água.

A - SRC PhysProp Database. Disponível em <http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>

B - Haynes, 2015. CRC Handbook of Chemistry and Physics Online. Disponível em <http://hbcponline.com>.

CAS - número de identificação único da substância no banco de dados do *Chemical Abstract Services* , incluindo os sinônimos.

SQI - substância química de interesse.

Fonte: EPA, 2016.

O produto puro presente no aquífero é denominado DNAPL – *Dense Non-Aqueous Phase*, ou seja, forma uma fase livre não aquosa mais densa que a água.

A volatilidade aumenta com a perda do cloro, o que pode ser observado pelo aumento na pressão de vapor e nos valores da constante de Henry, na comparação entre o tetracloroetano e o cloreto de vinila.

A variação nos valores dos coeficientes de partição (Koc e Kow) e difusividade em ar e água indicam maior tendência de adsorção e menor mobilidade dessas substâncias, quanto maior o número de cloros na molécula.

Considera-se, historicamente, os solventes industriais tetracloroetano (PCE) e o tricloroetano (TCE) como compostos pai, sendo os demais etenos clorados produtos da degradação destes.

As transformações dos etenos clorados envolvem reações químicas de substituição (hidrólise e desidroalogenação), oxidação e redução (hidrogenólise e de-halogenação) (Pankow e Cherry, 1996; Fetter, 1999).

Em condições ambientais, as reações de redução são favorecidas, uma vez que os compostos pais já estão em estado oxidado.

Diversos processos abióticos e bióticos envolvidos na degradação de etenos clorados já foram identificados (Vogel *et al.*, 1987). As transformações abióticas ocorrem pela ação de minerais reativos presentes na matriz, em geral tendo o acetileno como produto final (Lee e Batchelor, 2004; Butler e Hayes, 1999).

Concentrações de até 0,5% de minerais reativos já podem ser consideradas significativas para a ocorrência de degradação abiótica, quando associada a condições geoquímicas favoráveis, como o pH. Em geral, a degradação abiótica é mais lenta que a degradação biótica (Tobiszewski and Namieśnik, 2012; He *et al.*, 2015).

Experimentos em laboratório demonstraram a diversidade de processos bióticos que favorecem a degradação de etenos clorados, por meio de oxidação aeróbia (Bradley e Chapelle, 2000) e anaeróbia (Bradley, Landmeyer, *et al.*, 1998; Bradley and Chapelle, 1996, 1997), cometabolismo aeróbio (McCarty *et al.*, 1998; Hopkins and McCarty, 1995) e anaeróbio (Maymó-Gatell *et al.*, 1999, 2001; Hazen, 2010) e decloração redutiva anaeróbia (Fennell; Gossett, 1998; HE *et al.*, 2003; Maymó-Gatell *et al.*, 1999).

É importante destacar que mais de um processo biótico pode ocorrer no meio, dada a heterogeneidade nas condições geoquímicas no aquífero.

Os processos de degradação por vezes envolvem a produção e acúmulo no aquífero de substâncias mais tóxicas que o composto pai, como o cloreto de vinila, que é comprovadamente carcinogênico. Bioensaios realizados em laboratório também indicaram potencial carcinogênico dos demais etenos clorados. O sistemas afetados pela exposição a essas substâncias, em cobaias, estão relacionados na Tabela 3.2. (US EPA, 2017).

Tabela 3.2 – Sistemas afetados pela exposição a etenos clorados

| CAS Nº | Compostos | Evidência de câncer (WOE - Weight of Evidence) | Sistema afetado (agudo e/ou crônico) |
|----------|------------------------|--|---|
| 75-01-4 | Cloreto de Vinila | A (Carcinogênico para humanos) | Hepático |
| 156-59-2 | cis-1,2-Dicloroeteno | Sem dados para avaliar potencial carcinogênico | Urinário, corpo todo |
| 156-60-5 | trans-1,2-Dicloroeteno | Sem dados para avaliar potencial carcinogênico | Imunológico |
| 75-35-4 | 1,1-Dicloroeteno | C (Possível carcinogênico para humanos) | Hepático |
| 79-01-6 | Tricloroeteno | Carcinogênico para humanos | Múltiplo (cardiovascular, imunológico, desenvolvimento, hepático, urinário, hematológico) |
| 127-18-4 | Tetracloroeteno | Potencialmente carcinogênico para humanos | Nervoso, ocular, hepático |

CAS: *Chemical Abstracts Service*. IRIS *Integrated Risk Information System* Fonte: EPA, 2017b.

A integração de estudos microbiológicos, biogeoquímicos e isotópicos é recomendada para caracterizar processos de degradação em ambientes complexos, corroborando a importância da avaliação de microrganismos, como linha de evidência para auxiliar a tomada de decisão (Bombach *et al.*, 2010; Carreón-Diazconti *et al.*, 2009; Imfeld *et al.*, 2011; Ding e He, 2012; Matturro *et al.*, 2012).

3.3 Mecanismos de partição e transporte de solventes halogenados

Os solventes organoclorados utilizados nas atividades industriais (PCE e TCE) migram para camadas mais profundas dos aquíferos, em função das suas propriedades físico-químicas, da massa do contaminante e da heterogeneidade da matriz, havendo mobilidade enquanto a pressão hidrostática do DNAPL superar a pressão capilar da água entre os poros. Havendo massa suficiente para migração

vertical, esta é interrompida ao se atingir uma camada mais argilosa ou o topo rochoso, pois quanto menor o raio dos poros interconectados, maior a pressão capilar.

No caso de rocha fraturada, o transporte será determinado pela abertura da fratura e o ângulo de contato entre o DNAPL e a água da fratura, bem como por fatores antropogênicos que alterem essas variáveis, como a extração de água do aquífero subjacente, com conseqüente diminuição da pressão dentro dessas fraturas (Pankow e Cherry, 1996; Fetter, 1999).

Durante a migração do DNAPL no solo e no aquífero há formação de uma fase residual, ou seja, parte da massa fica imobilizada dentro de poros, por ação das forças capilares. As zonas onde ocorre acúmulo das fases livre e residual de DNAPL constituem fontes contínuas de geração de pluma de fase dissolvida de contaminantes na zona saturada (Pankow e Cherry, 1996; Fetter, 1999).

A transferência de massa de contaminantes entre as diferentes fases ocorre até que se atinja o equilíbrio, que é dinâmico, em função da partição entre ar, água e solo (Cleary, 1989; Domenico and Schwartz, 1997; Pankow and Cherry, 1996).

A volatilização do contaminante da água para o ar ocorre na interface entre esses dois meios (Sterling *et al.*, 2005). Embora o efeito da volatilização em plumas abaixo do nível d'água seja pouco significativo, esse fator deve ser considerado na escolha das técnicas para identificação dessa classe de compostos em amostras representativas do meio físico local. Esse equilíbrio é representado por uma constante de proporcionalidade denominada constante de Henry, ou seja, a quantidade de gases dissolvidos é proporcional à pressão parcial na fase gasosa e é específica para cada composto (Gossett, 1987).

O principal mecanismo de transporte de contaminantes na água subterrânea é a advecção, ou seja, o transporte passivo das substâncias junto com a água subterrânea. O fluxo laminar em aquíferos porosos é regido pela lei de Darcy, onde a velocidade de fluxo é proporcional ao gradiente hidráulico, e em aquíferos fraturados, pela lei cúbica, onde, para um determinado gradiente hidráulico o fluxo é proporcional ao cubo da abertura da fratura (Domenico e Schwartz, 1997).

As características da matriz, como a rugosidade, distância entre os poros e tortuosidade do caminho, influenciam na dispersão dos compostos. A dispersão mecânica e a molecular constituem a dispersão hidrodinâmica do composto no aquífero. Porém, a dispersão por difusão molecular é um mecanismo de transporte de

massa lento, uma vez que requer maior tempo de contato com o contaminante para que ocorra a condição de equilíbrio, e apresenta relevância significativa em áreas de menor permeabilidade, como solos argilosos e/ou fraturas (Fetter, 1999; Wiedemeier *et al.*, 1999; Berkowitz *et al.*, 2008).

Outro mecanismo de partição é a sorção, que pode ocorrer por uma interação de superfície de uma dada partícula (adsorção) ou incorporação na própria partícula (absorção). Apesar dos mecanismos de sorção de solventes organoclorados em subsuperfície não serem conhecidos em detalhe, visto a influência da composição da matriz, matéria orgânica no solo e colóides em suspensão, seu impacto no transporte pode ser calculado em laboratório ou derivado a partir de coeficientes de partição, como o coeficiente de distribuição (K_d), o coeficiente de distribuição na fração orgânica (K_{oc}) e o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) (Berkowitz *et al.*, 2008; Pankow e Cherry, 1996; Wiedemeier *et al.*, 1999).

O transporte de contaminantes é afetado também pela recarga do aquífero, tanto pela diluição quanto pela introdução de nutrientes, aceptores e doadores de elétrons nos horizontes mais superficiais, favorecendo os processos de transformação. A introdução dessas substâncias auxilia na degradação, embora seja pouco significativa em aquíferos onde a contaminação está a maiores profundidades, devido ao gradiente hidráulico vertical na água subterrânea ser pouco expressivo em relação ao gradiente horizontal (Wiedemeier *et al.*, 1999).

A degradação é um processo destrutivo de transformação das substâncias e pode ocorrer por mecanismos abióticos ou bióticos. As reações envolvidas na degradação de solventes clorados envolvem hidrólise e, principalmente, reações de óxido-redução mediada por microrganismos (Wiedemeier *et al.*, 1999), dentre os quais as bactérias halorespiradoras, no caso dos etenos clorados.

Na degradação do percloroetileno, também chamado tetracloroetileno (PCE) e o tricloroetileno (TCE) os isômeros *cis*-1,2-dicloroeteno (*cis*-DCE) e *trans*-1,2-dicloroeteno (*trans*-DCE), o 1,1-dicloroeteno (1,1-DCE) e o cloreto de vinila (CV) são os principais etenos clorados formados.

3.4 Comportamento microbiológico associado a contaminações por solventes organoclorados

A distribuição espacial de microrganismos em subsuperfície apresenta grande variabilidade, mesmo em escala de centímetros, e é governada pela estrutura do habitat, sua geologia, estratigrafia, clima, características geoquímicas e hidrogeológicas (Madsen, 2000).

A distribuição microbiana em escala centimétrica tende também a ser heterogênea, sendo bastante influenciada pela umidade, que influencia na escala de amostragem necessária para interceptar as micro-colônias presentes, como avaliado por Brockman e Murray (1997) em experimentos com solos da zona vadosa, (Figura 3.3).

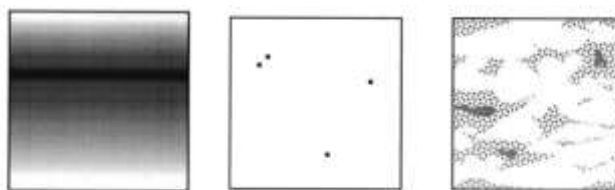


Figura 3.3 – Modelos de distribuição microbiológica em subsuperfície (escala centimétrica)

Nos três modelos as áreas escuras exemplificam a distribuição de microrganismos, onde há propriedades no solo que favorecem o desenvolvimento microbiano. Áreas claras indicam ausência de microrganismos. Fonte: Brockman; Murray (1997).

A Figura 3.4 ilustra alguns modelos de atividade microbiana em escala estratigráfica, onde há cenários possíveis que envolvem o maior adensamento de atividade microbiana na interface, como resultado da mistura de aceptores e doadores de elétrons (cenário A), em uma litologia específica, em função de suas características (cenário B), e ao longo do perfil, em função da influência de processos que favoreceram o fluxo de água e nutrientes em gradiente vertical (cenário C). No meio ambiente, essas zonas podem variar em espessura de centímetros a metros (Brockman and Murray, 1997) e não necessariamente possuem continuidade lateral.

O movimento de bactérias em subsuperfície reúne uma complexidade de fatores, que resultam na distribuição irregular no meio físico. Os principais fatores são a predação, o estado fisiológico das células, que afetam seu tamanho, e os fatores hidrogeológicos (porosidade, textura do solo, umidade, velocidade da água), que influenciam nos mecanismos de transporte da célula pelas partículas do solo (filtração) e nos mecanismos de interação da superfície celular e dos sólidos (quimiotaxia, gradiente químico, etc.), adesão (interação da superfície celular) (Maier *et al.*, 2009).

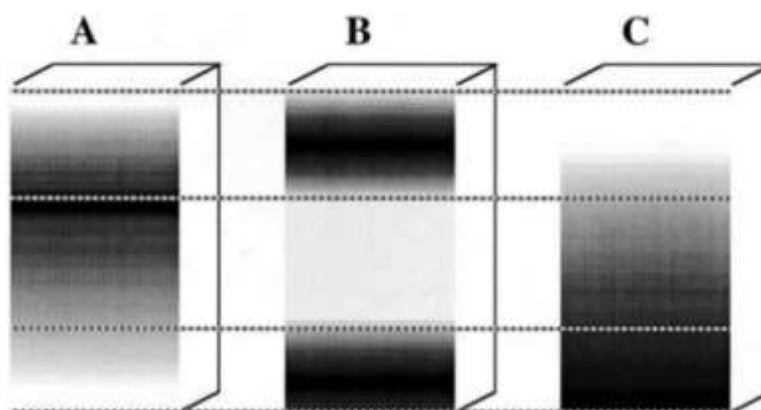


Figura 3.4 – Modelos de distribuição microbiológica em subsuperfície (escala estratigráfica)

“.....”: contato litológico. Áreas escuras indicam maior intensidade de fatores que favorecem o desenvolvimento microbiano. Áreas claras indicam ausência de microrganismos (A – fatores favoráveis na interface entre os estratos/ B – fatores favoráveis apenas em uma litologia com características específicas/ C – gradiente dos fatores favoráveis ao longo do perfil/). Fonte: Brockman e Murray (1997).

Embora compostos orgânicos halogenados (haletos orgânicos) de origem biogênica sejam conhecidos desde 1968, sendo conhecidos atualmente mais de 3000 metabólitos halogenados, acreditava-se que organismos não pudesse degradar compostos halogenados de origem antropogênica, por possuírem estruturas distintas. Entretanto, em meados da década de 1980 estudos com *Mycobacterium* e cloreto de vinila (Hartmans *et al.*, 1985), *Xanthobacter autotrophicus* GJ1 e haloalcanos (Janssen *et al.*, 1985) e etenos clorados sob condições metanogênicas (Vogel and McCarty, 1985) indicaram a existência de potencial de degradação de compostos sintéticos por organismos isolados.

Os metabólitos halogenados (origem biogênica) possuem estrutura distinta dos xenobióticos de origem antropogênica e são utilizados para defesa química e prevenção de formação de biofilmes, sendo mais comuns em organismos marinhos. Haletos orgânicos também possuem origem geogênica, identificados em gás de lava e ambientes terrestres (Keppler *et al.*, 2002).

Essa ocorrência natural de compostos halogenados pode explicar a existência e vias metabólicas que envolvem sua degradação, embora a degradação de haletos orgânicos naturais não seja similar à degradação de etenos clorados sintéticos, que ocorre por ação de redutases que atuam a nível de membrana.

Diversos processos envolvidos na degradação de etenos clorados já foram identificados em campo e em ensaios laboratoriais:

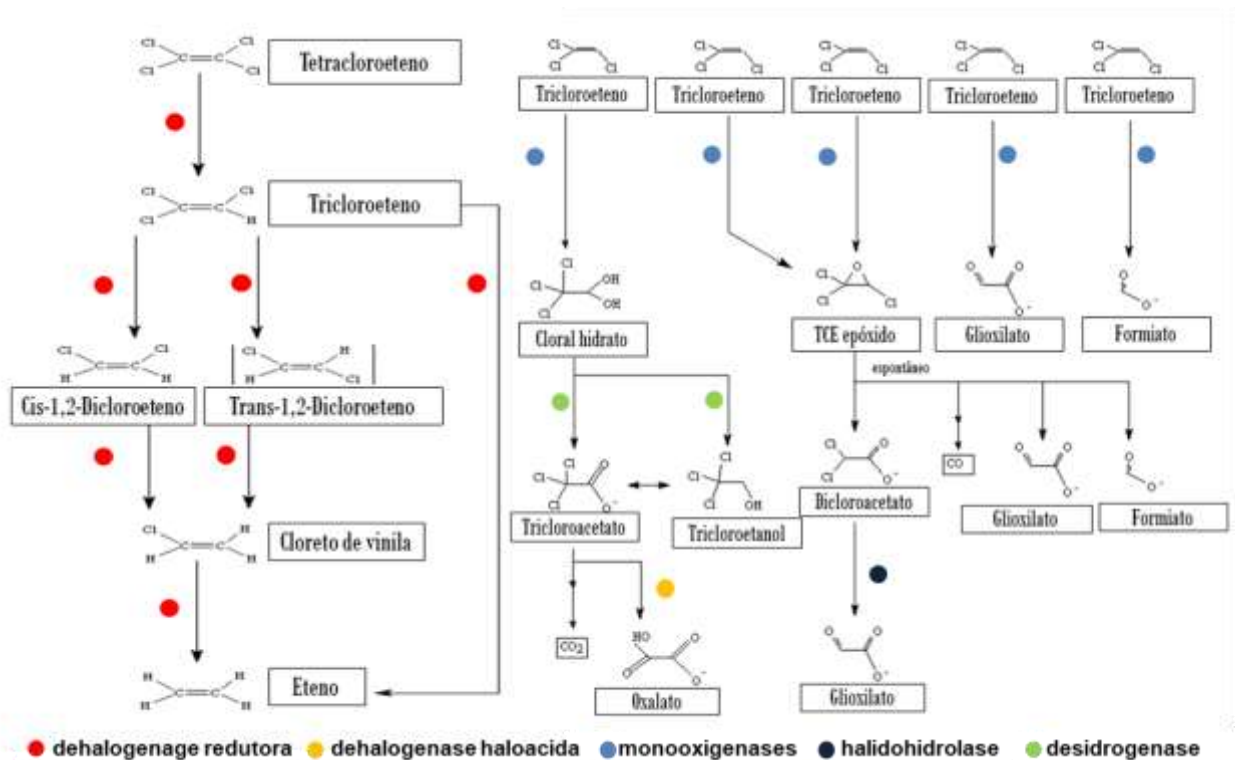
- oxidação aeróbia (Bradley and Chapelle, 2000; Hage and Hartmans, 1999) e anaeróbia (BRADLEY *et al.*, 1998; BRADLEY; CHAPELLE, 1997; BRADLEY; LANDMEYER, 1998; DIJK *et al.*, 2000);
- cometabolismo aeróbio (McCarty *et al.*, 1998; Hopkins and McCarty, 1995) e anaeróbio (Maymó-Gatell *et al.*, 1999, 2001; Hazen, 2010);
- decloração redutiva anaeróbia (Fennell e Gossett, 1998; HE *et al.*, 2003; Maymó-Gatell *et al.*, 1999); e
- transformações abióticas (Lee e Batchelor, 2004; Butler e Hayes, 1999; Tobiszewski e Namieśnik, 2012).

O consumo rápido de oxigênio em subsuperfície torna difícil que ambientes aeróbios sejam mantidos naturalmente em porções mais profundas do aquífero, sendo seu consumo mais favorecido na franja capilar (Bombach *et al.*, 2010; Frascari *et al.*, 2015).

A própria presença de etenos clorados pode provocar o rápido desenvolvimento de condições anóxicas ou microaerofílicas que favorecem a ocorrência da decloração redutiva em campo, embora essas reações sejam energeticamente menos favoráveis aos microrganismos de forma geral. Gossett (2010) identificou a degradação de cloreto de vinila em baixas concentrações de oxigênio (0,10 a 0,02 mg/L), desta forma, mesmo em ambientes caracterizados como anóxicos, a difusão de oxigênio proveniente de regiões próximas pode favorecer a degradação por vias aeróbias.

Em meios anaeróbios, a decloração redutiva também podem ocorrer por meio de hidrogenólise (“hidrodeshalogenação”), que consiste na substituição de um halogênio, no caso, o cloro, por um átomo de hidrogênio. No caso da decloração do TCE, a hidrogenólise por ação de microrganismos favorece a produção de cis-DCE, ao passo que a produção de trans-DCE geralmente está associada a degradação abiótica, que pode ocorrer na presença de minerais reduzidos, como a pirita. A decloração redutiva também pode ocorrer pelo mecanismo de “dehaloeliminação”, que consiste na remoção de dois halogênicos após a transferência de dois elétrons, resultando em uma dupla ligação, resultando na formação de PCE a partir de hexacloroetano, por exemplo (Alvarez e Illman, 2006).

A Figura 3.5 apresenta as vias de degradação do TCE e PCE (anaeróbia) e principais classes de enzimas envolvidas, demonstrando a diversidade metabólica necessária para a transformação dessas substâncias (GAO *et al.*, 2010). As enzimas são proteínas que catalisam as reações celulares, aumentando a taxa de reação na ordem de 10^8 a 10^{20} acima da taxa de reação espontânea, sem alterar o equilíbrio ou energia total da reação. Sua conformação tridimensional atribui alta especificidade, catalisando apenas um tipo de reação, ou algumas classes de reações inter-relacionadas (Madigan *et al.*, 2012).



Fonte: Adaptado de Biocatalysis/ Biodegradation Pathways (GAO *et al.*, 2010).

Figura 3.5 – Vias de degradação de etenos clorados e enzimas

Algumas dehalogenases redutoras (redutases) são utilizadas como biomarcadores e na tomada de decisão no gerenciamento de áreas contaminadas, tais como a *tceA* (*trichloroethene reductase*), *bvcA* (*vinyl chloride reductase*) e *vcrA* (*vinyl chloride reductase*), envolvidas na halorespiração de bactérias *Dehalococcoides*.

Na Figura 3.6 são apresentados o número de enzimas dehalogenases presentes em bactérias halorespiradoras (*organohalide respiration*), com destaque em vermelho para as linhagens de *Dehalococcoides* já estudadas.

| Genomas disponíveis para bactérias haloinspiradoras (<i>OHRB -Organohalide respiration bactéria</i>) | | | | |
|--|-------------------------------|--|----------------|------------------------|
| Organismo | Nº de dehalogenases redutoras | Referências das culturas(Richardson, 2015) | Filo | Tamanho do genoma (Mb) |
| <i>Dehalobacter restrictus</i> DSM 9455/PERK23 | 22 | N/A [83] | Firmicutes | 2.94 |
| <i>Dehalobacter</i> sp. FTH1 | 32 | N/A [28] | Firmicutes | 6.33 |
| <i>Dehalobacter</i> sp. DCA | 17 | [84,85] | Firmicutes | 3.07 |
| <i>Dehalobacter</i> E1 (metagenome assembly) | 10 | [27**] | Firmicutes | 2.6 |
| <i>Dehalobacter</i> CF | 17 | [84,85] | Firmicutes | 3.09 |
| <i>Dehalobacter</i> strain 12DCB1 | 39 | [24] | Firmicutes | 2.89 |
| <i>Dehalobacter</i> strain 13DCB1 | 27 | [24] | Firmicutes | 2.99 |
| <i>Dehalobacter</i> strain 14DCB1 | 39 | [24] | Firmicutes | 3.06 |
| <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195 | 17 | [82] | Chloroflexi | 1.47 |
| <i>Dehalococcoides mccartyi</i> BAV1 | 10 | [17] | Chloroflexi | 1.34 |
| <i>Dehalococcoides mccartyi</i> CBDB1 | 32 | [86] | Chloroflexi | 1.4 |
| <i>Dehalococcoides mccartyi</i> GT | 20 | N/A [44] | Chloroflexi | 1.36 |
| <i>Dehalococcoides</i> sp. VS | 36 | [17] | Chloroflexi | 1.41 |
| <i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i> BL-DC-9 | 25 | [23] | Chloroflexi | 1.69 |
| <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> JW/IU-DC1, ATCC 51507 | 6 | N/A | Firmicutes | 4.32 |
| <i>Desulfitobacterium dichloroeliminans</i> LMG P-21439 | 1 | N/A | Firmicutes | 3.62 |
| <i>Desulfitobacterium hafriense</i> DCB-2 | 7 | [32*] | Firmicutes | 5.28 |
| <i>Desulfitobacterium hafriense</i> PCP-1 | 7 | N/A | Firmicutes | 5.56 |
| <i>Desulfitobacterium hafriense</i> TCE-1 | 1 | N/A | Firmicutes | 5.74 |
| <i>Desulfitobacterium hafriense</i> TCP-A | 5 | N/A | Firmicutes | 4.97 |
| <i>Desulfitobacterium hafriense</i> Y51 | 2 | [33] | Firmicutes | 5.73 |
| <i>Desulfitobacterium</i> sp. LBE | 2 | N/A | Firmicutes | 5.54 |
| <i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE1, DSM 10344 | 6 | N/A | Firmicutes | 4.22 |
| <i>Geobacter lovleyi</i> SZ | 2 | [29] | Proteobacteria | 3.99 |
| <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C | 2 | [31] | Proteobacteria | 5.01 |

^a N/A: Referência

Fonte: Adaptado de Richardson, 2013.

Figura 3.6 – Número de enzimas dehalogenases redutoras e lista de bactérias haloinspiradoras

A haloinspiração consiste na utilização de etenos clorados como aceptores finais de elétrons durante a respiração, utilizando-se hidrogênio ou outros doadores de elétrons, como o acetato, piruvato e formato (Alvarez e Illman, 2006). O termo OHR – *organohalide respiration* (haloinspiração) é frequentemente utilizado para indicar a classe de organismos que possuem esse tipo de metabolismo. *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium*, *Dehalogenimonas* e *Dehalococcoides* são exemplos de bactérias haloinspiradoras (Figura 3.6).

Dentre os organismos isolados que atuam na decloração redutiva, os mais citados são do gênero *Dehalococcoides*, uma vez que estudos apontaram que estes realizam a decloração de tetracloreto de eteno a eteno, em ambiente anaeróbio, sem a acumulação dos intermediários com maior toxicidade, ou seja, cis-dicloroeteno e cloreto de vinila (Maymó-Gatell *et al.*, 1997; Bradley, 2000; Frascari *et al.*, 2015). Na degradação de

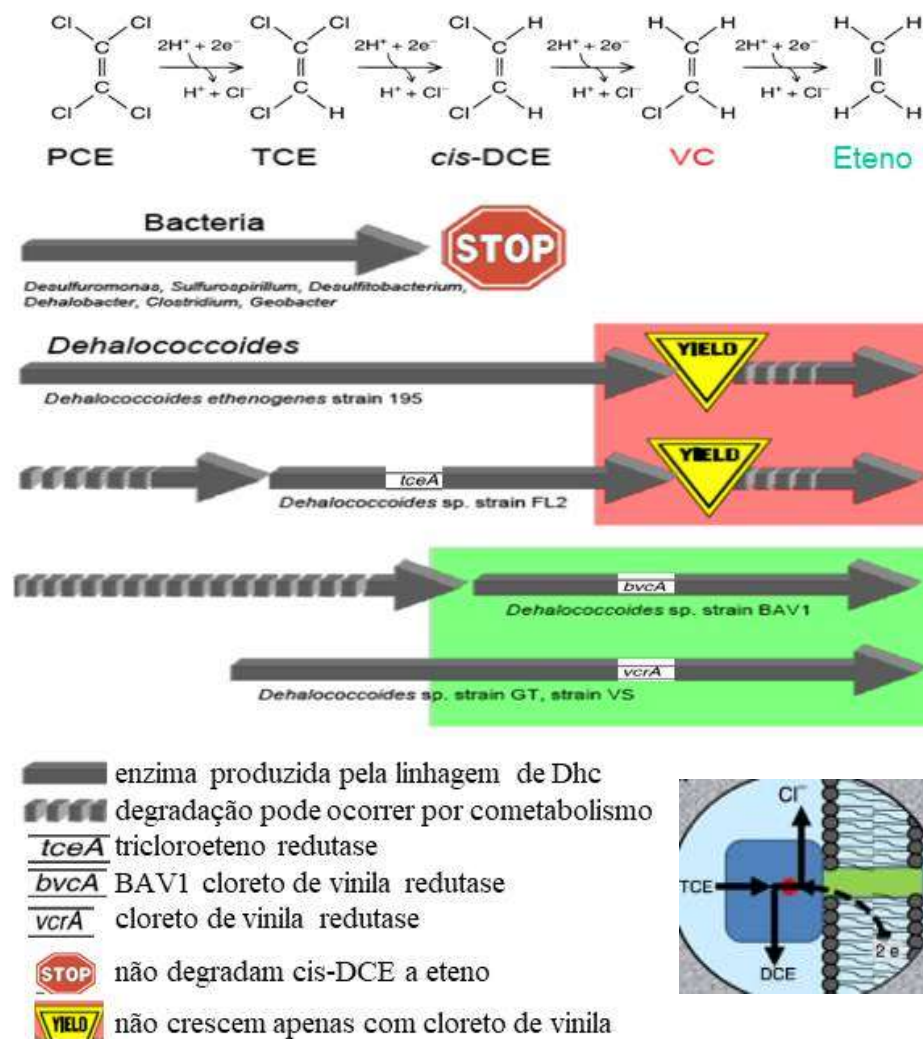
TCE, as principais bactérias citadas são *Dehalospirillum multivorans* (filo Proteobacteria) e *Dehalobacter restrictus* PER-K23 (filo Firmicutes).

A *Dehalococcoides mccartyi* ainda é o único gênero descrito que consegue degradar completamente o PCE a eteno (Löffler *et al.*, 2013).

Como nem todas as linhagens de *Dehalococcoides* efetuam a degradação completa, os etenos clorados podem ser consumidos no cometabolismo, juntamente com outras bactérias halorespiradoras, como espécies dos gêneros *Dehalobacter*, *Clostridium*, *Desulfitobacterium*, *Desulfuromonas*, *Geobacter* e *Sulfurospirillum*, que também se beneficiam do consórcio de microrganismos para efetuar a degradação de etenos clorados (Fennell e Gossett, 2003; Patil *et al.*, 2014; Wild *et al.*, 1997). O cometabolismo consiste na degradação de uma substância (substrato secundário) a partir da presença de outro composto (substrato primário) produzido por outra bactéria na mesma comunidade.

A identificação de *Dehalococcoides* sp (Dhc) por meio da sequência de 16S rRNA, permite confirmar a presença ou não desses organismos na área de estudo. Como linhagens distintas de Dhc possuem sequências de 16S rRNA similares ou idênticas, mas níveis de atividade e potenciais de degradação diferentes, são utilizadas também sequências de genes funcionais que codificam as redutases, para avaliar a correlação com o potencial de biodegradação de etenos clorados.

Na Figura 3.7 estão representadas linhagens de Dhc e respectivas enzimas, que favorecem a remoção do cloro do PCE, no processo de decloração redutiva a eteno. A *Dehalococcoides* sp. BAV1 requer a presença de outros organismos para degradação cometabólica do PCE e TCE, mas degrada o DCE e CV, pois possui o gene *bvcA*, que codifica a redutase associado ao uso de CV na respiração. Os microrganismos *Dehalococcoides* da linhagem 195 e FL2 se desenvolvem na presença de etenos clorados, mas são inibidas em meio em que há apenas o CV (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004). A presença do gene que codifica a dehalogenase *vcrA* também está associada à redução nas concentrações de DCE e CV, mas apenas sua presença não favorece a redução de PCE e TCE (Müller *et al.*, 2004). A *tceA* é uma dehalogenase associada à alta taxa de redução de TCE e DCE, além de compostos com três a cinco cloros, em menor proporção (Magnuson *et al.*, 2000).



Fonte: Adaptado de RITALAHTI *et al*, 2010; LEBRÓN *et al*, 2011, Nijenhuis, Kuntze, 2016

Figura 3.7 – Degradação redutiva do PCEa eteno por bactérias *Dehalococcoides* (Dhc) e etapas de participação das enzimas redutases tceA, bvcA e vcrA.

A razão entre a quantidade de genes Dhc 16SrRNA e de bactérias totais (Dhc/BT) e a razão entre a soma da quantidade de redutases de cloreto de vinila e Dhc (vcrA + bvcA/ Dhc) apresentam forte correlação com biodegradação anaeróbia em áreas contaminadas nos Estados Unidos. Essas razões podem ser inseridas na ferramenta BioPic - *Bio Pathway Identification Criteria* (Lebrón *et al*, 2015), na planilha *Reductase Genes.xlsx*, para avaliar se os resultados estão na faixa esperada de produção de etenos clorados *in situ* e avaliação de potencial atenuação natural.

De forma geral, análises por qPCR (*Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) que indiquem abundâncias acima de 1000 cópias genômicas de Dhc por litro correlacionam-se com a atividade degradadora no meio (Lebrón *et al.*, 2015).

3.5 Microbiologia

As características evolutivas das células permitem o agrupamento dos organismos vivos em três grandes domínios: Bacteria, Archaea e Eucariotos (Brown and Doolittle, 1997; McClendon, 1999; Alberts *et al.*, 2006), partindo do paradigma atual de todos terem sua origem de um ancestral comum. Durante cerca de 80% da história da Terra houve o predomínio de vida microbiana, inicialmente Bacteria e depois Archaea, incorporando grande variabilidade metabólica nesses grupos, resultante da lenta modificação nas condições atmosféricas anóxicas para a oxigenação até os níveis atuais.

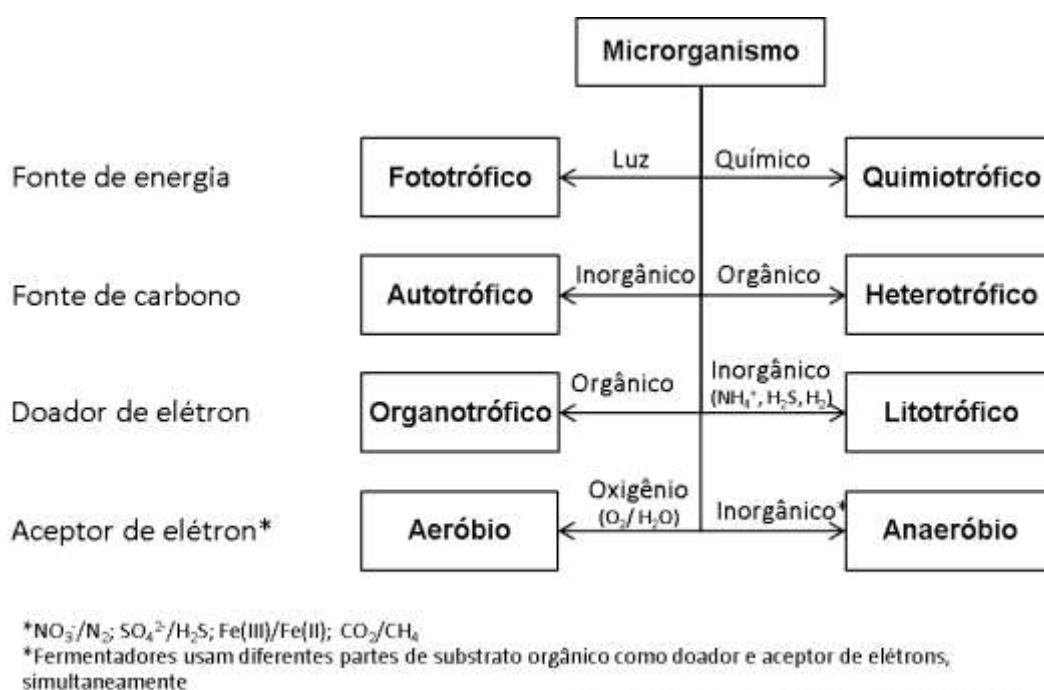
Os Eucariotos uni e pluricelulares, representados por algas, protozoários, fungos e demais organismos pluricelulares, foram se desenvolvendo com o aumento nos níveis de oxigênio na atmosfera, por ação de cianobactérias.

Como organismos dos grupos Archaea e Bacteria não possuem organelas e núcleo delimitados por membrana e são morfologicamente semelhantes, com DNA circular, ocasionalmente acompanhado por plasmídios (DNA circular de menor tamanho) (Alberts *et al.*, 2006). Entretanto, apesar de semelhantes às bactérias “verdadeiras”, o grupo Archaea apresenta características genéticas e bioquímicas específicas, que estão presentes tanto em eucariotos quanto em procariotos (unicelulares). As bactérias metanogênicas, que apresentam influência significativa em sistemas aquíferos anaeróbios, são exemplos de organismos do domínio Archaea (Alberts *et al.*, 2006; Chapelle, 2001; Maier *et al.*, 2009).

De acordo com Madigan; Martinko, Stahl (2012) o tamanho de células procarióticas cultivadas em laboratório variam entre 0,5 μm e 4 μm de diâmetro, entretanto, um estudo de Christensen; Hansen; SØRENSEN (1999), em solos arenosos indicaram que 68% a 77% eram de células com 0,25 a 0,5 μm de diâmetro. Bactérias *Dehalococcoides mccartyi* são ainda menores e possuem diâmetro que variam entre 0,3 e 1 μm e 0,1 a 0,2 μm de espessura (Löffler *et al.*, 2013; Cheng and He, 2009).

O tamanho do organismo é limitado pela taxa metabólica, entretanto, apesar de tamanhos menores propiciarem vantagem na relação superfície/ volume, há um limite para que a célula possa manter em seu interior as moléculas essenciais à vida (DNA, proteínas etc.) e ainda manter vantagem seletiva em áreas com muita variação das condições ambientais (Madigan *et al.*, 2012)

Os microrganismos podem ser agrupados de acordo com a fonte de energia (fototrófico e quimiotrófico) e fonte de carbono (autotrófico e heterotrófico), além dos tipos de doadores e aceptores de elétrons utilizados (Figura 3.8). Essas características podem ser usadas para segregar o organismo de interesse em ensaios de bancada, como os estudos em microcosmos, mantendo o ambiente em condições que favoreçam apenas o desenvolvimento do metabolismo alvo.



Fonte: Adaptado de ALVAREZ; ILLMAN, 2006.

Figura 3.8 – Fatores que caracterizam o metabolismo de microrganismos.

Conforme Fennell e Gossett (1998), também é importante avaliar a quantidade e qualidade dos doadores de elétrons usados na bioestimulação. Eles verificaram que a adição de doadores de elétrons de rápida assimilação favoreceram o predomínio de bactérias metanogênicas em lugar de estimular bactérias halo-respiradoras, afetando o processo de decloração redutiva. O uso de técnicas de biologia molecular permite o estudo do comportamento destes organismos.

A Figura 3.9 apresenta o esquema de síntese protéica, cujo conhecimento favoreceu o aprimoramento de técnicas de sequenciamento de bases que compõe o DNA (ácido desoxirribonucleico), que codificam as proteínas utilizadas no metabolismo celular. Em resumo, a síntese protéica dependerá da transferência da informação presente no DNA, por meio de moléculas de RNA (ácido ribonucleico) específicas

como o mensageiro (mRNA), transportador (tRNA) e ribossomal (rRNA). O conhecimento dos mecanismos de duplicação, transcrição e tradução permitiram o estudo direcionado de genes específicos de interesse, denominados genes funcionais.

Grande parte das ferramentas moleculares utilizadas atualmente baseiam-se nas informações contidas no 16S rRNA, pois é uma região do DNA altamente conservada e com alta variabilidade entre os procariontes (Alberts *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2009).

A composição das duas subunidades do RNA ribossomal (rRNA) permitem diferenciar organismos eucariotos e procariontes em função de diferentes valores de taxa de sedimentação em ultracentrífuga (“S”).

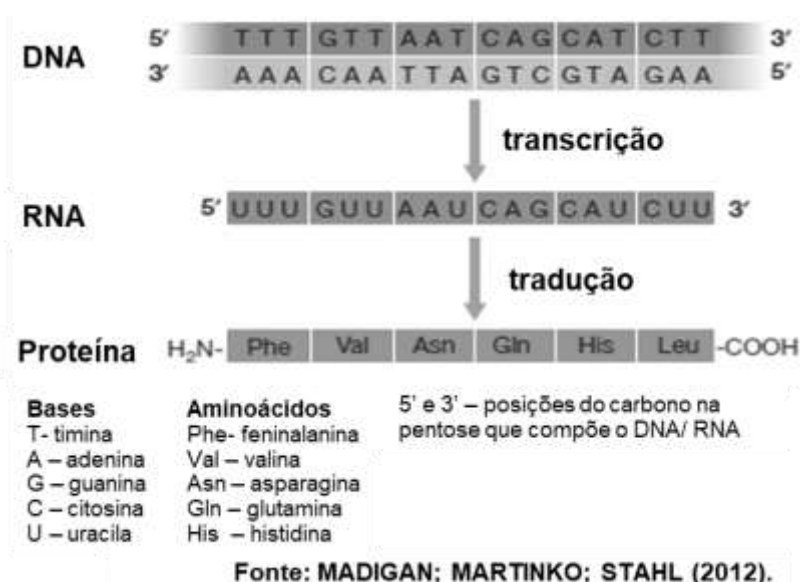


Figura 3.9 – Esquema simplificado de síntese protéica.

Assim, sabe-se que ribossomos 28S rRNA e 18S rRNA são característicos de organismos eucariotos e os ribossomos 23S rRNA e 16S rRNA são de procariontes, permitindo a separação desses organismos para estudos de atividade gênica direcionados (Madigan *et al.*, 2012). O estudo de sequências de DNA permite identificar a presença de determinado organismo e/ou gene de interesse, entretanto a identificação de RNA é que permite afirmar se esses genes estão sendo expressos, ou seja, se há atividade gênica.

O uso da biologia molecular auxiliou nos estudos ambientais, uma vez que as técnicas microbiológicas clássicas para contagem de células e avaliação do crescimento microbiano envolvem culturas puras previamente isoladas, o que não se

aplica às amostras ambientais, onde os microrganismos se desenvolvem em comunidade.

Estudos da década de 80 apontaram a baixa recuperação de bactérias heterotróficas (máximo de 1%) em ambientes oligotrófico ou mesotrófico (baixa quantidade de nutrientes), em relação a ambientes eutróficos (com abundância de nutrientes), onde a recuperação chegava a 90%. A discrepância entre a contagem de células viáveis em placa e a contagem direta em microscópio indicava que não era possível recuperar a biodiversidade existente na natureza (Staley, James T; Konopka, 1985).

Novas técnicas foram desenvolvidas desde então, de forma a permitir tanto o estudo da biodiversidade microbiana em amostras ambientais complexas, no campo da metagenômica, quanto de estudos de organismos específicos, com uso de biomoléculas como biomarcadores.

Entre as alternativas de contagem de células independentes de cultivo pode-se citar, além das ferramentas moleculares, a contagem de células em microscópio, com uso de corantes, e a citometria de fluxo (He *et al.*, 2005; Löffler *et al.*, 2005).

3.6 Técnica para estudo microbiológico

3.6.1 PCR – Polymerase Chain Reaction

A reação em cadeia da polimerase, o PCR (*polymerase chain reaction*) consiste na replicação de um segmento de DNA em inúmeros ciclos, aumentando a quantidade de material genético.

O uso dessa técnica requer o conhecimento da sequência de iniciadores (*primers*) do organismo alvo, que são pequenas sequências de DNA (oligonucleotídeos) que irão se acoplar em regiões específicas do DNA.

Em síntese, a enzima DNA polimerase prolonga o iniciador utilizando o DNA da célula como molde, repetidamente, nos ciclos de amplificação. Estas duplicações ocorrem em termocicladores, uma vez que o processo requer rápidas variações na temperatura, específicas para cada organismo e gene alvo, em múltiplos ciclos de amplificação. Posteriormente, a amplificação é confirmada por visualização em gel de eletroforese (Madigan *et al.*, 2012).

Uma das variações do PCR clássico é o qPCR (*quantitative real time PCR*), no qual é possível quantificar a concentração do DNA alvo na amostra de origem. Essa técnica envolve o uso de marcadores fluorescentes que se ligam ao DNA que foi amplificado, o que permite monitorar a taxa de amplificação a partir do aumento da intensidade da fluorescência utilizada. A quantificação é realizada pela comparação com curvas padrão de concentração conhecida das células alvo e que passam pelo mesmo procedimento, tais como tempo e temperatura específicos para a reação da PCR.

Em geral, bactérias possuem múltiplas cópias do gene 16S rRNA em seu genoma (conjunto de genes de um organismo), a qual pode ser associada à rapidez de resposta metabólica às mudanças ambientais (Klappenbach *et al.*, 2000). Como *Dehalococcoides* (linhagens FL2, 195 e BAV1) possuem apenas uma cópia do gene 16S RNA (Löffler *et al.*, 2005) o uso de qPCR favorece sua quantificação com maior segurança.

3.6.2 Contagem de células por citometria de fluxo

A citometria de fluxo consiste na contagem de células individuais em meio líquido, tanto em culturas isoladas quanto em meios com população heterogênea. Uma célula por vez passa pelo canal, para leitura de dispersão do raio laser em partículas/ células. O sinal de dispersão frontal (*forward scatter*), na linha de feixe de luz, é proporcional ao tamanho da célula e, da dispersão lateral (*side scatter*), reflete o formato e complexidade da célula, cujas características podem ser separadas por diferentes filtros.

Detectores específicos permitem registrar as variações das frequências resultantes de corantes químicos da própria partícula da célula ou de corantes adicionadas (fluorescências). Entre estas fluorescências está o SYBR® Green I, que se liga ao DNA de dupla fita dos microrganismos e possui pico de fluorescência em 520 nm e *range* de 480 nm a 670 nm (*Thermo Fisher Scientific*). A intensidade da fluorescência está relacionada à quantidade de corantes utilizados na reação.

Citômetros portáteis, como o modelo BD Accuri C6™ (BD Accuri cytometers, Belgium), são utilizados no monitoramento de processos de tratamento de água online (Prest *et al.*, 2013; Hammes and Egli, 2010). Besmer *et al.* (2016) utilizou essa ferramenta para o monitoramento online durante 14 dias em um poço de extração,

obtendo valores entre 120 e 280 células por μL , identificando flutuações periódicas na contagem de células, associadas a mudanças hidrogeológicas, e pontuais, por influência da precipitação e flutuação nos níveis de um rio próximo.

3.6.3 Ensaios de bancada -estudos com microcosmos

Ensaios de bancada são frequentemente utilizados para estudos microbiológicos em ambiente controlado (laboratório). O microcosmo é uma unidade representativa de um cenário, para coleta de informações experimentais de interesse. Em estudos de degradação, em geral são utilizados solo e água do aquífero em frascos apropriados para a medição de atividade microbiológica (Chapelle, 2001).

O protocolo elaborado por Wiedemeier (1998) apresenta orientações para montagem de microcosmos com solo e água subterrânea, com adição de fontes de carbono distintas, entretanto em artigos de estudos ambientais, tanto para isolamento de organismos quanto para estudos de degradação, há grande variação nas metodologias utilizadas na montagem de microcosmos. As diferenças de frascos, tipo de extração (água, ar), proporções na composição do meio de estudo, em relação à quantidade de solo, água e ar nos microcosmos, elaboração de réplicas ou amostras destrutivas, dificulta a comparação entre as pesquisas realizadas em meios com condições geoquímicas semelhantes.

Os ensaios em geral utilizam amostras de solo do aquífero poroso, mas também há trabalhos utilizando amostras trituradas de rocha na montagem de microcosmos (Darlington *et al.*, 2008; Druschel and Kinner, 2013).

Também existem técnicas que permitem a instalação de microcosmos *in-situ*, associado à análise de isótopos estáveis (SIP), para avaliação das variáveis que afetam a degradação, minimizando as alterações devido à manipulação e transporte de amostras (Alvarez e Illman, 2006, Microbial Insights, 2016).

Wiedemeier *et al.* (1999) recomenda a utilização dos microcosmos, como ferramenta para obter linhas de evidência, quando não é possível ter informações históricas sobre o comportamento das substâncias químicas de interesse no campo. Embora seja possível estimar o balanço de massa da biodegradação do contaminante em laboratório, o microcosmo avalia as condições da área no momento da coleta, as

quais podem já ser distintas ao final do experimento, em função de variações hidrogeológicas sazonais, como os níveis de recarga do aquífero.

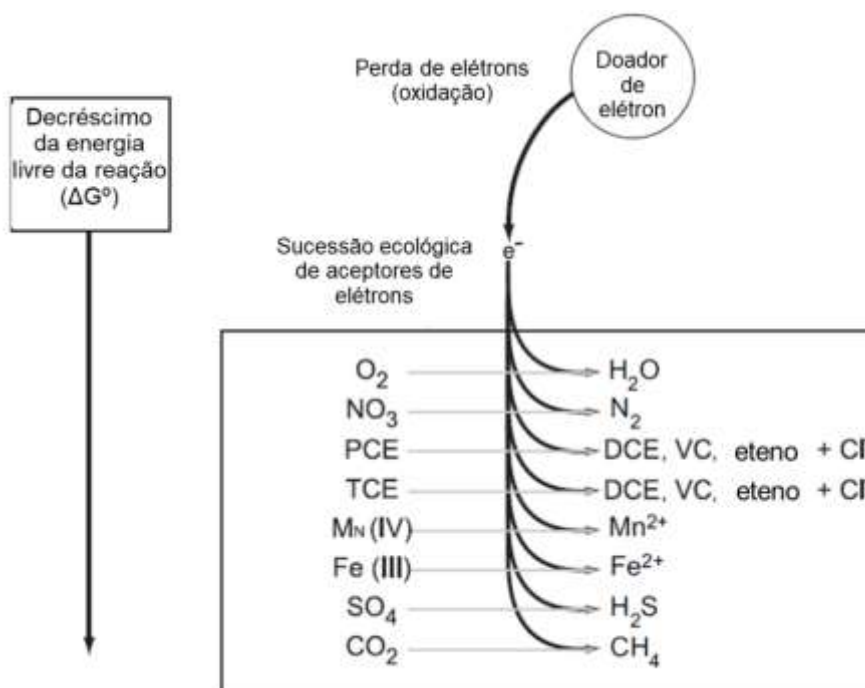
Os microcosmos são elaborados considerando as condições de cultivo mais apropriadas ao crescimento do organismo alvo, de forma a avaliar o que pode estar ausente ou inibindo o desenvolvimento microbiano.

Os meios de cultura utilizados nos ensaios são classificados de acordo com suas propriedades e objetivos. Um meio definido ou sintético é aquele cuja composição é conhecida, em oposição a um meio complexo ou não definido, no qual não se sabe as concentrações exatas e substâncias presentes, no caso de uso de extrato de levedura, por exemplo.

Um meio classificado como seletivo é utilizado para selecionar ou inibir organismos com uma característica específica, como resistência a um antibiótico ou capacidade para degradar determinadas substâncias, como os etenos clorados, por exemplo.

Já um meio de cultura enriquecido é aquele preparado para o crescimento de um organismo com uma característica fisiológica específica, com excesso do nutriente específicos. Também é considerado um meio de cultura enriquecido a adição de suplementos que influenciam o desenvolvimento da fisiologia de interesse, em um meio não seletivo, tal como hidrogênio e acetato, que são utilizados como doadores de elétrons e poderiam favorecer o desenvolvimento de bactérias haloinspiradoras.

Em relação às condições redox, sabe-se que há uma hierarquia energética quanto ao uso de aceptores de elétrons, sendo os etenos clorados passíveis de serem utilizados na respiração microbiana (McMahon and Chapelle, 2008). A Figura 3.10 exemplifica a sequência esperada no consumo dos aceptores de elétrons, considerando a energia livre de Gibbs (ΔG°) das reações.



Fonte: MCMAHON; CHAPELLE (2008).

Figura 3.10 – Sequência de aceptores de elétrons e subprodutos

O sucesso de estudos de microcosmos depende da natureza geológica do material utilizado no estudo, propriedades físicas, estratégia de amostragem e duração do estudo, pois as taxas podem ser superestimadas ou, devido ao tempo de incubação, a biodegradação pode ser subestimada.

Para minimizar as variáveis que afetam esse tipo de estudo, o material deve ser selecionado após o conhecimento do comportamento geoquímico predominante da pluma de contaminação que será avaliada (Wiedemeier *et al.*, 1999). Sabe-se que a heterogeneidade do meio afeta também a identificação dos processos redox predominantes, pois há mistura de zonas distintas, dependendo da área da seção filtrante do poço utilizado para caracterização. Assim, mais de um processo geoquímico pode estar ocorrendo em regiões próximas.

As incertezas em estudos laboratoriais incluem as possíveis alterações no solo após a coleta e transporte, que envolvem da mudança na composição da microbiana, por exemplo, por predação e/ou alterações nas condições físico-químicas, resultando também na diferença entre as condições dos aceptores de elétrons em campo e no microcosmo (Chapelle, 2001; Wiedemeier, 1998).

A taxa de degradação em microcosmos que simulam o uso de oxigênio e nitrato, por exemplo, não conseguem reproduzir as condições de campo quando estes são

limitantes, pois o fornecimento desses aceptores no meio natural ocorrerá por dispersão hidrodinâmica, dificilmente simulado em microcosmos estáticos. Condições sulfato e ferro redutoras e metanogênicas são mais favoráveis de serem replicadas em escala de campo (Wiedemeier, 1998).

A caracterização geoquímica prévia da área de estudo também permite caracterizar o perfil nutricional do meio em subsuperfície, que em geral é oligotrófico. (Alvarez e Illman, 2006).

A taxa de degradação, que pode ser obtidas nos ensaios de bancada, é definida pelo coeficiente de biodegradação λ (lambda), o qual pode ser determinada também a partir de dados de campo (Wiedemeier *et al.*, 1999; Alvarez e Illman, 2006).

Em laboratório, partindo da premissa que não há novo aporte de massa de contaminante durante o experimento, o coeficiente pode ser calculado a partir da redução nas concentrações da SQI ao longo do tempo, conforme a equação diferencial (1), que segue o modelo de decaimento de primeira ordem. Assim, a inclinação da reta equivale ao coeficiente de degradação, como indicado na equação (2).

$$dC/dt = -\lambda C \quad \text{Equação (1)}$$

$$\ln(C_f) = -\lambda t + \ln(C_i) \quad \text{Equação (2)}$$

É importante destacar que o λ é um coeficiente *site-specific*, ou seja, específico da área em estudo, pois depende das condições redox e dos microrganismos presentes. Ainda, esse coeficiente pode variar temporalmente e espacialmente (Alvarez e Illman, 2006), em função da heterogeneidade do meio, como já discutido previamente. As taxas calculadas em ensaios laboratoriais também demandam validação com dados do campo, para evitar subestimar ou superestimar o tempo para se atingir metas de remediação específicas. Dependendo das características do contaminante, taxas calculadas em laboratório podem ser até menores do que as observadas em campo (Alvarez e Illman, 2006).

3.7 Atenuação natural monitorada - MNA

O termo atenuação natural era usado para designar os efeitos combinados dos processos de diluição, dispersão, sorção e biodegradação na redução de concentrações de contaminantes no meio ambiente. Entretanto, estudos realizados na década de 1990 indicaram que o papel da biodegradação era o mais expressivo na redução de massa, denominada biorremediação intrínseca, ou seja, sem a ação humana para incrementar a biodegradação no meio. Posteriormente, para não ser considerada uma alternativa de “não ação”, essa técnica de remediação passou a ser denominada atenuação natural monitorada (*monitored natural attenuation* – MNA), para assegurar a obrigatoriedade do monitoramento da evolução das concentrações de SQT e avaliar se o tempo de ação dos processos de atenuação seria suficiente para atingir as metas de remediação (Chapelle, 2001; Wiedemeier *et al.*, 1999).

A definição clássica é que MNA é uma técnica de remediação sem intervenção humana, de redução de massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração de contaminantes no solo e na água subterrânea, por meio dos processos de dispersão, diluição, sorção, volatilização e estabilização, transformação e destruição biológica e química dos compostos (Wiedemeier, 1998). A técnica requer o monitoramento de longo prazo da pluma de contaminação.

Características do aquífero, como a condutividade hidráulica, porosidade e gradientes hidráulicos afetam as taxas de atenuação natural em campo.

São três as linhas de evidência clássicas que indicam a ocorrência de atenuação natural:

- Avaliação das tendências históricas das concentrações de contaminantes, indicando estabilização e/ou perda de massa da pluma ao longo do tempo;
- Dados analíticos indicando que as condições geoquímicas são favoráveis para biodegradação e que está ocorrendo o consumo de aceptores de elétrons e/ou produção de subprodutos de metabolismo;
- Dados microbiológicos que apoiem a ocorrência de biodegradação (Wiedemeier *et al.*, 1999).

Essa terceira linha de evidência é indicada quando não é possível ter informações históricas, pois permite realizar o balanço de massa da biodegradação do contaminante (Wiedemeier *et al.*, 1999).

A Tabela 3.3 indica as vantagens e limitações de MNA como alternativa de remediação (Wiedemeier, 1998).

Tabela 3.3 – Vantagens e limitações da atenuação natural com bioremediação intrínseca

| Vantagens | Limitações |
|---|---|
| Redução de massa e transformação em subprodutos inócuos | Prazo para a remediação completa pode ser longo |
| Não intrusiva e permite o uso das instalações durante a remediação | Demanda responsabilidade pelos custos associados ao monitoramento de longo prazo e implementação de controles institucionais |
| Não envolve geração ou transferência de resíduos | Sujeita às mudanças naturais e antropogênicas nas condições hidrogeológicas locais, incluindo mudança na direção e velocidade da água subterrânea |
| Frequentemente menos dispendiosa que outras tecnologias de remediação | As condições geoquímicas e hidrogeológicas apropriadas para atenuação natural podem mudar com o tempo ou resultar em mobilidade de contaminantes estabilizados, afetando eficácia da remediação |
| Pode ser utilizada junto ou na sequência de outras medidas de remediação intrusivas | Heterogeneidade do aquífero pode complicar a caracterização |
| Não é sujeita às limitações de equipamentos de remediação mecanizados | Produtos de biodegradação intermediários podem ser mais tóxicos que o composto original |

Fonte: WIEDEMEIER, 1998

No protocolo de Wiedemeier 1998, a principal ferramenta da terceira linha de evidência são os estudos de biodegradação em microcosmos, por permitir a obtenção da variável biológica.

O desenvolvimento da biologia molecular e a de extração de biomarcadores (DNA, RNA, proteínas) de células presentes em amostras ambientais tornou viável o uso de ferramentas moleculares (*Molecular Biological Tools* - MBT) na caracterização de áreas contaminadas, fornecendo evidência direta da presença e/ou atividade de microrganismos degradadores de forma mais rápida. O conjunto de técnicas emergentes que permite a análise das características químicas e biológicas dos meios físicos impactados, tais como o MBT e o CSIA (*Compound Specific Isotope Analysis*) é denominado EMD (*Environmental Molecular Diagnostic*) (ITRC, 2011).

Assim, novos parâmetros podem ser utilizados para avaliar o potencial de atenuação natural. Em Wiedemeier (1998), uma ampla lista de parâmetros geoquímicos e concentrações de produtos de degradação eram utilizados para a classificação do potencial de atenuação natural de uma área contaminada. Essa lista

foi reavaliada, com inclusão de novos parâmetros em Lebrón *et al.* (2015), como aprimoramento do protocolo original de Wiedemeier (1998). Os parâmetros que afetam a degradação de etenos clorados, citados por Lebrón *et al.* (2015) são: concentrações de compostos orgânicos voláteis (VOC); aceptores de elétrons como oxigênio e sulfato; presença de compostos reduzidos, como o Fe(II) e o metano, abundância de genes *Dhc 16SrRNA* e dehalogenases; e suscetibilidade magnética. Os valores destes indicadores pode ser inseridos em planilhas auxiliares dentro da ferramenta BioPic, para avaliação da correlação com o potencial de atenuação natural *in-situ*.

O uso de ferramentas moleculares (MBT) foi validado em diversos estudos financiados pelo SERDP (*Strategic environmental reseearch na Development Program*) nos Estados Unidos (Lebrón *et al* 2008, 2011; Mattes *et al*, 2013)

4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades realizadas no âmbito dessa pesquisa incluíram atividades de campo, que consistiram na instalação dos poços de monitoramento para obtenção de amostras de solo e água subterrânea, e atividades laboratoriais, para elaboração de microcosmos. Os resultados foram tratados no *software* Excel®, da Microsoft, e no *software* livre R v. 3.4.2 (*R Foundation for Statistical Computing*).

4.1 Instalação de poços de monitoramento multiníveis

Os sistemas multiníveis utilizados para obtenção das amostras de água subterrânea utilizadas neste trabalho foram instaladas como parte do projeto do CEPAS, com o objetivo de estabelecer o modelo conceitual hidrológico e de transporte de compostos organoclorados no aquífero fraturado, com o uso de ferramentas de alta resolução (Pino, 2015; Bertolo, 2017; Lojkasek-Lima, 2016).

A partir de levantamentos realizados previamente (perfilagens geofísicas, descrição litológica/ estrutural e ensaios hidráulicos) pelo grupo de pesquisa, foram selecionados os sistemas multiníveis, que permitem o estudo de intervalos múltiplos em uma única perfuração, podendo ser utilizados em formações heterogêneas com litologias consolidadas ou inconsolidadas.

Além dos sistemas multiníveis Westbay® MP-01 e CMT-01 foram utilizados neste estudo os poços de monitoramento convencionais já presentes na área (PM-11, PM-11A e PM-11B), devido sua proximidade, como ilustrado na Figura 4.1. O perfil litológico-construtivo dos poços convencionais pré-existentes consta no ANEXO A (Servmar, 2013).

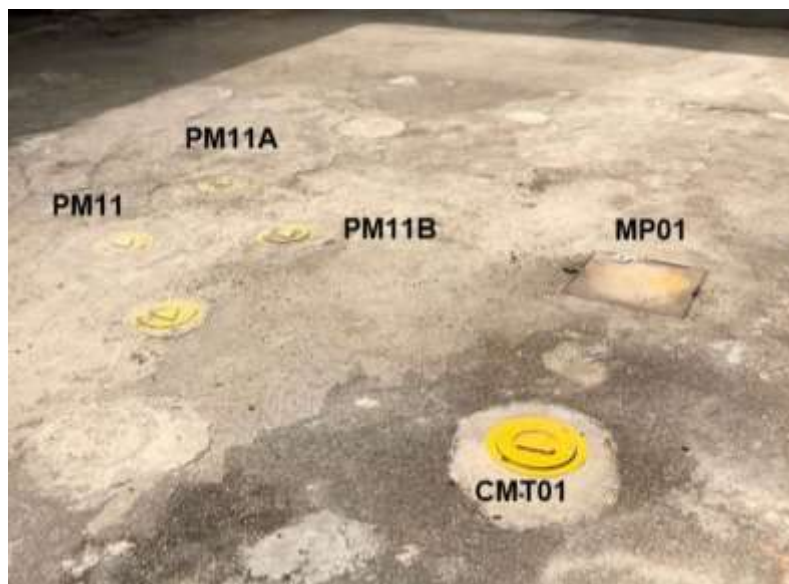


Figura 4.1 – Disposição dos sistemas multiníveis instalados CMT-01 e MP-01 e proximidade aos trio de poços de monitoramento multiníveis convencionais PM-11, PM-11A e PM-11B, presentes na área.

Os sistemas multiníveis utilizados na área de estudo foram o CMT (*Continuous Multichannel Tubing*®), desenvolvido por Einarson; Cherry (2002) e comercializados pela Solinst, e o sistema Westbay®, o qual vem sendo aperfeiçoado desde o final da década de 80 (Gilmore, 1989) e atualmente é comercializado pela Westbay Instruments.

Em maio de 2016 foi realizada uma sondagem para instalação do poço CMT no aquífero poroso e próximo à interface com a rocha mãe. A perfuração foi realizada pela empresa Engesolos Engenharia de Solos e Fundações Ltda., com descrição do perfil geológico e coleta de amostras de solo para análises químicas, no âmbito do projeto de doutorado de Lojkasek-Lima (2016).

O CMT utilizado possui sete canais em um tubo de polietileno contínuo, de 1,7" de diâmetro (43 mm), resultando em sete pontos de monitoramento (poços multiníveis) na mesma perfuração. Os seis canais periféricos são de 10 mm (0,4") de diâmetro e o central, de 9 mm (3/8") de diâmetro, os quais armazenam volumes de 131,2 mL/m (40 mL/ft) e 98,4 mL/m (30 mL/ft), respectivamente.

As profundidades dos poços (Tabela 4.1) foram definidas de acordo com o levantamento histórico dos perfis de sondagens e de concentrações de etenos clorados em áreas adjacentes, considerando também as variações identificadas durante a perfuração do poço CMT (Lojkasek-Lima, 2016; Pino, 2015).

Tabela 4.1 – Perfil construtivo do poço de monitoramento multinível CMT

| Poço | Profundidade porta | Seção Filtrante | | Pré-Filtro | | Canal do CMT | Perfuração |
|-------|--------------------|-----------------|-------|------------|-------|-------------------------|-------------------------|
| | m | m | m | m | m | (\varnothing - pol.) | (\varnothing - pol.) |
| CMT01 | 2,30 | 2,27 | 2,34 | 2,10 | 2,40 | 0,4" | 4" |
| CMT02 | 3,70 | 3,67 | 3,74 | 3,50 | 3,90 | 0,4" | 4" |
| CMT03 | 6,20 | 6,17 | 6,24 | 6,00 | 6,40 | 0,4" | 4" |
| CMT04 | 8,80 | 8,77 | 8,84 | 8,60 | 9,00 | 0,4" | 4" |
| CMT05 | 10,20 | 10,17 | 10,24 | 10,00 | 10,40 | 0,4" | 4" |
| CMT06 | 12,20 | 12,17 | 12,24 | 12,00 | 12,40 | 0,4" | 4" |
| CMT07 | 14,50 | 14,48 | 14,50 | 14,30 | 14,80 | 3/8" | 4" |

A montagem do poço foi realizada no momento da instalação, na área de estudo, após a definição da profundidade final de instalação (14,50 m).

O corte das portas periféricas (poços) nas profundidades de interesse foram realizadas em campo, com ferramentas específicas (Figura 4.2A e B), em seguida envoltas em tela de aço inoxidável, para proteção contra a entrada de sedimento (Figura 4.2C).

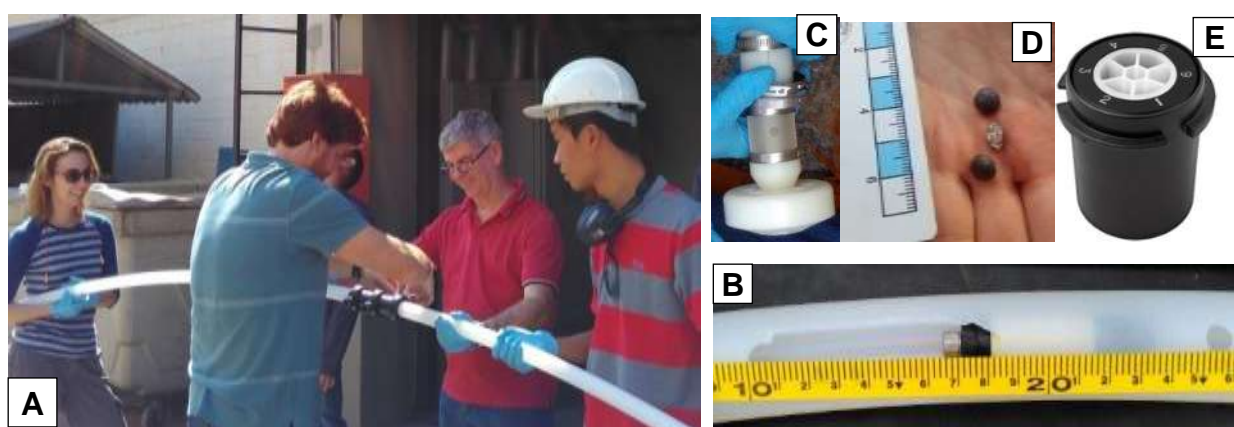


Figura 4.2 – Instalação do poço CMT.

A. Corte das portas da seção filtrante; B. Detalhe do corte e vedação; C. Detalhe da base do poço CMT e tela metálica de aço inoxidável; D. Bentonita revestida. Tampa de acesso.

A bentonita revestida em *pellet* com 1,4” de diâmetro (*coated bentonite pellet TR 60 Pel-Plug®*), ilustrada na Figura 4.2D, foi utilizada no selamento entre os poços, devido às propriedades de hidratação lenta e prevenção de formação de vazios no selo entre as portas. A tampa de acesso aos canais (Figura 4.2E) possui numeração das portas, a qual é crescente, com o aumento de profundidade. A Figura 4.3 ilustra o perfil esquemático do poço CMT.

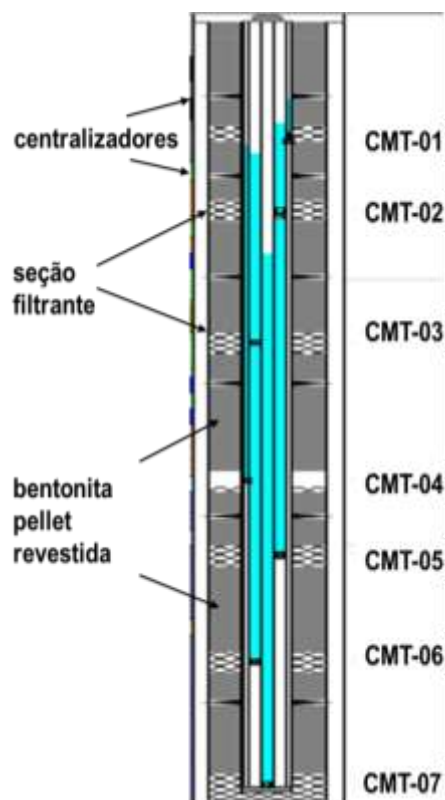


Figura 4.3 – Esquema do perfil construtivo do poço CMT, com sete portas de monitoramento.

A perfuração para futura instalação do segundo poço multinível, no aquífero fraturado, foi realizada em 2015 (Lojkasek-Lima, 2016). Esta perfuração MP-01 permaneceu selada pelo FLUTE® *blank liner*, um tecido de nylon revestido com uretano que evita fluxos verticais de água (*cross connection*) entre as fraturas, em função do furo aberto (Cherry *et al.*, 2007; Keller, 2012), o qual foi removido apenas durante ensaios geofísicos em furo aberto, realizados no âmbito do projeto de doutorado de Pino (2015), e para instalação do poço, em junho de 2016

O poço multinível MP-01 é um sistema Westbay® de coleta de amostra sem purga, e foi pré-montado de acordo com as características da área de estudo, com base na

interpretação de perfilagens, descrições litológicas e estruturais de testemunhos de sondagens obtidos durante a perfuração (Lojkasek-Lima, 2016; Pino, 2015).

O Westbay® System consiste em um tubo de diâmetro interno de 1,5" (38 mm), por onde a sonda é inserida. Os tubos pré-fabricados (Figura 4.4A e B) são acoplados no momento da instalação, na entrada do furo aberto. Em seguida são realizados testes de estanqueidade em todas as portas de monitoramento e de bombeamento para garantir o selo dos *packers*.

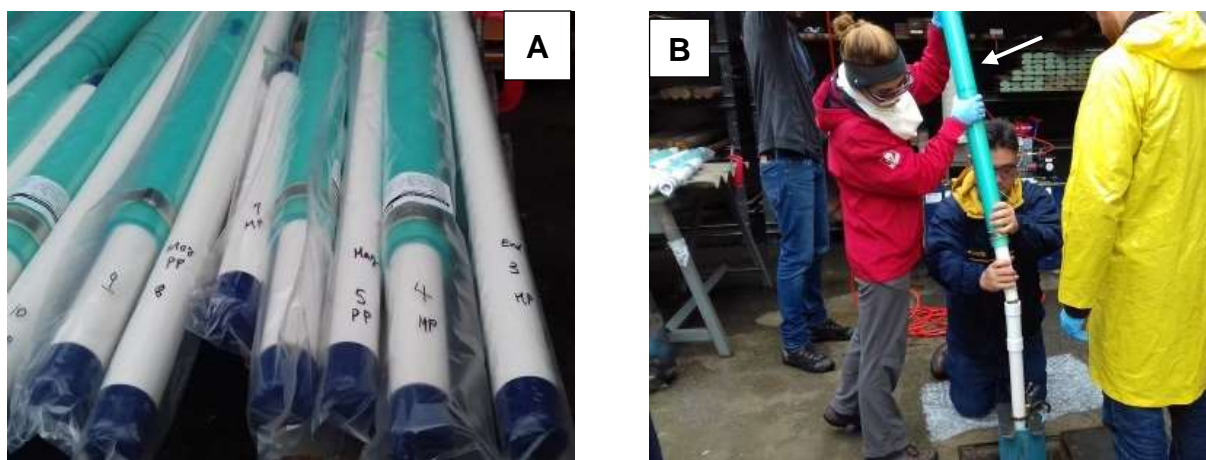


Figura 4.4 – Instalação do poço Westbay® MP-01.

A. Preparação dos tubos pré montados; B. Montagem do poço MP-01.

A seção de interesse (poço) é isolada por meio de *packers* de 0,90 m de comprimento (seta na Figura 4.4B), que asseguram o isolamento entre os grupos de fratura de interesse e são inflados no final da instalação.

Foram definidas 15 zonas de monitoramento, sendo que na primeira zona há duas portas de amostragem, uma dentro do revestimento (WB-16) e outra na rocha (WB-15), como indicado na Figura 4.5.

As portas foram denominadas WB e numeradas da base para o topo, em ordem crescente, devido à metodologia de leitura das cargas hidráulicas, a qual é ascendente.

A medição de carga hidráulica e a coleta de amostra de água subterrânea são realizadas na porta de monitoramento, no ponto de acoplamento da sonda, que possui um transdutor de pressão (Figura 4.6A-C). A MAGI - MOSDAX *Automated Groundwater Interface* (Figura 4.6D) é a interface que envia o sinal para o acionamento do motor para acoplamento da sonda, para obtenção da pressão de fluido dentro do tubo e na zona de monitoramento, bem como abertura e fechamento da válvula para amostragem.

Os perfis litológicos dos sistemas multiníveis CMT e Westbay® foram gerados no software Wellcad® e constam no APÊNDICE E.

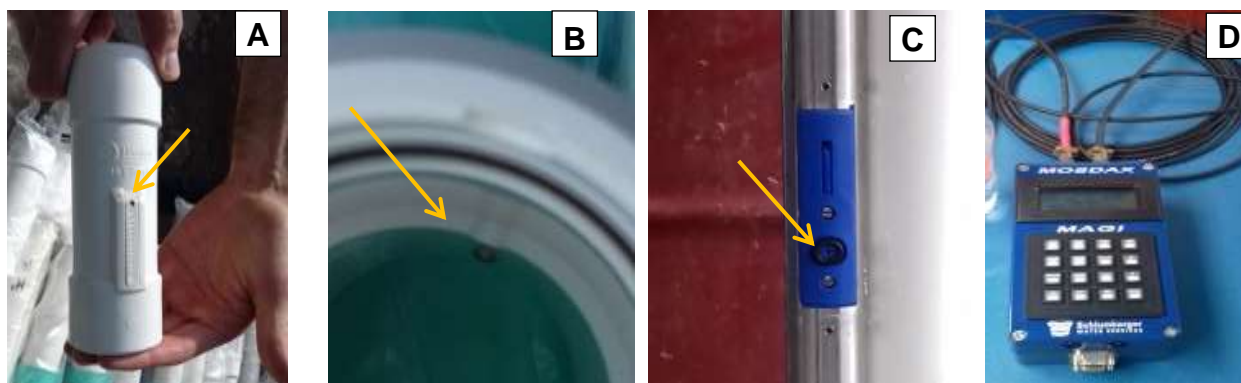


Figura 4.6 – Detalhe da porta de monitoramento do WB e sonda

A. Porta de monitoramento; B. Detalhe da porta de monitoramento; C. Detalhe da sonda. Setas indicam ponto de contato do meio com a sonda. D. MAGI - interface da sonda.

4.2 Metodologias de coleta e ensaios realizados em amostras de água subterrânea

Nos meses de junho e julho de 2016 foram realizadas mobilizações para purga, medição de nível d'água e de parâmetros físico-químicos das portas do poço CMT, a fim de reduzir a turbidez constatada após a instalação. Em junho de 2016 foram realizadas coletas de amostras de água das portas do poço MP-01, também para avaliação visual da turbidez e para medição de parâmetros físico-químicos.

A primeira campanha de monitoramento analítico foi realizada entre agosto e setembro de 2016, a fim de caracterizar a qualidade da água subterrânea e subsidiar a seleção de amostras para os ensaios microbiológicos. Além da coleta de amostras dos poços multiníveis instalados, contemplou-se também a coleta em poços pré-existentes (PM-11, PM-11A, PM-11B), selecionados de acordo com a posição da seção filtrante e proximidade ao conjunto multiníveis CMT e Westbay® MP-01.

Em novembro de 2016 foi realizada a coleta de água para montagem dos ensaios em microcosmos e, em março e abril de 2017 foram realizadas coletas para ensaios microbiológicas complementares, as quais serão detalhadas no item 4.2.2.

A coleta de amostras de água subterrânea na área de estudo foi precedida de medição de parâmetros físico-químicos, com auxílio de equipamentos multiparâmetros YSI Professional Pro e Aquaread, previamente calibrados. Foram registrados os parâmetros oxigênio dissolvido (OD), potencial de óxido-redução com eletrodo de platina (ORP), condutividade elétrica (CE), potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura.

Nos poços de monitoramento convencionais e CMT foi utilizado o medidor de nível mini M102 da Solinst Canada Ltd, com fita de 25 m de comprimento e sonda com 10 mm de diâmetro por 70 mm de comprimento.

Cada tipo de poço apresenta uma metodologia específica de coleta, conforme as características do poço, conforme detalhado a seguir.

A amostragem de água do poço Westbay® MP-01 foi realizada com auxílio de *canisters*. Estes são compartimentos de aço inoxidável, com capacidade para 250 mL, que podem ser conectados por um tubo flexível, com tubo teflon, e sistema de vedação de *o-rings*, para evitar vazamento de ar e/ou água no sistema.

O acesso à água subterrânea ocorre apenas após o acionamento de comandos pela MAGI. Para amostragem de água subterrânea os quatro *canisters* são conectados em série, para coleta de até 1 L, e inseridos no poço (Figura 4.7A-C).



Figura 4.7 – *Canisters* para amostragem do poço Westbay® MP-01

A. Tripé com *canisters* acoplados à sonda; B. Mesa de montagem e descontaminação dos *canisters*. C. Detalhe da conexão entre os *canisters*; D. Detalhe da válvula manual do *canisters*. Seta indica a válvula para abertura manual.

Na superfície, são feitos testes de pressão para assegurar a estanqueidade do sistema, seguido de aplicação de pressão negativa nos *canisters*, a qual é mantida pelo rápido fechamento da válvula da sonda, acionada pela interface MAGI. Na profundidade de interesse, mede-se a pressão interna do tubo e a pressão na zona de monitoramento. A válvula da sonda é aberta para a entrada de água nos *canisters*, por diferença de pressão.

A pressão da zona amostrada é mantida até atingir a superfície, quando as válvulas manuais dos *canisters* são abertas (Figura 4.7D), para o acondicionamento da amostra.

No sistema multinível CMT, as amostras foram obtidas com o auxílio de uma mini bomba inercial de inox da Solinst (Figura 4.8A), inserida em mangueira de ¼" descartáveis para obtenção de amostra de água de cada porta.



Figura 4.8 – Equipamentos utilizados na amostragem de água subterrânea: mini bomba inercial de inox, bomba peristáltica e bomba de bexiga

A. Mini bomba inercial de inox; B. bomba peristáltica Geotech; C. Amostragem por baixa vazão nos poços convencionais com bomba de bexiga. D. Detalhe da bomba de bexiga *SamplePro* desmontada para descontaminação. E. Detalhe da troca de bexiga entre as amostragens dos poços de monitoramento convencionais.

Nos poços de monitoramento convencionais a coleta foi realizada pela metodologia de baixa vazão com bomba peristáltica Geopump™ da *Geotech Environmental Equipment* (campanha de agosto e setembro de 2016). Para os ensaios microbiológicos foi utilizada a bomba de bexiga portátil *SamplePro* e controlador de

vazão e rebaixamento digital com compressor MicroPurge®, da QED Environmental Systems (Figura 4.8B-E), acopladas a célula de fluxo, para melhor controle da vazão e manutenção da pressão durante o enchimento dos microcosmos em campo.

O método de baixa vazão consiste no rebaixamento mínimo e controlado do nível d'água a uma vazão reduzida (entre 0,05 L/min e 1,0 L/min), acompanhado pelo monitoramento de parâmetros físico-químicos até sua estabilização, para assegurar que seja coletada a água representativa do aquífero (ABNT, 2010).

Os equipamentos não descartáveis foram descontaminados entre cada ponto de amostragem, com detergente não fosfatado Extran MA02 Neutro e água de garrafão com baixo teor de sólidos.

Nas etapas de coleta para ensaios microbiológicos (novembro de 2016, março e abril de 2017), além do detergente foi adicionada uma etapa de desinfecção dos insumos, com álcool 70%, seguida de lavagem com água ultrapura (MilliQ®). A água ultrapura é uma água deionizada, seguida de purificação de compostos orgânicos e filtração em membrana de 0,22 µm.

O álcool etílico em alta concentração (90 a 100%) tende a coagular proteínas de membrana de forma rápida, inativando a célula, que em condições adequadas pode retomar a atividade. Em concentrações mais baixas (70%), o álcool permeia a membrana celular e entra em toda a célula, pois o efeito da coagulação é mais lento, sendo mais eficaz na desinfecção de grande parte dos microrganismos (Morton, 1950; McDonnell and Russell, 1999). Os materiais plásticos utilizados, como tubos e frascos Nalgene, que não puderam ser autoclavados, foram irradiados previamente no Centro de Tecnologia das Radiações – CTR IPEN/ CNEN, com a dose padrão de esterilização de 15 kGy.

4.2.1 Ensaios realizados para caracterização da qualidade da água subterrânea

O perfil vertical detalhado dos sistemas multiníveis instalados contempla sete pontos de amostragem no poço CMT e 16 portas de monitoramento do poço Westbay® MP-01 (15 zonas). A porta CMT-01 não apresentou coluna d'água suficiente para a coleta de amostra nas campanhas realizadas.

A primeira campanha foi realizada entre agosto e setembro de 2016, e incluiu poços de conjuntos multiníveis tradicionais (PM-11/PM-11A/PM-11B), seis portas do poço multinível CMT e dezesseis portas do poço multinível Westbay® MP01, totalizando 30 pontos de coleta, além das amostras de controle de qualidade (brancos de campo e equipamento).

Em todas as amostras foram analisados os parâmetros Compostos Orgânicos Voláteis (VOC varredura), gases dissolvidos (metano, etano, eteno), ferro e manganês totais e filtrados e sulfeto, no laboratório Analytical Technology; íons maiores e alcalinidade, no laboratório do CEPAS – IGc-USP; e TOC (*Total Organic Carbon* - carbono orgânico total - filtrado) e NPOC (*Non Purgeable Organic Carbon* – carbono orgânico não purgável) no laboratório do Semi Industrial – Engenharia Química – USP. Como o TOC sofre influência também das concentrações de etenos clorados, o NPOC é melhor indicador do carbono orgânico disponível para assimilação, pois os compostos orgânicos voláteis e o carbono inorgânico são eliminados com a acidificação da amostra para a análise (APÊNDICE A).

As amostras foram filtradas em campo para as análises de TOC/NPOC e cátions maiores, com seringa descartável de 60 mL e filtro de seringa com membrana de celulose regenerada, 25 mm diâmetro e 0,45 µm de porosidade, da marca *Sartorius Stedim Biotech*.

A análise de TOC e NPOC foi realizada em até 12 horas a partir da coleta, sem preservação, com o auxílio de um amostrador automático *Autosampler* ASI-L acoplado ao TOC-L Shimadzu modelo 5000A.

A análise de VOC inclui 63 compostos orgânicos voláteis, entretanto nesta pesquisa foram considerados apenas os etenos clorados tetracloroeteno (PCE), tricloroeteno (TCE), isômeros de dicloroeteno (DCE, cis e trans) e cloreto de vinila (CV).

Os limites de quantificação para essas substâncias, analisadas no laboratório Analytical Technology, são inferiores aos valores orientadores da CETESB (CETESB, 2016).

Em relação aos gases, Wiedemeier *et al.* (1999) recomenda que o limite de quantificação para metano esteja na ordem de 1 µg/L, para avaliação de bioremediação intrínseca de solventes clorados, entretanto, tecnologias para atingir esses limites não estão disponíveis em escala comercial, tampouco a análise de

hidrogênio em campo, o qual também apresenta correlação com a degradação de etenos clorados (Löffler *et al.*, 1999).

No APÊNDICE B estão as tabelas com os limites de quantificação, metodologias e equipamentos utilizados nos laboratórios Analytical Technology e CEPAS – IGc- USP.

Em novembro e dezembro de 2016, durante a montagem dos microcosmos, foram coletadas amostras adicionais dos poços PM-11B e CMT-07, para posterior comparação com as análises dos microcosmos. Foram analisados os parâmetros: VOC varredura, amônia e nitrato, ferro e manganês totais e filtrados, sulfato, sulfeto, no laboratório Analytical Technology, e TOC/ NPOC no laboratório Semi Industrial – Engenharia Química da USP. Como discutido no item 0, a profundidade da seção filtrante desses poços (CMT-07 a 14,5 m e PM-11B entre 13,25 e 14,25 m) está na zona de alteração com dupla porosidade, na base do manto de intemperismo e com porosidade de fratura. Estudos detalhados dessa zona de transição são abordados em projetos de doutorado em andamento no grupo de pesquisa (Lojkasek-Lima, 2016; Pino, 2015).

Entre março e abril de 2017 foi realizada uma campanha de monitoramento analítico parcial, envolvendo a coleta de amostras para análises microbiológicas complementares (ensaio molecular e contagem de células), que incluiu a análise de VOC em 10 pontos de monitoramento: trio multinível PM-11/PM-11A/PM-11B, CMT-07, WB-15, WB-14, WB-12, WB-09 e WB-03.

Entre os critérios de seleção dos pontos potenciais para coleta de amostras para ensaios de PCR em tempo real, a fim de avaliar a abundância de bactérias *Dehalococcoides* (gene *Dhc*) e seus genes funcionais, estão a presença de concentrações de VOC acima de 100 µg/L e de produtos de degradação de etenos clorados (Lebrón *et al.*, 2011).

4.2.2 Ensaios moleculares de PCR em tempo real (qPCR)

Na campanha de monitoramento analítico parcial (março e abril de 2017) foram coletadas amostras para análises moleculares por PCR em tempo real, ou qPCR (*Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) (Cupples, 2008), no laboratório SiREM, uma divisão do grupo *Geosyntec Consultants*, localizado em Guelph, no Canadá.

Dentro do arcabouço de testes Gene-Trac® disponíveis na SiREM, foram selecionados o Gene-Trac® Universal, que quantifica a biomassa total de bactérias (16SrRNA), o Gene-Trac® Dhc, que quantifica bactérias do gênero *Dehalococcoides* (Dhc), e o Gene-Trac® FGA, que quantifica os genes funcionais das redutases *vcrA* (*vinyl chloride reductase*), *bvcA* (BAV1 *vinyl chloride reductase*) e *tceA* (*trichloroethene reductase*).

O laboratório disponibilizou filtros sterivex® para filtração em campo e a coleta foi realizada de acordo com o protocolo de Ritalahti, Hatt, Petrovskis, *et al.* (2010). Os filtros foram utilizados para filtração dos poços do conjunto multinível PM-11/PM-11A/PM-11B e do CMT-07, conectados às bombas de coleta utilizadas. Buscou-se a filtração de ao menos 1 L de amostra de água ou até saturação da membrana.

Para a amostragem do sistema Westbay® MP-01 foi projetado um adaptador, na Oficina Central do Instituto de Física – USP, para a filtração em campo (APÊNDICE C).

Os testes em laboratório indicaram bom funcionamento do sistema de filtração com a bomba de pressão. Entretanto, durante o teste em campo, verificou-se alteração na coloração da amostra do poço de monitoramento convencional PM-11A, possivelmente devido ao uso da atmosfera ambiente na pressurização do frasco, o que provocou a oxidação da amostra antes da filtração.

Sabe-se que óxidos de ferro provocam entupimento da membrana em etapas subsequentes dos ensaios por qPCR (Ritalahti, Hatt, Lugmayr, *et al.*, 2010), desta forma as amostras das portas WB-15, WB-14, WB-12, WB-09, WB-07 e WB-03 foram enviadas em frascos de polietileno de alta densidade (HDPE) de 1 L, completamente preenchidos. As amostras foram mantidas sob refrigeração logo após a coleta e durante o transporte.

O período entre a coleta em campo e o congelamento das amostras em ultrafreezer (-80°C), no laboratório SiREM, foi de 6 a 8 dias. Embora o ideal seja a extração da amostra dentro de um intervalo de 24 horas, essa incerteza tem que ser considerada na avaliação dos resultados, uma vez que essa análise não está disponível em escala comercial no Brasil (Ritalahti, Hatt, Lugmayr, *et al.*, 2010). Para as análises realizadas o laboratório SiREM considera o *holding time* das amostras de 10 dias e limite de detecção de 1000 cópias genômicas por litro (CG/L).

No laboratório SiREM procedeu-se a extração e purificação do DNA com o protocolo do kit *MagAttract® PowerSoil®* DNA e o equipamento *KingFisher® Duo*, da

Thermo Scientific (automático). O preparo das amostras para a análise de qPCR foi automatizado no equipamento QIAgility, da Qiagen, e a detecção no equipamento IQ-5, da BioRad. Os *primers* específicos utilizados para a quantificação de *Dehalococcoides* e genes funcionais estão relacionados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Primers utilizados nas análises moleculares de Dhc e redutases

| Primer | Sequências (5'-3') |
|-------------------------------|---|
| Dhc TM Forward ⁽¹⁾ | GGTAATACGTAGGAAGCAAGCG |
| Dhc TM Reverse ⁽¹⁾ | CCGGTTAAGCCGGGAAATT |
| Dhc Probe ⁽²⁾ | CAL Fluor Orange 560-CCAACUUGAAAGACCACCUAC-BHQ-1 plus |
| vcrAf ⁽¹⁾ | CTCGGCTACCGAACGGATT |
| vcrAr ⁽¹⁾ | GGGCAGGAGGATTGACACAT |
| vcrA probe ⁽¹⁾ | FAM-CGCACTGGTTATGGCAACCACTC-BHQ-1 |
| bvcAf ⁽¹⁾ | GGTGCCGCGACTTCAGTT |
| bvcAr ⁽¹⁾ | TCGGCACTAGCAGCAGAAATT |
| bvcA probe ⁽¹⁾ | CAL Fluor Red 610-TGCCGAATTTTCACGACTTGGATGAAG-BHQ-2 |
| tceAf ⁽¹⁾ | ATCCAGATTATGACCCTGGTGAA |
| tceAr ⁽¹⁾ | GCGGCATATATTAGGGCATCTT |
| tceA probe ⁽²⁾ | Quasar 670-UGGGGCUAUGGCGACCGCAGG- |
| Bac1055YF ⁽³⁾ | ATGGYTGTCGTCAGCT |
| Bac1392R ⁽³⁾ | ACGGGCGGTGTGTAC |
| Bac1115Probe ⁽³⁾ | FAM-CAACGAGCGCAACCC-BHQ-1 plus |

⁽¹⁾ HOLMES *et al.* (2006)

⁽²⁾ Biosearch

⁽³⁾ RITALAHTI *et al.* (2006)

Fonte: SiREM Lab (2017).

4.2.3 Quantificação de células por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada nas amostras PM-11/PM-11A/PM-11B, CMT-07, WB-15, WB-14, WB-09, WB-07 e WB-03, para a quantificação do número de células, como alternativa para a identificação de microrganismos na água subterrânea.

As amostras foram fixadas em campo, logo após a coleta. Alíquotas das amostras foram filtradas em membrana de nylon de 40 µm, para remoção de sedimentos, e um volume de 1,5 mL do filtrado foi fixado com glutaraldeído, a fim de atingir concentração final de 0,2% (Marie *et al.*, 1999). Os criotubos utilizados para armazenar essas

amostras foram previamente autoclavados e, após a coleta, refrigerados com gelo seco e armazenamento em ultrafreezer (-80°C) até o momento do processamento, no Laboratório de Ecologia de Micro-organismos do Instituto Oceanográfico da USP (LECOM-IOUSP), por profissional especializado nos equipamentos.

Em testes realizados com amostras congeladas e não preservadas com glutaraldeído, os resultados indicaram ausência de células na amostra, enfatizando a importância da fixação prévia para o sucesso da análise.

No momento da análise, a cada 1,5 mL de amostra foi adicionado 1,5 µL do corante SYBR Green I (1:10.000 diluído em DMSO; Molecular Probes), seguido de homogeneização e incubação no escuro por 10 min, a 35°C. A quantificação de células em cada amostra foi realizada em triplicata, utilizando-se a média.

Essa técnica foi realizada também em alíquotas dos microcosmos, a fim de avaliar a presença de células nos frascos esterilizados (microcosmo C), entretanto o corante resazurina, utilizado como indicador de óxido redução, afetou a leitura do equipamento, em função da sobreposição de comprimentos de onda com o corante SYBR Green®.

Para quantificação de células nas amostra de água foram comparados os resultados em dois equipamentos, disponíveis no LECOM-IO USP.

O citômetro BD Accuri C6™ (BD Accuri cytometers, Belgium) é equipado com o laser de 50 mW com comprimento de onda fixo de 488 nm. A intensidade de fluorescência foi coletada nos canais FL1 = 533± 30 nm (verde) e FL3 > 670 nm (vermelho), com velocidade de fluxo baixo (35 mL/min) e *threshold* de 500 no canal de fluorescência verde (FL1) (Hammes and Egli, 2005, 2010; SLMB, 2012). O *threshold* é definido para exclusão de pequenos detritos que geram ruído na análise. Os dados foram processados com o *software* BD Accuri CFlow™.

O citômetro Attune NxT® Acoustic Focusing (Life Technologies, Eugene, Oregon USA) é equipado com o laser de 50 mW, comprimento de onda 488 nm (azul) e o laser de 100mW, de 637 nm (vermelho). A tecnologia Acoustic permite maiores velocidades de fluxo, a qual foi em média de 150 mL/min. A intensidade de fluorescência foi coletada nos canais BL1 e BL3, nos comprimentos de onda de 440 nm e 400 nm, respectivamente. Também foi utilizado o *threshold* de 500, no canal de fluorescência verde (BL1) (Hammes and Egli, 2005, 2010; SLMB, 2012). Os dados foram processados com o *software* Invitrogen Attune NxT™.

Em ambos os equipamentos, a seleção de sinais de bactérias foi realizada por meio de gráficos de densidade, sendo no eixo X a fluorescência no verde (FL1/ BL1) e no eixo Y a fluorescência no vermelho (FL3/ BL3), conforme ilustrado na Figura 4.9. O traçado vermelho (*gate*) foi definido para o estudo de grupo de bactérias, conforme o método descrito em PREST *et al.* (2013).

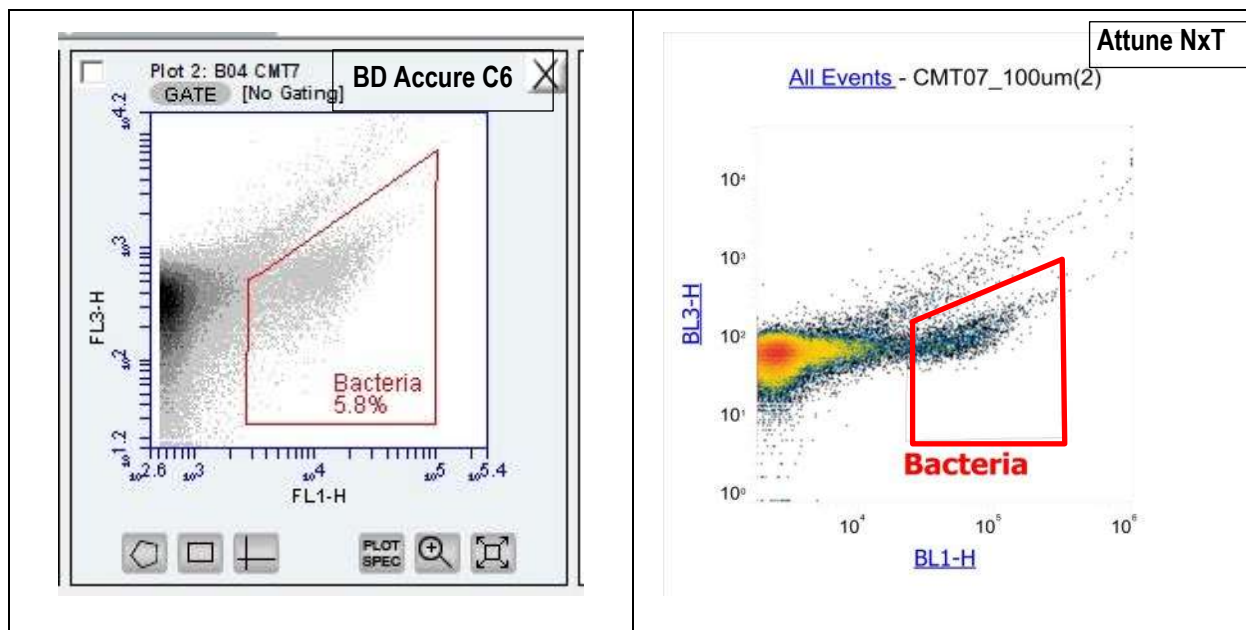


Figura 4.9 – Gráfico de densidade de fluorescência verde (FL1/BL1) versus vermelho (FL3/BL3), que exemplifica a região com seleção de bactérias em amostras de água de poço (com *gate* fixo - traçado vermelho). Comparação dos gráficos gerados no equipamento BD Accure C6 e Attune NxT.

Os dados dentro do traçado para estudo de bactérias (*gate*) foram posteriormente visualizados em um histograma de fluorescência no canal verde (FL1/ BL1) para posterior análise e quantificação, como indicado na Figura 4.10. As porcentagens do conteúdo de ácidos nucleicos nas bactérias (LNA e HNA) indicam a distribuição geral da comunidade bacteriana para esses dois clusters. Os resultados são expressos em células/mL e convertidos a células/L.

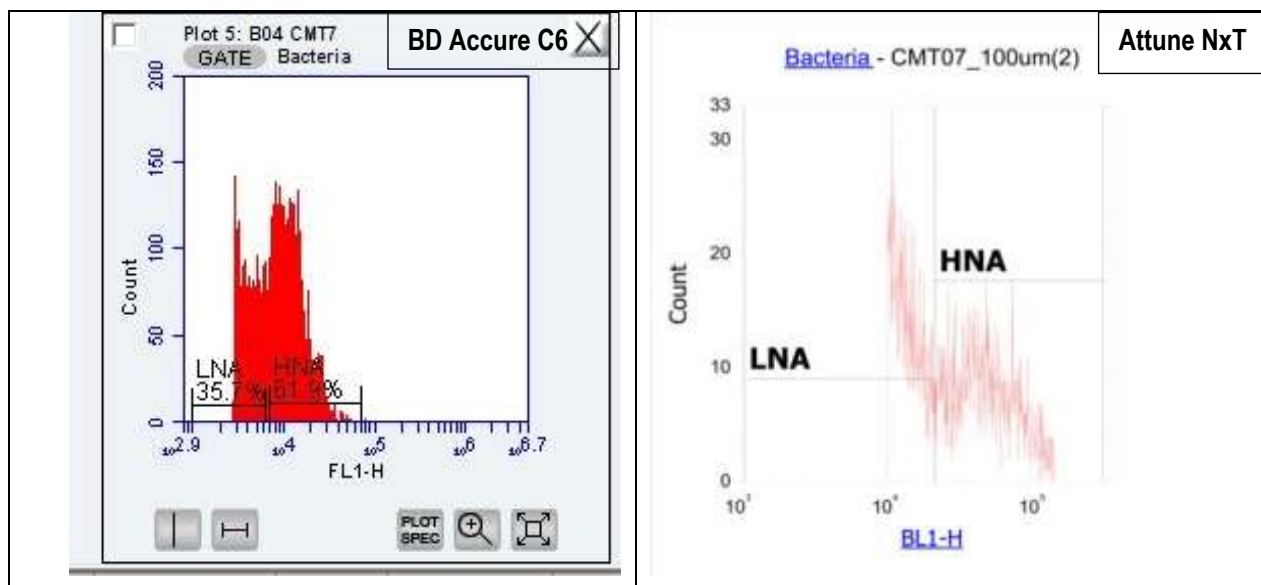


Figura 4.10 – Seleção de bactérias (LNA e HNA) no histograma de fluorescência em verde (FL1/ BL1) com dados selecionados do *gate*.

4.2.4 Estudos microbiológicos complementares

Entre as atividades executadas para a avaliação da presença de microrganismos nas amostras de água subterrânea, está aplicação de metodologias para extração de material genético para ensaios moleculares nos laboratórios da USP.

Os testes foram realizados com amostras de água subterrânea coletadas na área de estudo e em poços de monitoramento instalados na raia da USP, na Cidade Universitária. Foi utilizado o protocolo “R” de extração de 16S rRNA, desenvolvido no âmbito do doutorado de NAMMOURA NETO (2016), sob orientação do Prof. Dr. René P. Schneider, que apresentou-se eficaz na extração em amostras ambientais complexas e meios de cultura com bactérias redutoras de ferro. Este método envolve a extração do RNA ribossômico das amostras, molécula que permite identificar a efetiva atividade do gene de interesse e não apenas sua presença (Nammoura Neto, 2016).

A vantagem desta técnica sobre os procedimentos convencionais, baseados na extração de DNA, era a sua seletividade para os microrganismos metabolicamente ativos na amostra. Devido à baixa biomassa em água subterrânea, foram realizados testes para concentrar microrganismos por filtração de volume razoável de água.

A avaliação da extração ocorre em géis de agarose com alíquotas de amostras de ácidos nucleicos, após a aplicação de protocolo de extração, sendo em seguida foto documentados sob luz ultravioleta e analisados pelo programa *Scientific Images Systems*. As quantificações do produto de extração foram realizadas com o espectrofotômetro DeNovix® DS11. A qualidade da extração é realizada por meio de gel de agarose e absorbância. Proteínas possuem maior absorbância em 280 nm, do que os ácidos nucleicos, assim, o valor da razão de absorbância A_{260}/A_{280} de uma amostra é indicadora de contaminação por proteína (Reddy *et al.*, 2007).

A razão de absorbâncias na faixa A_{260}/A_{230} , é mais sensível como indicadora de contaminação, visto que, a absorbância máxima de ácidos nucleicos ocorre em 208 nm e 260 nm e mínima em 234 nm. Como o pico de 208 nm não é específico, caso haja alta absorbância em 208 nm e também em 234 nm há sinal de contaminação no material extraído. A razão A_{260}/A_{270} é indicadora de contaminação de fenóis, que possuem alta absorbância em 270 nm (Reddy *et al.*, 2007). De forma geral, valores de razões de A_{260}/A_{280} acima de 1,8 e A_{260}/A_{230} acima de 1,7 indicam boa qualidade da extração.

O fluxograma da Figura 4.11 ilustra as etapas previstas para os ensaios com amostras de água subterrânea e dos microcosmos. Entretanto, apenas os passos destacados em azul foram realizados, uma vez que não foi possível a extração de amostras de boa qualidade nos testes realizados, inviabilizando o sequenciamento de DNA e RNA das amostras de água subterrânea a partir dos protocolos utilizados.

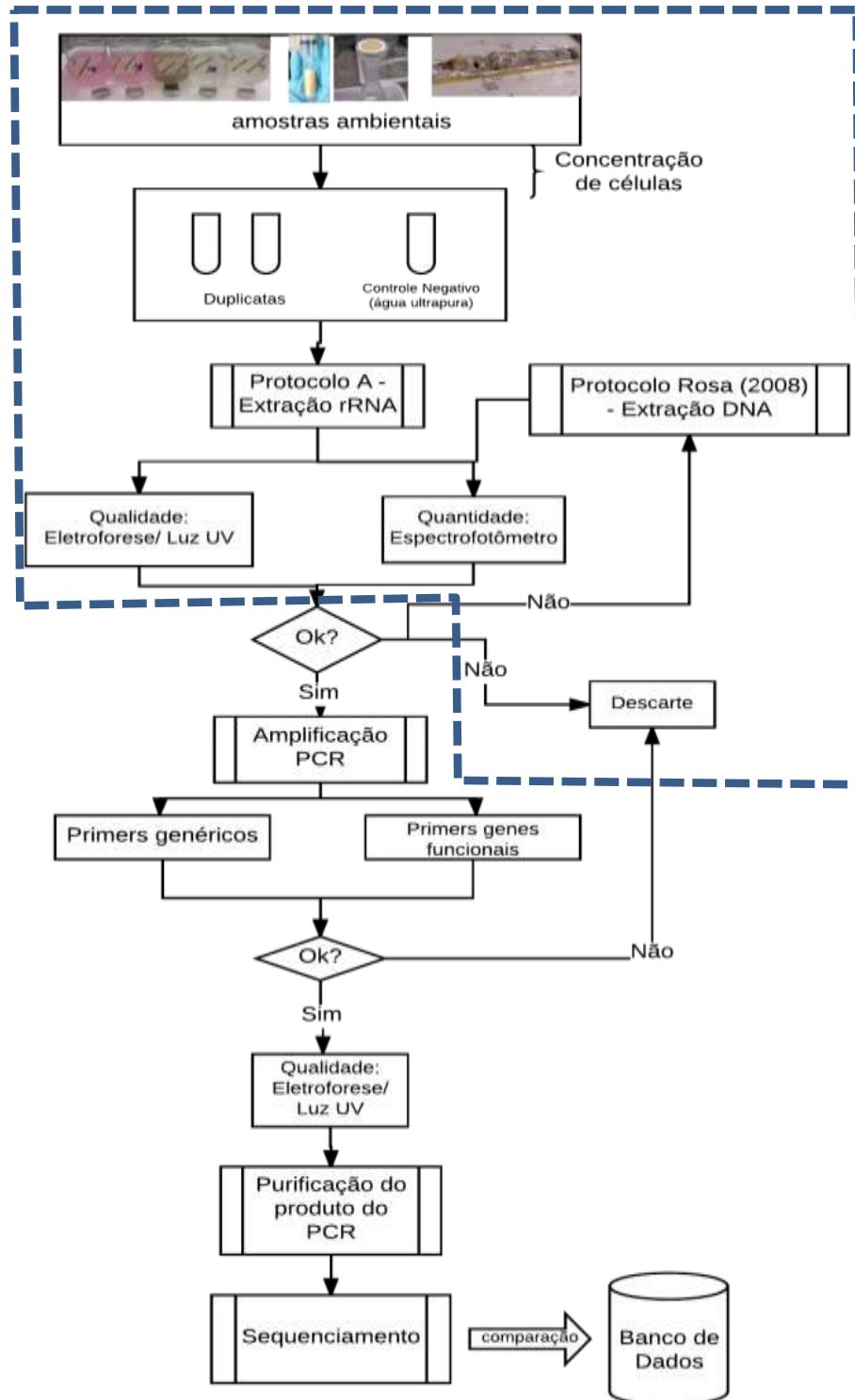


Figura 4.11 – Fluxograma esquemático da análise de ácidos nucleicos. Tracejado em azul indica as etapas realizadas em amostras de água subterrânea.

4.3 Ensaio de bancada - degradação de etenos clorados em microcosmos

Os critérios para seleção da profundidade de coleta de amostra de água para montagem do experimento foram:

- representatividade hidrogeoquímica, para refletir também as características do aquífero na maioria dos pontos avaliados, de forma que os resultados possam ser extrapolados para esses horizontes;
- contaminações de etenos clorados acima dos padrões ambientais em vigor (CETESB, 2016b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), bem como presença de produtos de degradação, tais como cloreto de vinila e 1,2-dicloroetano, e concentrações totais de VOC acima de 100 µg/L, devido à maior probabilidade da presença de bactérias halorespiradoras (Lebrón *et al.*, 2011) nesse cenário;
- seção filtrante em zona de alteração, ou seja, na porção do aquífero no manto de intemperismo.

Após a avaliação dos resultados da primeira campanha de amostragem (item 5.1), foi selecionado o poço PM-11B, para obtenção da água para a montagem dos microcosmos. Este possui seção filtrante entre 13,25 m e 14,25 m, em uma camada de argila arenosa rica em mica, referente à alteração de micaxisto, ou seja, na base do manto de intemperismo, onde não houve avanço com método de perfuração (impenetrável ao trado mecanizado).

A rocha alterada utilizada no microcosmo foi segregada de um dos testemunhos da sondagem MP-01A, realizada na área de estudo próxima ao MP-01, em novembro de 2015, como parte de projetos de pesquisa do CEPAS (Bertolo, 2017; Lojkasek-Lima, 2016). A amostra de rocha foi obtida na profundidade de transição entre a rocha alterada e a rocha consolidada (15 a 16 m), onde há porosidade granular e de fraturas, o que confere alta complexidade nas relações de partição dos contaminantes alvo (etenos clorados) e cujo potencial de biodegradação envolve fatores ambientais associados a esses dois tipos de porosidade.

Os teores de carbono na rocha alterada utilizada no microcosmo foram medidos no equipamento TOC-L Shimadzu modelo 5000A. Para a análise de sólidos foi utilizado o

módulo SSM-5000A da Shimadzu, com gás oxigênio de alta pureza, pressão de 200 kpa e vazão de 0,6 L/min. As amostras foram pulverizadas em cadinho e pesadas em duas alíquotas, para medição de carbono total e carbono inorgânico, com adição de ácido fosfórico. O funcionamento do equipamento está detalhado no APÊNDICE A. Para comparação, foram analisadas também amostras de bentonita revestida Pel-Plug®, utilizada na instalação do poço CMT, e de bentonita *pellet* tradicional, sem revestimento, utilizada frequentemente em poços convencionais.

Os microcosmos foram montados para mimetizar da maneira mais próxima possível as condições ambientais originais, principalmente com respeito à disponibilidade de oxigênio (anaerobiose ou microaerofilia) seguindo protocolos descritos na literatura (Fennell *et al.*, 2001; Löffler *et al.*, 2005; Druschel e Kinner, 2013; Maymó-Gatell *et al.*, 1997) e utilizados no laboratório Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GenBio), da Poli Química, USP (Schneider e Oliveira, 2013).

Foram utilizados frascos de 100 mL de volume nominal (frasco penicilina), previamente autoclavados. Em cada frasco foi adicionado aproximadamente 50 g de rocha alterada, com cuidado para evitar sua desagregação completa e a ressuspensão de partículas durante a adição de água da área de estudo e/ou água ultrapura, a fim de evitar transformar o material em “lama”. Os frascos foram purgados com gás nitrogênio e selados com septo de butila. Os frascos com os fragmentos de rocha da sondagem MP-01A foram autoclavados a 121°C, por 30 minutos. Após resfriamento os microcosmos foram selados com lacre de alumínio e pesados em balança de precisão, envoltos em papel alumínio e a tampa com parafilme.

Em novembro de 2016, os microcosmos foram levados a campo para adição de amostra de água subterrânea. A coleta foi realizada com auxílio de uma bomba de bexiga SamplePro de 1,75”, com bexiga descartável modelo QED38360, acoplada a tubo de 0,25” (¼) com uma seringa de 1 mL. Nos frascos foram adicionadas, em média, 99 mL de água para minimizar a presença de *headspace* (espaço com ar no interior do frasco) no início do experimento.

O APÊNDICE D apresenta as fotos de preparação dos microcosmos e coleta em campo.

Os microcosmos controle (A) foram preparados em laboratório. Na câmara de fluxo foi adicionada água ultrapura nos frascos destinados ao controle negativo (microcosmo A), para comprovação da ausência de adição de massa de contaminante no sistema a

partir dos fragmentos de rocha da sondagem MP-01A, que poderiam eventualmente particionar para a água. Ao longo do experimento espera-se que não sejam identificados etenos clorados em alíquotas do microcosmo A.

Após a montagem dos microcosmos foi adicionada alíquota de resazurina 0,1% (20 µL), em laboratório, como indicador de óxido-redução e por não ser tóxica em baixas concentrações à maioria dos microrganismos. A resazurina é um corante azul que, após a remoção de oxigênio e aquecimento, sofre uma reação irreversível para resofurina, que é rosa. Após esse tratamento, é possível acompanhar as condições redox nos microcosmos, pois quando o meio apresenta potencial redox (Eh) abaixo de -110 mV a solução se torna incolor. As formas reduzidas da resazurina são foto-oxidadas e produzem intermediários tóxicos, não sendo recomendável em simulação de ambientes fototróficos (Reddy *et al.*, 2007), entretanto os frascos foram mantidos juntos e no escuro, representando as condições ambientais originais.

Nos frascos para controle abiótico (microcosmo C) foi adicionado 1 mL de azida sódica, para inibição da atividade biológica (Fogel *et al.*, 1986; Major *et al.*, 2002). A azida sódica age como inibidor metabólico, com interferência conhecida no citocromo c da cadeia respiratória (Krzmarzick *et al.*, 2012).

Para os ensaios de degradação foram montadas três réplicas para cada cenário, dos quais eram extraídas alíquotas para análises de VOC no laboratório Analytical Technology:

- microcosmos para controle negativo (A1, A2 e A3)
- microcosmos para avaliação da degradação natural (B1, B2 e B3)
- microcosmos com azida sódica como inibidor biológico (C1, C2 e C3)

Foram montados microcosmos adicionais semelhantes ao cenário B (D1, D2 e D3) para testes microbiológicos destrutivos, discutidos nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

A extração de alíquotas e preparo dos *vials* para análises de VOC foi realizada no laboratório Semi-Industrial, onde foram mantidos os microcosmos para o ensaio de degradação. Conforme dados fornecidos pela Analytical Technology, foi utilizado o GC/MS da marca Thermo FOCUS GC, com coluna capilar DB-624, 60 m x 0,32 mm x 1,80 µm e injeção do tipo Split de razão 10:1; temperatura do injetor de 200°C e temperatura da linha de Transferência de 250°C. O espectrômetro de massas é do tipo quádrupolo – modelo ISQ Thermo. As condições da corrida do FOCUS GC é

temperatura inicial de 40°C; tempo inicial de 2,00 min e rampa 1:10°C/min; temperatura final 1:100°C e *Holding Time* 1:1 min; Rampa 2:20°C/min; Temperatura final 2:240°C; *Holding Time* final: 4,0 min; Vazão do gás de arraste (hélio) de 1,5 mL/min; Condições do Espectrômetro de Massas: fonte de íons: 200°C; *scan mode*: *Full Scan*; parâmetros para método *Full Scan* (VOC): Mass range 35-400 (ANALYTICAL TECHNOLOGY, 2017).

Para evitar eventual difusão de gases por meio do septo, os frascos dos microcosmos foram mantidos na horizontal, para que o septo permanecesse em contato com o líquido. Após a montagem dos microcosmos, estes foram incubados no escuro por uma semana e mantidos em temperatura ambiente antes da primeira extração, a qual ocorreu em triplicata para cada cenário avaliado (B1, B2 e B3 e C1, C2 e C3) e uma amostrado do controle negativo (microcosmo A), o qual se manteve sem concentrações de VOC durante o experimento. Os volumes retirados dos microcosmos variaram de 0,2 mL a 5 mL, no decorrer do experimento, que teve duração de 245 dias (item 4.3.1).

Ao fim do experimento os microcosmos foram desmontados, para análises de alcalinidade, nitrato, amônio, ferro e manganês (filtrado e não filtrado) no líquido remanescente, uma vez que para esses ensaios foi necessário maior volume de água, inviabilizando a manutenção de mínimo *headspace* nos frascos.

Para avaliação complementar da presença de bactérias nos microcosmos B e C, em maio de 2017 foram montados microcosmos com meio complexo, de extrato de levedura e alíquotas dos microcosmos B e C. Estes microcosmos foram montados em frascos de penicilina de 50 ml, com adição de 30 mL de extrato de levedura com concentração final de 1g/L. Um grupo de sete frascos foi fechado com septo de butila, em atmosfera ambiente, e outro grupo de sete frascos foi purgado com gás nitrogênio, para manter uma atmosfera microaerofílica e/ou anaeróbia, sendo fechados com septo de butila e lacre de alumínio em seguida. Ambos os grupos foram autoclavados a 121°C por 30 minutos.

Foram mantidos um controle estéril aeróbio (AC) e um anaeróbio (AnC). Na câmara de fluxo foram adicionadas alíquotas de 50 µL de cada microcosmo biótico (B1, B2, B3) e com inibidor metabólico (C1, C2 e C3) tanto nos frascos de meio complexo, onde o crescimento de eventuais bactérias seria mais rápido, quanto nos frascos de meio

complexo anaeróbio, mais adequado para refletir as condições de incubação originais. Os frascos foram mantidos no escuro, em temperatura ambiente.

4.3.1 Extração de VOC

A análise de VOC consistiu na extração de alíquotas de água dos microcosmos (entre 0,2 e 5 mL), diluídas em água ultrapura para obtenção de volume total de 10 mL no *vial* para análise. As amostras foram diluídas devido ao volume restrito de água dentro dos microcosmos e a necessidade de manter o mínimo *headspace* nos frascos durante o experimento. A alíquota inicial foi de 2 mL, mas as altas concentrações de PCE na amostra de origem (poço PM-11B) resultaram em valores acima do último ponto da curva de calibração do laboratório (1000 µg/L), não sendo possível quantificar todos os etenos clorados. Assim, na semana seguinte a alíquota inicial foi reduzida a 0,2 mL, com aumento progressivo ao longo do experimento e de forma a manter as concentrações máximas de etenos clorados dentro da curva de quantificação do método analítico.

O preparo consistiu na diluição de alíquotas de amostra em *vials* com água ultrapura acidificada com ácido clorídrico (2 gotas), seguida de adição de 5 µL de padrão de controle analítico (interno e *surrogate*), com microseringa de 10 µL, e imediatamente crimpados com lacre magnético com septo de teflon, totalizando volume de 10 mL em cada *vial*. As alíquotas foram extraídas dos microcosmos com seringas descartáveis de 0,5 mL e 1,0 mL, previamente purgadas com gás nitrogênio, para evitar a entrada de oxigênio da atmosfera ambiente nos frascos. O gás nitrogênio também foi utilizado para compensação da pressão interna, durante a retirada das alíquotas de água dos frascos.

O padrão de controle analítico (interno e *surrogate*), *vials* de *headspace* de borossilicato de 20 mL, septos de PTFE/silicone (teflon) e lacres de alumínio magnéticos bimetálico de 20 mm foram fornecidos pelo laboratório Analytical Technology.

Os *vials* foram mantidos sob refrigeração e imediatamente levados ao laboratório Analytical Technology, para a realização das análises de VOC varredura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a avaliação dos resultados das atividades realizadas em campo, nos sistemas multiníveis e nos poços convencionais, foram selecionadas os pontos para os estudos realizados em laboratório, conforme descrito a seguir.

5.1 Concentrações químicas e parâmetros físico-químicos nas amostras de água subterrânea

Os perfis construtivos contínuos dos sistemas multiníveis em alta resolução CMT e Westbay®, instalados no primeiro semestre de 2016, estão ilustrados no APÊNDICE E, juntamente com a descrição da litologia (Pino, 2015; Lojkasek-Lima, 2018).

Durante a etapa de purga do sistema multinível CMT a medição parâmetros físico-químicos e a turbidez indicaram anomalias na qualidade da água subterrânea, com destaque para os altos níveis de condutividade elétrica, cujas medidas ficaram entre 1151 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e 3382 $\mu\text{S}/\text{cm}$, valores estes discrepantes do observado historicamente nos poços convencionais da área de estudo. Essas anomalias permaneceram durante as campanhas de amostragem realizadas durante este projeto de pesquisa. Nas etapas de campo, a porta CMT-01 (2,30 m) não apresentou coluna d'água suficiente para amostragem de água, apesar das variações sazonais no nível do aquífero freático. Para avaliação dessa profundidade foi utilizado o poço convencional PM-11, de 2", que abrange o intervalo acima (seção filtrante entre 1,80 m e 3,80 m de profundidade).

A Figura 5.1 ilustra a distribuição vertical das concentrações obtidas nas amostras do CMT e MP-01, nas coletas realizadas em agosto/setembro de 2016 (1ª campanha). Em cinza estão ilustradas as amostras cujos valores estão abaixo do limite de quantificação. Os resultados analíticos da primeira campanha (APÊNDICE F) indicaram que em todas as profundidades as amostras dos sistemas multiníveis CMT e MP-01 apresentaram concentrações de VOC total acima de 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, ou seja, acima do limite em que o desenvolvimento de bactérias halorespiradoras é estimulado.

Na Figura 5.2 estão ilustrados os resultados de etenos clorados nas campanhas realizadas para a montagem de microcosmos (novembro /dezembro de 2016) e para coleta de amostras para análises moleculares (março/abril de 2017), cujos valores VOC total mantiveram-se acima de 100^o $\mu\text{g}/\text{L}$.

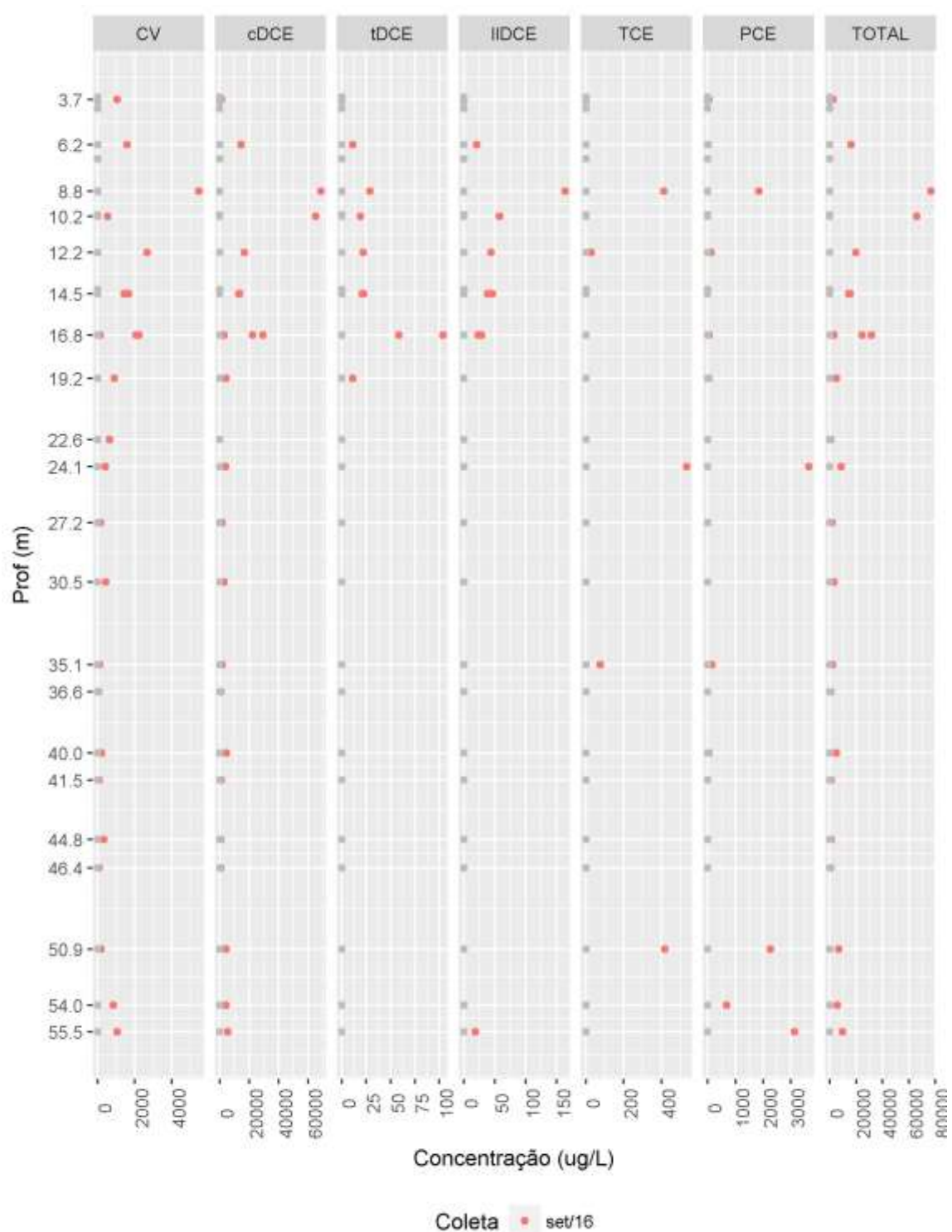


Figura 5.1 – Perfil vertical de concentrações de SQL a partir de amostras dos sistemas multiníveis de alta resolução CMT e MP-01 (µg/L).

Varição das concentrações de etenos clorados ao longo do perfil vertical nos sistemas multiníveis CMT e Westbay®, obtidas na primeira campanha de monitoramento analítico (vermelho). Amostras com valores abaixo do limite de quantificação do método estão representadas em cinza. CV – cloreto de vinila, cDCE – cis-1,2-Dicloroeteno, t-DCE – trans-1,2-Dicloroeteno, IIDCE – 1,1-Dicloroeteno, TCE – tricloroeteno, PCE – tetracloroeteno.

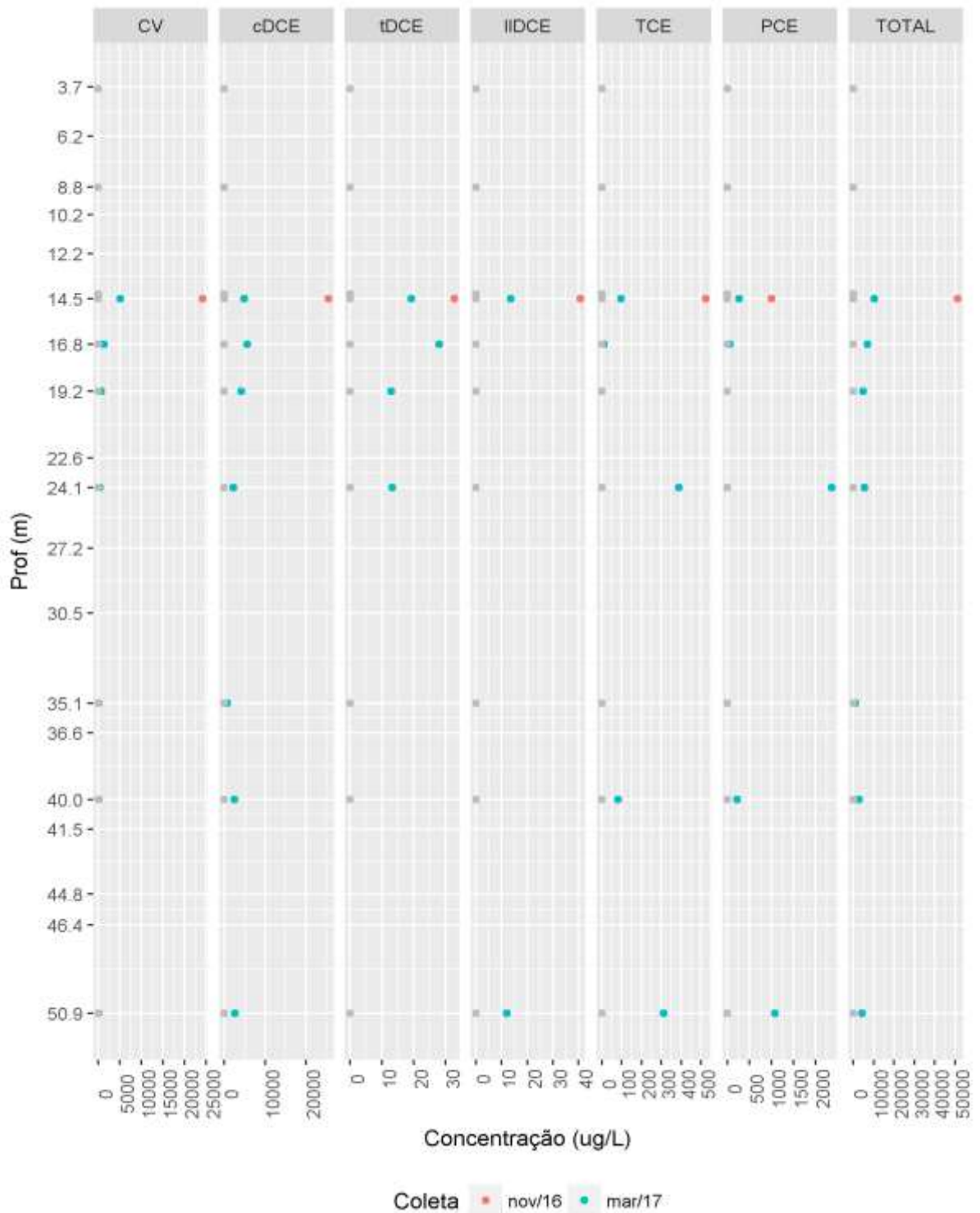


Figura 5.2 – Perfil vertical de concentrações de SQL a partir de amostras dos sistemas multiníveis de alta resolução CMT e MP-01 (µg/L).

Varição das concentrações de etenos clorados ao longo do perfil vertical nos sistemas multiníveis CMT e Westbay®, obtidas na coleta de amostra para montagem do microcosmo (vermelho) e na campanha para análises moleculares (verde). Amostras com valores abaixo do limite de quantificação do método estão representadas em cinza. CV – cloreto de vinila, cDCE – cis-1,2-Dicloroeteno, t-DCE – trans-1,2-Dicloroeteno, IIDCE – 1,1-Dicloroeteno, TCE – tricloroeteno, PCE – tetracloroeteno. Círculos cinza indicam resultado analítico abaixo do limite de quantificação laboratorial.

Na Figura 5.3 estão representados apenas os poços convencionais PM-11, PM-11A, PM-11B e as portas do CMT. Nos poços convencionais, na primeira campanha a amostra do poço raso (PM-11) não apresentou concentração de VOC quantificáveis e nas demais amostras o resultado de VOC total também manteve-se acima de 100 µg/L. Concentrações de etanos clorados (clorofórmio, 1,1-dicloroetano e 1,1,1-tricloroetano) e o tolueno (APÊNDICE F) foram quantificados apenas nos poços convencionais PM-11A e PM-11B, desta forma o estudo considerou apenas os etenos clorados.

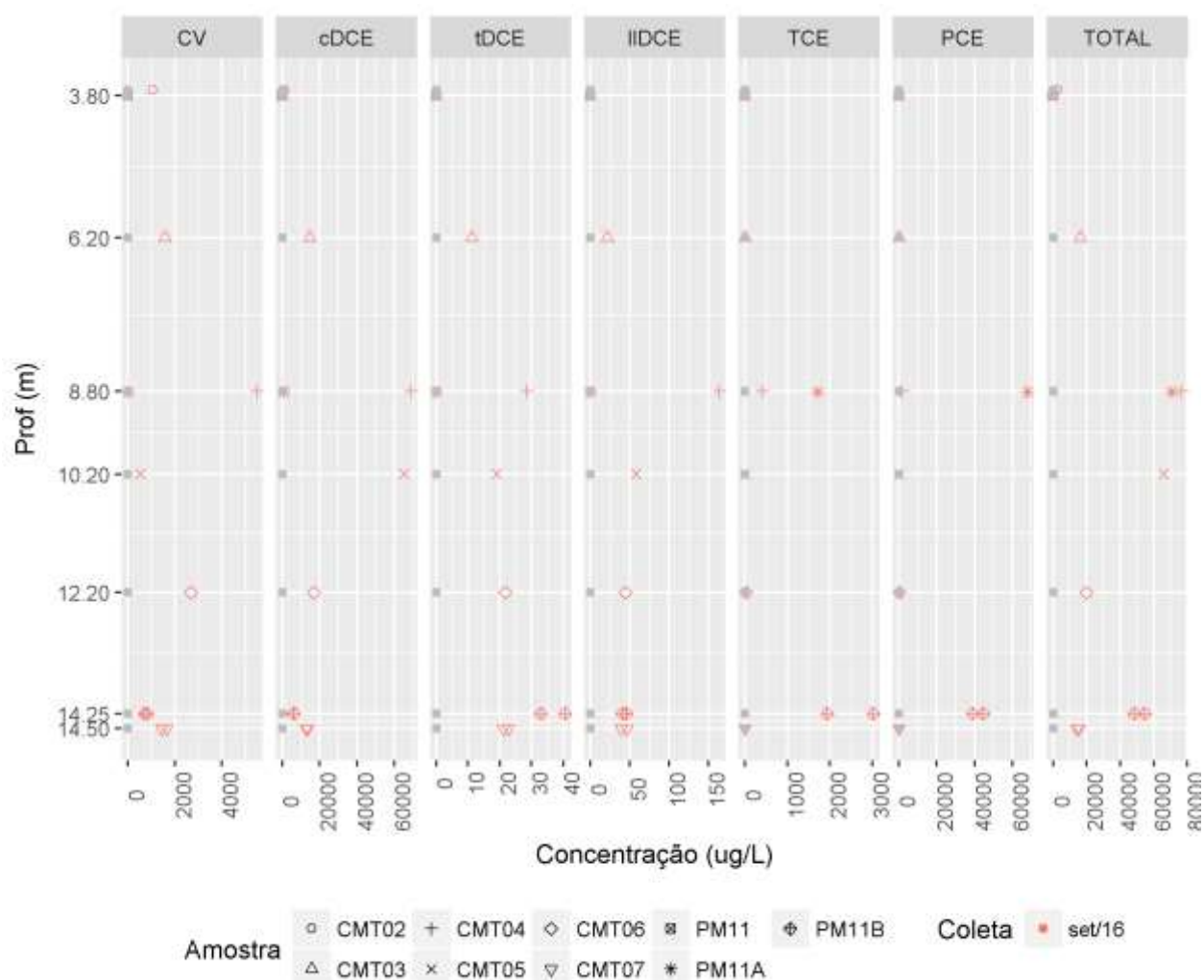


Figura 5.3 – Perfil de concentrações de SQI no poço multinível convencional (PM-11, PM-11A, PM-11B e CMT (µg/L).

Varição das concentrações de etenos clorados ao longo do perfil vertical nos sistemas multiníveis CMT e Westbay®, obtidas na primeira campanha de monitoramento analítico (vermelho). Amostras com valores abaixo do limite de quantificação do método estão representadas em cinza. CV – cloreto de vinila, cDCE – cis-1,2-Dicloroetano, t-DCE – trans-1,2-Dicloroetano, IIDCE – 1,1-Dicloroetano, TCE – tricloroetano, PCE – tetracloroetano.

Nas amostras do multinível CMT não houve quantificação de PCE, entretanto as concentrações dos produtos de sua degradação são mais expressivas do que nas amostras dos poços convencionais, evidenciando que há processos distintos ocorrendo nessa distância de cerca de 2,0 m, entre o CMT e o trio 11.

Os resultados obtidos nas amostras do CMT trouxeram incertezas quanto à sua representatividade para avaliação do cenário de contaminação predominante na área de estudo. Entretanto, a presença de etenos clorados (PCE, cis-DCE e CV) na amostra do CMT-02 (3,7 m de profundidade) corrobora a importância da investigação em alta resolução para detalhamento da caracterização vertical da contaminação em meios heterogêneos e identificação das zonas de contaminação, uma vez que no poço convencional PM-11, que abrange esse intervalo, não foram detectadas concentrações de VOC acima do limite de quantificação do método analítico.

Conforme informações disponíveis em relatórios técnicos, os poços convencionais foram instalados em 2007 e 2009, com seção filtrante de 2,0 m a 1,0 m de comprimento (ANEXO A).

Na avaliação dos parâmetros físico-químicos da água subterrânea, registrados durante a coleta de amostras na primeira campanha, nas amostras dos poços CMT e poços convencionais, situados a menos de 2,0 m de distância, observa-se discrepância nos valores registrados em uma mesma profundidade, como ilustrado na Figura 5.4. Destacam-se os valores de condutividade elétrica, que se mantiveram altos no CMT (entre 1405 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e 4435 $\mu\text{S}/\text{cm}$) e relativamente baixos nos poços convencionais (de 283 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 833 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Também há diferenças no potencial de óxido redução (ORP), cujos valores no CMT foram mais negativos (-115,8 mV a -63,3 mV) em relação ao trio PM-11/PM-11A/PM-11B (-41,4 mV a 76,5 mV). Os valores de pH estiveram dentro da faixa de 6 a 9 (Alvarez and Illman, 2006), a qual é favorável ao desenvolvimento de bactérias com metabolismo para degradar etenos clorados, exceto, nos poços PM-11A e PM-11B, que estavam pouco abaixo de 6 (APÊNDICE F).

A Figura 5.5 apresenta os resultados apenas nos sistemas multiníveis CMT e MP-01. De forma geral, o pH obtido nas amostras estiveram no intervalo de 6 a 7,2, favorável ao crescimento de microrganismos.

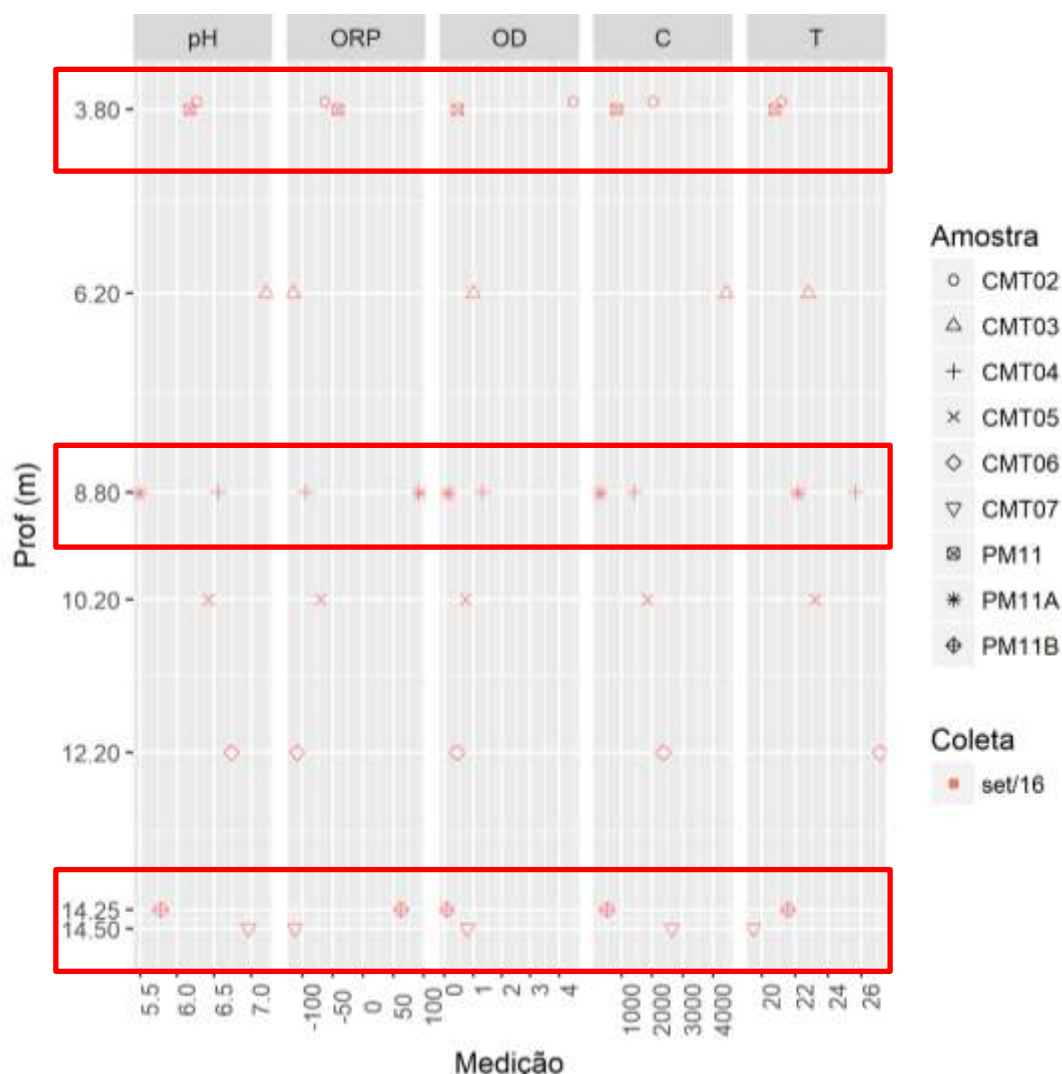


Figura 5.4 – Parâmetros físico-químicos no trio multinível PM-11, PM-11A, PM-11B e CMT. Variação dos parâmetros físico-químicos ao longo do perfil vertical nos sistemas multiníveis na primeira campanha de monitoramento analítico (vermelho). Retângulos em vermelho destacam as profundidades das amostras dos poços convencionais. pH – potencial hidrogeniônico, ORP – potencial de oxido redução, OD – oxigênio dissolvido, CE – condutividade elétrica, T – temperatura.

A temperatura registrada nas amostras permaneceu entre 19°C e 27°C, não sendo fator inibidor ao desenvolvimento microbiano. O oxigênio dissolvido (OD) nos poços convencionais, onde a medição foi feita em sistema fechado (célula de fluxo), a máxima concentração foi de 1,62 mg/L. Nos sistemas multiníveis, devido ao tipo de coleta, a amostra precisou ser manipulada e exposta ao ambiente, sendo registrados valores de até 6,34 mg/L (WB-06, a 41,5 m de profundidade), a 19,1°C. O oxigênio dissolvido é um parâmetro sensível para medição em campo e os resultados devem ser avaliados com cuidado e em conjunto com os demais indicadores de qualidade, uma vez que também ocorre seu consumo com o aumento da profundidade.

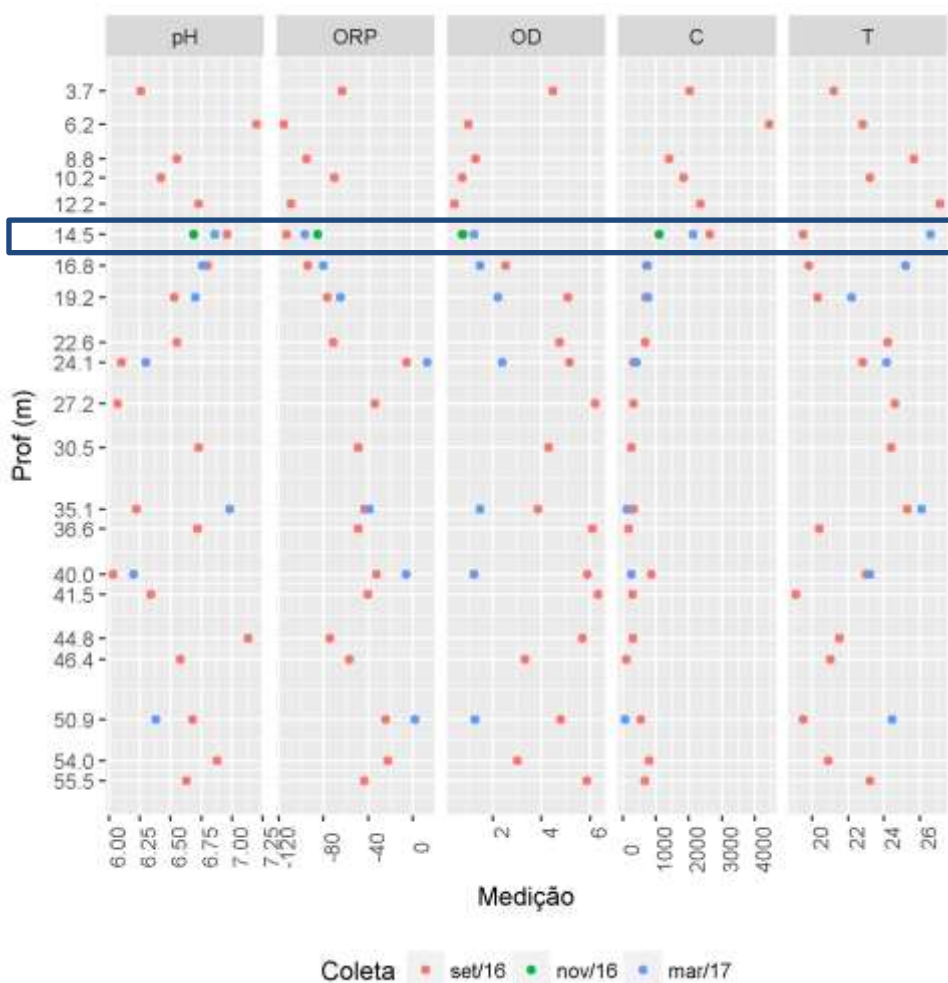


Figura 5.5 – Parâmetros físico-químicos no CMT e MP-01.

Varição dos parâmetros físico-químicos ao longo do perfil vertical nos sistemas multiníveis, nas campanhas de amostragem realizadas na primeira campanha de monitoramento analítico (vermelho), na coleta de amostra para montagem do microcosmo (verde) e na campanha para análises moleculares. Retângulo em azul destaca as variações registradas no CMT-07. pH – potencial hidrogeniônico, ORP – potencial de oxido redução, OD – oxigênio dissolvido, CE – condutividade elétrica, T – temperatura.

Outro parâmetro que indicou anomalias no sistema multinível CMT foram os altos teores de carbono orgânico (TOC/ NPOC) nessas amostras, como representado na Figura 5.6, a qual ilustra também os níveis dos pares redox (nitrito, manganês, ferro, sulfato) analisados na primeira campanha. As diferenças entre o comportamento geoquímico e concentrações dos pares redox nas amostras do CMT, em relação aos poços convencionais, que representam a mesma zona do aquífero, também reforçaram as incertezas quanto à representatividade das amostras do poço CMT. Assim, optou-se em manter as análises moleculares apenas no CMT-07, por ter a seção filtrante na zona de interesse e para comparação com as características do poço convencional mais próximo com seção filtrante no mesmo intervalo (PM-11B).

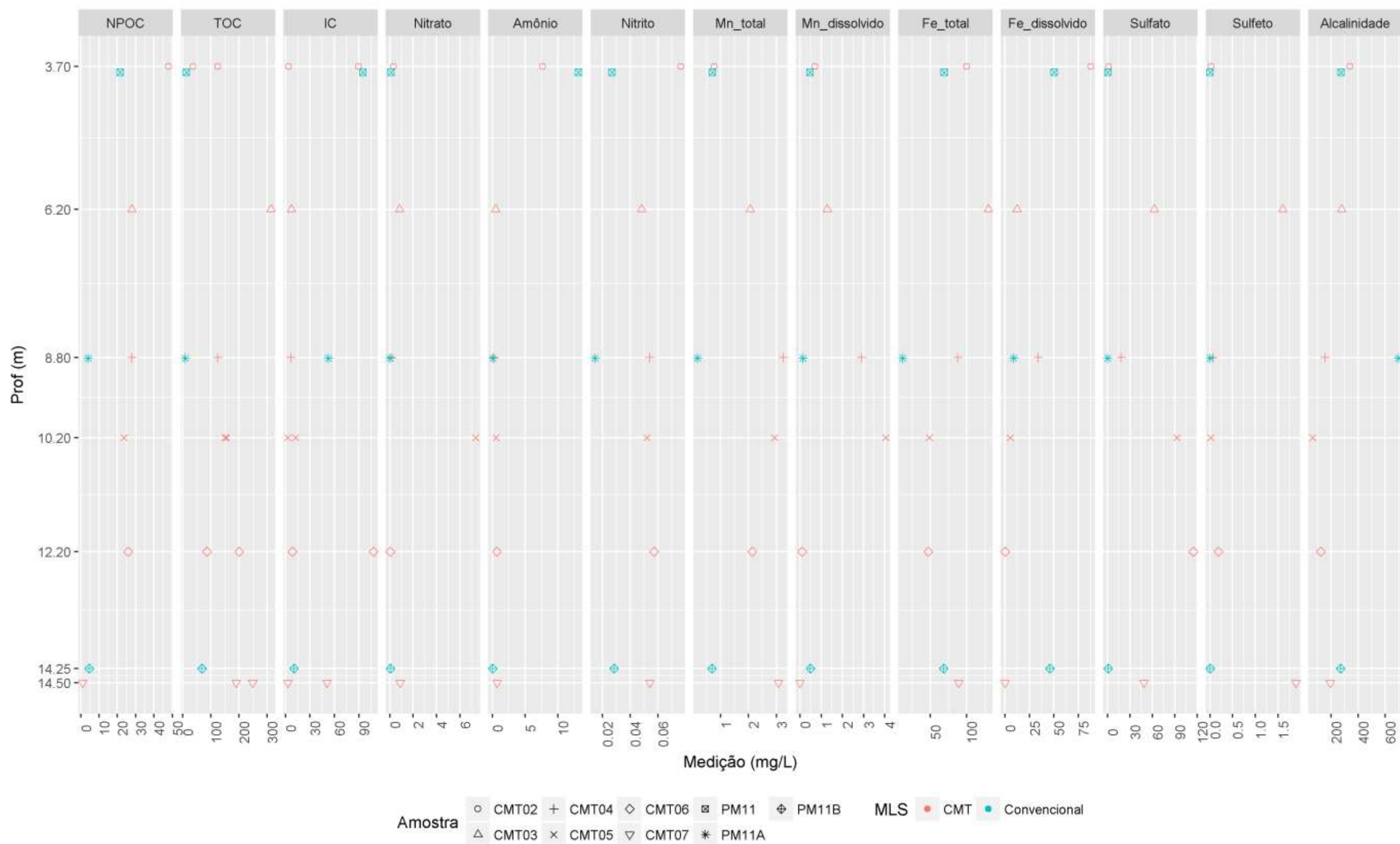


Figura 5.6 – Carbono e pares redox em amostras do aquífero poroso – 1ª campanha.

Concentrações no aquífero poroso no sistema multinível (MLS) CMT e nos poços convencionais. NPOC – carbono não purgável; TOC – carbono orgânico total; IC – carbono inorgânico; Mn – manganês; Fe – ferro.

Nas análises de gases realizadas na primeira campanha foi quantificado metano em amostras do poço PM-11 e PM-11A, indicando atividade microbiana. Nas amostras do CMT-02, CMT-03 e CMT-05 também foram quantificados metano e, apenas no CMT-03, eteno. Entretanto, em função dos demais parâmetros discrepantes discutidos anteriormente, estes não foram utilizados nos ensaios moleculares. Assim, para a avaliação da distribuição vertical de bactérias *Dehalococcoides* (Dhc) e genes funcionais no aquífero poroso foi incluído o conjunto multinível PM-11/PM-11A/PM-11B.

O escopo de amostragem para avaliação do aquífero fraturado incluiu as portas WB-15 e WB-14, mais próximas à zona de transição de porosidade granular e de fratura. Entre as demais portas, foram selecionadas aquelas com presença de PCE, ou seja, WB-12, WB-09, WB-07 e WB-03, uma vez que as condições geoquímicas são similares.

Para avaliar os processos redox predominantes foi utilizada a ferramenta *RedoxAssignment.xls* (Jurgens *et al.*, 2009), desenvolvida a partir da hierarquia energética no consumo de aceptores de elétrons e considerando as concentrações limites (*threshold*) necessárias para a atividade metabólica microbiana (McMahon and Chapelle, 2008). A razão entre ferro dissolvido e sulfetos, apresentados na planilha *RedoxAssignment.xls*, auxilia na distinção entre processos ferro redutores e sulfato redutores.

Apesar das incertezas relacionadas à medição de oxigênio dissolvido em campo, devido à manipulação e exposição da amostra e às interferências no equipamento de medição (multiparâmetros), que são inerentes à metodologia utilizada, esses valores foram considerados na simulação, cujos resultados estão resumidos na Tabela 5.1 e detalhados no APÊNDICE G.

A ferramenta *RedoxAssignment.xls* (Jurgens *et al.*, 2009) indicou que nos poços convencionais os processos eram predominantemente anóxicos, chegando a ser metanogênico na amostra do poço PM-11A.

Nos sistemas multiníveis, foram utilizadas as concentrações de oxigênio dissolvido obtidas durante a coleta, o que indicou mistura de processos óxicos e anóxicos, sendo os principais processos ferro redutores e sulfato redutores. No sistema CMT, as razões de ferro dissolvido e sulfeto indicaram predominância de processos ferro redutores (CMT-02, CMT-04 e CMT-05).

Tabela 5.1 – Processos redox predominantes ao longo da profundidade (*Redox assignment*, JURGENS *et al*, 2009)

| Sistemas Multiníveis CMT e Westbay® - ago/2016 | | | Poços convencionais - ago/2016 | | |
|--|------------------------|---|--------------------------------|------------------------|---|
| Poço | Categoria geral | Processo Redox | Poço | Categoria geral | Processo Redox |
| CMT02 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III) | PM11 | Anóxico | Fe(III)/SO ₄ |
| CMT03 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)-SO ₄ | PM11A | Anóxico | CH ₄ gen |
| CMT04 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III) | | | |
| CMT05 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III) | PM11B | Anóxico | Fe(III)/SO ₄ |
| CMT06 | Mistura(anóxico) | Fe(III)-SO ₄ | | | |
| CMT07 | não determinado | | | | |
| WB16 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -CH ₄ gen | Amostragem - nov/2016 | | |
| WB15 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -CH ₄ gen | PM11B | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ |
| WB14 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | CMT07 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ |
| WB13 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -CH ₄ gen | | | |
| WB12 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB11 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB10 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB09 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB08 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB07 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB06 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB05 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB04 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB03 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB02 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |
| WB01 | Mistura(óxico-anóxico) | O ₂ -Fe(III)/SO ₄ | | | |

As concentrações de inorgânicos nas portas mais rasas do Westbay®, i.e. WB-16, WB-15 e WB-13, indicaram predomínio de processos metanogênicos. Ressalta-se que a simulação indicou também a ocorrência de processos associados à presença de oxigênio dissolvido, entretanto, no sistema Westbay®, a medição não ocorre em sistema fechado, como discutido previamente. Assim, a interpretação do valor é mais qualitativa do que quantitativa, pois não é possível afirmar a disponibilidade desses níveis de oxigênio no meio.

Considerando os dados apresentados neste capítulo, para as análises microbiológicas foram selecionadas as profundidades do MP-01 com presença de concentrações do composto pai (PCE) e que também apresentaram produtos

associados à sua degradação (TCE, DCE e CV). Foram mantidos os poços convencionais PM-11, PM-11A, PM-11B e o CMT-07, para avaliar a componente biológica na degradação do PCE no aquífero porosos e zona de transição com o aquífero fraturado.

Observa-se que as concentrações de etenos clorados na campanha parcial de março de 2017 foram menores, em relação às concentrações quantificadas na primeira campanha, fato este que pode estar associado a efeitos de diluição/recarga, uma vez que as cargas hidráulicas nos sistemas multiníveis elevaram-se entre 0,5 m (CMT-02 ao CMT-05) e 1,7 m (WB-09), em relação a agosto de 2016. Na época de chuvas (março e abril) a condutividade elétrica aumentou nas amostras dos poços no aquífero poroso e nos poços WB-15, WB-14 e WB-12, mas diminuiu nos poços WB-09, WB-07 e WB-03. Já os valores de ORP indicaram condições mais redutoras no aquífero poroso (PM-11, PM-11A e CMT-07) e menos redutoras e em alguns pontos oxidantes, na zona de transição e aquífero fraturado. Embora nessa etapa o monitoramento tenha sido parcial, esses dados podem indicar a influência sazonal no transporte de nutrientes, aceptores e doadores de elétrons na água subterrânea, cuja avaliação requer também o refinamento do modelo conceitual hidrogeológico, o qual está sendo realizado no âmbito de projetos de doutorado em andamento no CEPAS.

5.2 Caracterização Microbiológica - ensaios moleculares e quantificação por citometria de fluxo

A presença de bactérias na água subterrânea foi avaliada com uso de técnicas qualitativa e/ou quantitativa, com destaque para a quantificação de células por citometria de fluxo e ensaios moleculares de abundância de bactérias totais, Dhc e expressão de genes funcionais, por PCR em tempo real (qPCR). Essas análises refletem as condições presentes no momento da coleta, as quais sofrem alterações sazonais em função de mudanças nos fatores hidrogeológicos e nutricionais do meio físico (recarga).

Durante os ensaios utilizando a citometria de fluxo, verificou-se a importância do fixador glutaraldeído no congelamento, pois as análises realizadas em amostras de água subterrânea previamente congeladas sem o fixador não indicaram a presença de células pelo metodologia utilizada em ambos os citômetros utilizados.

Amostras de água subterrânea de nove profundidades distintas foram analisadas por citometria, oriundas dos poços convencionais (trio 11), CMT-07, WB-15, WB-14, WB-09, WB-07 e WB-03. Como indicado na Figura 5.7, a contagem de células obtidas com o Attune NxT apresentou valores até duas ordens de grandeza acima do obtido com o citômetro BD Accuri C6, com valores na ordem de 10^8 células por litro.

Apesar de alto, esse valor está dentro da faixa encontrada em estudos que envolvem o monitoramento da qualidade da água subterrânea para abastecimento, por citometria de fluxo, como de Besmer *et al.* (2016) e Van Nevel *et al.* (2017), que identificaram de 73 a 280 células/ μL , ou seja, na ordem de 10^7 e 10^8 células/L.

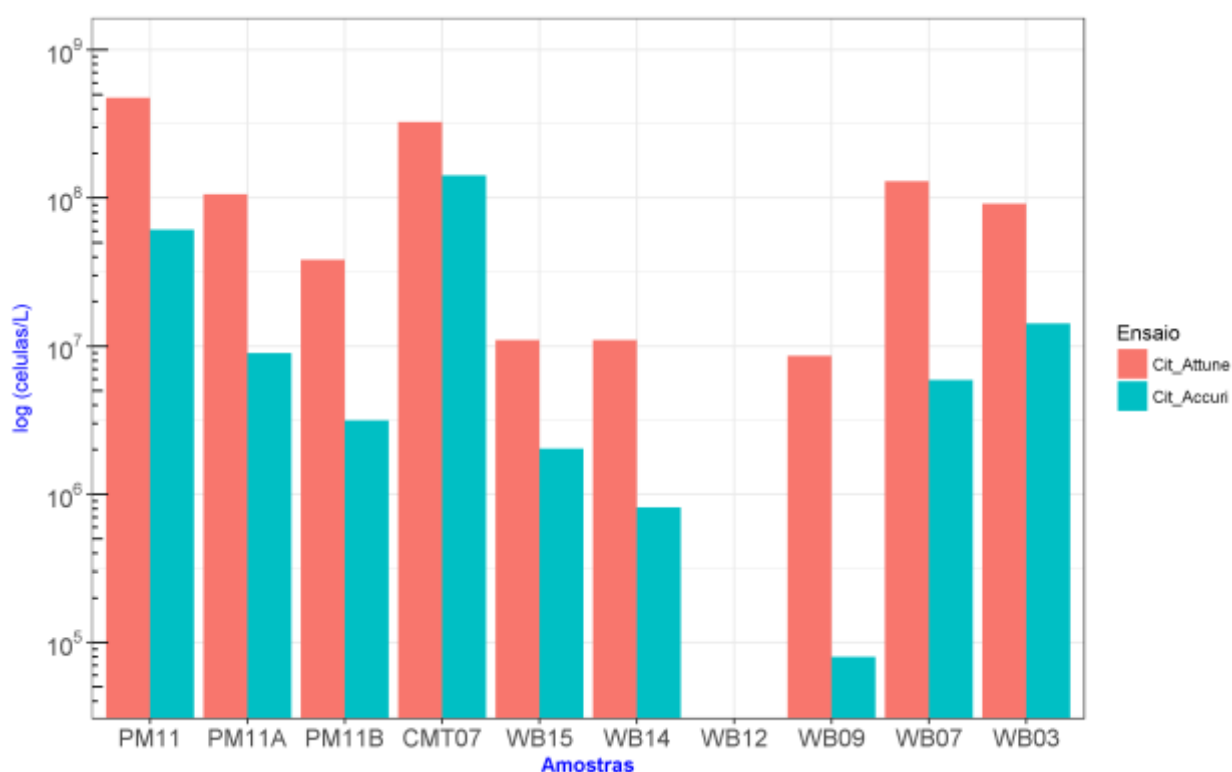


Figura 5.7 – Comparação dos resultados de quantificação de células por citometria de fluxo nos equipamentos Attune e Accuri (IO USP)

Na avaliação da abundância de cópias genômicas de 16S rRNA nas amostras de água subterrânea por qPCR, verifica-se que em todas as amostras foram identificadas bactérias, em menor quantidade nos poços convencionais PM-11A e PM-11B (Figura 5.8). A presença de bactérias permitiu a análise dos demais genes de interesse em todas as amostras enviadas.

Cabe destacar que, embora o gênero *Dehalococcoides* possua apenas uma cópia do gene 16S RNA em seu genoma (Löffler *et al.*, 2005), sabe-se que as bactérias podem ter mais de três cópias do gene 16S RNA por genoma (Větrovsky and Baldrian,

2013). Como a análise GeneTrac® Universal (16SrRNA) da Sirem considera que os microrganismos possuem apenas uma cópia desse gene esses valores não necessariamente refletem o número de bactérias presentes na amostra.

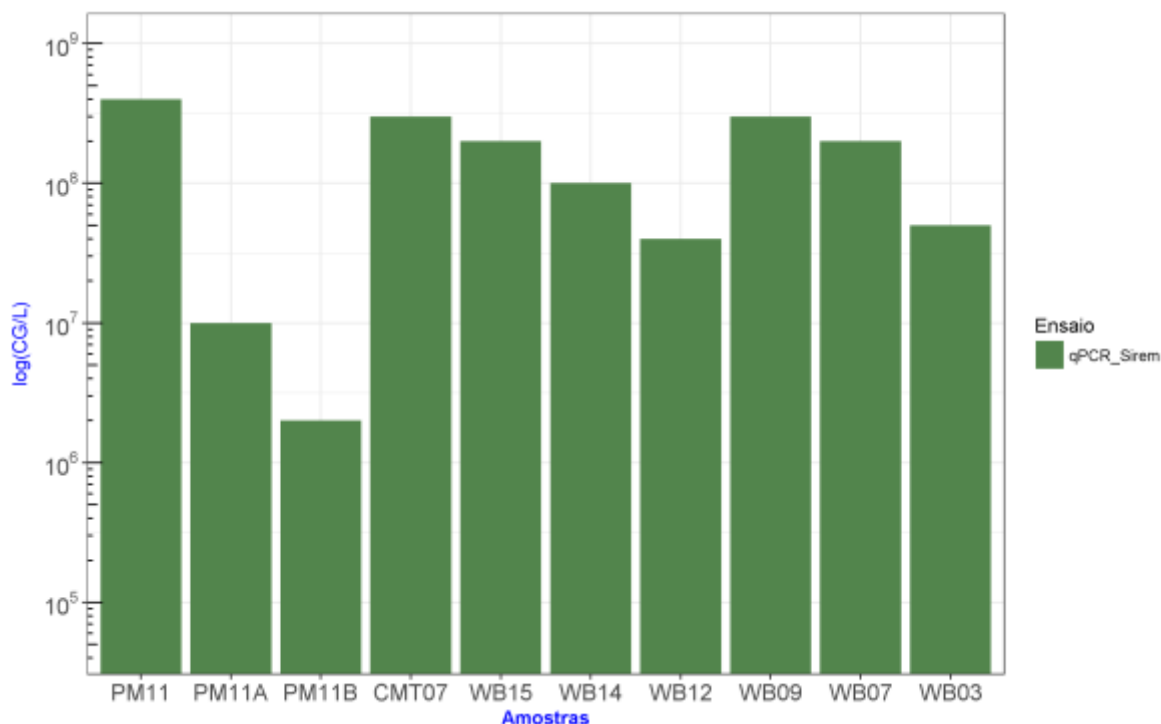


Figura 5.8 – Cópias genômicas do gene 16S rRNA por PCR em tempo real (qPCR) nas amostras de água subterrânea (Sirem)

Os níveis de cópias genômicas do gene 16SrRNA obtidos na análise por qPCR são semelhantes aos do citômetro Attune NxT, com variações em até uma ordem de grandeza. As maiores discrepâncias entre as duas técnicas e equipamentos foram observadas nas amostras do poço PM-11B e porta WB-09.

É importante considerar que pode haver alteração na composição da comunidade microbiana entre a coleta e a análise, tanto em análises de PCR em tempo real quanto por citometria de fluxo. No caso da análise de qPCR, um viés a ser considerado é o tempo do transporte, pois as amostras são mantidas refrigeradas a 4°C e são congeladas para processamento entre 6 a 8 dias após a coleta, na chegada ao laboratório, em Guelph, no Canadá. Ainda assim, os resultados de análises de genes específicos de interesse, como de bactérias Dhc e genes funcionais, fornecem informações relevantes para o entendimento do potencial de biodegradação na área de estudo para as substâncias químicas de interesse.

Na Figura 5.9 estão representadas a quantificação de bactérias por qPCR e de células por citometria de fluxo, ao longo do perfil vertical. Apesar de grandezas distintas, nos três cenários houve o decréscimo na quantidade de células nos poços de monitoramento convencionais com o aumento da profundidade.

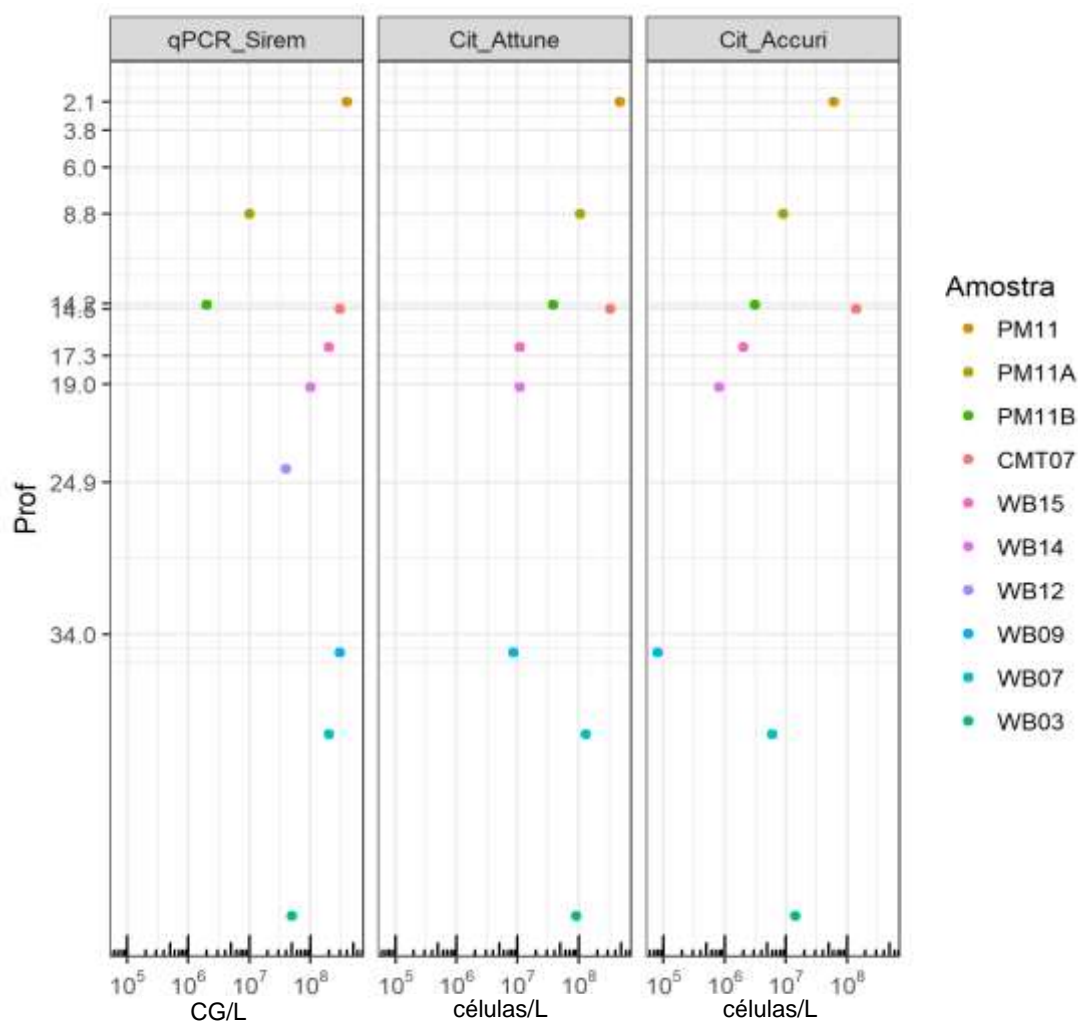


Figura 5.9 – Comparativo da variação de cópias genômicas (CG) e número de células ao longo da profundidade

Nos poços instalados na base do saprólito (PM-11B e CMT-07) observa-se discrepância no número de bactérias, embora os poços estejam a menos de 2,0 m de distância. A contagem registrada no CMT-07 está mais próxima à observada no poço PM-11, o qual possui parte da seção filtrante na transição entre os depósitos aluvionares e o saprólito. Tal fato pode estar associado à maior disponibilidade de carbono orgânico no primeiro, oriundo do revestimento orgânico da bentonita utilizada.

Nas amostras oriundas das portas do poço MP-01 (Westbay System®), na análise de qPCR, o número de cópias genômicas de 16S rRNA de bactéria esteve dentro da faixa de 10^7 a 10^8 cópias/L e houve maior variabilidade na quantificação de células por citometria de fluxo, em especial na análise com o citômetro Attune Nxt (10^6 a 10^8 células/L).

A metodologia utilizada nesta pesquisa, para a citometria de fluxo, está associada à monitoramentos de água de consumo humano no hemisfério norte em tempo real (Hammes e Egli, 2005, 2010; SLMB, 2012; Prest *et al.*, 2013), tendo sido observadas flutuações ao longo das medições mesmo em curto intervalo (15 minutos).

A variação observada entre a citometria e a análise de qPCR sofre influência da escala de amostragem, uma vez que a filtração para análise de qPCR foi em média de 1 L por filtro, para a citometria de fluxo foram utilizadas alíquotas de 1,5 mL. Ainda assim, a quantificação de células por citometria de fluxo mostrou-se uma alternativa viável para uma avaliação inicial da presença de microrganismos em águas subterrânea.

Como a decloração redutiva está associada à presença de bactérias halorespiradoras, como as do gênero *Dehalococcoides* foi realizada a quantificação de espécies desse gênero, como indicado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Análise de genes de Bactéria total e *Dehalococcoides* sp.

| Poço | Concentração do DNA extraído | gene 16S rRNA (Bactéria total) CG/L | Dhc/L (1) CG/L | Dhc / Bactéria |
|--------|------------------------------|-------------------------------------|----------------|----------------|
| PM-11 | 2123 ng/L | 4,00E+08 | 5,00E+05 | 0.04 - 0.1 % |
| PM-11A | 169 ng/L (J) | 1,00E+07 | 1.00E+03 U | NA |
| PM-11B | 67 ng/L (J) | 2,00E+06 | 1.00E+03 U | NA |
| CMT-07 | 1244 ng/L | 3,00E+08 | 1,00E+08 | 16 - 40 % |
| WB-15 | 1332 ng/L | 2,00E+08 | 1,00E+07 | 2 - 5 % |
| WB-14 | 1326 ng/L | 1,00E+08 | 1,00E+07 | 2 - 6 % |
| WB-12 | 801 ng/L | 4,00E+07 | 3,00E+05 | 0.07 - 0.2 % |
| WB-09 | 1616 ng/L | 3,00E+08 | 9,00E+06 | 1 - 3 % |
| WB-07 | 1410 ng/L | 2,00E+08 | 3,00E+04 | 0.005 - 0.01 % |
| WB-03 | 747 ng/L | 5,00E+07 | 8,00E+04 | 0.02 - 0.07 % |

(J) - valor do DNA extraído está entre o limite de detecção e o limite de quantificação, por isso não são analisados genes funcionais (ausência de Dhc)

NA: não analisado.

(1): assumindo que *Dehalococcoides* possuem apenas uma cópia do gene 16S rRNA.

U: limite de quantificação.

CG/L - cópias genômicas por L

Fonte: Sirem (2017).

Nota-se que apenas a presença de bactéria não pode ser considerada como indicador de biodegradação, pois nem todas possuem metabolismo para degradar compostos halogenados, como os etenos clorados. Apesar do número de bactérias totais ter se mantido entre 10^7 e 10^8 cópias genômicas por litro, nas amostras onde foi possível a extração de DNA para análise de Dhc, a presença de bactérias do gênero *Dehalococcoides* variou entre 0,005 % (WB-07) e 40 % (CMT-07) da comunidade microbiana.

Estudos em áreas contaminadas nos Estados Unidos correlacionam formação de eteno em áreas onde as razões entre cópias de genes Dhc e de bactéria total estão acima de 0,05% (Lebrón *et al.*, 2015), resultado esse observado nas amostras dos poços PM-11, CMT-07, WB-15, WB-14, WB-09 e WB-07.

Nas amostras coletadas no aquífero fraturado, observa-se que, independentemente da concentração de bactérias totais, a quantidade de Dhc decresce com a profundidade (Tabela 5.2).

A concentração de Dhc no PM-11 é moderada (10^5 cópias genômicas/L), embora nessa amostra não tenham sido registrados etenos clorados acima do limite de quantificação. A presença de etenos clorados na amostra do CMT-02, no horizonte de abrangência do PM-11, indica que há contaminação nessa profundidade. Também a concentração de metano na amostra do PM-11 (476 mg/L) é coerente com o potencial redutor observado durante a coleta dessa amostra, pois condições metanogênicas favorecem o desenvolvimento de bactérias haloinspiradoras, como a *Dehalococcoides*.

Nos poços PM-11A e PM-11B não foram analisados os genes funcionais, devido à ausência de Dhc acima do limite de quantificação.

A Tabela 5.3 apresenta os resultados das análises de genes funcionais. Nas porções mais profundas, representadas pelas amostras WB-03 (50,9 m) e WB-07 (40 m), instalados no horizonte de gnaiss fino (APÊNDICE E) a presença de Dhc e *vcrA* foi baixa, na ordem de 10^4 cópias genômicas por litro, o que requer incremento nas condições ambientais para que ocorra crescimento da comunidade e a biodegradação ocorra em taxas significativas (SiREM, 2017).

No poço WB-12 (24,1 m) e WB-09 (35,1 m) a concentração de Dhc é moderada, na ordem de 10^5 cópias genômicas/L. Entre as Dhc, de 30% a 40% possuem cópias do gene funcional *vcrA*, que codifica a redutase que pode converter cloreto de vinila a eteno. Entretanto, como discutido previamente, essa análise não permite saber se a

enzima está sendo efetivamente produzida, mas apenas o potencial de produção pelas bactérias presentes.

Tabela 5.3 – Análises 16SrRNA, Dhc e genes funcionais

| Poço | Cópias genômicas por litro (1) | | | |
|--------|--------------------------------|----------|-------------|-------------|
| | Dhc | vcrA | bvcA | tceA |
| PM-11 | 5,00E+05 | 2,00E+05 | 2.00E+03(U) | 2,00E+03 |
| PM-11A | 1.00E+03(U) | NA | NA | NA |
| PM-11B | 1.00E+03(U) | NA | NA | NA |
| CMT-07 | 1,00E+08 | 1,00E+07 | 2,00E+05 | 4,00E+07 |
| WB-15 | 1,00E+07 | 4,00E+06 | 1.00E+03(J) | 2,00E+05 |
| WB-14 | 1,00E+07 | 5,00E+06 | 3.00E+03(U) | 3,00E+04 |
| WB-12 | 3,00E+05 | 1,00E+05 | 3.00E+03(U) | 3.00E+03(U) |
| WB-09 | 9,00E+06 | 4,00E+06 | 3.00E+03(U) | 3.00E+03(U) |
| WB-07 | 3,00E+04 | 1,00E+04 | 3.00E+03(U) | 3.00E+03(U) |
| WB-03 | 8,00E+04 | 2,00E+04 | 3.00E+03(U) | 7,00E+03 |

(J) - valor do DNA extraído está entre o limite de detecção e o limite de quantificação, por isso não são analisados genes funcionais (ausência de NA: não analisado.

(1): assumindo que *Dehalococcoides* possuem apenas uma cópia do gene 16S rRNA.

U: limite de quantificação.

Fonte: Sirem (2017).

Nos poços WB-15 (16,8 m) e WB-14 (19,2 m), as amostras possuíam acima de 10^7 cópias genômicas/L, grandeza já associada a taxas de de cloração significativas (SiREM, 2017; LU *et al.*, 2006). Nesses poços, mais de 40% das bactérias Dhc possuíam o gene funcional vcrA e abaixo de 2% das bactérias possuíam genes funcionais tceA, que por sua vez codificam as redutases para degradação do tricloroetano a cis-dicloroetano e cloreto de vinila, por cometabolismo. Como indicado no laudo emitido pela SiREM, a ausência desse gene funcional não indica inviabilidade no processo de degradação, pois há bactérias de outros gêneros, como a *Dehalobacter* e a *Geobacter*, que possuem o gene pceA, que codifica a redutase que participa na transformação de tetracloroetano a cis-dicloroetano. Dentre os oito pontos com análise de genes funcionais, apenas a amostra do CMT-07 apresentou genes que codificam as três enzimas avaliadas (vcrA, bvcA, tceA), em concentrações que favorecem altas taxas de degradação, ou seja, acima de 10^7 cópias de genes por L de Dhc, vcrA e tceA (SiRem, 2017).

Para avaliar se a ausência de Dhc na amostra do PM-11B (14,25 m) era resultado de substâncias inibidoras dos reagentes dos ensaios moleculares, a SiREM analisou uma duplicata da amostra do poço PM-11B, com e sem spike de bactérias *Dehalococcoides* de concentração conhecida. A recuperação de cópias genômicas de Dhc na amostra do PM-11B não indicou presença de substâncias inibidoras do processo de extração de DNA e/ou dos reagentes da qPCR.

A Figura 5.10 ilustra a comparação entre a quantidade dos genes analisados nas amostras de água subterrânea.

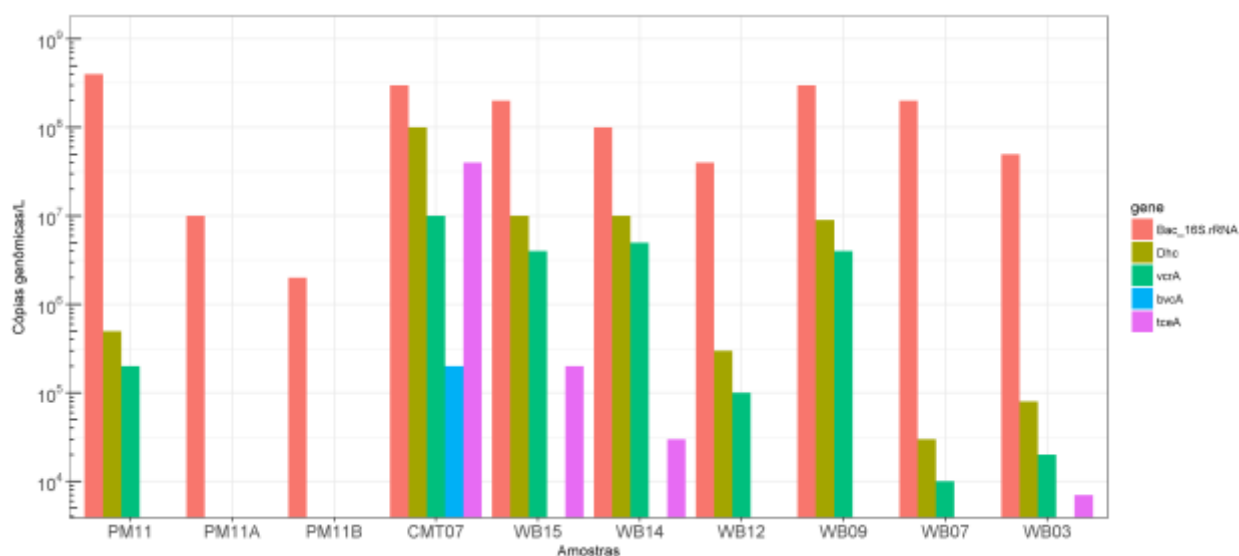
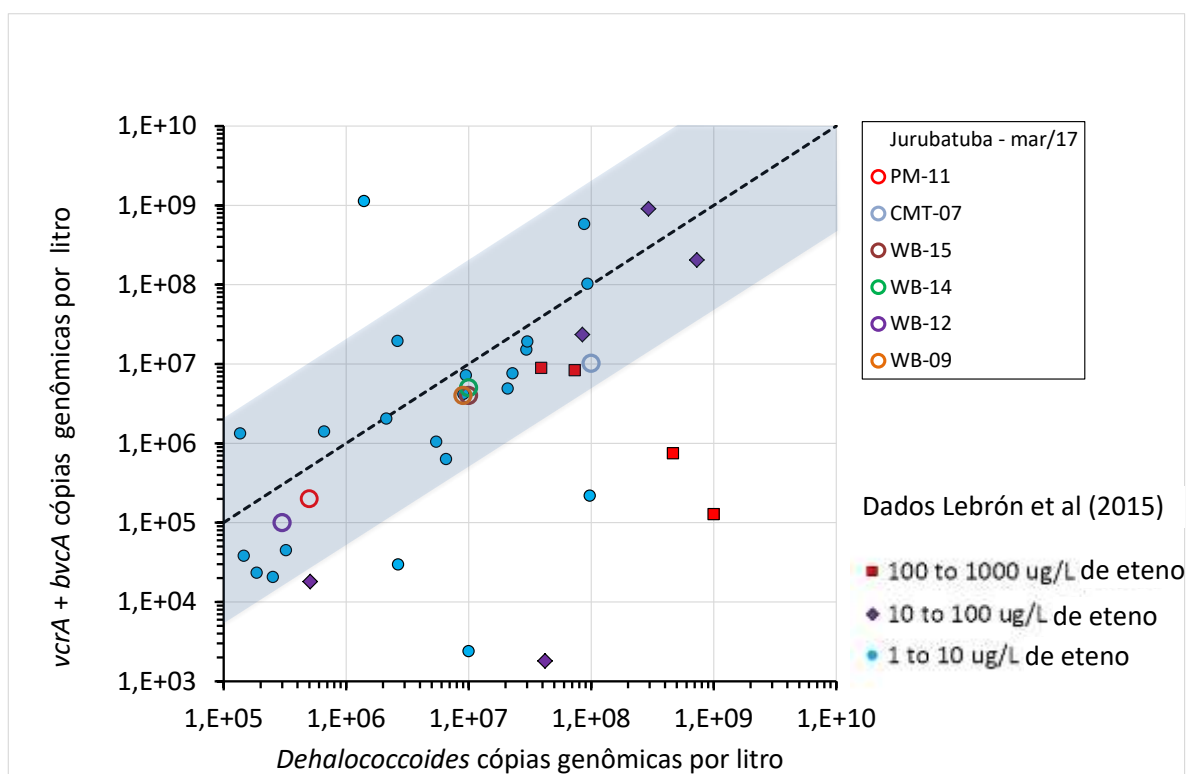


Figura 5.10 – Comparativo dos resultados de qPCR para os genes 16S rRNA, Dhc, vceA, bvcA, tceA em amostras de água subterrânea

Os resultados de Dhc e genes funcionais vcrA e bvcA foram plotados na planilha *Reductase Genes.xlsx* (Figura 5.11), que faz parte da ferramenta BioPIC (Lebrón *et al.*, 2015), para avaliação da biodegradação *in situ*.

O hachurado azul ao longo da linha tracejada (Figura 5.11) representa o intervalo de 5% abaixo e 20% acima da razão entre a soma de cópias dos genes funcionais e cópias de genes Dhc. Valores nessa faixa indicam que há potencial para degradação de cloreto de vinila a eteno, pela ação dos genes funcionais vcrA e bvcA (Lebrón *et al.*, 2015).



Fonte: *Reductase genes.xlsx*, BioPIC (Lebrón *et al.*, 2015).

Figura 5.11 – Relação entre a soma de cópias genômicas de *vcrA+bvcA* e *Dhc* plotados na ferramenta BioPIC, indicam que há potencial para degradação de cloreto de vinila *in-situ*.

Hachurado azul ao longo da linha tracejada indica intervalo em que a presença de genes funcionais *vcrA* e *bvcA* se correlacionam a degradação de cloreto de vinila a eteno *in situ*. Dados de Lebrón *et al* (2015) indicam níveis de etenos associados com a quantidade de *Dhc* e soma de *vcrA+bvcA*.

A linha tracejada indica quantidades iguais de *Dhc* e da soma de genes funcionais *vcrA* e *bvcA*. De acordo com Lebrón *et al.* (2015), os genes funcionais *vcrA* e *bvcA* não ocorrem juntos nas *Dehalococcoides* e, quando a soma das cópias genômicas desses genes está abaixo da quantidade de cópias genômicas de *Dhc*, ou seja, abaixo da linha tracejada, significa que nem todas as *Dehalococcoides* presentes possuem esses genes funcionais, fato esse observado nas amostras coletadas nos poços PM-11, CMT-07, WB-15, WB-14 e WB-09.

Nas campanhas realizadas em agosto/ setembro de 2016 e setembro de 2017, não foram identificadas concentrações de eteno acima do limite de quantificação nas amostras coletadas, o qual é de 60 µg/L. Entretanto, como indicado na Figura 5.11, em estudos de caso de áreas contaminadas nos Estados Unidos, o levantamento de concentrações de etenos que indicam biodegradação predominam na faixa de 1 a 10 µg/L, níveis que ainda não são quantificáveis em laboratórios comerciais no Brasil.

Desta forma, não é possível descartar que ocorra a produção de etenos na área, associada à biodegradação em função da presença dos genes funcionais *vcrA* e *bvcA* na comunidade de *Dehalococcoides*.

A amostra do CMT-07 apresentou as maiores quantidades de bactérias *Dehalococcoides* e a única com a presença de todos os genes funcionais. Apesar de não ser possível afirmar a atividade desses genes, a ausência de PCE e TCE nas amostras desse poço, associada à presença dos produtos de sua degradação, em comparação ao cenário observado no poço PM-11B, indicam que a atividade microbiana foi favorecida. Como já discutido previamente, esse comportamento pode ser atribuído à carga orgânica presente na bentonita *pellet* revestida Pel-Plug®, adicionada durante a instalação do sistema multinível CMT.

Na Tabela 5.4 estão os resultados das análises de carbono orgânico total (TOC), carbono inorgânico (IC) e carbono total (TC) em triplicata, realizadas na bentonita revestida Pel-Plug®, na bentonita *pellet* tradicional e na rocha alterada (micaxisto) utilizada no microcosmo. As amostras de ambas as bentonitas apresentam TOC maiores do que o existente no horizonte de transição, entretanto o uso desse tipo de material é necessário para o selamento adequado da seção filtrante do poço.

Tabela 5.4 – Comparação dos resultados de TOC, IC e TC no substrato do microcosmo com a bentonita revestida e bentonita *pellet* tradicional

| Análise | Amostra | média (mg) | desvio padrão |
|---------|-------------------------------------|------------|---------------|
| TOC | Bentonita <i>pellet</i> tradicional | 2.14 | 0.26 |
| | Bentonita revestida | 10.89 | 2.08 |
| | Rocha alterada | 0.05 | 0.03 |
| IC | Bentonita <i>pellet</i> tradicional | 1.69 | 0.12 |
| | Bentonita revestida | 3.42 | 0.49 |
| | Rocha alterada | 0 | 0 |
| TC | Bentonita <i>pellet</i> tradicional | 3.84 | 0.25 |
| | Bentonita revestida | 14.32 | 1.61 |
| | Rocha alterada | 0.05 | 0.03 |

A presença de bactérias *Dehalococcoides* e genes funcionais, utilizados como biomarcadores, indica que na área existe população microbiana com o arcabouço metabólico para a biodegradação de etenos clorados.

A ausência de cópias genômicas de Dhc acima do limite de quantificação (10^3 cópias genômicas/L) nos poços PM-11A e PM-11B, bem como valores mais baixos de bactérias totais (10^7 a 10^6 cópias genômicas/L, respectivamente), indica que as condições naturais do meio não favorecem o desenvolvimento de Dhc e que há outros processos predominantes que interferem na biodegradação de etenos clorados, os quais podem apresentar alguma relação com a presença de outros interferentes, como o tolueno e etanos clorados. Destaca-se que nessas duas amostras ocorrem as maiores concentrações de PCE (acima de 34 ppm) e a presença de subprodutos indica que outros organismos podem estar envolvidos na biodegradação.

Uma das dificuldades do uso de ferramentas moleculares em escala comercial é a ausência de laboratórios que realizem esse ensaios no Brasil, o que resulta no aumento do intervalo entre a coleta e a análise por laboratórios especializados e pode influenciar na alteração da comunidade microbiana avaliada.

5.3 Ensaios moleculares para extração de RNA e DNA

Os ensaios moleculares para extração de RNA e DNA de amostras ambientais oriundas de água subterrânea foram realizados no laboratório do Grupo de Engenharia de Bioprocessos (GenBio), da Poli Química, USP.

As amostras utilizadas nos ensaios moleculares foram coletadas em campo, por filtração, e mantidas no freezer a -80°C até o momento da extração, com os protocolos utilizados no laboratório do GenBio da Engenharia Química – USP (Dias Rosa, 2008; Almeida and Nammoura Neto, 2010a, 2010b). Para bactéria foram utilizados os oligonucleotídeos (*primers*) 909 R e para Archaea o 340 F e 915R.

Os ensaios foram realizados com amostras de água do poço PM-11B, uma vez que este foi utilizado para a montagem de microcosmos. Nos ensaios realizados para extração de DNA e/ou RNA, a quantidade de material genético não ultrapassou $120\text{ ng}/\mu\text{L}$ e a razão 260/230 esteve abaixo de 1,8, ou seja, baixa qualidade.

Para avaliar a qualidade de extração foi realizada eletroforese com alíquotas das amostras extraídas e de marcadores moleculares no gel de agarose. Não foram identificadas bandas nas fotos tiradas sob luz ultravioleta, no equipamento Gel Logic, ou seja, não foi possível a amplificação. Nas etapas de purificação também houve perda de material, confirmada pela ausência de bandas no gel de agarose, após a PCR.

A recuperação de DNA na amostra do PM-11B, realizada pela SiREM foi de 67 ng/L (Tabela 5.2), corroborando a pouca quantidade de células nessa amostra e que afetaram o uso da metodologia de extração (Nammoura Neto, 2017; Dias Rosa, 2008).

Cabe destacar que foram realizados testes com amostras de água subterrânea de outros pontos, para avaliar métodos de filtração, entretanto estes também não indicaram recuperação de material genético para a realização de ensaios posteriores.

5.4 Microcosmos

O experimento teve início no dia 30 de novembro de 2016 e duração de aproximadamente 8 meses (245 dias). A extração das alíquotas de água eram quinzenais e, a partir de fevereiro, passou a ser mensal.

As concentrações de etenos clorados nas triplicatas dos microcosmos A, B e C estão plotadas na Figura 5.12.

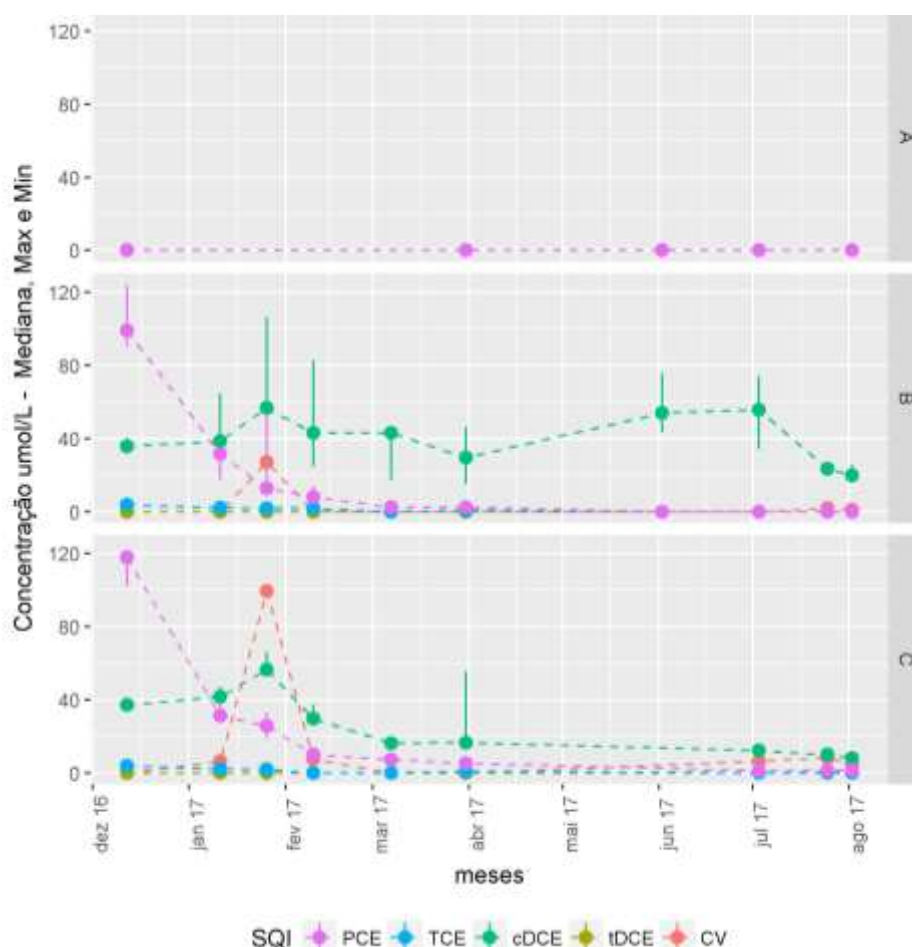


Figura 5.12 – Evolução das concentrações de etenos clorados nos microcosmos.

Barras indicam a variação (máximo e mínimo). Os círculos representam a mediana. A – microcosmo controle, com rocha desagregada e água deionizada; B – microcosmo preparado rocha desagregada e água do PM11B; C – microcosmo com rocha desagregada, água do PM-11B e azida sódica como inibidor metabólico.

As amostras extraídas no dia 05 de dezembro de 2016, na semana seguinte à preparação dos microcosmos, foram desconsideradas no gráfico, pois na primeira extração foi utilizada diluição de 5 vezes e as concentrações de PCE, TCE e cis-DCE ficaram acima do último ponto da curva de quantificação do laboratório, que é de 1000 µg/L, impossibilitando sua quantificação. O cloreto de vinila também foi detectado nas alíquotas dos microcosmo B e C analisadas na ocasião. Os compostos trans-1,2-DCE, 1,1-DCE e clorofórmio também foram detectados, mas não foram quantificadas, em função da alta concentração de PCE nas alíquotas da primeira extração.

Assim, nas extrações seguintes a diluição foi maior, resultando no aumento do limite de quantificação inicial, que passou a 75 µg/L para o CV e 150 µg/L para os demais compostos. O limite de quantificação foi progressivamente reduzido, chegando a 3 µg/L para CV e 6 µg/L para os demais compostos, na extração realizada em agosto de 2017. As amostras extraídas do microcosmo controle A não indicaram particionamento de VOC do solo para a água ultrapura ao longo do experimento.

A Tabela 5.5 apresenta as concentrações das SQI na amostra original, do poço PM-11B, e a média das concentrações obtidas nas alíquotas dos microcosmos B e C, extraídas no dia 12 de dezembro de 2016. Nas triplicatas dos microcosmos não foram detectados CV, 1,1-DCE e trans-1,2-DCE, possivelmente devido às diluições necessárias para quantificação dos compostos PCE e TCE.

Tabela 5.5 – Comparativo da concentração de etenos clorados - amostra original (PM-11B) e média das amostras dos microcosmos B e C

| CAS | SQI | VOR | PM-11B | Média B*/ % redução | Média C*/ % redução |
|----------|---------------|------|-----------|------------------------|------------------------|
| | | | (µg/L) | (µg/L) / % | (µg/L) / % |
| 75-01-4 | CV | 2,0 | 995,60 | NQ | NQ |
| 75-35-4 | 1,1-DCE | 30,0 | 19,20 | NQ | NQ |
| 156-60-5 | trans-1,2-DCE | 50,0 | 18,10 | NQ | NQ |
| 156-59-2 | cis-1,2-DCE | 50,0 | 5.437,10 | 3.531,67 / 65% | 3.585,00 / 66% |
| 79-01-6 | TCE | 20,0 | 3.385,30 | 484,67 / 14% | 503,33 / 15% |
| 127-18-4 | PCE | 40,0 | 55.748,90 | 17.336,67 / 31% | 18.886,67 / 34% |

29/11/2016

12/12/2016

NQ - não quantificado. VOR - valor orientador (CETESB, 2016).

*média das alíquotas dos microcosmos em triplicata. Redução em relação às concentrações na amostra do poço de monitoramento

As reduções nas concentrações das SQI nos microcosmos que pode ser atribuída aos efeitos de adsorção no meio sólido, visto que foi mantido o mínimo *headspace* nos frascos e incubação horizontal para evitar a volatilização dos compostos, como indicado no APÊNDICE D.

Na segunda semana, houve redução na concentração de cis-DCE de 65% (microcosmos B) e 66% (microcosmos C) e de PCE de 31% (microcosmos B) e 34% (microcosmos C), em relação às concentrações iniciais na amostra do poço PM-11B. As demais SQI não foram detectadas, em função da diluição.

O particionamento de etenos clorados no solo está relacionado também à processos de sorção. Como o material utilizado nos microcosmos apresenta baixo teor de carbono orgânico (Tabela 5.4), os principais sítios de sorção podem estar associados aos argilominerais presentes na alteração de micaxisto.

Para evitar o particionamento para o ar foi mantido o mínimo *headspace* nos frascos e a atmosfera em seu interior foi mantida anaeróbia a microaerofílica, com o uso de gás nitrogênio industrial durante a manipulação.

Durante as extrações de alíquotas para análises foi identificada alteração na coloração da água, pela resazurina/ resofurina, indicando a reação com o oxigênio presente no cilindro de nitrogênio (impurezas). Em menos de 24 horas o meio voltava a ser incolor (APÊNDICE H), indicando ambiente anaeróbio.

Ressalta-se que a disponibilidade de oxigênio em aquíferos está associada à recarga e fluxo da água subterrânea, desta forma, mesmo nos poços onde as medições de oxigênio dissolvido estiveram abaixo do limite de detecção do equipamento ele pode estar presente (ambiente microaerofílico). Como indicado no APÊNDICE G, mesmo pouco oxigênio dissolvido na amostra do PM-11B, pode viabilizar processos aeróbios.

Foram realizadas simulações para identificação dos processos redox predominantes (Jurgens *et al*,2009) também com as concentrações dos pares redox nas amostras dos microcosmos. Nas amostras filtradas dos microcosmos B e C não foi detectado ferro, tornando a simulação inconclusiva. Entretanto, a simulação realizada com os resultados de ferro e manganês no sobrenadante dos microcosmos, sem filtração, apontou o predomínio de processos metanogênicos no microcosmo B (APÊNDICE G/ ANEXO B).

Na simulação com as concentrações obtidas no microcosmo C (APÊNDICE G) houve indicação de mistura de processos anóxicos, ou seja, além das condições ferro e

sulfato redutoras, processos redutores de nitrato também eram favorecidos, pois a concentração de amônio foi cerca de 65% maior no microcosmo C, em relação aos demais. A presença de nitrato no microcosmo C pode ser atribuída ao uso do inibidor metabólico (azida sódica – NaN_3). No momento da análise o pH era 7 e, ao longo do experimento, variou entre 6 e 7, condições favoráveis à atividade microbiana.

Para a comparação entre os microcosmos B e C, a soma dos subprodutos de degradação (CV e DCE) foi normalizada pela soma dos compostos que podem gera-los (PCE e TCE), conforme a Tabela 5.6. Sabe-se que o TCE também é subproduto do PCE e sua produção está incorporada aos valores reportados abaixo.

Tabela 5.6 – Razão entre produtos de degradação e compostos degradados

| data | Microcosmo | PCE+TCE ($\mu\text{mol/L}$) | CV+DCE ($\mu\text{mol/L}$) | (TCE+DCE+CV)/ PCE | (PCE+TCE)/ (PCE+TCE) | (CV+DCE)/ (PCE+TCE) |
|----------|------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
| 12/12/16 | B | 102.80 | 35.85 | 0.40 | 1.00 | 0.35 |
| | C | 121.77 | 37.14 | 0.35 | 1.00 | 0.30 |
| 11/01/17 | B | 33.61 | 38.50 | 1.30 | 1.00 | 1.15 |
| | C | 33.36 | 48.04 | 1.61 | 1.00 | 1.44 |
| 26/01/17 | B | 14.69 | 83.88 | 6.70 | 1.00 | 5.71 |
| | C | 27.45 | 155.90 | 6.17 | 1.00 | 5.68 |
| 10/02/17 | B | 9.84 | 43.15 | 5.63 | 1.00 | 4.39 |
| | C | 9.86 | 37.10 | 3.76 | 1.00 | 3.76 |
| 07/03/17 | B | 2.49 | 42.94 | 17.26 | 1.00 | 17.26 |
| | C | 7.09 | 16.07 | 2.27 | 1.00 | 2.27 |
| 31/03/17 | B | 2.95 | 29.57 | 12.83 | 1.00 | 10.03 |
| | C | 5.85 | 16.36 | 3.31 | 1.00 | 2.80 |
| 02/06/17 | B | <LQ | 53.90 | NA | NA | NA |
| 03/07/17 | B | <LQ | 55.56 | NA | NA | NA |
| | C | 1.03 | 18.78 | 18.32 | 1.00 | 18.32 |
| 25/07/17 | B | <LQ | 25.03 | NA | NA | NA |
| | C | 1.44 | 18.40 | 13.56 | 1.00 | 12.76 |
| 02/08/17 | B | <LQ | 20.84 | NA | NA | NA |
| | C | 1.30 | 12.52 | 9.66 | 1.00 | 9.66 |

NA: não se aplica.

< LQ: menor que o limite de quantificação laboratorial.

*Em 02/06/17 não houve extração nos microcosmos C.

É possível constatar que a concentração molar dos subprodutos de degradação no microcosmo B é maior do que no microcosmo C, corroborando a ação inibidora da azida na degradação biológica. Em menos de 184 dias o PCE e o TCE foram consumidos no microcosmo B, resultado confirmado nas análises subsequentes.

No microcosmo C, a concentração de PCE manteve-se acima do valor de referência ambiental (CETESB, 2016) até o fim do experimento e não foi obtido TCE acima do limite de quantificação do método analítico nas amostras coletadas a partir de 215 dias. A partir das medianas foram calculadas as frações molares das SQI quantificadas durante o experimento, ilustradas na Figura 5.13, juntamente com o VOC total.

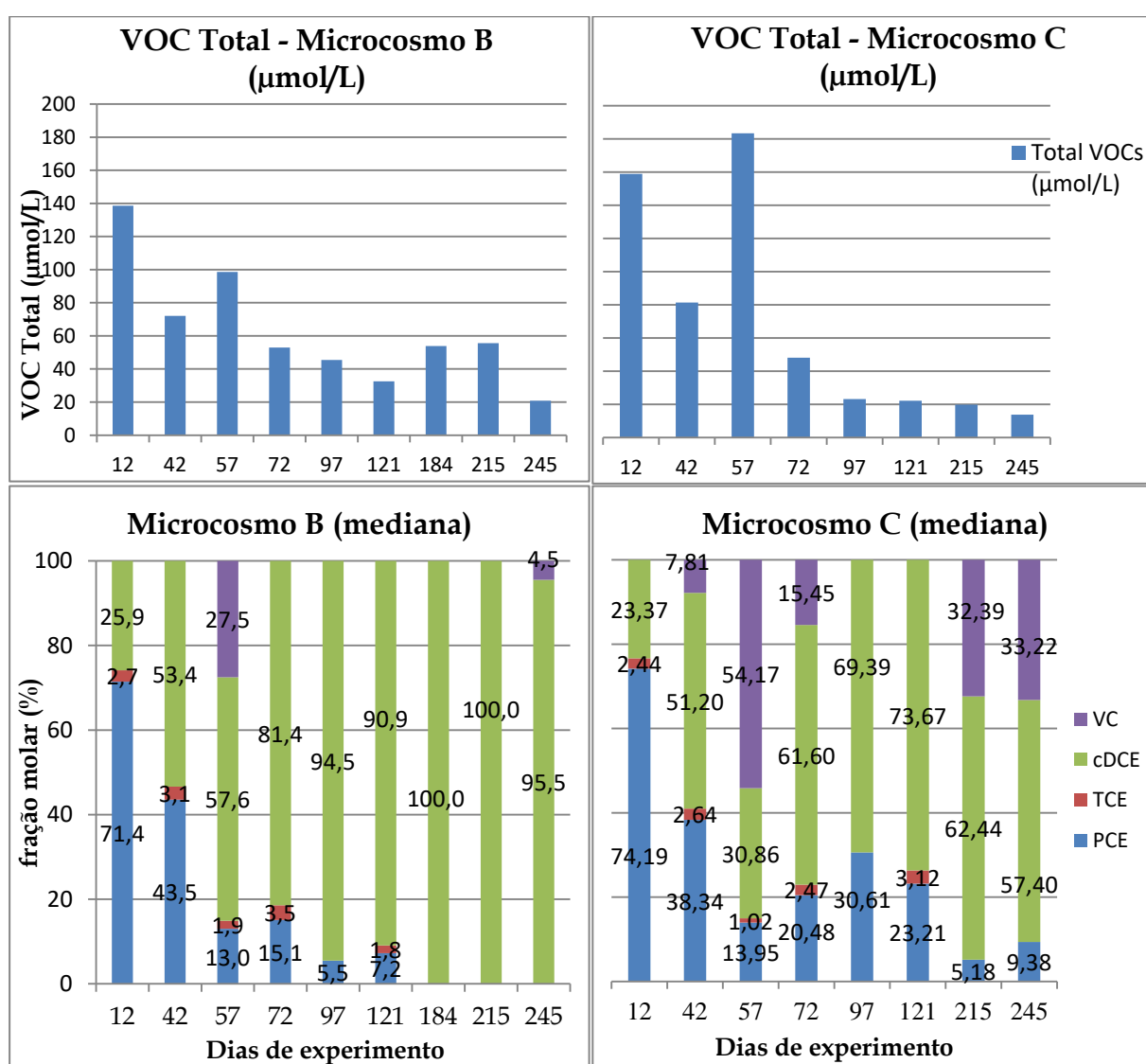


Figura 5.13 – Fração molar de etenos clorados nos microcosmos

Houve perda de massa nos dois microcosmos, mas como o escopo do experimento não permitiu a inclusão de análises de gases, tanto devido ao pouco volume de água nos frascos quanto ao alto limite de quantificação do método utilizado pelo laboratório, o eteno não foi analisado. Pelas frações molares é possível constatar que no microcosmo B houve a completa degradação do PCE e TCE, identificados no início do experimento, resultando em acúmulo de cis-DCE e identificação de CV (menos de 5%) apenas no final do experimento. Já no microcosmo C houve quantificação de PCE ao longo de todo o experimento e maior concentração de CV (acima de 30 %), no final do experimento.

Os microcosmos foram manipulados em conjunto, ou seja, eventuais perdas por volatilização durante as extrações ocorreram em ambos os microcosmos, desta forma, pode-se assumir que as alterações nas frações molares entre os dois cenários avaliados indicam que houve degradação dos contaminantes estudados de forma mais acelerada no microcosmo B, onde não houve adição do inibidor azida.

Os resultados indicam que o efeito da inibição metabólica pela azida sódica afetou principalmente a degradação de PCE. Cabe destacar que o TCE também é um subproduto de degradação do PCE, e está sendo formado e, concomitantemente, degradado a DCE e CV.

Considerando os resultados das condições redox nos microcosmos B e C, constata-se que houve alteração dessas condições em relação à amostra original, proveniente do poço PM-11B (APÊNDICE G). A área de estudo apresenta condições ferro e sulfato redutoras. No microcosmo B as condições permaneceram metanogênicas e, no microcosmo C, há mistura de condições nitrato, ferro e sulfato redutoras.

Para avaliar a composição biológica nos microcosmos foi realizado um teste de viabilidade com microcosmos preparados com extrato de levedura, em meio anaeróbio e aeróbio. Inicialmente, houve tentativa de contagem de células por citometria de fluxo, entretanto devido à interferência da resazurina (comprimento de onda 563/587 nm) no corante SYBR (530/30 nm) os testes realizados com amostras dos microcosmos não apresentaram resultados favoráveis.

No acompanhamento da turvação dos microcosmos inoculados com extrato de levedura, quatro dias após a inoculação de alíquotas das amostras foi observada turvação na réplica de controle abiótico C1.

Após dois meses, todas as amostras, exceto o controle Anaeróbio, apresentaram algum grau de turvação, como indicado na Tabela 5.7. Esse resultado indica que há efeito da azida sódica na inibição da atividade biológica, mas que não gera esterilidade em longo prazo, pois a viabilidade é retomada após fornecimento de nutrientes limitantes.

Tabela 5.7 – Acompanhamento do teste de viabilidade nos ensaios com extrato de levedura e alíquotas dos microcosmos B e C (aeróbio e anaeróbio)

| Data | Aeróbio | | | | | | Anaeróbio | | | | | | Controle | |
|----------|---------|------|------|------|------|------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-----|
| | A-B1 | A-B2 | A-B3 | A-C1 | A-C2 | A-C3 | An-B1 | An-B2 | An-B3 | An-C1 | An-C2 | An-C3 | AC | AnC |
| 17/05/17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18/05/17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | ✓ | - | - | - | - | - | - | - |
| 25/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | ✓ | - | - | - | - | - | - | - |
| 26/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | ✓ | ✓ | - | - | - | - | - | - |
| 30/05/17 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | ✓ | ✓ | - | - | - | - | - | - |
| 21/07/17 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - |

B1, B2, B3 - com alíquotas dos microcosmos B (biótico).

C1, C2, C3 - com alíquotas dos microcosmos C (com inibidor metabólico azida sódica).

A - aeróbio; An - anaeróbio; AC - controle aeróbio. AnC - controle anaeróbio.

: turvação

Esses estudos complementares de microcosmos com extrato de levedura, para avaliar a presença de bactérias, indicaram que estas ainda estão presentes no microcosmo C, desta forma não foi possível isolar a componente biológica da degradação, apenas os efeitos inibitórios de atividade microbiana.

O estudo de microcosmos permitiu constatar que a biodegradação pode ocorrer mesmo em cenários com baixos níveis de carbono, em condições metanogênicas. Houve alteração nas condições redox no microcosmo B, em relação às condições originais, no poço PM-11B, desta forma, em campo, não necessariamente ocorrerá o mesmo cenário de degradação de etenos clorados observado em laboratório.

As condições ferro e sulfato redutoras presentes na área de estudo estão associadas à matriz, visto que no microcosmo controle, com a rocha desagregada e água ultrapura, essas mesmas condições foram mantidas em laboratório.

Os ensaios de bancada são de grande importância para estudos da biodegradação, entretanto os custos de sua aplicação são altos para avaliação de indicadores isoladamente. Por se tratar da reprodução de um cenário anaeróbio e/ou microaerofílico, tanto a montagem quanto a manipulação das amostras sob essas condições, mantendo ainda um ambiente estéril e sem fontes luminosas, demanda estrutura laboratorial específica para essa classe de contaminantes, devido à toxicidade das substâncias.

Nesse tipo de ensaio é fundamental a avaliação das condições geoquímicas predominantes, pois taxas de degradação e/ou biodegradação apenas podem ser utilizadas em áreas que possuam condições semelhantes aos identificados durante o ensaio, o que requer um número significativo de análises de acompanhamento, até que haja aclimatação e desenvolvimento dos microrganismos.

6 CONCLUSÕES

A primeira campanha de monitoramento analítico nos sistemas multiníveis CMT e Westbay® indicou presença de etenos clorados ao longo de todo o perfil vertical, em especial dos produtos de degradação do tetracloreto, o que indica a ocorrência de degradação na área.

Não foram obtidas concentrações de eteno acima do limite de quantificação laboratorial (60 µg/L). O eteno como indicador de degradação de tetracloreto, tricloreto, dicloreto e cloreto de vinila, em áreas contaminadas, demanda o aperfeiçoamento das técnicas analíticas para redução do limite de detecção, uma vez que concentrações de etenos entre 1 e 10 µg/L já se correlacionam com presença de genes funcionais *vcrA* e *bvcA*.

Foram identificados fortes indícios de que o teor de carbono orgânico na bentonita revestida influenciou na degradação do tetracloreto ao longo do perfil do sistema multinível CMT, visto que o conjunto multinível convencional mais próximo (PM-11, PM-11A, PM-11B) manteve concentrações significativas dessa substância (acima de 34 ppm).

Porém, mesmo sem adição de fontes de carbono foi observada a completa degradação de tetracloreto nos ensaios de bancada, nas réplicas do microcosmo B. Ou seja, baixas concentrações de carbono orgânico não inviabilizam a biodegradação, se mantidas condições metanogênicas. Nas réplicas do microcosmo C não houve degradação completa do tetracloreto, em função da inibição metabólica, (azida sódica) de organismos importantes nessa degradação. Ensaios complementares indicaram que, mesmo com a azida sódica, alguns microrganismos permaneceram ativos no microcosmo C, não sendo possível isolar a degradação biótica da abiótica.

Com o uso de ferramentas moleculares (qPCR), verificou-se que mesmos níveis de bactérias totais, na ordem de 10^7 e 10^8 cópias por litro, apresentam alta variação quanto à presença do organismo alvo (0,005% a 40% de bactérias *Dehalococcoides* na comunidade). Tal fato indica que não há relação direta entre a quantidade de bactérias *Dehalococcoides* e de bactérias totais nas amostras de água subterrânea, reforçando a necessidade de análise dos organismos-alvo com a capacidade metabólica específica para biodegradação do contaminante de interesse.

Embora os ensaios moleculares tenham apontado a ausência de ocorrência natural de bactérias do gênero *Dehalococcoides* na zona de alteração de rocha (PM-11B),

pode-se afirmar que o revestimento biodegradável da bentonita *pellet* favoreceu o estabelecimento dessa população nessa zona de alteração, na base do manto de intemperismo (CMT-07), o qual influenciou os teores de carbono orgânico ao longo do sistema multinível CMT.

Foi observada degradação completa do PCE em todas as réplicas do microcosmo B, em comparação aos microcosmos C, entretanto a avaliação das condições redox indicou que apenas o microcosmo controle A apresentou as mesmas condições ferro e sulfato redutoras observadas na área de estudo. A degradação de PCE no microcosmo B foi favorecida pelas condições metanogênicas estabelecidas.

Devido às mudanças nas condições redox terem sido distintas nos microcosmos B e C, não foi possível isolar apenas a componente biológica (coeficiente de biodegradação), sendo calculadas taxas de degradação que englobam também efeitos abióticos.

Dessa forma, ensaios de bancada devem ser avaliados criticamente quanto à representatividade dos resultados para a área de estudo, pois apenas o decaimento das concentrações das substâncias químicas de interesse não confirmam que esse mesmo potencial de biodegradação ocorra na área avaliada.

A partir do histórico de concentrações em campo nas amostras do poço PM-11B, a primeira linha de evidência não indica redução na concentração de etenos clorados ao longo do tempo, tampouco sua degradação. Esse cenário é corroborado pela ausência de bactérias *Dehalococcoides* e genes funcionais, utilizados como biomarcadores, nas amostras desse poço.

O uso de ferramentas moleculares foi conclusivo ao indicar o potencial de biodegradação existente na área de estudo, destacado pelos resultados na amostra do poço CMT-07, onde houve degradação completa do PCE e os três genes funcionais avaliados (*vcrA*, *bvcA*, *tceA*) foram identificados.

Os resultados indicaram que há potencial para a biodegradação na área de estudo, mas que a biorremediação intrínseca, como parte do processo de atenuação natural, não é favorecida pelas condições geoquímicas na área de estudo, ou seja, requer incrementos (bioestimulação).

REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2010, NBR 15847:2010 - Amostragem de água subterrânea em poços de monitoramento — Métodos de purga, 15p.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2006, *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition: New York, Garland Science, 1616p.
- Almeida, R.N.A., Nammoura Neto, G.M., 2010a, Protocolo POP Extração de DNA em flocos de lodo ativado, 59p, disponível em <http://www.prosabmicrobiologia.org.br/rede/manuais>.
- Almeida, R.N.A., Nammoura Neto, G.M., 2010b, Protocolo POP Extração de rRNA em flocos de lodo ativado, 27p.
- Alvarez, P.J.J., Illman, W.A., 2006, *Bioremediation and Natural Attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models* (P. Alvarez & W. Illman, Eds.): New Jersey, Wiley-Interscience, 609p., doi: 10.1002/047173862X.
- Barbosa, M.B., 2015, *Sistema de Informações Geográficas Aplicado ao Gerenciamento da Contaminação da Antiga ZUPI 131, Jurubatuba, SP: Universidade de São Paulo*, 137p.
- Berkowitz, B., Dror, I., Yaron, B., 2008, *Contaminant Geochemistry: Interactions and Transport in the Subsurface Environment*: Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 371p, disponível em <http://edepot.wur.nl/63499>.
- Bertolo, R.A., 1996, *Relações entre rios e o aquífero sedimentar da Bacia de São Paulo em área de exploração intensiva de água subterrânea - Dissertação de Mestrado: Universidade de São Paulo*, 100p.
- Bertolo, R.A., 2017, *Tese Livre-Docência “Bases técnicas para a gestão de áreas contaminadas por solventes organoclorados em aquíferos fraturados”*: Universidade de São Paulo, 19p.
- Besmer, M.D., Epting, J., Page, R.M., Sigrist, J.A., Huggenberger, P., Hammes, F., 2016, *Online flow cytometry reveals microbial dynamics influenced by concurrent natural and operational events in groundwater used for drinking water treatment: Scientific reports*, v. 6, 10p, doi: 10.1038/srep38462.
- Bombach, P., Richnow, H.H., Kästner, M., Fischer, A., 2010, *Current approaches for the assessment of in situ biodegradation: Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, 839–852, doi: 10.1007/s00253-010-2461-2.
- Bradley, P.M., 2000, *Microbial degradation of chloroethenes in groundwater systems: Hydrogeology Journal*, v. 8, 104–111, doi: 10.1007/s100400050011.
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 1996, *Anaerobic Mineralization of Vinyl Chloride in Fe(III)-Reducing, Aquifer Sediments: Environmental Science & Technology*, v. 30, 2084–2086, doi: 10.1021/es950926k.
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 1997, *Kinetics of DCE and VC Mineralization under Methanogenic and Fe(III)-Reducing Conditions: Environmental Science & Technology*, v. 31, 2692–2696, doi: 10.1021/es970110e.
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 2000, *Aerobic microbial mineralization of dichloroethene as sole carbon substrate: Environmental Science & Technology*, v. 34, 221–223,

doi: 10.1021/es990785c.

- Bradley, P.M., Landmeyer, J.E., Dinicola, R.S., 1998, Anaerobic Oxidation of [1,2-¹⁴C]Dichloroethene under Mn(IV)-Reducing Conditions: Applied and Environmental Microbiology, v. 64, 1560–1562.
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., Lovley, D.R., 1998, Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene: Applied and environmental microbiology, v. 64, 3102–3105.
- Brockman, F.J., Murray, C.J., 1997, Subsurface microbiological heterogeneity: Current knowledge, descriptive approaches and applications, in FEMS Microbiology Reviews, v. 20, 231–247, doi: 10.1016/S0168-6445(97)00010-7.
- Brown, J.R., Doolittle, W.F., 1997, Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition: Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 61, 456–502.
- Butler, E.C., Hayes, K.F., 1999, Kinetics of the transformation of trichloroethylene and tetrachloroethylene by iron sulfide: Environmental Science and Technology, v. 33, 2021–2027, doi: 10.1021/es9809455.
- Carreón-Diazconti, C., Santamaría, J., Berkompas, J., Field, J.A., and Brusseau, M.L., 2009, Assessment of in situ reductive dechlorination using compound-specific stable isotopes, functional gene PCR, and geochemical data: Environmental Science & Technology, v. 43, 4301–4307, doi: 10.1021/es803308q.
- CEN (European Committee for Standardization), 1997, EN 1484 Water analysis - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC), v. 2007, 11p.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2014, Decisão de Diretoria 045/2014/E/C/I, de 20-02-2014 - “Valores Orientadores para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo”: São Paulo, Diário Oficial do Estado de São Paulo. edição no 124(36) do dia 21/02/2014 - 53, 4p.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2016, Decisão de Diretoria no 256/2016/E - Dispõe sobre a aprovação dos “Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo - 2016” e dá outras providências: Diário Oficial do Estado de São Paulo. edição no 126(219) do dia 24/11/2016, 55-56, v. 126, 5p.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2017a, Decisão de Diretoria no 038/2017/C, de 07 fevereiro de 2017 - Dispõe sobre a aprovação do “Procedimento para a Proteção da Qualidade do Solo e das Águas Subterrâneas”, da revisão do “Procedimento para o Gerenciamento de Áreas Contaminadas”: Diário Oficial do Estado de São Paulo. edição no 127(28) do dia 10/02/2017, 47-52, v. 127, 65p.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2017b, Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo: São Paulo, 14p.
- Chapelle, F.H., 2001, Groundwater microbiology and geochemistry: New York, John Wiley & Sons, 479p.
- Cheng, D., He, J., 2009, Isolation and characterization of “Dehalococcoides” sp. strain MB, which dechlorinates tetrachloroethene to trans-1,2-dichloroethene: Applied and Environmental Microbiology, v. 75, 5910–5918, doi: 10.1128/AEM.00767-09.

- Cherry, J. A., Parker, B.L., Keller, C., 2007, A new depth-discrete multilevel monitoring approach for fractured rock: *Ground Water Monitoring & Remediation*, v. 27, 57–70, doi: 10.1111/j.1745-6592.2007.00137.x.
- Christensen, H., Hansen, M., Sørensen, J., 1999, Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, 1753–1761.
- Cleary, R.W., 1989, Hidrogeologia de Águas Subterrâneas, in Ramos, F. Occhipint, A.G. eds., *Engenharia hidrológica*, Rio de Janeiro, ABRH, 291–404.
- Cupples, A.M., 2008, Real-time PCR quantification of *Dehalococcoides* populations: Methods and applications: *Journal of Microbiological Methods*, v. 72, 1–11, doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.005.
- Cwiertny, D.M., Scherer, M.M., 2010, Chapter 2 - Chlorinated Solvent Chemistry: Structures, Nomenclature and Properties, in *In Situ Remediation of Chlorinated Solvent Plumes*, 29–38, doi: 10.1007/978-1-4419-1401-9.
- DAEE/ DPO/ GISAT, 2011, Mapa da Área de restrição e controle de captação e uso de águas subterrâneas na região do Jurubatuba: Sistema Georreferenciado de Informações (GISAT)/ DPO.
- DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica/ IG - Instituto Geológico, 2009, Projeto Jurubatuba: restrição e controle de uso de água subterrânea / Cadernos do Projeto Estratégico Aquíferos; no 01: São Paulo, Secretaria de Estado de Saneamento e Energia, 109p.
- Darlington, R., Lehmicke, L., Andrachek, R.G., Freedman, D.L., 2008, Biotic and abiotic anaerobic transformations of trichloroethene and cis-1,2-dichloroethene in fractured sandstone: *Environmental Science & Technology*, v. 42, 4323–4330, doi: 10.1021/es702196a.
- Dias Rosa, D., 2008, Método rápido de extração de DNA de bactérias: *Summa Phytopathologica*, v. 34, 259–261.
- Dijk, J.A., Bont, J.A.M. de, Xiaoxia Lu, Becker, P.M., Bosma, T.N.P., Rijnaarts, H.H.M., Gerritse, J., 2000, Anaerobic oxidation of (chlorinated) hydrocarbons, in Wickramanayake, G.B. and Gavaskar, A.R. eds., *The second International Conference of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*, Monterrey, CA, Batelle Press, 63–70.
- Ding, C., He, J., 2012, Molecular techniques in the biotechnological fight against halogenated compounds in anoxic environments: *Microbial Biotechnology*, v. 5, 347–367, doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00313.x.
- Domenico, P.A., Schwartz, F.W., 1997, *Physical and chemical hydrogeology*. Second edition: New York, John Wiley & Sons, 506p.
- Druschel, S.J., Kinner, N.E., 2013, Improvements to TCE Microcosm Protocols for Biostimulation in Bedrock Aquifers: *Remediation Journal*, v. 23, 73–84, doi: 10.1002/rem.
- Einarson, M.D., Cherry, J.A., 2002, A new multilevel ground water monitoring system using multichannel tubing: *Ground Water Monitoring & Remediation*, v. 22, 52–65, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-6592.2002.tb00771.x/abstract>.

- ESTCP, 2011, ESTCP ER-0518 Guidance Protocol - Application of Nucleic Acid-Based Tools for Monitoring Monitored Natural Attenuation (MNA), Biostimulation and Bioaugmentation at Chlorinated Solvent Sites, 34p.
- ESTCP, 2016, BioPic Tool. Pathway Identification Criteria A Decision Guide to Achieve Efficient Remediation of Chlorinated Ethenes. Planilha Microsoft Excel 2013.
- Fennell, D.E., Carroll, A.B., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 2001, Assessment of indigenous reductive dechlorinating potential at a TCE-contaminated site using microcosms, polymerase chain reaction analysis, and site data: *Environmental Science & Technology*, v. 35, 1830–1839, doi: 10.1021/es0016203.
- Fennell, D.E., Gossett, J.M., 1998, Modeling the production of and competition for hydrogen in a dechlorinating culture: *Environmental Science & Technology*, v. 32, 2450–2460, doi: 10.1021/es980136l.
- Fennell, D.E., Gossett, J.M., 2003, Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications, in Häggblom, M.M. Bossert, I.D. eds., Boston, MA, Springer US, 385–420, doi: 10.1007/0-306-48011-5_15.
- Fernandes, A.J., Fiume, B., Bertolo, R., Hirata, R.C.A., 2016, Modelo geométrico de fraturas e análise da tectônica rúptil aplicados ao estudo do fluxo do aquífero cristalino, São Paulo (SP): *Geologia USP - Serie Científica*, v. 16, 71–88, doi: 10.11606/issn.2316-9095.v16i3p71-88.
- Fetter, C.W., 1999, *Contaminant Hydrogeology*: New Jersey, Prentice Hall, 500p.
- Fiume, B., 2013, *Geologia Estrutural de Detalhe para Elaboração de Modelo Conceitual de Circulação de Água Subterrânea: Estudo de Caso em Jurubatuba*, SP: Universidade de São Paulo, 165p.
- Fogel, M.M., Taddeo, A.R., Fogel, S., 1986, Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 51, 720–724.
- Frascari, D., Zanaroli, G., Danko, A.S., 2015, In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: A review: *Journal of Hazardous Materials*, v. 283, 382–399, doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.09.041.
- Gao, J., LBM, E., Wackett, L., 2010, The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access: *Nucleic Acids Research*, 488–491, disponível em <http://eawag-bbd.ethz.ch/%3E>. (acesso em maio de 2015).
- Gilmore, T.J., 1989, The Installation of the Westbay Multiport Ground-Water Sampling System in Well 699-43-42K Near the 216-B-3 Pond, 39p.
- GOOGLE EARTH®, 2015, “Jurubatuba”. Coordenadas UTM 327265.46m E; 7380636.88m S; 23 K; 19/04/2015, acesso em 19/04/2015.
- Gossett, J.M., 1987, Measurement of Henry’s law constants for C1 and C2 chlorinated hydrocarbons: *Environmental Science & Technology*, v. 21, 202–208, doi: 10.1021/es00156a012.
- Gossett, J.M., 2010, Sustained aerobic oxidation of vinyl chloride at low oxygen concentrations: *Environmental science & technology*, v. 44, 1405–1411, doi: 10.1021/es9033974.

- Hage, J.C., Hartmans, S., 1999, Monooxygenase-mediated 1,2-dichloroethane degradation by *Pseudomonas* sp. strain DCA1: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, 2466–2470.
- Hammes, F., Egli, T., 2010, Cytometric methods for measuring bacteria in water: Advantages, pitfalls and applications: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, 1083–1095, doi: 10.1007/s00216-010-3646-3.
- Hammes, F., Egli, T., 2005, New Method for Assimilable Organic Carbon Determination Using Flow- Cytometric Enumeration and a Natural Microbial Consortium as Inoculum New Method for Assimilable Organic Carbon Determination Using Flow- Cytometric Enumeration and a Natural Microbial Con: v. 39, 3289–3294, doi: 10.1021/es048277c.
- Hartmans, S., De Bont, J.A.M., Tramper, J., and Luyben, K.C.A.M., 1985, Bacterial Degradation of Vinyl Chloride: *Biotechnology Letters*, v. 7, 383–388.
- Haynes, W.M., 2015, *Physical Constants of Organic Compounds* (D. R. Lide & T. J. Bruno, Eds.): Boca Raton, CRC Press, 2677p., doi: 10.1016/B978-1-907568-27-5.50012-3.
- Hazen, T.C., 2010, Cometabolic Bioremediation, in Timmis, K.N., McGenity, T.J., Meer, J.R. van der, Lorenzo, V. de eds., *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 1–6, 2505–2514, doi: 10.1007/978-3-540-77587-4.
- He, J., Ritalahti, K.M., Yang, K.-L., Koenigsberg, S.S., Löffler, F.E., 2003, Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium: *Nature*, v. 424, 62–65, disponível em <http://dx.doi.org/10.1038/nature01717>.
- He, J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E., 2005, Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE) and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe: *Environmental Microbiology*, v. 7, 1442–1450, doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00830.x.
- He, Y.T., Wilson, J.T., Su, C., Wilkin, R.T., 2015, Review of Abiotic Degradation of Chlorinated Solvents by Reactive Iron Minerals in Aquifers: *Groundwater Monitoring & Remediation*, v. 35, 57–75, doi: 10.1111/gwmr.12111.
- Hirata, R.C.A., Ferreira, L.M.R., 2001, Os aquíferos da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê: disponibilidade hídrica e vulnerabilidade à poluição: *Revista Brasileira de Geociências*, v. 31, 43–50.
- Holmes, V.F., He, J., Lee, P.K.H., Alvarez-Cohen, L., 2006, Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, 5877–5883, doi: 10.1128/AEM.00516-06.
- Hopkins, G.D., McCarty, P.L., 1995, Field Evaluation of in Situ Aerobic Cometabolism of Trichloroethylene and Three Dichloroethylene Isomers Using Phenol and Toluene as the Primary Substrates: *Environmental Science & Technology*, v. 29, 1628–1637, doi: 10.1021/es00006a029.
- Hug, L. a, Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F.E., Smidt, H., Edwards, E. a, and Adrian, L., 2013, Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 368, 1–10, doi:

10.1098/rstb.2012.0322.

- Imfeld, G., Pieper, H., Shani, N., Rossi, P., Nikolausz, M., Nijenhuis, I., Paschke, H., Weiss, H., Richnow, H.H., 2011, Characterization of groundwater microbial communities, dechlorinating bacteria, and in situ biodegradation of chloroethenes along a vertical gradient: *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 221, 107–122, doi: 10.1007/s11270-011-0774-0.
- IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas /BNDES, 2014, Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas (M. S. Lúcia, T. C. Echevengúá, & M. A. M. de Sousa, Eds.): Sao Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT / BNDES, 395 p.
- ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council), 2011, Environmental Molecular Diagnostics Fact Sheets: EMD-1, 83p, disponível em <http://www.itrcweb.org>.
- Janssen, D.B., Scheper, a., Dijkhuizen, L., Witholt, B., 1985, Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, 673–677.
- Juliani, C., 1992, O embasamento pré-cambriano da Bacia de São Paulo, in In Seminário Problemas Geológicos e Geotécnicos na Região Metropolitana de São Paulo, São Paulo, ABAS/ABGE/SBG-SP, 3–20.
- Jurgens, B.C., McMahon, P.B., Chapelle, F.H., Eberts, S.M., 2009, An Excel® workbook for identifying redox processes in ground water: U.S. Geological Survey Open-File Report, 8p.
- Kayo, A., 2016, Onde passava o Rio Pinheiros - Mestrado Profissional em Habitação - IPT: Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT, 1p, disponível em <https://riopinheiros.files.wordpress.com/2013/10/xbienal-painel.jpg> (acesso em julho de 2016).
- Keller, C., 2012, Hydro-geologic Spatial Resolution using Flexible Liners: TPG - The Professional Geologist, v. 49, 45–51.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M., 2000, rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, 1328–1333, doi: 10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000.
- Krajmalnik-Brown, R., Holscher, T., Thomson, I.N., Saunders, F.M., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E., 2004, Genetic Identification of a Putative Vinyl Chloride Reductase in strain BAV1: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, 6347–6351, doi: 10.1128/AEM.70.10.6347.
- Krzmarzick, M.J., Crary, B.B., Harding, J.J., Oyerinde, O.O., Leri, A.C., Myneni, S.C.B., Novak, P.J., 2012, Natural niche for organohalide-respiring chloroflexi: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, 393–401, doi: 10.1128/AEM.06510-11.
- L'Apicciarella, E.S.P., 2009, Contaminação e áreas de restrição de uso de água subterrânea no entorno do canal Jurubatuba em São Paulo – SP. Dissertação de mestrado: Universidade de São Paulo, 136p, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/44/44138/tde-14102009-094432/publico/ESPLA.pdf>.
- Lebrón, C.A., Acheson, C., Dennis, P., Druar, X., Wilkinson, J., Ney, E., Major, D., Petrovskis, E., Barros, N., Yeager, C.M., Löffler, F.E., Ritalahti, K.M., Hatt, J., Edwards, E.A., et al., 2008, SERDP Project ER 1561 - Literature Review Report

- Standardized Procedures for Use Of Nucleic Acid-Based Tools: SERDP, 82p.
- Lebrón, C.A., Wiedemeier, T.H., Wilson, J.T., Löffler, F.E., Hinchee, R.E., Singletary, M.A., 2015, ESTCP Project ER-201129 - Development and Validation of a Quantitative Framework and Management Expectation Tool for the Selection of Bioremediation Approaches at Chlorinated Ethene Sites: SERDP, 178p.
- Lee, W., Batchelor, B., 2004, Abiotic reductive dechlorination of chlorinated ethylenes by soil: *Chemosphere*, v. 55, 705–13, doi: 10.1016/j.chemosphere.2003.11.033.
- Löffler, F.E., Sanford, R.A., Ritalahti, K.M., 2005, Enrichment, cultivation, and detection of reductively dechlorinating bacteria: *Methods in Enzymology*, v. 397, 77–111, doi: 10.1016/S0076-6879(05)97005-5.
- Löffler, F.E., Tiedje, J.M., Sanford, R.A., Tiedje, J.M., 1999, Fraction of Electrons Consumed in Electron Acceptor Reduction and Hydrogen Thresholds as Indicators of Halorespiratory Physiology Fraction of Electrons Consumed in Electron Acceptor Reduction and Hydrogen Thresholds as Indicators of Halorespiratory Physio: v. 65, 4049–4056.
- Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Mu, J.A., Fullerton, H., Zinder, S.H., Spormann, A.M., 2013, *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia classis nov.*, order *Dehalococcoidales ord. nov.* and family *Dehalococcoidaceae fam. nov.*, within the phylum *Chloroflexi*: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 625–635, doi: 10.1099/ijs.0.034926-0.
- Lojkasek-Lima, P., 2018, Tese de Doutorado. “Caraterização de detalhe do perfil vertical de contaminação em um aquífero cristalino fraturado e intemperizado - Jurubatuba – São Paulo”: Universidade de São Paulo, 160p.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., 2012, *Brock Biology of Microorganisms* (M. T. Madigan, J. M. Martinko, & D. A. Stahl, Eds.): Glenview, Benjamin Cummings, 1155 p., doi: 10.1016/B978-1-4832-3136-5.50010-3.
- Madsen, E.L., 2000, Nucleic-acid characterization of the identity and activity of subsurface microorganisms: *Hydrogeology Journal*, v. 8, 112–125, doi: 10.1007/s100400050012.
- Magnuson, J.K., Romine, M.F., Burris, D.R., Kingsley, M.T., 2000, Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and substrate range characterization: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, 5141–5147, doi: 10.1128/AEM.66.12.5141-5147.2000.
- Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C., 2009, *Environmental Microbiology*: Academic Press, 598p.
- Major, D.W., Cox, E.E., Dworatzek, S.M., Hendrickson, E.R., Starr, M.G., Payne, J.O.A.N.N., Buonamici, L.W., 2002, Field Demonstration of Successful Bioaugmentation To Achieve Dechlorination of Tetrachloroethene To Ethene: v. 36, 5106–5116.
- Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D., Brussaard, C., 1999, *Current Protocols in Cytometry* (L. L. Robinson, J. Paul;Darzynkiewicz, Zbigniew; Dean Phillip N.; Orfao, Alberto;Rabinovitch, Peter S.;Stewart, Carleton C.; Tanke, Hans J.; Wheelless, Ed.): *Current protocols in cytometry*, v. Supplement, 17p, doi:

10.1002/0471142956.cy0706s02.

- Mattes, T.E., Jin, Y.O., Dobson, M., Lee, M., Schmidt, S., Fogel, S., Findlay, M., Smoler, D., 2013, SERDP Project ER-1683 - Quantifying the Presence and Activity of Aerobic, Vinyl Chloride-Degrading Microorganisms in Dilute Groundwater Plumes by Using Real-Time PCR, 198p.
- Matturro, B., Aulenta, F., Majone, M., Papini, M.P., Tandoi, V., Rossetti, S., 2012, Field distribution and activity of chlorinated solvents degrading bacteria by combining CARD-FISH and real time PCR: *New Biotechnology*, v. 30, 23–32, doi: 10.1016/j.nbt.2012.07.006.
- Matturro, B., Heavner, G.L., Richardson, R.E., Rossetti, S., 2013, Quantitative estimation of *Dehalococcoides mccartyi* at laboratory and field scale: Comparative study between CARD-FISH and Real Time PCR: *Journal of Microbiological Methods*, v. 93, 127–133, doi: 10.1016/j.mimet.2013.02.011.
- Maymó-Gatell, X., Anguish, T., Zinder, S.H., 1999, Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1, 2-dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, 3108–3113.
- Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1997, Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene: *Science (New York, N.Y.)*, v. 276, 1568–1571, doi: 10.1126/science.276.5318.1568.
- Maymó-Gatell, X., Nijenhuis, I., Zinder, S.H., 2001, Reductive Dechlorination of cis-1,2-Dichloroethene and Vinyl Chloride by “*Dehalococcoides ethenogenes*”: *Environmental Science & Technology*, v. 35, 516–521, doi: 10.1021/es001285i.
- McCarty, P.L., Goltz, M.N., Hopkins, G.D., Dolan, M.E., Allan, J.P., Kawakami, B.T., Carrothers, T.J., 1998, Full-Scale Evaluation of In Situ Cometabolic Degradation of Trichloroethylene in Groundwater through Toluene Injection: *Environmental Science & Technology*, v. 32, 88–100, doi: 10.1021/es970322b.
- McClendon, J.H., 1999, The Origin of Life: *Earth-Science Reviews*, 71–93.
- McDonnell, G., Russell, A.D., 1999, Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, 147–179, doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- McMahon, P.B., Chapelle, F.H., 2008, Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems: *Ground Water*, v. 46, 259–271, doi: 10.1111/j.1745-6584.2007.00385.x.
- Ministério da Saúde, 2011, Portaria no 2914, de 12 de dezembro de 2011: Brasil, *Diário Oficial da União*, 1–38.
- Morton, H.E., 1950, The relationship of concentration and germicidal efficiency of ethyl alcohol: *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 53, 191–196, doi: 10.1111/j.1749-6632.1950.tb31944.x.
- Müller, J.A., Rosner, B.M., Von Abendroth, G., Meshulam-Simon, G., McCarty, P.L., Spormann, A.M., 2004, Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, 4880–4888, doi: 10.1128/AEM.70.8.4880-4888.2004.

- Nammoura Neto, G.M., 2017, Tese de Doutorado. “Desenvolvimento e validação de método para a identificação de micro-organismos metabolicamente ativos em biofilmes de amostras ambientais através da análise de rRNA 16S”: Universidade de São Paulo, 203p.
- Nijenhuis, I., Kuntze, K., 2016, Anaerobic microbial dehalogenation of organohalides-state of the art and remediation strategies: *Current Opinion in Biotechnology*, v. 38, 33–38, doi: 10.1016/j.copbio.2015.11.009.
- Pankow, J.F., Cherry, J.A., 1996, Dense chlorinated solvents and other DNAPLs in groundwater: History, behavior, and remediation: Oregon, Waterloo Press, 552p.
- Patil, S.S., Adetutu, E.M., Ball, A.S., 2014, Microbiology of chloroethene degradation in groundwater: *Microbiology Australia*, 211–214.
- Peacock, A., Davis, G., White, D., 2004, In Situ Microcosms (ISMs) - Biotrap (Methods of sampling microbial communities and apparatus therefore) - *MICROBIAL INSIGHTS*, 17p.
- Pino, D.S., 2015, Processo FAPESP 15/02474-5 - “Aplicação do método Discrete Fracture Network para definição do modelo conceitual hidrogeológico do aquífero fraturado da região de Jurubatuba, São Paulo”, disponível em <http://bv.fapesp.br/pt/bolsas/158491/aplicacao-do-metodo-discrete-fracture-network-para-definicao-do-modelo-conceitual-hidrogeologico-do/>.
- Prest, E.I., Hammes, F., Köttsch, S., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S., 2013, Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method: *Water Research*, v. 47, 7131–7142, doi: 10.1016/j.watres.2013.07.051.
- Rebouças, A.C., 1992, Condições de uso e proteção das águas subterrâneas: ABAS, ABGE, SBG/SP, Sem. Probl. Geológ. Geotécnicos na Região Metropolitana de São Paulo. Atas, 77–88.
- Reddy, C.A., Beveridge, T.J., Breznak, J.A., Marzluf, G., 2007, Methods for general and molecular microbiology: American Society for Microbiology Press, 1069p.
- Riccomini, C., 1989, O rift continental do sudeste do Brasil - Tese de doutoramento: Universidade de São Paulo, 319p, disponível em http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/44/44136/tde-18032013-105507/publico/Riccominic_doutorado.pdf.
- Riccomini, C., Coimbra, A.M., Takiya, H., 1992, Tectônica e sedimentação na Bacia de São Paulo: Seminário Problemas Geológicos e Geotécnicos na Região Metropolitana de São Paulo, 21–45.
- Riccomini, C., Sant’Anna, L.G., Ferrari, A.L., 2004, Evolução Geológica Do Rift Continental Do Sudeste Do Brasil, in *Geologia do Continente Sul - Americano - Evolução da Obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*, 383–405.
- Richardson, R.E., 2013, Genomic insights into organohalide respiration: *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, 498–505, doi: 10.1016/j.copbio.2013.02.014.
- Ritalahti, K.M., Amos, B.K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S.S., Löffler, F.E., 2006, Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple Dehalococcoides strains: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, 2765–2774, doi: 10.1128/AEM.72.4.2765-2774.2006.

- Ritalahti, K.M., Hatt, J.K., Lugmayr, V., Henn, K., Petrovskis, E.A., Ogles, D.M., Davis, G.A., Yeager, C.M., Lebrón, C.A., Löffler, F.E., 2010, Comparing On-site to off-site biomass collection for dehalococcoides biomarker gene quantification to predict in situ chlorinated ethene detoxification potential: *Environmental Science & Technology*, v. 44, 5127–5133, doi: 10.1021/es100408r.
- Ritalahti, K.M., Hatt, J.K., Petrovskis, E., Löffler, F.E., 2010, Groundwater Sampling for Nucleic Acid Biomarker Analysis, in Smyth, T.J.P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., and Banat, I.M. eds., *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, v. 5, 3407–3418, doi: 10.1007/978-3-540-77587-4.
- Schneider, R.P., Oliveira, L. de, 2013, PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO (POP) - Montagem de microcosmos anaeróbios da Rede PROSAB Microbiologia para o Saneamento Básico, 27p.
- SERVMAR Serviços Técnicos Ambientais, 2013, Relatório de Investigação Detalhada Complementar - MA/12517/12/DSP, 843p.
- SLMB, 2012, Technical Report. Analysis Method 333.1 - Determining the total cell count and ratios of high and low nucleic acid content cells in freshwater using flow cytometry, in *Swiss food book*, Switzerland. Veal, 1–31.
- SMA - Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2017, RESOLUÇÃO SMA No 11, de 08-02- 2017. Dispõe sobre a definição das regiões prioritárias para a identificação de áreas contaminadas: São Paulo, Diário Oficial do Estado de São Paulo. edição no 127(28) do dia 10/02/2017, 43-47, 53p.
- SRC Inc., 2013, PHYSPROP DATABASE: SRC's Fate Pointer File, disponível em <http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp> (acesso em agosto de 2016).
- Staley, James T; Konopka, A., 1985, Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats: *Annual Review of Microbiology*, v. 39, 321–346.
- Sterling, S.N., Parker, B.L., Cherry, J. a., Williams, J.H., Lane, J.W., Haeni, F.P., 2005, Vertical cross contamination of trichloroethylene in a borehole in fractured sandstone: *Ground Water*, v. 43, 557–573, doi: 10.1111/j.1745-6584.2005.0087.x.
- Tobiszewski, M., Namieśnik, J., 2012, Abiotic degradation of chlorinated ethanes and ethenes in water: *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, 1994–2006, doi: 10.1007/s11356-012-0764-9.
- US EPA - United States Environmental Protection Agency, 2017a, Integrated Risk Information System (IRIS): ORD Assessment, National Center for Environmental, disponível em <http://www.epa.gov/iris/index.html> (acesso em outubro de 2017).
- US EPA - United States Protection Agency, 2017b, Regional Screening Levels (RSLs) - Generic Tables, disponível em <https://www.epa.gov/risk/regional-screening-levels-rsls-generic-tables-june-2017> (acesso em outubro de 2017).
- Větrovsky, T.Š., Baldrian, P., 2013, The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses: *PLoS ONE*, v. 8, 10p, doi: 10.1371/journal.pone.0057923.
- Vianna, M.M.G.R., 2001, Dissertação de Mestrado: “Estudo em escala de laboratório da adsorção de componentes orgânicos do vinhoto em argila organofílica”: Universidade de São Paulo, 89p.

- Vidali, M., 2001, Bioremediation: an overview: *Biotechnology*, v. 10, 7p.
- Vogel, T.M., Criddle, C.S., McCarty, P.L., 1987, Transformations of halogenated aliphatic compounds: Oxidation, reduction, substitution, and dehydrohalogenation reactions occur abiotically or in microbial and mammalian systems: *Environmental Science and Technology*, v. 21, 722–736, doi: 10.1021/es00162a001.
- Vogel, T.M., McCarty, P.L., 1985, Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, 1080–1083.
- Wei, Y., Reavis, J., Meadows, C., Woung, L., Greenlee, J., 1998, Are you reporting valid TOC numbers? The importance of analytical methods and NOM characteristics in TOC reporting, in *Proceedings of 1998 Water Quality Technology Conference*, Houston, 10p, disponível em <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/toc/app17.pdf> (acesso em janeiro de 2017).
- Wiedemeier, T.H., Rifai, H.S., Newell, C.J., Wilson, J.T., 1999, *Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface*: New York, John Wiley & Sons, 632 p., doi: 10.1016/S0169-7722(99)00099-6.
- Wiedemeier, T., Swanson, M.A., Moutoux, D.E., Kinzie Gordon, E., Wilson, J.T., Wilson, B.H., Kampbell, D.H., Hass, Patrick E., Miller, R.N., Hansen, J.E., Chapelle, F.H., 1998, *Technical Protocol for Evaluating Natural Attenuation of Chlorinated Solvents in Ground Water - EPA/600/R-98/128*: Washington, D.C., 248 p.
- Wild, A., Hermann, R., Leisinger, T., 1997, Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene: *Biodegradation*, v. 7, 507–511, doi: 10.1007/BF00115297.
- Williams, J., Koppmann, R., 2007, Volatile Organic Compounds in the Atmosphere: An Overview, in *Volatile Organic Compounds in the Atmosphere*, 1–32, doi: 10.1002/9780470988657.ch1.

APÊNDICE A – ESQUEMA DE ANÁLISE DE TOC/ NPOC NO EQUIPAMENTO SHIMADZU

Carbono Orgânico Total (TOC) solo

Equipamento TOC-L acoplado a módulo de sólidos SSM-5000A da Shimadzu, com gás oxigênio de alta pureza, pressão de 200kpa e vazão de 0,6 L/min. A calibração das curvas de solo utiliza glicose PA com cinco pontos de concentração, que abrange o intervalo de concentração esperado para a amostra.

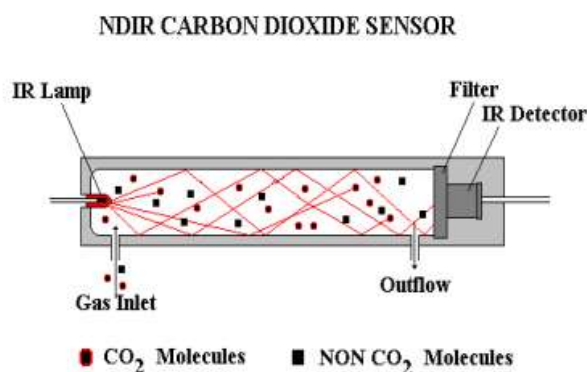


Figure 1: NDIR CARBON DIOXIDE SENSOR

Fonte:(Wei *et al.*, 1998)

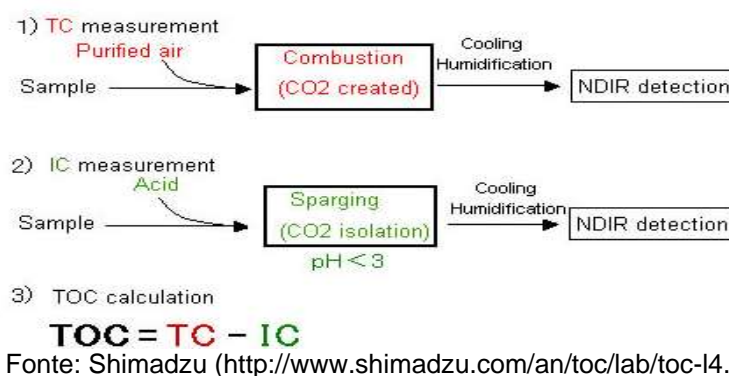
Ocorre a queima do carbono orgânico da amostra, gerando CO₂, a 900°C e 200°C, para carbono total (TC) e carbono inorgânico (IC), respectivamente. O CO₂ absorve luz em um comprimento de onda específico (4,26 μm) e um filtro permite a passagem apenas desse comprimento de onda para o detector de infravermelho não dispersivo (NDIR). Uma fonte de infravermelho passa pelo filtro e é absorvido pelo CO₂ difundido na câmara. A intensidade de luz com comprimento de onda de 4.26 μm que chega ao detector é inversamente proporcional à concentração de CO₂ (Wei *et al.*, 1998). A concentração de carbono orgânico total (TOC) é obtida pela diferença entre o TC e o IC (Vianna, 2001).

Carbono Orgânico Total (TOC) na água

A água é analisada com auxílio de um amostrador automático Autosampler ASI-L acoplado ao TOC-L Shimadzu modelo 5000A, cujo gás de arraste é ar sintético com filtro de antes da entrada no equipamento.

A solução padrão é preparada com concentração de carbonato e biftalato e diluições de cinco pontos, realizadas automaticamente a partir de programação no próprio equipamento, gerando curvas que contemplem os intervalos de interesse.

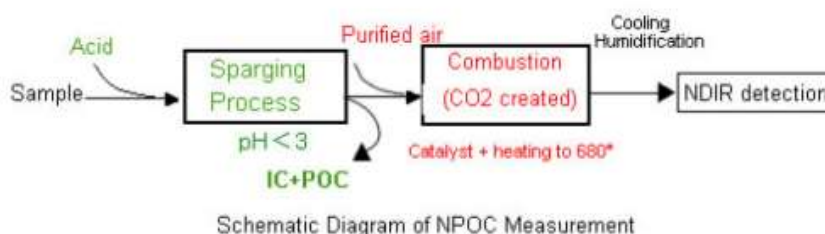
Há duas portas de entrada de amostra no equipamento. Em uma das portas a água é direcionada para o vaso reacional com ácido H_3PO_4 , gerando CO_2 , o qual passa por um filtro de membrana que retém os sólidos remanescentes. A outra porta direciona para um forno de $680^\circ C$, gerando CO_2 por queima, que passa por um filtro de halogênio, como indicado no esquema abaixo:



A amostra é captada por meio de uma seringa de sucção, com auxílio do ar sintético, que carrega o gás para o detector NDIR.

O equipamento apresenta a média de três leituras consecutivas. A concentração de carbono orgânico total é obtida pela diferença entre o TC e o IC.

O método da diferença só pode ser aplicado quando o TIC é menor do que o TOC (CEN - European Committee for Standardization, 1997). Assim, é recomendável utilizar o NPOC (*non purgeable organic carbon*) para análise de água potável. Essa análise envolve a acidificação da amostra para pH 2, para que o CO_2 originado de carbonatos e bicarbonatos sejam removidos pelo gás de arraste. Os compostos orgânicos não voláteis são oxidados a CO_2 (alta temperatura) e detectados pelo NDIR. Abaixo o esquema de análise de NPOC:



Fonte: Shimadzu (<http://www.shimadzu.com/an/toc/lab/toc-l4.html>).

APÊNDICE B – SQI, LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E METODOLOGIAS DE ANÁLISE

| | CAS | Substâncias | Unidade | Limite de Quantificação mínimo | Metodologia de Referência | |
|-------------|------------|------------------------|---------|--------------------------------|---------------------------|---|
| Gases Leves | 74-82-8 | Metano | mg/L | 0,06 | GC/FID | USEPA REG.01– NEW ENGLAND - NATATTEN.WPD:2002 |
| | 74-84-0 | Etano | mg/L | 0,06 | GC/FID | USEPA REG.01– NEW ENGLAND - NATATTEN.WPD:2002 |
| | 74-85-1 | Eteno | mg/L | 0,06 | GC/FID | USEPA REG.01– NEW ENGLAND - NATATTEN.WPD:2002 |
| VOC | 75-01-4 | Cloreto de Vinila | µg/L | 1,50 | GC/MS | USEPA 8260C:2006 |
| | 156-60-5 | Trans-1,2-Dicloroeteno | µg/L | 3,00 | GC/MS | USEPA 8260C:2006 |
| | 156-59-2 | Cis-1,2-Dicloroeteno | µg/L | 3,00 | GC/MS | USEPA 8260C:2006 |
| | 79-19-6 | Tricloroeteno | µg/L | 3,00 | GC/MS | USEPA 8260C:2006 |
| | 127-18-4 | Tetracloroeteno | µg/L | 3,00 | GC/MS | USEPA 8260C:2006 |
| Inorgânicos | 7439-89-6 | Ferro Dissolvido | µg/L | 50,00 | ICP-OES | USEPA 6010C:2007 |
| | 7439-96-5 | Manganês Dissolvido | µg/L | 10,00 | ICP-OES | USEPA 6010C:2007 |
| | 18785-72-3 | Sulfato Total | µg/L | 30,00 | IC | USEPA 9056A:2007 |
| | 001-07-7 | Nitrato (como N) | µg/L | 15,00 | IC | USEPA 9056A:2007 |
| | 18496-25-8 | Sulfeto | mg/L | 0,002 | IC | SMEWW - 22nd Ed. 2012 - 4500S2-D |

GC - cromatografia a gás FID - ionização de chama, MS: espectrometria de massa; IC - Cromatografia de Íons; ICP-OES - Espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido. Laboratório Analytical Technology.

| | Substâncias | Limite de Quantificação mínimo | Unidade | Equipamento utilizado nos ensaios | |
|---------|--|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------|----------------|
| Cátions | Li+ | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-900 |
| | Na+ | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-900 |
| | NH ₄ ⁺ | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-900 |
| | K+ | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-900 |
| | Mg ²⁺ | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-900 |
| | Ca ²⁺ | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-900 |
| ânions | F- | 0,01 | mg/L | IC | Dionex ICS-90 |
| | Cl- | 0,01 | mg/L | IC | Dionex ICS-90 |
| | NO ₂ ⁻ | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-90 |
| | Br- | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-90 |
| | NO ₃ ⁻ | 0,01 | mg/L | IC | Dionex ICS-90 |
| | HPO ₄ ²⁻ | 0,001 | mg/L | IC | Dionex ICS-90 |
| | SO ₄ ²⁻ | 0,01 | mg/L | IC | Dionex ICS-90 |
| | [CaCO ₃] mg/dm ³ | alcalinidade | mg/dm ³ | titulometria | |

IC - Cromatografia de Íons. Laboratório CEPAS Igc-USP

APÊNDICE C – Testes de filtração e coleta de amostras para ensaios biológicos

Foto 1 – Teste de filtração de amostra em laboratório



Foto 2 – Teste de filtração de amostra em campo



Foto 3 – Filtro sterivex® enviado pelo laboratório, para filtração em campo

Foto 4 – Filtração de amostra do poço PM-11B, com bomba de bexiga *SamplePro* e filtro sterivex®

Foto 5 – Filtração de amostra do CMT-07, com bomba peristáltica e filtro sterivex®



Foto 6 – Filtros identificados com volume filtrado e ponto de coleta, mantidos no gelo



APÊNDICE D – FOTOS DE MONTAGEM DOS MICROCOSMOS

Foto 7 – Frascos de penicilina esterelizados, para montagem dos microcosmos



Foto 8 – Rocha alterada utilizada nos microcosmos



Foto 9 - Pesagem da rocha (desagregada)



Foto 10 – Adição do sedimento nos frascos de penicilina



Foto 11 – Frascos esterelizados novamente após adição do sedimento

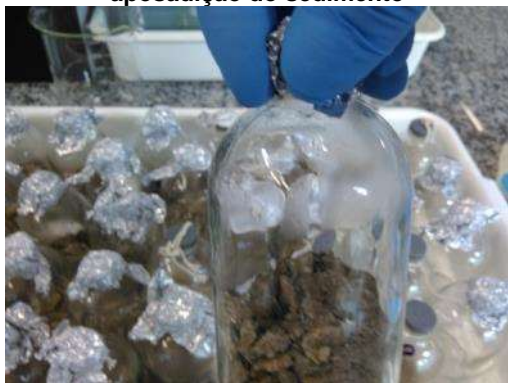


Foto 12 – Frascos levados a campo para adição de água subterrânea



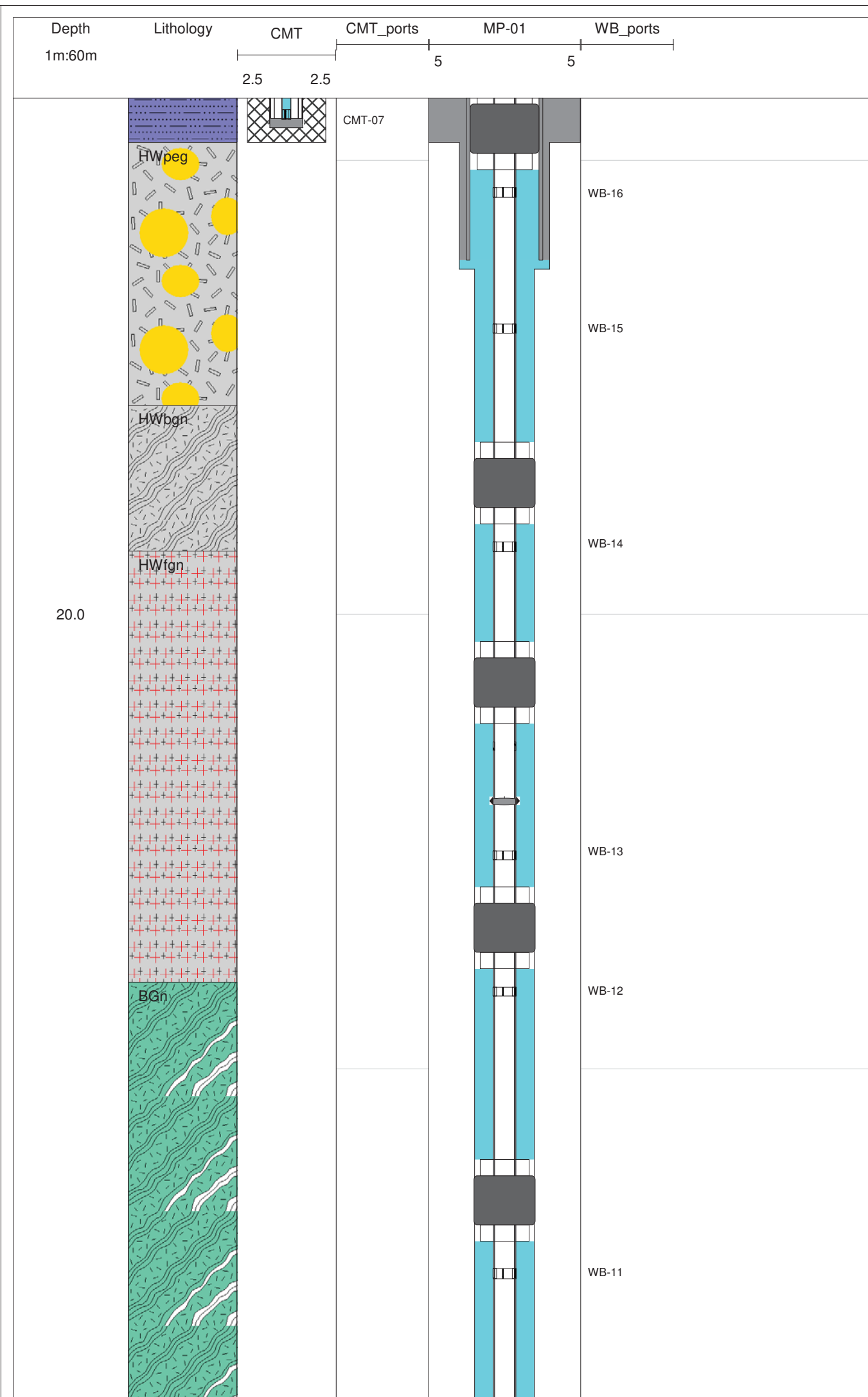
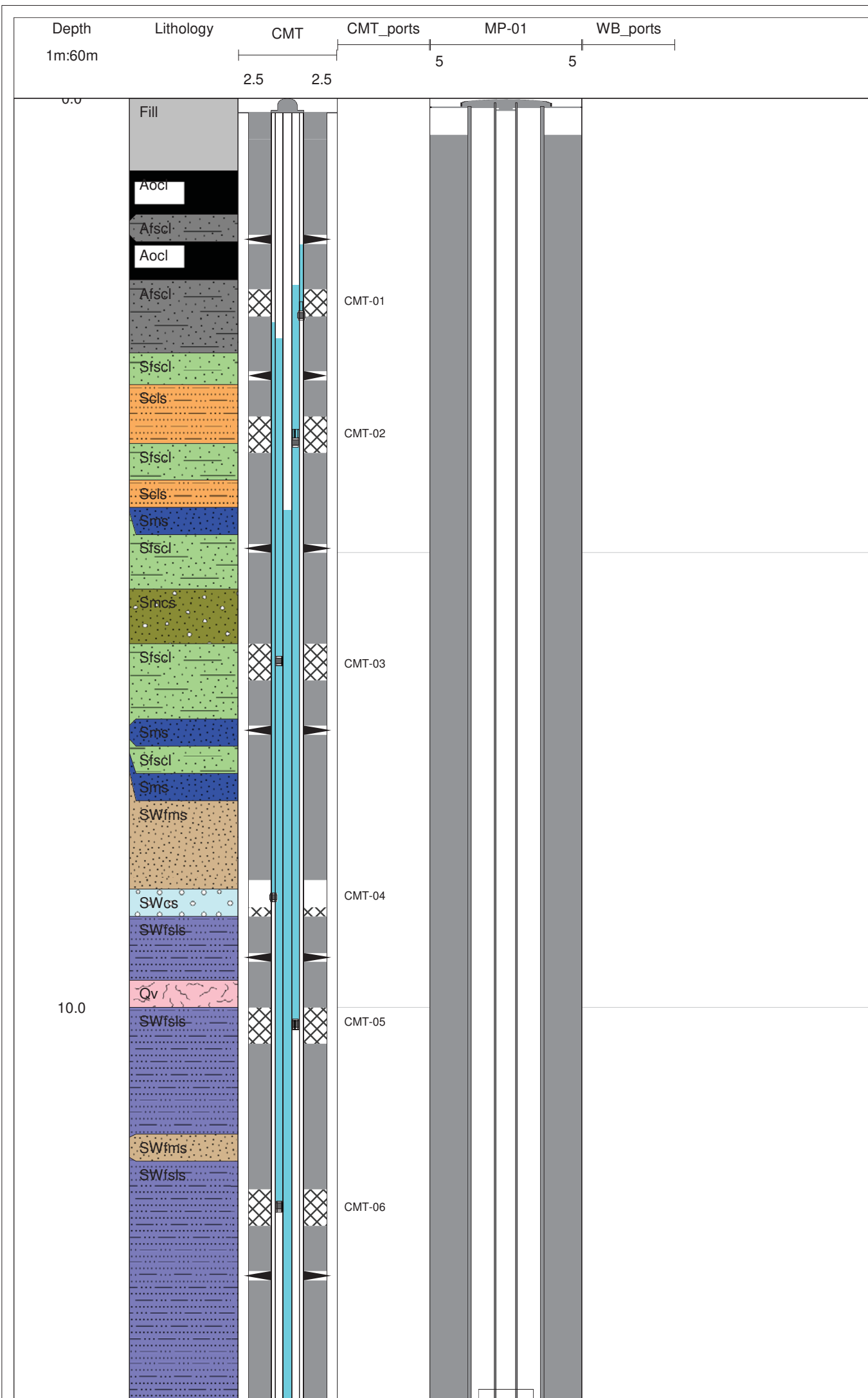
Foto 13 – Adição de água do poço PM-11B

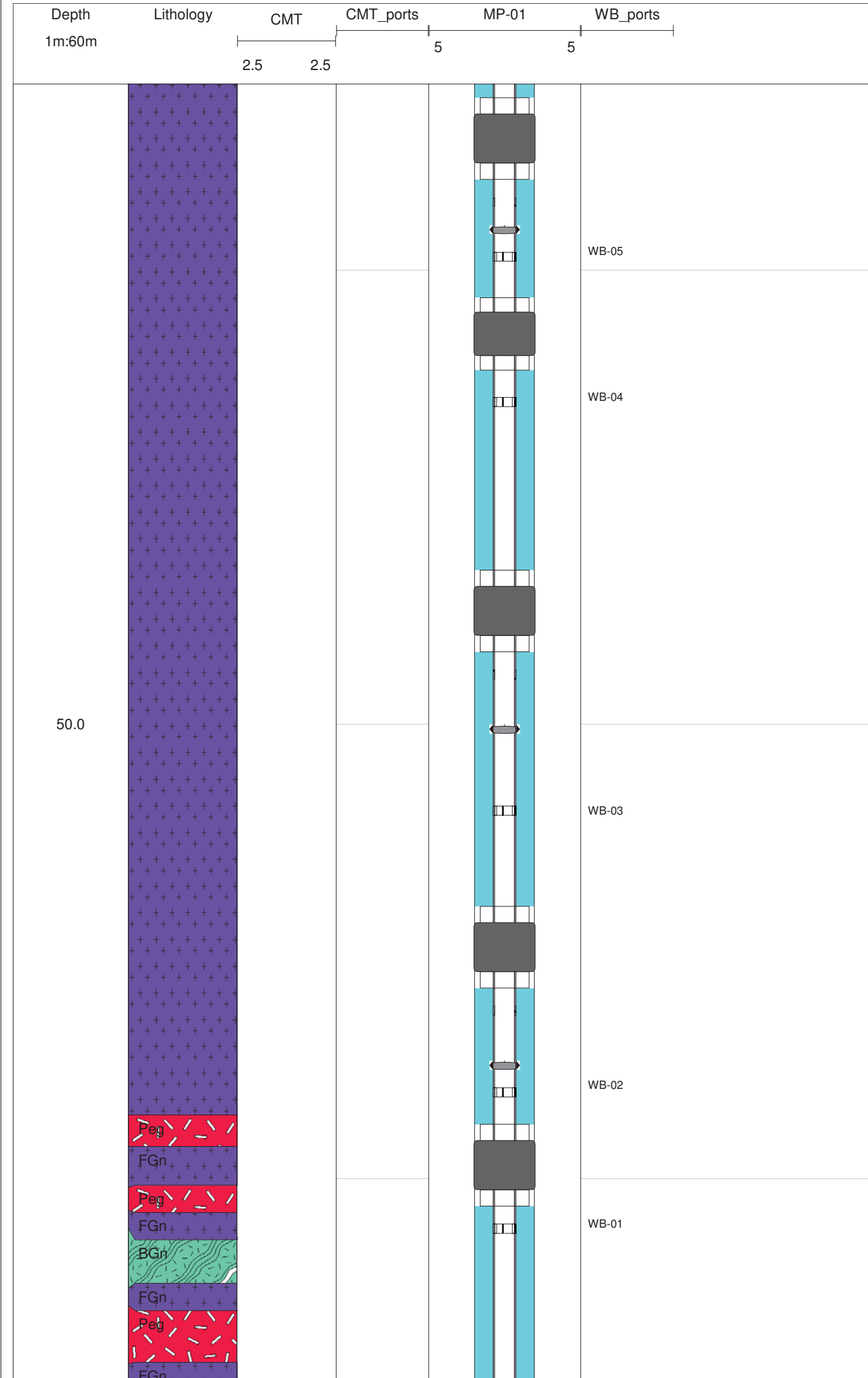
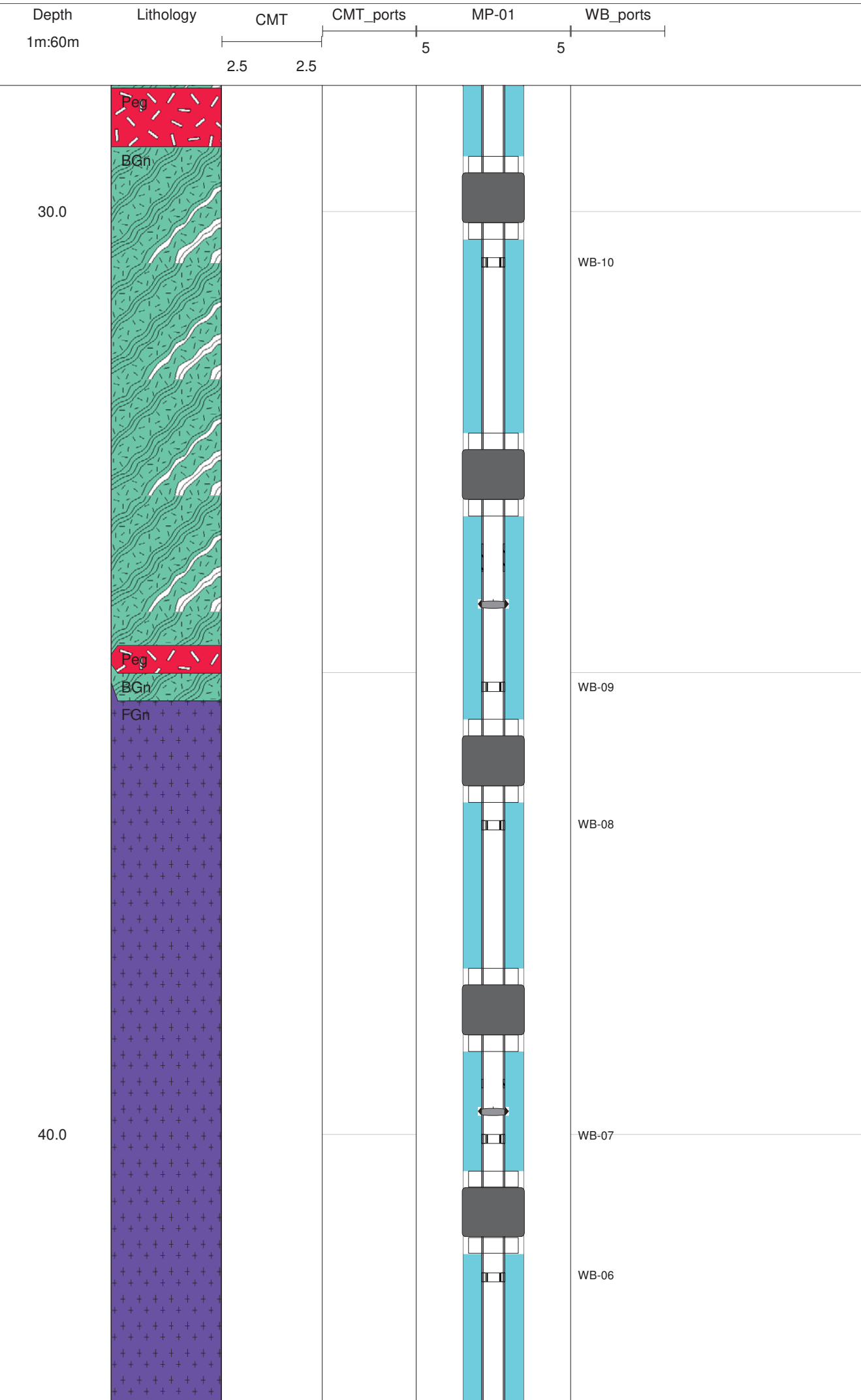


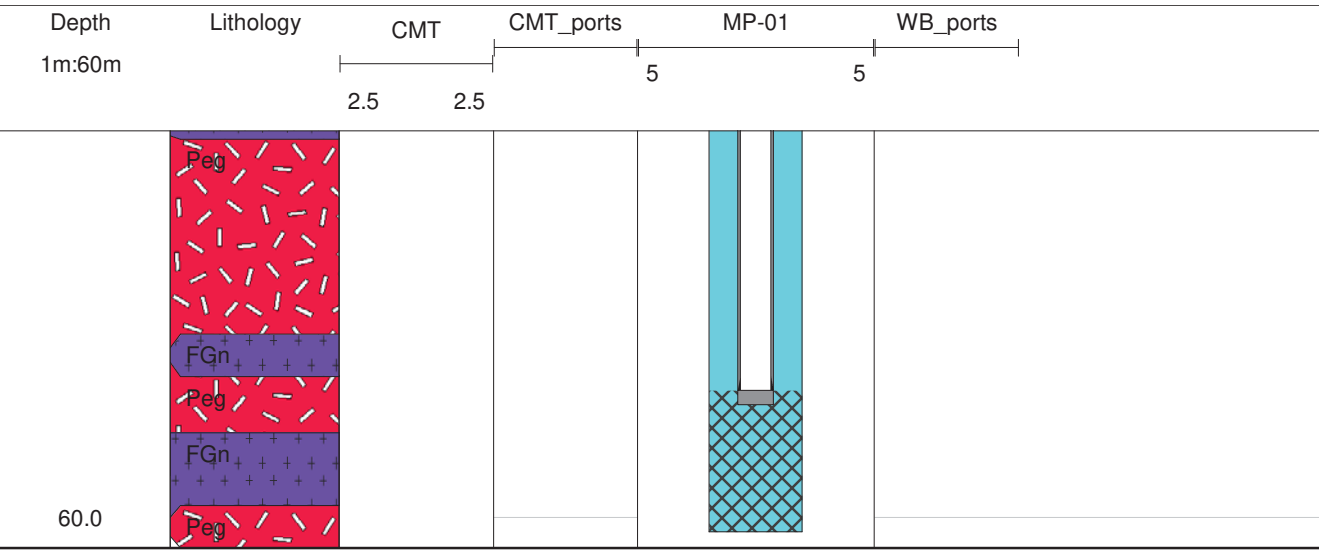
Foto 14 – Adição de resazurina e água ultrapura MiliQ® no controle negativo, em laboratório



APÊNDICE E – Perfis litológicos dos sistemas multiníveis CMT e WB



















PROJETO JURUBATUBA

Litologia MP-01



-  Fill - Fill
-  Aocl - Alluvial deposit - organic clay
-  Afsccl - Alluvial deposit - fine sand, clayey matrix
-  Sfsccl - Saprolite - fine sand, clayey matrix
-  Scsl - Saprolite - clayey sand
-  Sms - Saprolite - medium sand
-  Smcs - Saprolite - medium to coarse sand
-  SWcs - Soft weathered bedrock - coarse sand
-  SWfsls - Soft weathered bedrock - fine silty sand, clayey matrix
-  Qv - Quartz vein
-  SWfms - Soft weathered bedrock - fine to medium sand
-  HWpeg - Hard weathered bedrock - pegmatite
-  HWbgn - Hard weathered bedrock - banded gneiss
-  HWfgn - Hard weathered bedrock - fine gneiss
-  Peg - Fresh bedrock - pegmatite
-  BGn - Fresh bedrock - banded gneiss
-  FGn - Fresh bedrock - fine gneiss

APÊNDICE F – TABELAS COM RESULTADOS DE VOC E GASES NAS CAMPANHAS DE AMOSTRAGEM, PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ESTABILIZADOS E CONCENTRAÇÕES NOS MICROCOSMOS

| nº CAS | | TOTAL | 75-01-4 | 156-59-2 | 156-60-5 | 75-35-4 | 79-01-6 | 127-18-4 | 67-66-3 | 75-34-3 | 71-55-6 | 108-88-3 | Limite de quantificação (LQ) |
|--------------------|----------|-----------|------------------|------------------|---------------|---------------|-----------------|------------------|---------|---------------|-----------|----------|------------------------------|
| SQI | | | CV | cDCE | tDCE | 1,1-DCE | TCE | PCE | CL | 1,1-DCA | 1,1,1-TCA | Tolueno | |
| VOR (CETESB, 2016) | | - | 2,0 | 50,0 | 50,0 | 30,0 | 20,0 | 40,0 | 300,0 | 53,0 | 2000,0 | 700,0 | |
| Poço | Data | ug/L | ug/L | ug/L | ug/L | ug/L | ug/L | ug/L | ug/L | ug/L | ug/L | ug/L | |
| PM11 | 05/09/17 | <LQ | <1,50 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| PM11A | 05/09/17 | 70.864,20 | 14,00 | 920,90 | <3,00 | <3,00 | 1.713,00 | 68.083,10 | 23,90 | <3,00 | 35,00 | 74,30 | 3,00 |
| PM11B | 05/09/17 | 54.971,20 | 692,40 | 6.143,50 | 32,90 | 40,20 | 3.018,40 | 44.664,50 | 43,30 | 100,30 | <3,00 | 235,70 | 3,00 |
| PM11BD | 05/09/17 | 48.805,10 | 824,20 | 6.390,80 | 40,50 | 45,60 | 1.933,70 | 39.096,80 | 54,60 | 116,60 | <3,00 | 302,30 | 3,00 |
| CMT02 | 25/08/16 | 2.489,00 | 1.055,70 | 1.391,20 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 42,10 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| CMT03 | 26/08/16 | 16.089,20 | 1.583,10 | 14.460,40 | 11,20 | 20,90 | <3,00 | 13,60 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| CMT04 | 26/08/16 | 76.656,10 | 5.468,80 | 68.731,10 | 28,60 | 163,50 | 411,90 | 1.852,20 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| CMT05 | 29/08/16 | 65.825,90 | 526,20 | 65.223,10 | 19,00 | 57,60 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| CMT06 | 30/08/16 | 19.771,30 | 2.675,00 | 16.895,00 | 21,70 | 44,20 | 27,50 | 107,90 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| CMT07 | 30/08/16 | 15.280,30 | 1.653,30 | 13.557,90 | 22,60 | 46,50 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| CMT07D | 30/08/16 | 14.330,80 | 1.440,30 | 12.830,60 | 21,10 | 38,80 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB16 | 16/09/16 | 3.100,70 | 128,60 | 2.972,10 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB15D | 16/09/16 | 24.609,70 | 2.224,30 | 22.137,70 | 58,50 | 23,30 | <3,00 | 18,10 | <3,00 | 90,70 | <3,00 | 57,10 | 3,00 |
| WB15 | 16/09/16 | 31.682,00 | 2.066,00 | 29.264,40 | 103,60 | 28,30 | <3,00 | 39,30 | <3,00 | 96,90 | <3,00 | 83,50 | 3,00 |
| WB14 | 15/09/16 | 5.087,30 | 886,90 | 4.146,70 | 11,30 | <3,00 | <3,00 | 24,60 | <3,00 | 17,80 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB13 | 15/09/16 | 683,00 | 626,20 | 56,80 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB12 | 15/09/16 | 8.430,60 | 403,60 | 3.810,30 | <3,00 | <3,00 | 533,50 | 3.657,90 | <3,00 | 25,30 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB11 | 13/09/16 | 1.768,20 | 154,70 | 1.613,50 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB10 | 13/09/16 | 3.307,60 | 434,50 | 2.873,10 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB09 | 12/09/16 | 1.983,00 | 96,10 | 1.663,10 | <3,00 | <3,00 | 75,40 | 148,40 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB08 | 13/09/16 | 528,30 | 45,50 | 482,80 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB07 | 12/09/16 | 4.769,30 | 199,50 | 4.538,20 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 21,30 | <3,00 | 10,30 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB06 | 09/09/16 | 1.130,10 | 64,40 | 1.065,70 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB05 | 09/09/16 | 825,30 | 332,10 | 493,20 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB04 | 09/09/16 | 573,00 | 58,80 | 514,20 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB03 | 09/09/16 | 6.887,60 | 162,40 | 4.030,50 | <3,00 | <3,00 | 416,70 | 2.264,40 | <3,00 | 13,60 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB02 | 08/09/16 | 5.518,80 | 833,20 | 3.988,90 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 683,10 | <3,00 | 13,60 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB01 | 08/09/16 | 9.730,60 | 1.043,20 | 5.495,80 | <3,00 | 18,80 | <3,00 | 3.144,30 | <3,00 | 28,50 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| PM11B | 29/11/16 | 65.980,70 | 995,60 | 5.437,10 | 18,10 | 19,20 | 3.385,30 | 55.748,90 | 24,00 | 63,40 | <3,00 | 289,10 | 3,00 |
| CMT07 | 02/12/16 | 51.290,70 | 24.192,30 | 25.505,20 | 32,80 | 40,60 | 525,40 | 994,40 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| PM-11 | 21/03/17 | < LQ | <1,50 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| PM11A | 22/03/17 | 36.186,60 | <1,50 | 193,00 | <3,00 | <3,00 | 577,70 | 35.380,60 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 35,30 | 3,00 |
| PM11B | 23/03/17 | 39.738,20 | 197,20 | 3.927,80 | 12,00 | 14,40 | 1.078,70 | 34.386,60 | 26,10 | 33,00 | <3,00 | 62,40 | 3,00 |
| CMT07 | 23/03/17 | 10.378,70 | 5.102,20 | 4.858,80 | 19,30 | 13,50 | 97,30 | 267,40 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 20,20 | 3,00 |
| WB15 | 03/04/17 | 7.123,60 | 1.306,50 | 5.600,40 | 28,00 | <3,00 | 11,50 | 53,60 | <3,00 | 59,60 | <3,00 | 64,00 | 3,00 |
| WB14 | 03/04/17 | 4.828,40 | 634,50 | 4.161,20 | 12,90 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 19,80 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB12 | 04/04/17 | 5.386,60 | 272,80 | 2.307,10 | 13,30 | <3,00 | 389,30 | 2.372,50 | <3,00 | 31,60 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB09 | 04/04/17 | 814,60 | 83,10 | 731,50 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB07 | 04/04/17 | 2.826,80 | 64,40 | 2.446,80 | <3,00 | <3,00 | 81,20 | 221,40 | <3,00 | 13,00 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |
| WB03 | 04/04/17 | 4.162,00 | 110,20 | 2.640,60 | <3,00 | 12,00 | 311,40 | 1.071,00 | <3,00 | 16,80 | <3,00 | <3,00 | 3,00 |

<x,xx - Menor que o limite de quantificação (LQ) laboratorial.

x,xx Acima do VOR (Valor Orientador de Referência) da CETESB.

sufixo D: duplicata. CV: cloreto de vinila; cDCE: cis-1,2 Dicloroeteno; tDCE: trans-1,2-Dicloroeteno; 1,1-DCE: 1,1-dicloroeteno; TCE - tricloroeteno; PCE: tetracloroeteno; CL: clorofórmio; 1,1-DCA: 1,1-dicloroetano; 1,1,1-TCA: 1,1,1-tricloroetano.

| nº CAS | | 74-82-8 | 74-84-0 | 74-85-1 | Limite de quantificação (LQ) |
|--------|----------|---------|---------|---------|------------------------------------|
| Poço | Data | Metano | Etano | Eteno | |
| | | µg/L | µg/L | µg/L | |
| CMT02 | 25/08/16 | 566 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| CMT03 | 26/08/16 | 149 | < 60,0 | 175 | 60 |
| CMT04 | 26/08/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| CMT05 | 29/08/16 | 273 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| CMT06 | 30/08/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| CMT07 | 30/08/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| CMT07D | 30/08/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| PM11 | 05/09/17 | 476 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| PM11A | 05/09/17 | 89 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| PM11B | 05/09/17 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| PM11BD | 05/09/17 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB16 | 16/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB15D | 16/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB15 | 16/09/16 | 285 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB14 | 15/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB13 | 15/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB12 | 15/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB11 | 13/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB10 | 13/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB09 | 12/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB08 | 13/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB07 | 12/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB06 | 09/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB05 | 09/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB04 | 09/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB03 | 09/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB02 | 08/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| WB01 | 08/09/16 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |
| PM-11 | 21/03/17 | < 60,0 | < 60,0 | < 60,0 | 60 |

| Parâmetros físico-químicos estabilizados medidos durante a coleta de amostras de água subterrânea | | | | | | | |
|---|--------------|----------|------|------|--------|------|-------|
| Amostra | Profundidade | Data | NA | pH | ORP | OD | CE |
| | | | m | UpH | mV | mg/L | µS/cm |
| CMT02 | 3,70 | 25/08/16 | 2,92 | 6,26 | -63,3 | 4,48 | 2031 |
| CMT04 | 8,80 | 26/08/16 | 3,59 | 6,55 | -95,4 | 1,31 | 1405 |
| CMT03 | 6,20 | 29/08/16 | 2,93 | 7,20 | -115,8 | 1,00 | 4435 |
| CMT05 | 10,20 | 29/08/16 | 2,90 | 6,42 | -70,3 | 0,74 | 1836 |
| CMT06 | 12,20 | 30/08/16 | 3,28 | 6,73 | -109,3 | 0,43 | 2357 |
| CMT07 | 14,50 | 31/08/16 | 4,92 | 6,96 | -113,0 | 0,80 | 2637 |
| PM11 | 3,80 | 06/09/16 | 2,84 | 6,17 | -41,4 | 0,46 | 833 |
| PM11A | 8,81 | 05/09/16 | 3,05 | 5,49 | 93,0 | 0,12 | 283 |
| PM11B | 14,25 | 06/09/16 | 4,03 | 5,77 | 62,7 | 0,07 | 511 |
| WB15 | 16,80 | 16/09/16 | 3,90 | 6,80 | -94,2 | 2,53 | 707 |
| WB14 | 19,20 | 15/09/16 | 4,08 | 6,53 | -76,5 | 5,09 | 702 |
| WB13 | 22,60 | 15/09/16 | 4,70 | 6,55 | -71,4 | 4,75 | 677,2 |
| WB12 | 24,10 | 15/09/16 | 4,98 | 6,10 | -5,5 | 5,16 | 325,3 |
| WB11 | 27,20 | 13/09/16 | 4,91 | 6,07 | -34,0 | 6,21 | 316,2 |
| WB10 | 30,50 | 13/09/16 | 5,20 | 6,73 | -48,6 | 4,30 | 265,2 |
| WB09 | 35,10 | 12/09/16 | 5,11 | 6,22 | -43,3 | 3,85 | 319,2 |
| WB08 | 36,60 | 13/09/16 | NA | 6,72 | -48,7 | 6,10 | 180 |
| WB07 | 40,00 | 12/09/16 | 5,31 | 6,03 | -32,2 | 5,90 | 865 |
| WB06 | 41,50 | 09/09/16 | 5,46 | 6,34 | -40,2 | 6,34 | 290,1 |
| WB05 | 44,80 | 09/09/16 | 5,33 | 7,13 | -74,2 | 5,70 | 299,5 |
| WB04 | 46,40 | 09/09/16 | 5,48 | 6,58 | -56,6 | 3,33 | 97,4 |
| WB03 | 50,90 | 09/09/16 | 5,43 | 6,68 | -24,5 | 4,80 | 546 |
| WB02 | 54,00 | 08/09/16 | 5,22 | 6,88 | -22,4 | 3,01 | 791 |
| WB01 | 55,50 | 08/09/16 | 5,31 | 6,63 | -43,2 | 5,88 | 668 |
| PM11B | 14,25 | 29/11/16 | 4,60 | 5,64 | 74,6 | 0,68 | 480 |
| CMT07 | 14,50 | 02/12/16 | 3,70 | 6,69 | -85,2 | 0,74 | 1093 |
| PM11B | 14,25 | 08/02/17 | 5,90 | 5,73 | 23,0 | 0,07 | 548,7 |
| PM11 | 3,80 | 21/03/17 | 2,28 | 6,06 | -72,0 | 0,00 | 1072 |
| PM11A | 8,81 | 22/03/17 | 2,40 | 5,49 | 76,5 | 0,08 | 346 |
| PM11B | 14,25 | 23/03/17 | 4,40 | 5,74 | 76,4 | 0,10 | 608 |
| CMT07 | 14,50 | 23/03/17 | 4,00 | 6,86 | -96,8 | 1,22 | 2128 |
| WB15 | 16,80 | 03/04/17 | 3,11 | 6,76 | -80,3 | 1,48 | 754 |
| WB14 | 19,20 | 03/04/17 | 3,29 | 6,70 | -65,0 | 2,21 | 763 |
| WB12 | 24,10 | 04/04/17 | 3,95 | 6,30 | 13,3 | 2,39 | 416 |
| WB09 | 35,10 | 04/04/17 | 4,13 | 6,98 | -38,9 | 1,48 | 121 |
| WB07 | 40,00 | 04/04/17 | 4,07 | 6,20 | -6,0 | 1,22 | 250 |
| WB03 | 50,90 | 04/04/17 | 4,18 | 6,38 | 2,3 | 1,28 | 73 |

pH – potencial hidrogeniônico, ORP – potencial de oxido redução, OD – oxigênio dissolvido, CE – condutividade elétrica, T – temperatura.

| Concentrações de SQI nas triplicatas dos microcosmos (µmol/L) | | | | | | | | |
|---|---------|------------|--------|--------|------|-------|------|--------|
| Microcosmo | Amostra | Data | CV | cDCE | tDCE | IIDCE | TCE | PCE |
| A | A1 | 12/12/2016 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | A2 | 12/12/2016 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | A3 | 12/12/2016 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| B | B1 | 12/12/2016 | 0,00 | 33,16 | 0,00 | 0,00 | 3,44 | 90,45 |
| | B2 | 12/12/2016 | 0,00 | 40,28 | 0,00 | 0,00 | 3,88 | 99,05 |
| | B3 | 12/12/2016 | 0,00 | 35,85 | 0,00 | 0,00 | 3,75 | 124,13 |
| C | C1 | 12/12/2016 | 0,00 | 37,50 | 0,00 | 0,00 | 3,65 | 101,82 |
| | C2 | 12/12/2016 | 0,00 | 37,14 | 0,00 | 0,00 | 3,96 | 117,89 |
| | C3 | 12/12/2016 | 0,00 | 36,31 | 0,00 | 0,00 | 3,88 | 121,96 |
| D | D1 | 12/12/2016 | 0,00 | 42,45 | 0,00 | 0,00 | 4,19 | 123,23 |
| | D2 | 12/12/2016 | 0,00 | 43,79 | 0,00 | 0,00 | 4,34 | 132,33 |
| | D3 | 12/12/2016 | 0,00 | 46,27 | 0,00 | 0,00 | 4,83 | 157,81 |
| B | B1 | 11/01/2017 | 0,00 | 34,89 | 0,00 | 0,00 | 1,88 | 17,49 |
| | B2 | 11/01/2017 | 0,00 | 64,52 | 0,00 | 0,00 | 2,99 | 31,55 |
| | B3 | 11/01/2017 | 0,00 | 38,50 | 0,00 | 0,00 | 2,21 | 31,40 |
| C | C1 | 11/01/2017 | 6,36 | 41,68 | 0,00 | 0,00 | 2,15 | 27,54 |
| | C2 | 11/01/2017 | 6,28 | 37,99 | 0,00 | 0,00 | 2,13 | 31,21 |
| | C3 | 11/01/2017 | 7,48 | 47,12 | 0,00 | 0,00 | 2,59 | 38,50 |
| D | D1 | 11/01/2017 | 0,00 | 57,36 | 0,00 | 0,00 | 2,34 | 28,95 |
| | D2 | 11/01/2017 | 0,00 | 41,98 | 0,00 | 0,00 | 1,98 | 26,93 |
| | D3 | 11/01/2017 | 0,00 | 96,53 | 0,00 | 0,00 | 3,35 | 38,64 |
| B | B1 | 26/01/2017 | 12,20 | 45,41 | 0,00 | 0,00 | 1,90 | 12,15 |
| | B2 | 26/01/2017 | 27,12 | 56,76 | 0,00 | 0,00 | 1,70 | 12,80 |
| | B3 | 26/01/2017 | 48,96 | 106,25 | 0,00 | 0,00 | 3,96 | 57,77 |
| C | C1 | 26/01/2017 | 99,32 | 56,07 | 0,00 | 0,00 | 1,75 | 19,04 |
| | C2 | 26/01/2017 | 102,60 | 65,97 | 0,00 | 0,00 | 2,11 | 32,94 |
| | C3 | 26/01/2017 | 96,44 | 56,58 | 0,00 | 0,00 | 1,87 | 25,58 |
| D | D1 | 26/01/2017 | 19,12 | 50,19 | 0,00 | 0,00 | 1,89 | 13,31 |
| | D2 | 26/01/2017 | 28,08 | 58,57 | 0,00 | 0,00 | 2,04 | 27,50 |
| | D3 | 26/01/2017 | 37,88 | 64,68 | 0,00 | 0,00 | 2,78 | 49,63 |
| B | B1 | 10/02/2017 | 0,00 | 82,94 | 0,00 | 0,00 | 2,38 | 7,99 |
| | B2 | 10/02/2017 | 0,00 | 24,58 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,13 |
| | B3 | 10/02/2017 | 0,00 | 43,15 | 0,00 | 0,00 | 1,85 | 13,81 |
| C | C1 | 10/02/2017 | 7,44 | 28,03 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,09 |
| | C2 | 10/02/2017 | 9,64 | 37,39 | 0,00 | 0,00 | 1,20 | 14,17 |
| | C3 | 10/02/2017 | 7,28 | 29,66 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,86 |
| D | D1 | 10/02/2017 | 0,00 | 67,28 | 0,00 | 0,00 | 2,64 | 12,74 |
| | D2 | 10/02/2017 | 0,00 | 47,50 | 0,00 | 0,00 | 1,59 | 9,74 |
| | D3 | 10/02/2017 | 0,00 | 38,58 | 0,00 | 0,00 | 1,69 | 13,90 |
| B | B1 | 07/03/2017 | 0,00 | 44,15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,07 |
| | B2 | 07/03/2017 | 0,00 | 17,07 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,49 |
| | B3 | 07/03/2017 | 0,00 | 42,94 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,22 |
| C | C1 | 07/03/2017 | 0,00 | 17,30 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 7,09 |
| | C2 | 07/03/2017 | 0,00 | 16,07 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 7,19 |
| | C3 | 07/03/2017 | 0,00 | 14,88 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 6,27 |
| D | D1 | 07/03/2017 | 0,00 | 46,32 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,91 |
| | D2 | 07/03/2017 | 0,00 | 40,93 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,29 |
| | D3 | 07/03/2017 | 0,00 | 41,49 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,32 |
| A | A1 | 31/03/2017 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| B | B1 | 31/03/2017 | 0,00 | 46,34 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,84 |
| | B2 | 31/03/2017 | 0,00 | 29,57 | 0,00 | 0,00 | 0,77 | 2,35 |
| | B3 | 31/03/2017 | 0,00 | 15,14 | 0,00 | 0,00 | 0,60 | 5,25 |
| C | C1 | 31/03/2017 | 0,00 | 16,36 | 0,00 | 0,00 | 0,69 | 5,61 |
| | C2 | 31/03/2017 | 0,00 | 15,04 | 0,00 | 0,00 | 0,57 | 5,16 |
| | C3 | 31/03/2017 | 0,00 | 55,38 | 0,00 | 0,00 | 0,83 | 2,18 |
| A | A2 | 02/06/2017 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| B | B1 | 02/06/2017 | 0,00 | 53,90 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | B2 | 02/06/2017 | 0,00 | 43,44 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | B3 | 02/06/2017 | 0,00 | 75,95 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| A | A3 | 03/07/2017 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| B | B1 | 03/07/2017 | 0,00 | 55,56 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | B2 | 03/07/2017 | 0,00 | 34,12 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | B3 | 03/07/2017 | 0,00 | 74,03 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C | C1 | 03/07/2017 | 6,59 | 13,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,09 |
| | C2 | 03/07/2017 | 6,42 | 12,37 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,03 |
| | C3 | 03/07/2017 | 6,10 | 12,36 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,88 |
| B | B4 | 25/07/2017 | 1,71 | 23,32 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C | C4 | 25/07/2017 | 8,45 | 9,96 | 0,00 | 0,00 | 0,08 | 1,36 |
| A | A1 | 02/08/2017 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| B | B1 | 02/08/2017 | 0,88 | 19,91 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | B2 | 02/08/2017 | 0,93 | 17,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | B3 | 02/08/2017 | 1,43 | 25,84 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C | C1 | 02/08/2017 | 4,59 | 7,70 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,30 |
| C | C2 | 02/08/2017 | 5,00 | 8,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,60 |
| C | C3 | 02/08/2017 | 4,59 | 7,93 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,20 |

*testes em ensaios destrutivos ao longo do experimento foram realizados com alíquotas do microcosmo D. Valores nulos referem-se a amostras sem concentrações quantificadas nas análises químicas.

APÊNDICE G – PROCESSOS REDOX – PLANILHAS
 REDOX.ASSIGNMENT.XLS

Planilha Redox Assignment - amostras de água subterrânea

| Sample ID | Redox Variables | | | | Sulfide (sum of H ₂ S, HS ⁻ , S ²⁻) | | | | Num of Params | General Redox Category | Redox Process | Fe ²⁺ / Sulfide ratio |
|-----------|-------------------------|--|------------------|------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------|------------------------|----------------|----------------------------------|
| | Disolved O ₂ | NO ₃ ⁻ (as Nitrogen) | Mn ²⁺ | Fe ²⁺ | SO ₄ ²⁻ | SO ₄ ²⁻ | SO ₄ ²⁻ | SO ₄ ²⁻ | | | | |
| | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | | | | |
| CMT02 | 4.48 | 0.3271 | 0.704 | 87.632 | 1.6122 | 0.026 | none | 0.026 | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III) | 3370,46 |
| CMT03 | 1 | 0.8378 | 1.264 | 12.237 | 62.4891 | 1,6 | | | 6 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)-SO4 | 7,65 |
| CMT04 | 1,31 | 0,1384 | 2,911 | 33,678 | 18,2764 | 0,068 | | | 6 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III) | 495,26 |
| CMT05 | 0,74 | 7,3668 | 4,052 | 5,299 | 92,9406 | 0,021 | | | 6 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III) | 252,33 |
| CMT06 | 0,43 | 0,0464 | 0,0969 | 0,109 | 114,7131 | 0,186 | | | 6 | Mixed(anoxic) | Fe(III)-SO4 | 0,59 |
| CMT07 | 0,8 | 0,8818 | | | 48,779 | 1,89 | | | 4 | O2 >= 0,5 mg/L | Unknown | |
| PM10 | 0,72 | 0,4496 | 0,0478 | 2,9 | 5,6517 | 0,011 | | | 6 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III) | 263,64 |
| PM10B | 0,04 | 0,0544 | 3,025 | 20,5 | 5,2502 | | | | 5 | Anoxic | Fe(II)/SO4 | |
| PM11 | 0,46 | 0,0926 | 0,463 | 50,293 | 0,7637 | | | | 5 | Anoxic | Fe(II)/SO4 | |
| PM11A | 0,12 | 0,0271 | 0,134 | 8,699 | 0,1377 | | | | 5 | Anoxic | CH4gen | |
| PM11B | 0,07 | 0,055 | 0,492 | 45,902 | 0,9603 | | | | 5 | Anoxic | Fe(II)/SO4 | |
| PM18 | 0,17 | 0,0536 | 0,209 | 4,328 | 3,5061 | | | | 5 | Anoxic | Fe(II)/SO4 | |
| PM18A | 1,62 | 0,3468 | 0,287 | 0,13 | 2,6317 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| PM18B | 1,03 | 0,1091 | 0,617 | 2,217 | 2,7776 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB16 | 2,53 | 0,0477 | 2,668 | 81,63 | 0,2151 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB15 | 2,53 | 0,0477 | 2,668 | 81,63 | 0,2151 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-CH4gen | |
| WB14 | 5,09 | 0,1879 | 4,525 | 25,145 | 0,7642 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB13 | 4,75 | 0,0778 | 3,419 | 20,136 | 0,268 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-CH4gen | |
| WB12 | 5,16 | 0,1966 | 1,362 | 6,725 | 2,126 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB11 | 6,21 | 0,0573 | 0,763 | 3,422 | 3,1821 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB10 | 4,3 | 0,191 | 0,67 | 2,625 | 1,8162 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB09 | 3,85 | 0,0395 | 0,78 | 4,496 | 2,262 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB08 | 6,1 | 0,1274 | 0,149 | 0,2468 | 10,7968 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB07 | 5,9 | 0,0789 | 1,016 | 12,77 | 82,3369 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB06 | 6,34 | 0,0495 | 0,495 | 3,889 | 30,986 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB05 | 5,7 | 0,0934 | 0,452 | 3,097 | 42,5354 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB04 | 3,33 | 0,0448 | 0,163 | 1,274 | 4,5317 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB03 | 4,8 | 0,0535 | 0,523 | 4,402 | 54,2903 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB02 | 3,01 | 0,0932 | 0,724 | 17,197 | 79,7491 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| WB01 | 5,88 | 0,0336 | 1,089 | 3,994 | 114,4932 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| PM11B | 0,68 | 0,054 | 0,558 | 6,218 | 2,2558 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |
| CMT07 | 0,74 | 0,1608 | 2,252 | 0,327 | 17,3496 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | |

Set/16

Dez/16

An Excel Workbook for Identifying Redox Processes in Ground Water
 by Bryant C. Jurgens, Peter B. McMahon, Francis H. Chapelle, and Sandra M. Eberts
 U.S. Geological Survey Open-File Report 2009-1004.

RedoxAssignment_McMahonChapelle_1Campanha.xls

Planilha Redox Assignment - amostra de água subterrânea PM-11B e microcosmos

| Sample ID | Disolved O ₂ | | NO ₃ (as Nitrogen) | | Mn ²⁺ | | Fe ²⁺ | | SO ₄ ²⁻ | | Sulfide (sum of H ₂ S, HS ⁻ , S ²⁻) | | Num of Params | General Redox Category | Redox Process | Fe ²⁺ / Sulfide ratio |
|-----------|-------------------------|---------|-------------------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|-------------------------------|---------|---|---------|---------------|------------------------|---|----------------------------------|
| | Threshold values | Units | Threshold values | Units | Threshold values | Units | Threshold values | Units | Threshold values | Units | Threshold values | Units | | | | |
| Dez/16 | 0.5 | milli/L | 0.5 | milli/L | 0.05 | milli/L | 0.1 | milli/L | 0.5 | milli/L | none | milli/L | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | O ₂ -Fe(II)/SO ₄ | |
| PM 11B | 0.68 | | 0.054 | | 0.558 | | 6.218 | | 2.2558 | | | | 5 | Mixed(oxic-anoxic) | Fe(II)/SO ₄ | |
| A1 | 0 | | 0.015 | | 0.0254 | | 3.4424 | | 1.7215 | | | | 5 | Anoxic | CH ₄ gen | |
| B1 | 0 | | 0.015 | | 0.2303 | | 1.2663 | | 0.0546 | | | | 5 | Anoxic | NO ₃ -Fe(II)/SO ₄ | |
| Ago/17 | 0 | | 3.5194 | | 0.4876 | | 0.449 | | 3.1902 | | | | 5 | Mixed(anoxic) | | |
| C1 | | | | | | | | | | | | | | | | |

An Excel Workbook for Identifying Redox Processes in Ground Water
 by Bryant C. Jurgens, Peter B. McMahon, Francis H. Chapelle, and Sandra M. Eberts
 U.S. Geological Survey Open-File Report 2009-1004.

RedoxAssignment_McMahonChapelle_Microcosmos.xls

APÊNDICE H – FOTOS DOS MICROCOSMOS A, B E C DURANTE O EXPERIMENTO

Foto 15 – Microcosmos acondicionados



Foto 16 – Triplicata microcosmo controle A



Foto 17 – Triplicata microcosmo B



Foto 18 – Triplicata Microcosmo C – com inibidor metabólico



Foto 19 – Detalhe do microcosmo – lateral



Foto 20 – Detalhe do microcosmo – superior



APÊNDICE I – FOTOS DOS MICROCOSMOS COM EXTRATO DE LEVEDURA

Foto 21 – Microcosmos anaeróbios (An), controle e com alíquotas das réplicas dos microcosmos C



Foto 22 – Microcosmos anaeróbios (An), com alíquotas das réplicas dos microcosmos C e B



Foto 23 – Microcosmos aeróbios (A) com alíquotas das réplicas dos microcosmos C



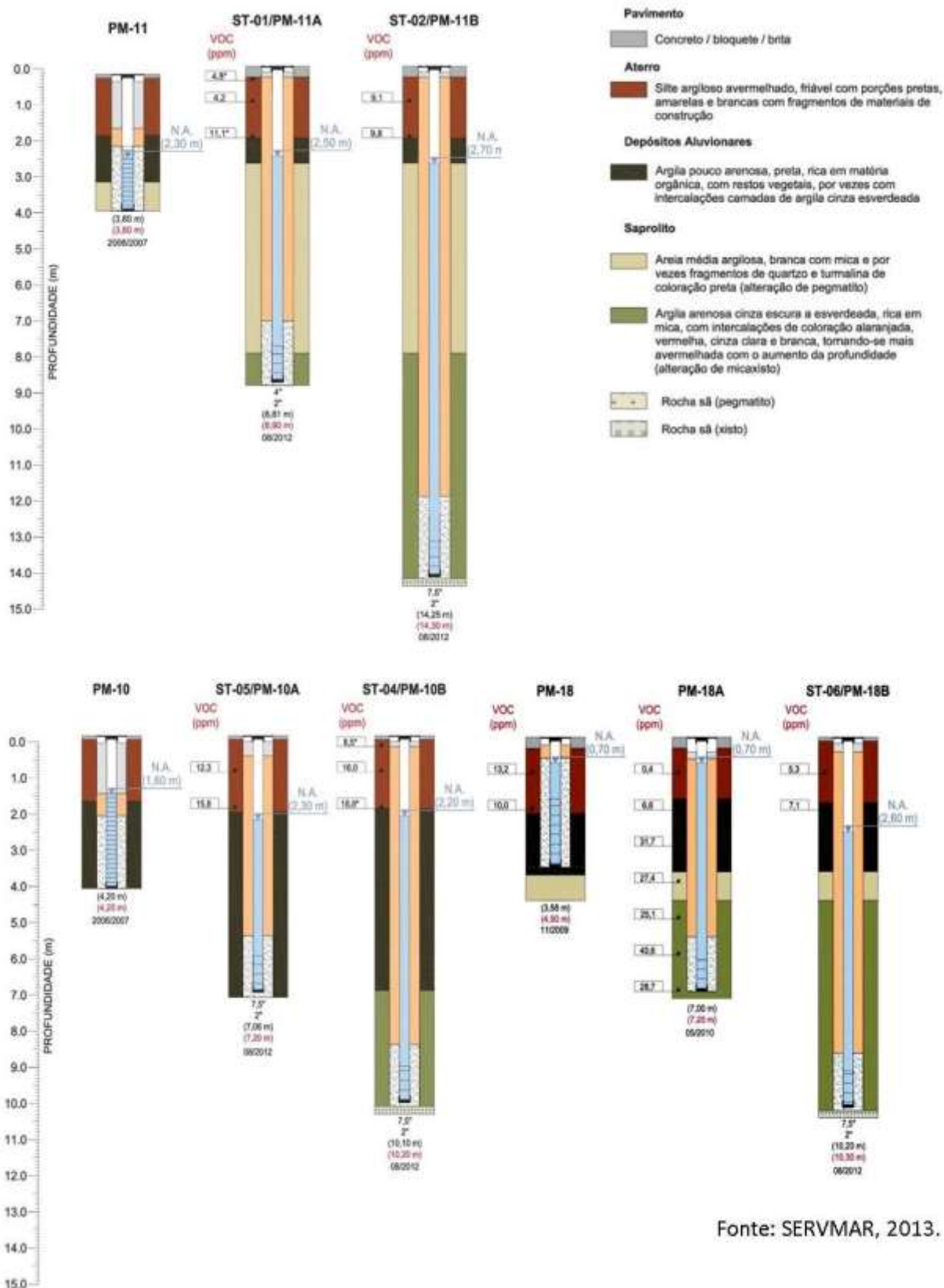
Foto 24 – Microcosmos aeróbios (A) com alíquotas das réplicas dos microcosmos C e B



Foto 25 – Comparação dos microcosmo aeróbio (AC1) e anaeróbio (AnC1) com alíquotas do microcosmo C, após 65 dias



ANEXO A – Perfil construtivo dos poços de monitoramento convencionais



Fonte: SERVIMAR, 2013.

ANEXO B – Critérios e Classificação da Planilha Redox.Assignment.xls (Jurgens *et al.*, 2009)

Table 1. Criteria and threshold concentrations for identifying redox processes in ground water.

[Table was modified from McMahon and Chapelle, 2008. Redox process: O₂, oxygen reduction; NO₃, nitrate reduction; Mn(IV), manganese reduction; Fe(III), iron reduction; SO₄, sulfate reduction; CH₄gen, methanogenesis. Chemical species: O₂, dissolved oxygen; NO₃⁻, dissolved nitrate; MnO₂(s), manganese oxide with manganese in 4+ oxidation state; Fe(OH)₃(s), iron hydroxide with iron in 3+ oxidation state; FeOOH(s), iron oxyhydroxide with iron in 3+ oxidation state; SO₄²⁻, dissolved sulfate; CO₂(g), carbon dioxide gas; CH₄(g), methane gas. Abbreviations: mg/L, milligram per liter; —, criteria do not apply because the species concentration is not affected by the redox process; ≤, less than or equal to; ≥, greater than or equal to; <, less than; >, greater than]

| Redox category | Redox process | Electron acceptor (reduction) half-reaction | Criteria for inferring process from water-quality data | | | | | Iron/sulfide (mass ratio) |
|----------------|-------------------------|--|--|-----------------------------|------------------|-------------|----------------|---------------------------|
| | | | Dissolved oxygen (mg/L) | Nitrate, as Nitrogen (mg/L) | Manganese (mg/L) | Iron (mg/L) | Sulfate (mg/L) | |
| Oxic | O ₂ | $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$ | ≥0.5 | — | <0.05 | <0.1 | — | — |
| Suboxic | Suboxic | Low O ₂ ; additional data needed to define redox process | <0.5 | <0.5 | <0.05 | <0.1 | — | — |
| Anoxic | NO ₃ | $2NO_3^- + 12H^+ + 10e^- \rightarrow N_{2(g)} + 6H_2O; NO_3^- + 10H^+ + 8e^- \rightarrow NH_4^+ + 3H_2O$ | <0.5 | ≥0.5 | <0.05 | <0.1 | — | — |
| Anoxic | Mn(IV) | $MnO_{2(s)} + 4H^+ + 2e^- \rightarrow Mn^{2+} + 2H_2O$ | <0.5 | <0.5 | ≥0.05 | <0.1 | — | — |
| Anoxic | Fe(III)/SO ₄ | Fe(III) and (or) SO ₄ ²⁻ reactions as described in individual element half reactions | <0.5 | <0.5 | — | ≥0.1 | ≥0.5 | no data |
| Anoxic | Fe(III) | $Fe(OH)_3(s) + H^+ + e^- \rightarrow Fe^{2+} + H_2O; FeOOH(s) + 3H^+ + e^- \rightarrow Fe^{2+} + 2H_2O$ | <0.5 | <0.5 | — | ≥0.1 | ≥0.5 | >10 |
| Mixed(anoxic) | Fe(II)-SO ₄ | Fe(III) and SO ₄ ²⁻ reactions as described in individual element half reactions | <0.5 | <0.5 | — | ≥0.1 | ≥0.5 | ≥0.3, ≤10 |
| Anoxic | SO ₄ | $SO_4^{2-} + 9H^+ + 8e^- \rightarrow HS^- + 4H_2O$ | <0.5 | <0.5 | — | ≥0.1 | ≥0.5 | <0.3 |
| Anoxic | CH ₄ gen | $CO_{2(g)} + 8H^+ + 8e^- \rightarrow CH_{4(g)} + 2H_2O$ | <0.5 | <0.5 | — | ≥0.1 | <0.5 | <0.5 |

by Bryant C. Jurgens, Peter B. McMahon, Francis H. Chapelle, and Sandra M. Eberts
U.S. Geological Survey Open-File Report 2009-1004.

Table 2. Classification of redox categories and processes assigned on the basis of water-quality data

[Redox category: O2 ≥ 0.5 mg/L, dissolved oxygen greater than or equal to 0.5 mg/L; O2 < 0.5 mg/L, dissolved oxygen less than 0.5 mg/L. Redox process: O2, oxygen reduction; NO3, nitrate reduction; Mn(IV), manganese reduction; Fe(III), iron reduction; SO4, sulfate reduction; CH4gen, methanogenesis. Abbreviations: mg/L, milligram per liter; <, less than; ≤, less than or equal to; ≥, greater than or equal to; >, greater than; Y, yes; N, no; —, criteria do not apply because the species concentration is not affected by the redox process; ?, insufficient data to determine whether process is occurring or not; f, and (or); -, and; x, not applicable]

| Redox Category | Redox Process | Dissolved | | Nitrate, as | | Manganese | | Iron | | Sulfate | | Iron/sulfide | |
|--------------------------------------|----------------------|------------------|---------|-------------|---------|------------|---------|------------|---------|-----------|-----------------|----------------|---------|
| | | oxygen ≥0.5 mg/L | mg/L | ≥0.5 mg/L | mg/L | ≥0.05 mg/L | mg/L | ≥0.01 mg/L | mg/L | ≥0.5 mg/L | mass ratio >0.3 | mass ratio >10 | |
| <i>Water-quality data complete</i> | | | | | | | | | | | | | |
| Oxic | O2 | Y | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Suboxic | Suboxic | N | N | N | N | N | N | N | N | — | — | x | x |
| Anoxic | NO3 | N | Y | N | N | N | N | N | N | — | — | x | x |
| Anoxic | Mn(IV) | N | N | N | N | Y | N | N | N | — | — | x | x |
| Anoxic | Fe(III)/SO4 | N | N | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | no data | no data |
| Anoxic | CH4gen | N | N | N | N | — | — | Y | Y | N | N | x | x |
| Mixed(oxic-anoxic) | O2-Mn(IV) | Y | — | — | — | Y | N | N | N | — | — | x | x |
| Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)/SO4 | Y | Y | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | no data | no data |
| Mixed(oxic-anoxic) | O2-CH4gen | N | N | N | N | — | — | Y | Y | N | N | x | x |
| Mixed(anoxic) | NO3-Mn(IV) | N | Y | Y | Y | Y | N | N | N | — | — | x | x |
| Mixed(anoxic) | NO3-Fe(III)/SO4 | N | Y | Y | Y | — | — | Y | Y | Y | Y | no data | no data |
| Mixed(anoxic) | NO3-CH4gen | N | Y | Y | Y | — | — | Y | Y | N | N | x | x |
| Anoxic | SO4 | N | N | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Mixed(anoxic) | Fe(III)-SO4 | N | N | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Anoxic | Fe(III) | N | N | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Mixed(oxic-anoxic) | O2-SO4 | N | N | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III)-SO4 | Y | Y | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Mixed(oxic-anoxic) | O2-Fe(III) | Y | Y | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Mixed(anoxic) | NO3-SO4 | N | Y | Y | Y | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Mixed(anoxic) | NO3-Fe(III)-SO4 | N | Y | Y | Y | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Mixed(anoxic) | NO3-Fe(III) | N | Y | Y | Y | — | — | Y | Y | Y | Y | N | N |
| <i>Water-quality data incomplete</i> | | | | | | | | | | | | | |
| O2 >= 0.5 mg/L | Unknown | Y | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data |
| O2 < 0.5 mg/L | Unknown | N | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data |
| OxicOrAnoxic | O2?OrNO3 | no data | Y | no data | no data | N | N | N | N | Y | Y | x | x |
| OxicOrSuboxic | O2?OrSuboxic | no data | N | N | N | N | N | N | N | N | N | x | x |
| AnoxicOrMixed(oxic-anoxic) | Mn(IV)-O2? | no data | N | N | N | Y | N | N | N | — | — | x | x |
| AnoxicOrMixed(oxic-anoxic) | Fe(III)/SO4-O2? | no data | N | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | no data | no data |
| AnoxicOrMixed(oxic-anoxic) | CH4gen-O2? | no data | N | N | N | — | — | Y | Y | N | N | x | x |
| Mixed(anoxic)Or(oxic-anoxic) | Mn(IV)-O2?OrNO3 | no data | Y | Y | Y | Y | N | N | N | — | — | x | x |
| Mixed(anoxic)Or(oxic-anoxic) | Fe(III)/SO4-O2?OrNO3 | no data | Y | Y | Y | — | — | Y | Y | Y | Y | no data | no data |
| Mixed(anoxic)Or(oxic-anoxic) | CH4gen-O2?OrNO3 | no data | N | N | N | — | — | Y | Y | N | N | x | x |
| AnoxicOrMixed(oxic-anoxic) | SO4-O2? | no data | N | N | N | Y | Y | Y | Y | Y | Y | N | N |
| Mixed(anoxic) | Fe(III)-SO4-O2? | no data | N | N | N | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| AnoxicOrMixed(oxic-anoxic) | Fe(III)-O2? | no data | N | N | N | — | — | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| Indeterminate | Unknown | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data | no data |

by Bryant C. Jurgens, Peter B. McMahon, Francis H. Chapelle, and Sandra M. Eberts
U.S. Geological Survey Open-File Report 2009-1004.