



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL: SANEAMENTO
AMBIENTAL

JOÃO PAULO DA SILVA SIQUEIRA

**ESTUDO DA BIORREMEDIAÇÃO *EX SITU* DE ÁGUAS DOCES E SALOBRAS
CONTAMINADAS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POR MEIO DE
REATORES MICROAERÓBIOS**

FORTALEZA

2018

JOÃO PAULO DA SILVA SIQUEIRA

ESTUDO DA BIORREMEDIAÇÃO *EX SITU* DE ÁGUAS DOCES E SALOBRAS
CONTAMINADAS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POR MEIO DE
REATORES MICROAERÓBIOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S63e Siqueira, João Paulo da Silva.
Estudo da biorremediação ex situ de águas doces e salobras contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos por meio de reatores microaeróbios / João Paulo da Silva Siqueira. – 2018.
120 f.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos.
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino.
1. Hidrocarbonetos aromáticos. 2. Intermediários. 3. Microaeração. 4. Salinidade. I. Título.

CDD 628

JOÃO PAULO DA SILVA SIQUEIRA

ESTUDO DA BIORREMEDIAÇÃO *EX SITU* DE ÁGUAS DOCES E SALOBRAS
CONTAMINADAS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POR MEIO DE
REATORES MICROAERÓBIOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 11/09/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos
(Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino
(Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando José Araújo da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Erick Rodrigues da Silva
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Ceará (IFCE)

Dr. Alexandre Colzi Lopes
Instituto Madrileño de Estudios Avanzados
(IMDEA)

A DEUS, fonte inesgotável de inspiração e fidelidade, a minha família e noiva, por todo o suporte e vivências.

AGRADECIMENTOS

Às providências de Deus, que não foram poucas. Pela sua presença real em cada dia e em cada pessoa que conheci.

Ao Prof. Dr. André Bezerra dos Santos, pela excelente orientação, confiança, ensinamentos e pelo crescimento adquirido durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino, pela coorientação, paciência e cuidado com a minha pesquisa.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, pelo conhecimento que adquiri e o convívio durante o período.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo apoio e correções.

Aos companheiros de pesquisa Andrey Marco e Amanda Maria por toda a colaboração durante os experimentos.

Aos amigos Daniel Lima, Diego Menezes, José Gilmar, Jessyca Brito, Luciane Mara, Simone Preeus (em ordem alfabética para evitar afloração de sentimentos), por aguentarem as minhas piadas, paródias, os abusos e por toda a amizade construída.

À Patrícia Buarque, pela paciência e toda ajuda nos cromatógrafos.

À todos os bolsistas do Laboratório de Saneamento (Labosan), pelo convívio e amizade.

Aos meus pais, Paulo e Luiza, por ter aberto as portas à educação através do exemplo e dedicação.

À minha noiva, Ana Paula, pela paciência e todo incentivo.

Às minhas irmãs Nayanna Paula e Nayara Paula, pelo incentivo.

Quero ainda expressar os meus agradecimentos aos grandes amigos, que embora não citados, forneceram coragem e que de alguma forma contribuíram para a conquista de mais este desafio.

“Ninguém é eterno e o que a gente ganha a gente não vai levar, a gente tendo Deus para a gente, o Divino Mestre se encarrega de colocar as coisas no lugar certo. A gente luta, sofre, suor, lágrimas, depois passa a viver de emoções.”

Luiz Gonzaga (o rei do baião)

RESUMO

O presente trabalho teve o objetivo geral de aprofundar os conhecimentos sobre a aplicação de biorreatores microaeróbios na remoção de BTEX para o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa de biorremediação *ex situ* de águas doces e salobras contaminadas com esses compostos. Para isso, foi avaliado o efeito de diferentes vazões de microaeração (0,5-2,0 mL ar·min⁻¹), pontos de injeção (linha de alimentação e *headspace*) e da recirculação de efluente (0,7 L·h⁻¹) na degradação microaeróbia de BTEX (~4,2 mg·L⁻¹ de cada composto) em um biorreator metanogênico (TDH = 24 h). Ainda, investigou-se a influência de crescentes concentrações de NaCl (0,15-3,64 g·L⁻¹) na degradação microaeróbia desses compostos, e avaliou-se o efeito da presença de intermediários (fenol, benzoato e tolueno) na eficiência de remoção de benzeno sob condições anaeróbias e microaeróbias. Finalmente, avaliou-se, em ensaios em batelada, o efeito da presença do cossustrato etanol (1 g DQO·L⁻¹), de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (0,88-2,65 mg·L⁻¹) e da aclimação do lodo de inóculo na degradação anaeróbia de BTEX. A microaeração assegurou altas eficiências de remoção (> 83%) para todos os compostos, e os melhores resultados foram obtidos com 1,0 mL ar·min⁻¹, particularmente para benzeno, com um aumento de 30% na eficiência de remoção, na condição de microaeração na linha de alimentação. A recirculação de efluente mostrou-se um fator importante para melhorar a transferência de massa e, conseqüentemente, a remoção de BTEX. A volatilização desses compostos foi insignificante mesmo sob condições microaeróbias, sugerindo que a atividade microbiana foi o principal mecanismo de remoção. Quando submetido a concentrações crescentes de NaCl (0,15-3,64 g·L⁻¹), houve redução da eficiência de remoção de BTEX, chegando a um decréscimo de 18% para o benzeno quando a maior concentração de NaCl (3,64 g·L⁻¹) foi adicionada. O estudo com os intermediários revelou que a degradação do benzeno era negativamente impactada pela presença dos mesmos, principalmente do benzoato, mesmo sob condições microaeróbias. Finalmente, a presença de cossustrato afetou negativamente a degradação anaeróbia de BTEX apenas para o lodo não aclimatado, enquanto a adição de oxigênio apresentou efeito positivo apenas para o lodo aclimatado, cujos melhores resultados foram obtidos na concentração de 1,77 mg·L⁻¹, evidenciando a importância da aclimação da microbiota a condições microaeróbias.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos aromáticos, intermediários, microaeração, salinidade.

ABSTRACT

The present work aimed at evaluating the application of microaerobic bioreactors on BTEX removal for the development of an alternative technology for *ex situ* bioremediation of fresh and brackish waters contaminated with these compounds. For this purpose, the effect of different microaeration flow rates (0.5-2.0 mL air·min⁻¹), injection points (feeding line and headspace) and effluent recirculation (0.7 L·h⁻¹) on microaerobic BTEX degradation (~4.2 mg·L⁻¹ of each compound) were evaluated in a methanogenic bioreactor (HRT = 24 h). Also, the influence of increasing NaCl concentrations (0.15-3.64 g·L⁻¹) on microaerobic degradation of these compounds was investigated, and the effect of the presence of intermediates (phenol, benzoate and toluene) on benzene removal efficiency under anaerobic and microaerobic conditions was studied. Finally, the effect of the presence of the co-substrate ethanol (1 g COD·L⁻¹), different dissolved oxygen concentrations (0.88-2.65 mg·L⁻¹) and acclimatization of the inoculum sludge on anaerobic BTEX degradation was assessed. The microaeration (0.5-2.0 mL air·min⁻¹) ensured high removal efficiencies (> 83%) for all compounds, and the best results were obtained with 1.0 mL air·min⁻¹, particularly for benzene, with an increase of 30% in the removal efficiency, with microaeration at the feeding line. Effluent recirculation proved to be an important factor in improving mass transfer and, consequently, BTEX removal. Volatilization of BTEX compounds was insignificant even under microaerobic conditions, suggesting that microbial activity was the main removal mechanism. When subjected to increasing NaCl concentrations (0.15-3.64 g·L⁻¹), there was a reduction of BTEX removal efficiency, reaching a decrease of 18% for benzene when the highest NaCl concentration (3.64 g·L⁻¹) was added. The study with the intermediates revealed that benzene degradation was negatively impacted by their presence, especially of benzoate, even under microaerobic conditions. Finally, the presence of co-substrate negatively affected anaerobic BTEX degradation only for the non-acclimatized sludge, whereas the addition of oxygen had a positive effect only for the acclimatized sludge, whose best results were obtained for the concentration of 1.77 mg·L⁻¹, evidencing the importance of microbiota acclimatization to microaerobic conditions.

Keywords: Aromatic hydrocarbons, intermediates, microaeration, salinity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Estrutura molecular dos compostos BTEX.....	18
Figura 2.2	Catabolismo de tolueno via adição de fumarato ao grupo metil.....	22
Figura 2.3	Possíveis rotas metabólicas de degradação anaeróbia inicial do benzeno.....	23
Figura 2.4	Ativação inicial da degradação anaeróbia de benzeno em que o benzeno sofre inicialmente carboxilação, metilação ou hidroxilação com subsequente transformação em benzoil-CoA.....	30
Figura 2.5	Ativação de tolueno através da adição de fumarato ao grupo metil para formar benzilsuccinato.....	31
Figura 2.6	Ativação inicial do etilbenzeno através da reação de desidrogenação.....	31
Figura 2.7	Ativação inicial do etilbenzeno através da adição de fumarato no segundo carbono do grupo etil.....	32
Figura 2.8	A ativação de m e o-xileno através da adição de fumarato em um dos grupos metis.....	33
Figura 2.9	Rota metabólica de degradação de benzeno sob condições microaeróbias.....	35
Figura 3.1	Biorreator UASB contínuo microaerado para remoção de BTEX.	45
Figura 3.2	Croqui do sistema.....	45
Figura 3.3	Concentrações afluentes e efluentes e eficiências de remoção de benzeno (a), tolueno (b), etilbenzeno (c), m,p-xilenos (d) e o-xileno (e).....	53
Figura 3.4	Variação da concentração de matéria orgânica (DQO) durante o experimento.....	59
Figura 3.5	Variação do pH afluente e efluente durante o experimento.....	59
Figura 3.6	Perfil dos hidrocarbonetos durante o desligamento da microaeração: a) benzeno; b) tolueno; c) etilbenzeno; d) m,p-xileno; e) o-xileno.....	60
Figura 4.1	Variação da concentração afluente e efluente, e eficiência de remoção dos compostos BTEX no líquido: a) benzeno; b) tolueno; c) etilbenzeno; d) m,p-xileno; e) o-xileno.....	70
Figura 5.1	Variação da concentração afluente, efluente e eficiência de benzeno no líquido.....	87
Figura 5.2	Variação da concentração afluente, efluente dos intermediários adicionados e eficiência de benzeno no líquido.....	91
Figura 6.1	Efeito da presença de etanol e de oxigênio dissolvido na degradação anaeróbia de BTEX pelo lodo não aclimatado L1.....	102
Figura 6.2	Efeito da presença de etanol e de oxigênio dissolvido na degradação anaeróbia de BTEX pelo lodo aclimatado L2.....	105
Figura 6.3	Efeito de diferentes concentrações iniciais de OD na degradação anaeróbia de BTEX pelo lodo aclimatado L2.....	106
Figura 6.5	Comportamento dos intermediários fenol e benzoato na degradação dos BTEX.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Parâmetros físico-químicos importantes na mobilidade de BTEX em água.....	19
Tabela 2.2	Sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo na remoção de BTEX.....	37
Tabela 2.2	Sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo na remoção de BTEX. (cont.).....	38
Tabela 3.1	Condições operacionais durante a remoção de BTEX anaeróbio e microaeróbio.....	46
Tabela 3.2	Concentrações médias de afluentes e efluentes de benzeno (B), tolueno (T), etilbenzeno (E), m, p-xilenos (m, p-X) e o-xileno (o-X), e suas respectivas eficiências médias de remoção durante as diferentes condições operacionais.....	50
Tabela 3.3	Variação da carga diária de BTEX no biogás nas diferentes condições operacionais testadas.....	51
Tabela 3.4	Índice de sensibilidade e tempo de recuperação de cada composto BTEX durante os períodos de desligamento da microaeração.....	62
Tabela 4.1	Condições operacionais aplicadas ao reator microaeróbio.....	68
Tabela 4.2	Concentração afluente e efluente de BTEX, e eficiência de remoção do reator microaeróbio para diferentes concentrações de NaCl.....	73
Tabela 4.3	Parâmetros de estabilidade do reator microaeróbio para diferentes concentrações de NaCl.....	77
Tabela 4.4	Carga de BTEX no biogás do reator microaeróbio para diferentes concentrações de NaCl.....	77
Tabela 5.1	Condições operacionais aplicada no reator durante a remoção de benzeno em condições anaeróbias e microaeróbias.....	82
Tabela 5.2	Variação das concentrações afluente e efluente, e eficiências de remoção de benzeno estudado, nas diferentes condições operacionais testadas.....	85
Tabela 5.3	Variação da carga diária de benzeno no biogás nas diferentes condições operacionais testadas. Variação da carga diária de benzeno no biogás nas diferentes condições operacionais testadas.....	86
Tabela 5.4	Variação das concentrações afluente e efluente do benzeno e intermediários fenol, benzoato e tolueno.....	92
Tabela 6.1	Constante cinética e tempo de meia vida dos compostos BTEX para L1 e L2.....	103
Tabela 6.2	Constante cinética e tempo de meia vida dos compostos BTEX para diferentes concentrações de OD.....	108

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO GERAL	16
1.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS: TIPOS, ORIGEM, IMPACTOS AMBIENTAIS E RISCOS À SAÚDE	18
2.2	BIOQUÍMICA DA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DOS HIDROCARBONETOS	21
2.2.1	ADIÇÃO DE FUMARATO	21
2.2.	HIDROXILAÇÃO	22
2.2.3	METILAÇÃO	24
2.2.4	CARBOXILAÇÃO	24
2.3	BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS BTEX	24
2.3.1	BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE BTEX	26
2.3.2	BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE BTEX	27
2.3.2.1	<i>Biodegradação anaeróbia de benzeno</i>	29
2.3.2.2	<i>Biodegradação anaeróbia de tolueno</i>	30
2.3.2.3	<i>Biodegradação anaeróbia de etilbenzeno</i>	31
2.3.2.4	<i>Biodegradação anaeróbia de xileno</i>	32
2.3.3	BIODEGRADAÇÃO MICROAERÓBIA DE BTEX	33
2.4	REATORES CONTÍNUOS ANAERÓBIOS TRATANDO COMPOSTOS BTEX	35
3	BIOENGENHARIA DE PROCESSOS APLICADA À DEGRADAÇÃO DE BTEX EM SISTEMAS DE TRATAMENTO MICROAERÓBIOS	42
3.1	INTRODUÇÃO	42
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.2.1	CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL	43
3.2.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	46
3.2.2.1	<i>Remoção Anaeróbia BTEX</i>	46
3.2.2.2	<i>Efeito da vazão de microaeração na remoção de BTEX</i>	46
3.2.2.3	<i>Efeito do ponto de dosagem de microaeração na remoção de BTEX</i>	46
3.2.2.4	<i>Efeito da recirculação de efluentes na remoção de BTEX</i>	47
3.2.2.5	<i>Análise de sensibilidade e tempo de recuperação em falhas de microaeração</i>	47
3.2.3	ANÁLISE QUÍMICA E CROMATOGRÁFICA	48
3.2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.3.1	REMOÇÃO ANAERÓBIA BTEX	49
3.3.2	EFEITO DA VAZÃO DE MICROAERAÇÃO NA REMOÇÃO DE BTEX	51
3.3.3	EFEITO DO PONTO DE APLICAÇÃO DA MICROAERAÇÃO NA REMOÇÃO DE BTEX	56
3.3.4	EFEITO DA RECIRCULAÇÃO DE EFLUENTES NA REMOÇÃO DE BTEX	57
3.3.5	ANÁLISE DE SENSIBILIDADE E RECUPERAÇÃO EM FALHAS DE MICROAERAÇÃO	60
3.4	CONCLUSÕES	63
4	ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS BTEX EM REATOR UASB MICROAERADO SUBMETIDO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAL	65
4.1	INTRODUÇÃO	65
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	67
4.2.1	CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL	67

4.2.2	<i>ÁGUA CONTAMINADA SINTÉTICA</i>	67
4.2.3	<i>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</i>	68
4.2.4	<i>ANÁLISES QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICA</i>	68
4.2.5	<i>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</i>	69
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.4	CONCLUSÃO	78
5	BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA E MICROAERÓBIA DE BENZENO: EFEITO DE IMPORTANTES INTERMEDIÁRIOS	79
5.1	INTRODUÇÃO	79
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	80
5.2.1	<i>CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL</i>	80
5.2.2	<i>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</i>	81
5.2.2.1	<i>Fase 1 – Otimização do processo de degradação microaeróbia de benzeno</i>	83
5.2.2.2	<i>Fase 2 – Efeito da presença de compostos intermediários na eficiência remoção de benzeno</i>	83
5.2.3	<i>ANÁLISES QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS</i>	84
5.2.4	<i>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</i>	84
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
5.3.1	<i>FASE 1 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO MICROAERÓBIA DE BENZENO</i>	85
5.3.2	<i>FASE 2 – EFEITO DA PRESENÇA DE COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS NA EFICIÊNCIA REMOÇÃO DE BENZENO</i>	90
5.4	CONCLUSÃO	96
6.1	INTRODUÇÃO	97
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	99
6.2.1	<i>COMPOSTOS QUÍMICOS</i>	99
6.2.2	<i>INÓCULO E MEIO BASAL</i>	99
6.2.3	<i>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</i>	99
6.2.3.1	<i>Efeito da presença de co substrato e oxigênio dissolvido, e da aclimação do lodo de inóculo na degradação anaeróbia de BTEX</i>	100
6.2.3.2	<i>Efeito de diferentes concentrações iniciais de oxigênio dissolvido na degradação anaeróbia de BTEX por lodo aclimatado</i>	100
6.2.4	<i>ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS</i>	101
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
6.3.1	<i>EFEITO DA PRESENÇA DE COSSUBSTRATO E OXIGÊNIO DISSOLVIDO, E DA ACLIMATAÇÃO DO LODO DE INÓCULO NA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE BTEX</i>	101
6.3.2	<i>EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO NA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE BTEX POR LODO ACLIMATADO</i>	106
6.4	CONCLUSÃO	110
	REFERÊNCIAS	111

1. INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos de petróleo são importantes fontes de energia e matéria prima para várias indústrias. Dessa forma, a grande demanda por produtos de petróleo no dia a dia pode ocasionar impactos ambientais, caso não haja operação e manutenção adequada dos equipamentos e atividades (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017). Atividades antrópicas, como, por exemplo, industriais, lançamento de efluentes, atividades da indústria de petróleo *off shore* e *on shore*, bem como derramamentos acidentais, causam poluição por hidrocarbonetos de petróleo. Essa poluição afeta o meio ambiente e representa risco à saúde, direta ou indiretamente, de todas as formas de vida no planeta Terra (ABBASIAN et al., 2015; ALVES et al., 2017; CORSEUIL et al., 2011; FARHADIAN et al., 2008). Os hidrocarbonetos de petróleo são compostos recalcitrantes e são classificados como poluentes prioritários (DENG; YANG; DENG, 2017; OTENIO et al., 2005).

Dentre os diversos compostos que compõem o petróleo e os seus derivados, estão os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX). Esses compostos possuem como principais características a presença do anel benzênico em sua estrutura molecular, o caráter volátil e elevada solubilidade em água quando comparado a outros hidrocarbonetos presentes na gasolina, como os alifáticos (FARHADIAN et al., 2008; NAKHLA, 2003).

Os compostos BTEX são liberados para o meio ambiente através de derrames acidentais de combustíveis fósseis, como gasolina, durante o transporte e vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo e tubulações (CORSEUIL et al., 1998, 2011; KHODAEI et al., 2017).

Portanto, a contaminação da água com compostos monoaromáticos é um grave problema ambiental e de saúde pública, uma vez que esses compostos são tóxicos e potencialmente carcinogênicos para humanos, causando desde dor de cabeça e tonturas a possível indução de neurotoxicidade, se exposto em longos períodos (ALVES et al., 2017; CORSEUIL et al., 2011; CRUZ et al., 2017; FARHADIAN et al., 2008; PENG et al., 2015; TSANGARI et al., 2017).

Entre as formas de contaminação da água subterrânea com BTEX, os postos de combustível são uma fonte significativa, seja por derramamento de lubrificantes ou aditivos de combustível, uso indevido de separadores de óleo ou, principalmente, vazamento de

combustível de tanques de armazenamento subterrâneos (ALVES et al., 2017; CORSEUIL et al., 2011).

Até a década de 1980, as investigações envolvendo a remoção por ação microbiológica desses compostos foram todas realizadas sob condições aeróbias, por ser considerada mais rápida e completa (OLAJIRE; ESSIEN, 2014). Não se conhecia, e mesmo não se esperava, que organismos anaeróbios pudessem realizar uma mineralização completa de hidrocarbonetos (CHAKRABORTY; COATES, 2004).

Pesquisas e estudos da degradação anaeróbia de hidrocarbonetos são mais recentes (MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016). O processo de mineralização anaeróbia de hidrocarbonetos no meio ambiente ocorre em zonas mais profundas com ausência ou baixas concentrações de oxigênio, como infiltrações em terra ou no fundo do mar (ABBASIAN et al., 2015), ou, até mesmo, em ambientes com baixo teor de oxigênio, onde a atividade biológica aeróbia cessa à medida que todo o oxigênio é utilizado (VARJANI; UPASANI, 2017; WAALS et al., 2017), ocorrendo uma sucessão de microrganismos anaeróbios que degradam hidrocarbonetos (ABBASIAN et al., 2015), fazendo uso de diferentes aceptores finais de elétrons (nitrito, ferro, sulfato e manganês) (VARJANI, 2017).

Estudos demonstraram que a capacidade de degradação dos microrganismos anaeróbios é muito maior do que se supunha anteriormente, auxiliados por diferentes aceptores finais de elétrons, tais como os citados anteriormente, na remediação anaeróbia de águas contaminadas com BTEX, os quais têm melhorado bastante a eficiência de diversos sistemas de tratamento (CALDWELL; SUFLITA, 2000; FARHADIAN et al., 2008; MÜLLER et al., 2017; SPERFELD et al., 2018; STASIK; WICK; WENDT-POTTHOFF, 2015; ZHANG et al., 2013).

Segundo Zhang e Lo (2015), com a adição de diferentes aceptores de elétrons, diferentes desempenhos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos podem ser observados. Além de boas eficiências de remoção de compostos aromáticos por culturas desnitrificantes inoculadas em reatores anaeróbios (GUSMÃO et al., 2007; MARTÍNEZ; CUERVO-LÓPEZ; GOMEZ, 2007), culturas mistas foram capazes de remover BTEX na supracitada condição, facilitando a utilização desse reator sob condições desnitrificantes no tratamento de aquíferos contaminados com gasolina (FIRMINO et al., 2015a; RIBEIRO et al., 2013).

Contudo, além da adição dos aceptores finais de elétrons já mencionados, a biodegradação de benzeno foi observada sob condições microaeróbias, em que o anel aromático do benzeno apresentou clivagem em todas as concentrações iniciais de oxigênio dissolvido (DO) de 0,05 a 1 mg·L⁻¹ (YERUSHALMI et al., 2001).

Recentemente, sistemas anaeróbios aplicados à remoção de BTEX têm sido estudados na presença de baixas concentrações de oxigênio para melhorar a remoção desses hidrocarbonetos de águas contaminadas (FIRMINO et al., 2018; WU et al., 2015), auxiliando no processo enzimático, já que a biodegradação de BTEX envolve uma série de etapas usando diferentes enzimas (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

Na presença de baixas concentrações de oxigênio, o processo de ativação do anel benzênico, provavelmente, é iniciado por microrganismos facultativos com produção de intermediários dos hidrocarbonetos. Em seguida, os intermediários (por exemplo, catecol, benzoato e fenol) são consumidos anaerobiamente, auxiliados por sulfato ou nitrato como aceptores finais de elétrons (LIU, 2015), ou por fermentação (FIRMINO et al., 2018), podendo chegar a mineralização completa do composto em estudo (LIU, 2015).

Contudo, os processos microaeróbios aplicados na remoção de BTEX ainda carecem de um maior aprofundamento como a avaliação da melhor vazão de microaeração, pontos de injeção de ar, recirculação, estudos cinéticos, verificação do efeito de importantes intermediários, assim como do efeito da elevação nos níveis de salinidades na remoção dos compostos e estabilidade operacional do reator.

1.1. Objetivo Geral

Aprofundar os conhecimentos sobre a aplicação de biorreatores microaeróbios na remoção de hidrocarbonetos aromáticos para o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa de biorremediação *ex situ* de águas doces e salobras contaminadas.

1.1.1. Objetivos específicos

Avaliar o efeito de diferentes vazões de microaeração, pontos de injeção e da recirculação de efluente na degradação microaeróbia de BTEX em um biorreator metanogênico de fluxo contínuo. Além disso, busca-se avaliar o índice de sensibilidade e a taxa de recuperação durante as simulações de falhas de microaeração (Capítulo 3).

Investigar a influência do aumento da concentração de NaCl na remoção microaeróbia de BTEX, simulando águas subterrâneas salobras (Capítulo 4).

Avaliar o efeito de diferentes vazões de microaeração, pontos de injeção e da recirculação de efluentes na degradação microaeróbia de benzeno em um biorreator metanogênico de fluxo contínuo, bem como o impacto da presença de possíveis

intermediários da degradação anaeróbia de benzeno (fenol, benzoato e tolueno) na eficiência de remoção desse composto sob condições anaeróbias e microaeróbias (Capítulo 5).

Avaliar o efeito da presença do cossustrato etanol, de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e da aclimação do lodo de inóculo na degradação anaeróbia de BTEX (Capítulo 6).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Hidrocarbonetos monoaromáticos: tipos, origem, impactos ambientais e riscos à saúde

Os hidrocarbonetos aromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX), representados graficamente na Figura 2.1, são alguns dos compostos orgânicos voláteis (COV) facilmente encontrados no petróleo bruto e seus derivados, e estão entre os poluentes mais importantes do solo e das águas subterrâneas (PENG et al., 2015). Os compostos BTEX são liberados para o meio ambiente através de derrames acidentais de combustíveis fósseis durante o transporte e vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo e tubulações (KHODAEI et al., 2017).

Esses compostos possuem como principais características a presença do anel benzênico em sua estrutura molecular, o caráter volátil e elevada solubilidade em água quando comparado a outros hidrocarbonetos presentes na gasolina, como os alifáticos (DOU; LIU; HU, 2008; FARHADIAN et al., 2008). A solubilidade dos hidrocarbonetos monoaromáticos é da ordem de 3 a 5 vezes maior que a dos alifáticos com o mesmo número de carbonos (TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004). Além disso, devido ao seu baixo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) (Tabela 2.1), também apresentam alta mobilidade em sistemas solo-água, facilitando a contaminação de águas superficiais e subterrâneas (NAKHLA, 2003; TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004).

Figura 2.1 Estrutura molecular dos compostos BTEX

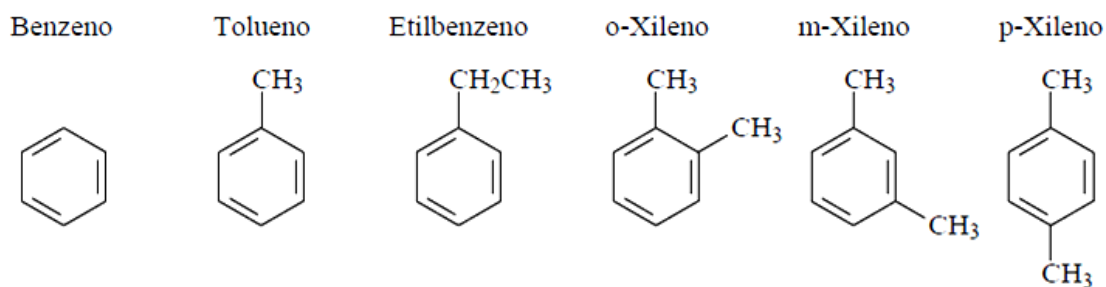


Tabela 2.1 Parâmetros físico-químicos importantes na mobilidade de BTEX em água

Composto	Fórmula química	Solubilidade em água a 25°C (mg·L⁻¹)	Log Kow
Benzeno	C ₆ H ₆	1785,5	2,13
Tolueno	C ₇ H ₈	532,6	2,73
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	161,5	3,15
o-Xileno	C ₈ H ₁₀	171,5	3,12
m-Xileno	C ₈ H ₁₀	161,5	3,20
p-Xileno	C ₈ H ₁₀	181,6	3,15

Kow, coeficiente de partição octanol-água

Fonte: Farhadian et al. (2008)

Segundo Fayemiwo et al. (2017), os hidrocarbonetos aromáticos, como, por exemplo, os BTEX, são menos visíveis nos locais de poluição, por isso, muitas vezes, são negligenciados nos esforços de remediação devido à sua natureza incolor na água, em comparação com os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) que são conhecidos por causarem uma degradação ambiental notável.

Embora sua presença na água não seja tão facilmente discernível quanto com os HPAs, os compostos BTEX são mais abundantes no ambiente e podem ser encontrados em diversas fontes (EL-NAAS et al., 2014), inclusive em águas com potencial uso para abastecimento humano, indicando grandes riscos para a saúde que podem não ser imediatamente evidentes.

Foi caracterizado a composição de hidrocarbonetos e outros compostos liberados em águas em diferentes regiões do Brasil como resultado de derrames de petróleo. Os estudos relatam que a concentração e a persistência de compostos BTEX são proporcionais à escala e duração do derramamento de óleo, destacando altas concentrações de BTEX em derramamentos de óleo em larga escala e de longa duração (MENICONI; GABARDO, 2010; SOARES-GOMES et al., 2016).

Camilli et al. (2010) rastream o transporte de hidrocarbonetos com origem na Deepwater Horizon, localizado no golfo do México, local do derramamento de óleo, e relataram que uma pluma de óleo contínua e persistente, com mais de 35 km de comprimento, foi presente. As amostras obtidas a partir dessa pluma de óleo continham altas concentrações de compostos BTEX. Wang et al. (2002) caracterizaram águas subterrâneas próxima à superfície (0-5 m) e águas subterrâneas de nível mais profundo (15-60 m) e relataram concentrações de BTEX de 155 µg/kg de água e 2,6 µg/kg de água, respectivamente. Esse relatório mostrou que, apesar da profundidade das águas subterrâneas, os compostos BTEX ainda estavam presentes, embora em baixas concentrações.

No Brasil, a gasolina brasileira é misturada com 27% v/v de etanol anidro, o que contribui para mudar a volatilidade dos BTEX e reduzir as emissões desses compostos para a atmosfera (CRUZ et al., 2017). A demanda por etanol aumentou no Brasil por causa da frota de carros flex, que representou 90% dos carros vendidos no país nos últimos anos. Entretanto, isso pode agravar o problema de contaminação de aquíferos subterrâneos, já que o etanol pode exercer um efeito de co-solvência, aumentando a solubilidade em água dos BTEX e, conseqüentemente, resultando em concentrações mais elevadas (CORSEUIL et al., 2011). Em 2009, 2904 locais contaminados foram encontrados no estado de São Paulo, Brasil, dos quais 2.279 estavam relacionados ao vazamento de tanques de armazenamento subterrâneos contendo combustível (CETESB, 2009).

Digiulio e Jackson (2016) realizaram uma análise abrangente de todos os dados e relatórios publicamente disponíveis para avaliar o impacto nas fontes subterrâneas de água potável como resultado da extração de petróleo pelo Pavillion, WY Field - Estados Unidos da América. Foram detectados, em águas subterrâneas extraídas de poço de monitoramento, benzeno, tolueno, etilbenzeno, m, p-xilenos e o-xileno em concentrações máximas de 247, 677, 101, 973 e 253 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Nas amostras de água potável, Serrano et al. (2007) relataram concentrações de benzeno entre 1 e 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Em 2004, foi relatado por Schmidt et al. (2004) que o Lago de Zurique, o maior fornecedor de água potável para a maior cidade suíça, continha compostos BTEX além de outros oxigenados de combustível. Yaghmaeian e Yousefi (2014) relataram a presença de hidrocarbonetos proveniente de combustível fóssil em amostras de águas de poços e do sistema de distribuição de água das cidades centrais da província de Mazandaran, Iran. Os autores detectaram uma contaminação da água presente na rede de distribuição de água urbana e observaram que 32,8% das amostras realizadas em poços de abastecimento estavam livres de contaminação com hidrocarbonetos e, pelo menos, 67,2% das amostras continham um dos compostos aromáticos.

Por apresentarem, muitas vezes, características imperceptíveis a olho nu no meio ambiente, os compostos BTEX podem ser absorvidos, principalmente, por via da pele, da respiração e da ingestão. Os hidrocarbonetos BTEX são lipofílicos e, devido a essa propriedade, podem causar danos aos órgãos internos, particularmente aos tecidos adiposos (VARJANI; GNANSOUNOU; PANDEY, 2017). Os riscos de curto prazo (agudos) de BTEX incluem toxicidade aguda para a vida aquática no recurso hídrico, especialmente em áreas relativamente confinadas. Os riscos potenciais a longo prazo (crônicos) desses compostos incluem alterações no fígado e efeitos nocivos nos rins, coração, pulmões e sistema nervoso (EL-NAAS; ACIO; EL TELIB, 2014; PENG et al., 2015). Concentrações elevadas de BTEX

nas águas subterrâneas podem representar potenciais riscos à saúde humana. O benzeno é classificado como composto cancerígeno para seres humanos e animais, já a inalação de tolueno e xilenos em concentrações de $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ causa dor de cabeça, tonturas e irritação das mucosas. A exposição prolongada a tolueno e xilenos pode causar danos cerebrais, e a inalação de etilbenzeno pode induzir neurotoxicidade (DENG; YANG; DENG, 2017; MOHAMMAD et al., 2017; PENG et al., 2015).

2.2. Bioquímica da degradação anaeróbia dos hidrocarbonetos

As pesquisas realizadas nos últimos anos revelaram novas vias associadas à biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos. Resumidamente, existem vários mecanismos anaeróbios que parecem ser importantes na mineralização de hidrocarbonetos para os quais os metabólitos e as enzimas necessários ao metabolismo foram identificados (CALLAGHAN, 2013).

A transformação de compostos orgânicos é baseado em microrganismos específicos orientados para determinada função (GHATTAS et al., 2017). Na seção seguinte, os processos de transformação sob condições anaeróbias são discutidos por uma variedade de grupos funcionais presentes em contaminantes orgânicos.

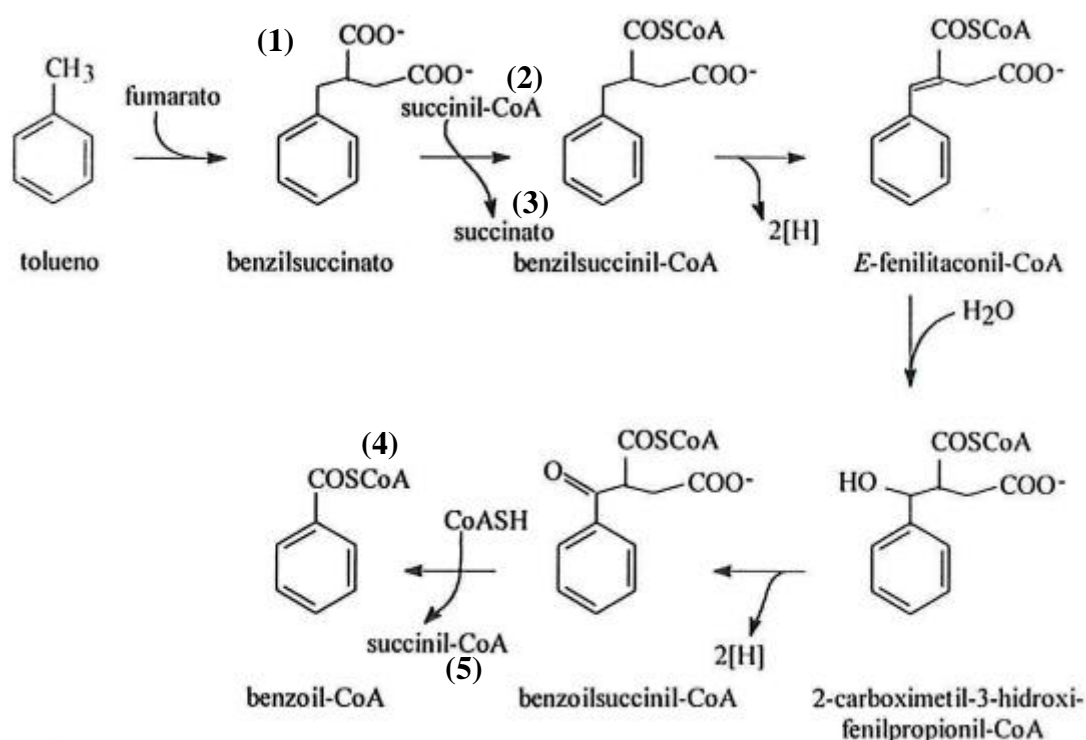
A transformação de hidrocarbonetos aromáticos, tais como BTEX, é frequentemente iniciada por uma das quatro seguintes reações: (i) adição de fumarato, pela atividade de síntese do benzoilsuccinato; (ii) metilação, pela transferência de um grupo metil antes da adição de fumarato; (iii) carboxilação, que é a conversão do composto químico à benzoato, observado no metabolismo do benzeno; e (iv) hidroxilação, que é a adição de um grupo hidroxila no anel aromático (DOU et al., 2010; GHATTAS et al., 2017; KUNAPULI et al., 2008; MASUMOTO et al., 2012; MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016).

2.2.1. Adição de fumarato

A degradação anaeróbia do tolueno é iniciada através da adição de fumarato, a qual é, normalmente, realizada por bactérias do gênero *Thauera* e usado como um exemplo típico desse tipo de via metabólica (Figura 2.2) (TIERNEY; YOUNG, 2010). Em primeiro lugar, a adição de um fumarato pela enzima benzilsuccinato sintase (BSS), intolerante ao oxigênio, converte tolueno em (R)-benzilsuccinato (1). Nessa reação, a remoção de um átomo de hidrogênio do grupo metil do tolueno converte a molécula em um intermediário do radical

benzil. Esse radical é muito instável e ataca a ligação não saturada de uma molécula de fumarato, recuperando o átomo de hidrogênio (associado à enzima) para formar benzilsuccinato. O benzilsuccinato é, então, substituído com succinil-CoA (2) em preparação para outros processos oxidativos. Ao longo dessa reação, é liberado um succinato, que é convertido (por succinato desidrogenase) em fumarato para regenerar a fonte de fumarato (3). O succinil-CoA funciona como doador de CoA-SH e é adicionado ao complexo através de uma enzima CoA transferase para ativar o benzilsuccinato. Finalmente, através de alguns processos, produz-se um benzoil-CoA (4), e o succinil-CoA (5) é liberado para continuar o ciclo. O benzoil-CoA é um intermediário comum no catabolismo anaeróbico de diversos hidrocarbonetos aromáticos que é ainda oxidado através da quebra do anel aromático (pela benzoil-CoA redutase), convertendo-o, assim, em compostos alifáticos, que, por sua vez, são atacados por outras reações hidrolíticas e oxidativas (LEUTHNER; HEIDER, 2000; ANDREONI; GIANFREDA, 2007; TIERNEY; YOUNG, 2010; ABBASIAN et al., 2015).

Figura 2.2 Catabolismo de tolueno via adição de fumarato ao grupo metil.



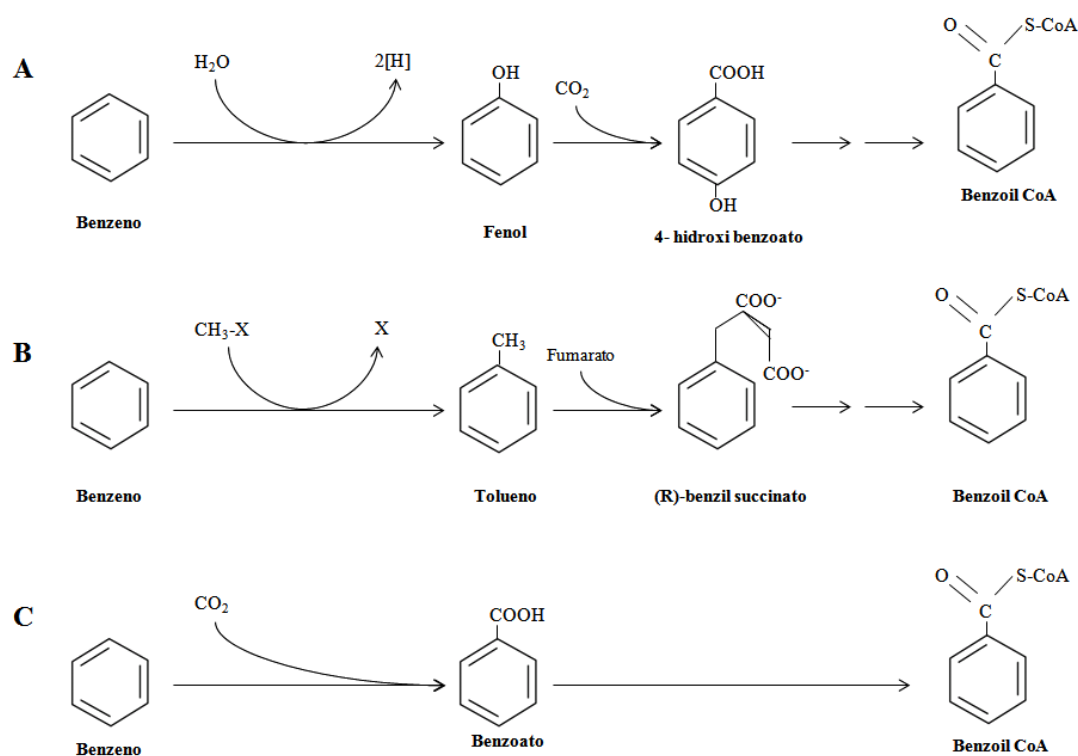
Fonte: Adaptado de Abbasian et al. (2015)

2.2.2. Hidroxilação

O fenol também foi detectado como intermediário na degradação anaeróbica de benzeno por pesquisadores, propondo a hidroxilação como uma rota de ativação inicial de

degradação desse composto (Figura 2.3-A) (CHAKRABORTY; COATES, 2005; KUNAPULI et al., 2008; ABU LABAN et al., 2009). Devido à sua abundância em sistemas biológicos, a água ou O_2 são os precursores usuais do grupo hidroxil. A primeira evidência de hidroxilação anaeróbia do benzeno para formar fenol foi obtida a partir de um sistema metanogênico onde os autores encontraram ^{18}O marcado proveniente da água no fenol proveniente da degradação do benzeno, mostrando que a hidroxilação a partir da água pode ser uma possível rota de ativação (VOGEL; GRBIC-GALIC, 1986). Chakraborty e Coates (2005) mostraram em sua pesquisa a produção de benzoato e fenol a partir do benzeno por uma cultura pura, o que corrobora as descobertas anteriores (CHAKRABORTY; COATES, 2005). Nesse caso, propôs-se que o fenol fosse, em vez disso, derivado de uma reação com oxigênio molecular e uma enzima. Estudos recentes mostraram uma formação abiótica de fenol a partir de benzeno em meios de cultura contendo bactérias redutoras de sulfato para organismos redutores de ferro e sulfato pelo contato com o ar (ABU LABAN et al., 2009; KUNAPULI et al., 2008). Contudo o fenol como intermediário proveniente da degradação do benzeno deve ser interpretado com cautela.

Figura 2.3 Possíveis rotas metabólicas de degradação anaeróbia inicial do benzeno



Fonte: Weelink et al. (2010). A: Hidroxilação; B: metilação; C: carboxilação.

2.2.3. *Metilação*

Estudos de análise de metabólitos realizados usando benzeno marcado com ^{13}C encontraram, no tolueno, carbono marcado proveniente do composto benzeno, sugerindo que a rota de ativação inicial envolve a metilação do benzeno para tolueno, seguida da adição de fumarato para benzilsuccinato (Figura 2.3-B), que depois seria degradado pela via de degradação de tolueno, levando a benzoil-CoA (KUNAPULI et al., 2008; ULRICH; BELLER; EDWARDS, 2005). No entanto, isso pareceu improvável a partir de análises de metabólitos, já que o benzilsuccinato ou compostos relacionados não foram detectados (ABU LABAN et al., 2010; KUNAPULI et al., 2008).

2.2.4. *Carboxilação*

Muitas bactérias anaeróbias utilizam enzimas carboxilase no primeiro passo da degradação anaeróbia de hidrocarbonetos para adicionar um grupo carboxil diretamente nos compostos alifáticos, como, por exemplo, o benzeno, convertendo em seu correspondente carboxilato (Figura 2.3-C) (ABBASIAN et al., 2015; ANDREONI; GIANFREDA, 2007; GHATTAS et al., 2017).

O benzoato, precursor do benzoil-CoA (CALDWELL; SUFLITA, 2000; FUCHS, 2008), foi encontrado em algumas culturas microbianas, o que poderia indicar que a carboxilação direta é o passo de ativação inicial (CHAKRABORTY; COATES, 2005; WAALS et al., 2017). No entanto, os estudos realizados com benzeno marcado com ^{13}C não chegaram a um consenso. Estudos indicam que o grupo carboxil marcado com ^{13}C do benzoato detectado é derivado do benzeno, com origem no processo de degradação celular (CALDWELL e SUFLITA, 2000). Outros estudos apontam que o grupo carboxil pode ser proveniente do tampão de carbonato (CHAKRABORTY; COATES, 2004; KUNAPULI et al., 2008).

2.3. **Biodegradação de compostos BTEX**

Diversas tecnologias para a remediação têm sido aplicadas em áreas contaminadas por derivados de petróleo. Muitos métodos convencionais de remediação físico-químicos para áreas contaminadas com BTEX são caros devido ao custo de escavação e transporte de grandes quantidades de materiais contaminados por exemplo, para lavagem de solo ex-situ, extração de vapores, bombeamento e tratamento de águas subterrâneas, injeção de ar na zona

saturada (*air sparging*), inativação química (uso de permanganato de potássio e/ou peróxido de hidrogênio como - oxidante para mineralizar contaminantes não aquosos, como o petróleo) e incineração (FARHADIAN et al., 2008; VARJANI, 2017). No entanto, a remoção biológica de BTEX é uma estratégia econômica e ambientalmente correta para tratamento de um ambiente contaminado (SHIM; YANG, 2002; SURENDRA; MAHALINGAM; VELAN, 2017; WU et al., 2015). As tecnologias de biorremediação utilizam microrganismos para tratar contaminantes pela degradação de compostos orgânicos em materiais menos tóxicos, como CO₂, metano, água e sais inorgânicos. Essas tecnologias incluem biorremediação intrínseca ou aumentada e podem ser realizadas *in situ* ou *ex situ* em condições aeróbias ou anaeróbias (FARHADIAN et al., 2008).

A biorremediação *in situ* é conhecida como tecnologia a longo prazo e sempre há dúvidas sobre a uniformidade de tratamento devido à variabilidade nas características do solo e da água subterrânea. Mas esse processo possui algumas vantagens, como a sua relativa simplicidade, baixo custo, boa eficiência e falta de produção de resíduos secundários (DOTT et al., 1995).

Já na biorremediação *ex situ*, o contaminante é tratado fora do local de contaminação, havendo um deslocamento do material contaminado (FARHADIAN et al., 2008). A biorremediação *ex situ* através de reator biológico anaeróbio foi utilizada com sucesso no tratamento de água contaminada com hidrocarbonetos monoaromáticos (DE NARDI et al., 2005). Os autores testaram dois reatores de fluxo horizontal em escala de bancada inoculados com biomassa anaeróbia com o objetivo de avaliar seu desempenho na remoção de águas subterrâneas contaminadas com gasolina. O primeiro reator foi alimentado inicialmente com substrato sintético contendo proteína, carboidratos e BTEX solubilizados em etanol, e o segundo, simulando uma contaminação real por gasolina. As eficiências de remoção de DQO foi de 96%, e as eficiências de remoção de BTEX variaram de 75 a 99% durante esse período experimental.

Muito provavelmente, a presença contínua de hidrocarbonetos na terra através da evolução da vida também moldou a evolução das vias metabólicas permitindo que os microrganismos os utilizassem como fontes de carbono (WILKES; SCHWARZBAUER, 2010). A variabilidade nos aglomerados de genes e a presença de muitas enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos aromáticos proporcionam aos microrganismos a capacidade de degradar uma grande variedade de compostos, incluindo os derivados de fontes antropogênicas (MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016).

Estudos anteriores sobre a biodegradação de BTEX tenderam a se concentrar em microrganismos isolados, no entanto as culturas puras parecem ser impotentes no tratamento conjunto de BTEX (JIN; CHOI; JEON, 2013; PRENAFETA-BOLD et al., 2004), em que a utilização de consórcio microbiano parece ser uma estratégia mais eficiente (MUKHERJEE; BORDOLOI, 2012).

Embora a biorremediação tenha muitas vantagens, essa tecnologia deve ser otimizada em estudos e pesquisas devido a algumas desvantagens que apresenta, como, por exemplo, o tempo de processo de remediação, que é maior do que o do tratamento térmico ou físico-químico (VARJANI, 2017). É difícil hipotetizar da escala de laboratório para o estudo de campo, já que muitos estudos em escala de laboratório ou piloto não proporcionam resultados idênticos em condições de campo (ERSAHIN et al., 2017). O registro da diversidade microbiana também é necessário de modo que a melhor resistência ao estresse físico e químico pode ser alcançada, e a alta capacidade de degradação de microrganismos pode ser facilmente realizada para fins de remediação (VARJANI; UPASANI, 2017).

Nos últimos anos, a biotecnologia ambiental tem sido aplicada para fornecer um método mais compatível com o meio ambiente e econômico para remediar os poluentes orgânicos persistentes. No entanto, a biorremediação completa é difícil de alcançar por sofrer influências de condições naturais e de se manterem controladas as condições ideais de biodegradação (VARJANI; GNANSOUNOU; PANDEY, 2017).

Existem, ainda, vários aspectos da remoção de hidrocarbonetos que permanecem desconhecidos ou que possuem informações insuficientes, o que requer atenção futura. Os tópicos abaixo apresentam o conhecimento sobre a remoção biológica de hidrocarbonetos monoaromáticos presente no meio líquido contaminado.

2.3.1. Biodegradação aeróbia de BTEX

Os processos aeróbios de tratamento são conduzidos por comunidades microbianas heterogêneas, que estabelecem complexas interações ecológicas. A biomassa é constituída de diversas espécies microbianas, incluindo predominantemente bactérias, fungos e protozoários (MELLO, 2007). Muitas bactérias podem degradar o BTEX em condições aeróbias, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Comamonas*, *Coccobacillus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Terrimonas*, *Sphingomonas*, *Chryseobacterium* e *Fulvimonas* (DENG; YANG; DENG, 2017). A respiração aeróbia se baseia na presença de um doador de elétrons, a matéria orgânica poluente, e de um aceptor final de elétrons, o oxigênio. A grande diferença de

potencial de oxirredução entre o acceptor e o doador de elétrons permite que as moléculas orgânicas sejam oxidadas a CO₂ com grande produção de ATP (adenosina trifosfato) (DENG; YANG; DENG, 2017; MELLO, 2007). Dessa disponibilidade energética, decorre acentuado crescimento microbiano no processo aeróbio (MELLO, 2007).

A degradação aeróbia da maioria dos poluentes orgânicos é considerada a mais rápida e completa (OLAJIRE; ESSIEN, 2014). Os autores comentam que o ataque inicial de poluentes orgânicos é um processo oxidativo e de ativação, como a incorporação de oxigênio na molécula do poluente, que é a reação enzimática chave catalisada por oxigenases (DENG; YANG; DENG, 2017; EL-NAAS; ACIO; EL TELIB, 2014; OLAJIRE; ESSIEN, 2014; VARJANI, 2017). O processo utiliza o oxigênio dissolvido (OD) na ativação do anel aromático, na oxidação dos subprodutos formados e como o acceptor de elétrons para sua completa degradação (ANDREONI; GIANFREDA, 2007; CHIU et al., 2017). As vias de degradação periférica convertem os poluentes orgânicos passo a passo em intermediários do metabolismo central (EL-NAAS; ACIO; EL TELIB, 2014). Um composto aromático só pode ser considerado biodegradável se o anel sofrer clivagem (DENG; YANG; DENG, 2017; EL-NAAS; ACIO; EL TELIB, 2014; OLAJIRE; ESSIEN, 2014; VARJANI, 2017). Por exemplo, o benzeno, através da dioxigenase, é convertido em catecol, já o tolueno e o etilbenzeno são degradados em caminhos separados levando à produção dos seus principais intermediários, 3-metilcatecol e 3-etilcatecol. Por fim, os xilenos são todos metabolizados para catecois mono-metilados, como, por exemplo, o 3-metilcatecol (EL-NAAS; ACIO; EL TELIB, 2014; SURENDRA; MAHALINGAM; VELAN, 2017), ou seja, o anel é aberto e depois degradado, finalmente, produzindo compostos de baixo peso molecular, tais como piruvato e acetaldeído, que podem ser mais oxidados através do ciclo de Krebs (SURENDRA; MAHALINGAM; VELAN, 2017).

Entretanto, esses processos podem apresentar perdas significativas dos compostos por volatilização durante a aeração e elevada produção de lodo quando comparado aos processos anaeróbios (FARHADIAN et al., 2008).

2.3.2. Biodegradação anaeróbia de BTEX

Pesquisas e estudos da degradação anaeróbia de hidrocarbonetos são mais recentes em comparação à degradação aeróbia (MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016). A decomposição de hidrocarbonetos anaeróbios na natureza é geralmente encontrada em zonas mais profundas e anóxicas, como vazamentos naturais de óleo e gás, infiltrações em terra ou

no fundo do mar e os sítios contaminados com óleo ou seus subprodutos (ABBASIAN et al., 2015). Além disso, esse tipo de biodegradação pode ocorrer abaixo da superfície das áreas expostas ao oxigênio, onde a atividade biológica aeróbia cessa à medida que todo o oxigênio é utilizado (VARJANI; UPASANI, 2017; WAALS et al., 2017). Na maioria dos casos, a atividade degradante de microrganismos aeróbios em um baixo gradiente de oxigênio limita a disponibilidade de oxigênio, levando a uma sucessão de microrganismos anaeróbios que degradam hidrocarbonetos (ABBASIAN et al., 2015). Após o esgotamento do oxigênio, há um emprego sequencial dos aceptores finais de elétrons (nitrato, ferro, sulfato e manganês) para fornecer a maior energia potencial da degradação de hidrocarbonetos (VARJANI, 2017).

Assim, a literatura reporta que o uso de diferentes aceptores finais de elétrons, tais como os citados anteriormente, na remediação anaeróbia de águas contaminadas com BTEX, tem melhorado bastante a eficiência de diversos sistemas de tratamento (CALDWELL; SUFLITA, 2000; FARHADIAN et al., 2008; MÜLLER et al., 2017; SPERFELD et al., 2018; STASIK; WICK; WENDT-POTTHOFF, 2015; ZHANG et al., 2013).

Ghattas et al. (2017) comentam que hidrocarbonetos aromáticos também podem ser degradados em condições metanogênicas. No entanto, os microrganismos degradadores sob via metanogênica podem não conseguir degradar diretamente essas moléculas complexas e, portanto, dependem do fornecimento de doadores de elétrons e substrato (H_2/CO_2 , formiato/acetato) por outros microrganismos. Portanto, os metanogênicos geralmente coexistem em um consórcio microbiano com seres hidrolíticos, fermentativos, sintróficos e acetogênicos.

Os hidrocarbonetos são inicialmente ativados, por via anaeróbia, através da adição de uma molécula de água (H_2O) à ligação dupla ou pela adição de um grupo hidroxila ao átomo de carbono adjacente à ligação não saturada (ABBASIAN et al., 2015). Vários microrganismos anaeróbios são capazes de mineralizar os hidrocarbonetos em metano como parte dos consórcios microbianos. Tal consórcio pode ser visto na relação de simbiose entre arqueias metanogênicas e bactérias produtoras de hidrogênio para a degradação de hidrocarbonetos aromáticos em metano e CO_2 . Nessa cooperação, o H_2 gerado por microrganismos especiais degradantes de hidrocarbonetos é usado para redução de CO_2 por arqueias metanogênicas para produzir metano (ABBASIAN et al., 2015; GRABOWSKI; BLANCHET; JEANTHON, 2005) como demonstrado nas Equações 2.1 e 2.2 para o hidrocarboneto tolueno.

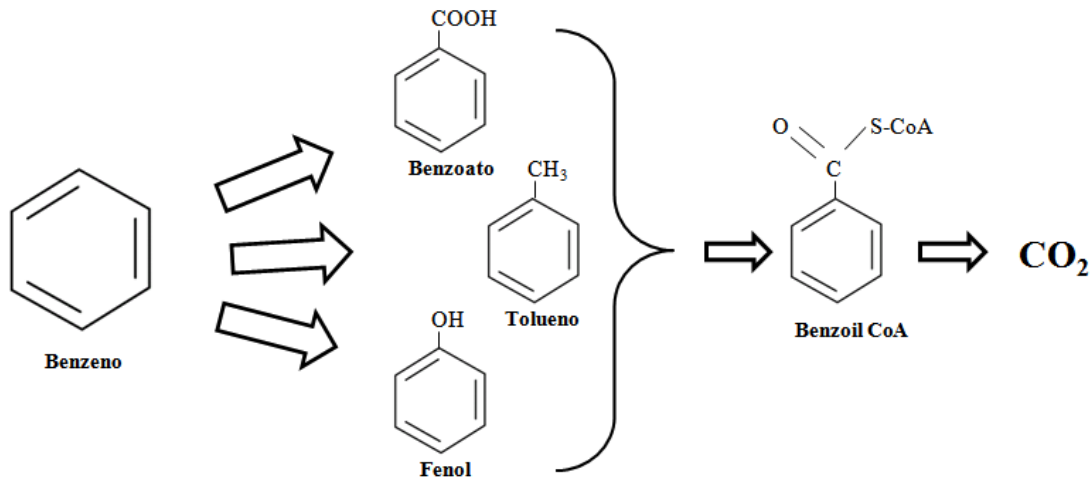


2.3.2.1. *Biodegradação anaeróbia de benzeno*

O benzeno é o composto mais recalcitrante dos compostos BTEX devido à estabilidade das ligações carbono-carbono e à estrutura simétrica do anel, que o tornam altamente resistente ao processo de clivagem. Por essas características, o benzeno ainda é considerado o mais recalcitrante de todos os compostos BTEX sob condições anaeróbias (MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016; WEELINK; VAN EEKERT; STAMS, 2010). Na última década, estudos demonstraram que a capacidade de degradação dos microrganismos anaeróbios é muito maior do que se supunha anteriormente, e muitos contaminantes de hidrocarbonetos considerados anteriormente recalcitrantes são agora conhecidos como biodegradáveis na ausência de oxigênio (MASUMOTO et al., 2012; FIRMINO et al., 2015). Isso tem implicações ecológicas importantes em relação às estratégias de biorremediação de solos e sedimentos contaminados com petróleo (COATES; CHAKRABORTY; MCINERNEY, 2002). Cunningham et al. (2001), utilizaram nitrato e sulfato para acelerar a biodegradação anaeróbia *in situ* de compostos BTEX um aquífero contaminado com petróleo em Seal Beach, CA. A degradação do benzeno também foi favorecida, mas apenas no final da demonstração de 15 meses. Os resultados são consistentes com a hipótese de que o benzeno pode ser biodegradado anaerobiamente após a remoção de outros hidrocarbonetos preferencialmente degradados.

As vias de degradação anaeróbia do benzeno não estão bem definidas até o momento, muito embora os primeiros passos na transformação desse composto possam constituir de hidroxilação, carboxilação ou metilação com a formação conseguinte do intermediário central, benzoil-CoA (Figura 2.4) (WEELINK et al., 2010; MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016).

Figura 2.4 Ativação inicial da degradação anaeróbia de benzeno em que o benzeno sofre inicialmente carboxilação, metilação ou hidroxilação com subsequente transformação em benzoil-CoA.



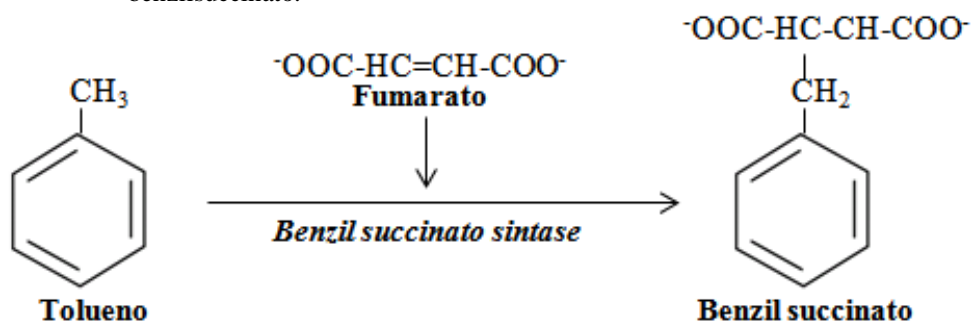
Fonte: Chakraborty e Coates (2004)

2.3.2.2. *Biodegradação anaeróbia de tolueno*

Sob condições anaeróbias, o tolueno é um dos hidrocarbonetos mais facilmente biodegradáveis, e muitos conhecimentos fundamentais sobre o metabolismo de hidrocarbonetos anaeróbios foram extraídos de estudos com esse modelo de substrato aromático (FOWLER et al., 2012, 2018; FIRMINO et al., 2015). A oxidação de tolueno em condições anaeróbias pode ser acoplada com a redução de nitrato, manganês, ferro ou sulfato e pode ser consumida sob condições fototróficas ou metanogênicas por culturas puras ou mistas altamente enriquecidas (CHAKRABORTY; COATES, 2004; FOWLER et al., 2018; HEIDER et al., 1998; WEELINK; VAN EEKERT; STAMS, 2010).

Em algumas culturas mineralizadoras de tolueno anaeróbias, o benzoato tem sido detectado como um produto transitoriamente excretado (HEIDER et al., 1998). Os autores ainda comentam que o tolueno pode ser ativado por outro mecanismo, conhecido como adição de fumarato, formando assim benzilsuccinato (Figura 2.5). Contudo mecanismos alternativos de ativação do tolueno na ausência de aceptores finais de elétrons podem ser possíveis, como a hidroxilação do anel ou do grupo metil (GRBIC-GALIC; VOGEL, 1987).

Figura 2.5 Ativação de tolueno através da adição de fumarato ao grupo metil para formar benzilsuccinato.

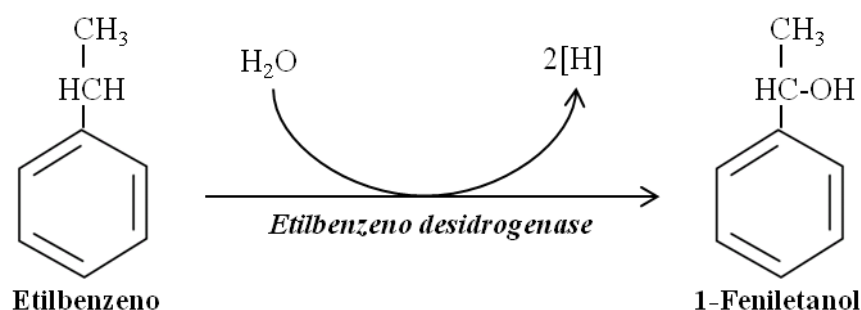


Fonte: Chakraborty e Coates (2004)

2.3.2.3. Biodegradação anaeróbia de etilbenzeno

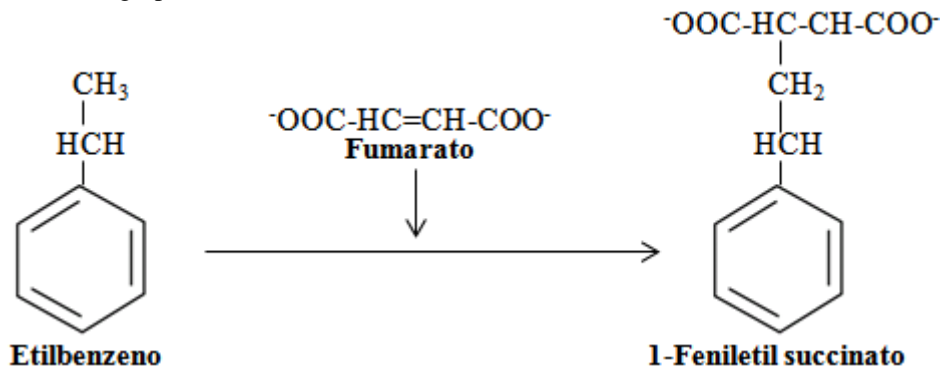
Semelhante aos demais hidrocarbonetos, foi observada a presença de benzoato ou benzoil-CoA no catabolismo intermediário do etilbenzeno por microrganismos redutores de sulfato e nitrato, usados como aceptores de elétrons na biodegradação anaeróbia do etilbenzeno (BALL et al., 1996; KÜHNER et al., 2005). Embora o etilbenzeno seja quimicamente muito semelhante ao tolueno, geralmente é degradado através de via diferente (WEELINK; VAN EEKERT; STAMS, 2010). A etapa inicial do processo é catalisada por uma enzima chamada etilbenzeno desidrogenase (Figura 2.6), que oxida o grupo metil, formando (S)-1-feniletanol como primeiro intermediário. A rota continua até a formação do benzoil-CoA, o qual é o intermediário central na degradação anaeróbia dos compostos aromáticos (KÜHNER et al., 2005). Entretanto, utilizando o sulfato comoceptor final de elétrons, a Deltaproteobacteria ativa o etilbenzeno pela adição de fumarato (Figura 2.7), de maneira semelhante ao tolueno (KNIEMEYER et al., 2003).

Figura 2.6 Ativação inicial do etilbenzeno através da reação de desidrogenação.



Fonte: Chakraborty e Coates (2004)

Figura 2.7 Ativação inicial do etilbenzeno através da adição de fumarato no segundo carbono do grupo etil.



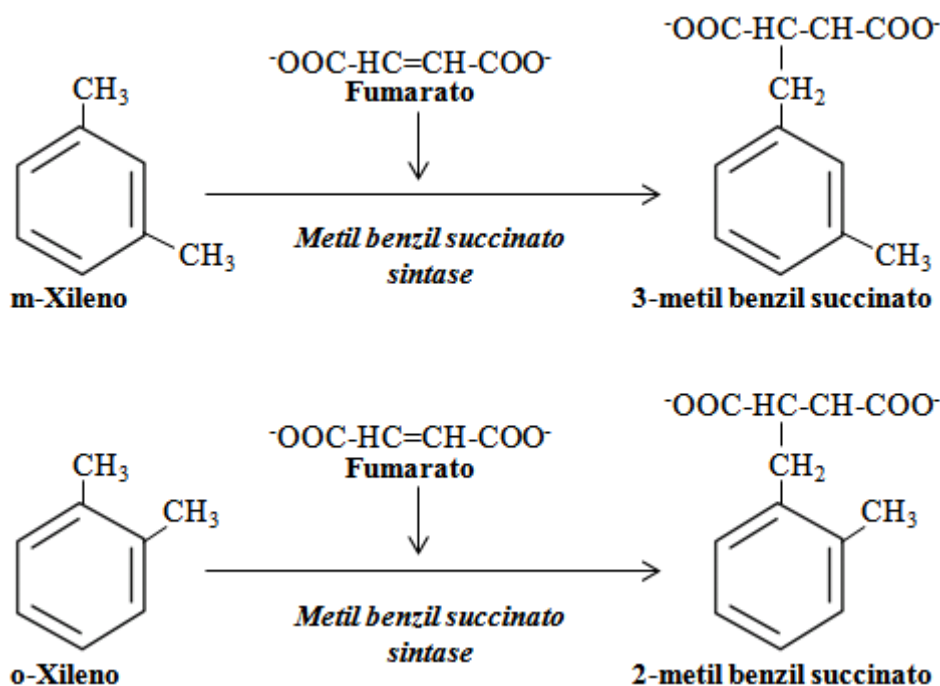
Fonte: Chakraborty e Coates (2004)

2.3.2.4. *Biodegradação anaeróbia de xileno*

A biodegradação de xilenos por microrganismos anaeróbios é reportada com o uso de sulfato e nitrato como aceptores de elétrons (EDWARDS et al., 1992).

Embora seja conhecido por ser quimicamente muito estável, o xileno pode ser ativado de forma redutora em condições anóxicas. A via de degradação anaeróbia do xileno ainda não é completamente compreendida, e o conhecimento sobre os microrganismos responsáveis é limitado (BOZINOVSKI et al., 2014). A via de degradação anaeróbia proposta indica, como etapa inicial, a adição de fumarato ao xileno, que forma 3 ou 2-metilbenzoil-CoA (Figura 2.8), que é reduzido no segundo passo da via de degradação (JUÁREZ et al., 2013).

Figura 2.8 A ativação de m e o-xileno através da adição de fumarato em um dos grupos metis



Fonte: Chakraborty e Coates (2004)

2.3.3. Biodegradação microaeróbia de BTEX

O O₂ é um reagente chave na primeira etapa de ativação para abrir o anel aromático (DENG; YANG; DENG, 2017; EL-NAAS; ACIO; EL TELIB, 2014; OLAJIRE; ESSIEN, 2014; VARJANI, 2017). Como os microrganismos ganham mais energia para suportar a síntese usando o O₂ como um acceptor final de elétrons, a biodegradação aeróbia do benzeno, por exemplo, ocorre amplamente quando o OD está disponível. De acordo com a estequiometria, a mineralização aeróbia completa de 1 mg de benzeno requer aproximadamente 1,4 mg de O₂, o que significa que o nível de OD em condições ambientais (8-12 mg·L⁻¹, segundo o autor) é suficiente para a oxidação de 5-8 mg·L⁻¹ de benzeno. Muitas vezes, a concentração de OD geralmente está bem abaixo da saturação. Embora a adição de oxigênio na água subterrânea, ou em outro sistema, por exemplo, acelere a biodegradação, torna a biorremediação onerosa. Assim, a biodegradação de benzeno sob condições de limitação de oxigênio pode ser de grande valor para a biorremediação *in situ*, por exemplo (LIU, 2015).

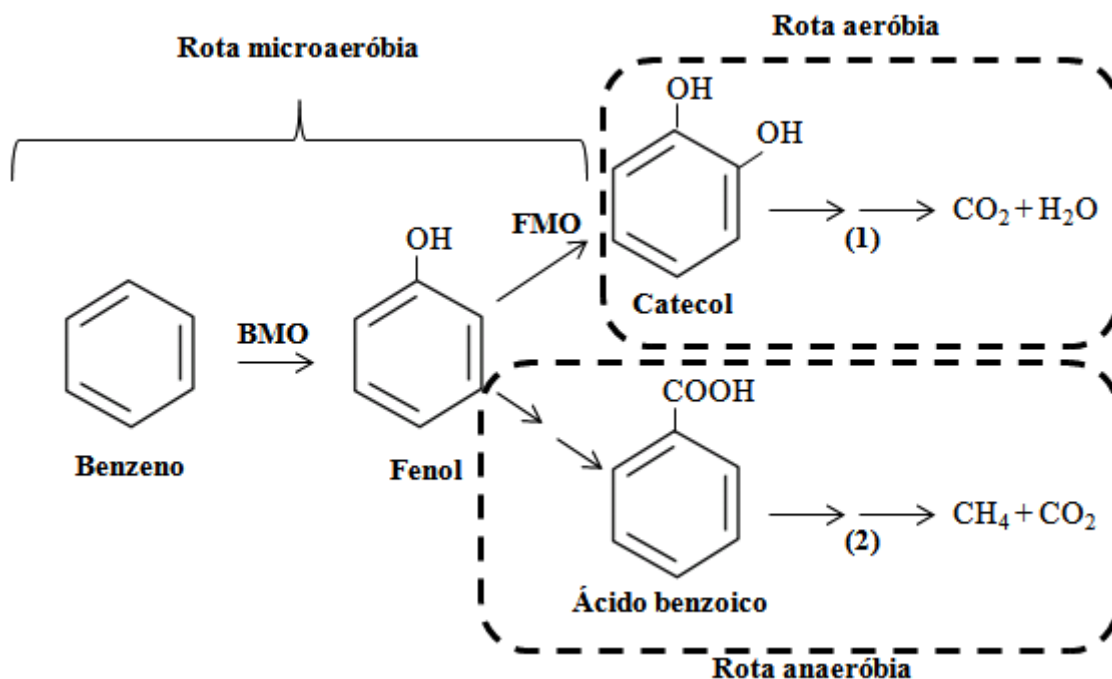
A biodegradação de benzeno foi observada sob condições microaeróbias, em que o anel aromático do benzeno apresentou clivagem em todas as concentrações iniciais de oxigênio dissolvido (DO) de 0,05 a 1 mg·L⁻¹ (YERUSHALMI et al., 2001). Contudo, os

mesmos autores observaram em experimentos sob condições anaeróbias estritas uma ausência de biotransformação do benzeno mesmo decorridos quase seis meses de experimentos.

A microaeração também foi bem sucedida e colaborou no aumento da eficiência de remoção de compostos BTEX e fenol, em um experimento que comparou um reator totalmente anaeróbio com outro reator anaeróbio com aeração limitada (OD entre 0,2 e 0,3 mg·L⁻¹) para tratar águas residuárias petroquímicas de uma planta localizada da China (WU et al., 2015). Os reatores foram inoculados com lodo aeróbio (sistema de lodo ativado). Os autores relataram que, mesmo na presença de concentrações consideráveis de BTEX e fenol, na faixa de 44,61 mg·L⁻¹, o reator com aeração limitada apresentou eficiência de 82,1%. Em contrapartida, a eficiência no reator anaeróbio foi de apenas 38,7%.

Aburto et al. (2009) relataram biodegradação *in situ* de benzeno por microrganismos anaeróbios, mas apenas quando algum oxigênio estava presente. Na presença de concentrações baixas de oxigênio, o processo de ativação do anel benzênico, provavelmente, é iniciado por microrganismos facultativos com produção de intermediários dos hidrocarbonetos. Em seguida, os intermediários (por exemplo, catecol, benzoato e fenol) são consumidos anaerobiamente, auxiliados por sulfato ou nitrato como acceptor final de elétrons (Figura 2.9) (LIU, 2015), ou por fermentação (FIRMINO et al., 2018), podendo chegar a mineralização completa do composto em estudo (LIU, 2015). Dessa forma, o biofilme formado na presença da microaeração, apresenta os microrganismos facultativos na camada mais externa do biofilme, devido ao oxigênio relativamente abundante, os quais usam o oxigênio para ativar ou oxidar completamente os hidrocarbonetos. Os intermediários podem, então, acumular com o esgotamento de oxigênio ao longo do interior do biofilme. No interior do biofilme, ausente de oxigênio, os microrganismos anaeróbios podem degradar posteriormente os intermediários (LIU, 2015).

Figura 2.9 Rota metabólica de degradação de benzeno sob condições microaeróbias.



BMO, benzeno mono-oxigenase; FMO, fenol mono-oxigenase. A mineralização completa de benzeno está condicionada à presença de quantidade adequada de oxigênio (1) ou de microrganismos apropriados (2).
Fonte: adaptado: Yerushalmi et al. (2001)

2.4. Reatores contínuos anaeróbios tratando compostos BTEX

Microrganismos anaeróbios são capazes de remover hidrocarbonetos aromáticos sob condições metanogênicas, na presença de diferentes aceptores finais de elétrons e sob condições microaeróbias como observado na Tabela 2.2. Reatores anaeróbios contínuos têm apresentado eficiências relevantes para tratar efluentes contendo hidrocarbonetos aromáticos. Nos parágrafos posteriores, serão apresentados alguns resultados alcançados com reatores anaeróbios diversos.

A bioestimulação é uma das estratégias de biorremediação que tem sido comumente empregada. Agentes bioestimuladores, incluindo aceptores de elétrons, co-substratos e nutrientes, têm sido empregados na tentativa de estimular microrganismos para degradar contaminantes orgânicos como os hidrocarbonetos aromáticos (DE NARDI; ZAIAT; FORESTI, 2007; ENRIGHT; COLLINS; O'FLAHERTY, 2007; FIRMINO et al., 2015b, 2018; GUSMÃO et al., 2007; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009; MARTÍNEZ; CUERVO-LÓPEZ; GOMEZ, 2007; RIBEIRO et al., 2013).

Na ausência de oxigênio, microrganismos anaeróbios podem crescer com aceptores de elétrons alternativos que se ligam a vários processos metabólicos anaeróbios,

incluindo, principalmente, a desnitrificação (GUSMÃO et al., 2007; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009; MARTÍNEZ; CUERVO-LÓPEZ; GOMEZ, 2007; RIBEIRO et al., 2013) e redução de sulfato (FIRMINO et al., 2015b).

Tabela 2.2 Sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo na remoção de BTEX.

Reator	TDH (d)	T (°C)	Hidrocarboneto	Conc. (mg·L ⁻¹)	Co-substrato	Aceptor de elétrons	Conc. (mg·L ⁻¹)	Remoção (%)	Referências
RAHLF	11,4	29-31	B	5,6-14,7	Etanol	-	-	70-95	De Nardi et al. (2007)
			T	5,1-12,9					
			E	4,9-11,8					
			o-X	4,9-12,2					
EGSB	24-48	15	T	6,0-84	Etanol e AGV	-	-	82-100	Enright et al. (2007)
RAHLF	12	28-32	B	41	Etanol	NO ₃ ⁻	2303	89	Gusmão et al. (2007)
			T	28			1997	99	
			E	31			2427	99	
			o-X	29			2290	94	
			m-X	28			1851	99	
			p-X	32			2259	99	
UASB	48	30	T	55-275	Acetato	NO ₃ ⁻	1575	95-99	Martínez; Cuervo-López; Gomez (2007)
EGSB	24	9,0-15	T	4,5-155	Etanol e AGV	-	-	72-96	Mckeown et al. (2008)
UASB	48	30	T	55-219	Acetato	NO ₃ ⁻	630	51-91	Martínez-Hernández et al. (2009)
RAHLF	13,5	29-31	B	1,4-6,7	Etanol	NO ₃ ⁻	133- 266	99	Ribeiro et al. (2013)
			T	1,6-4,9				99	
			E	1,6-3,7				99	
			o-X	1,4-4,2				99	
			m,p-X	2,6-7,2				99	

Tabela 2.3 Sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo na remoção de BTEX. (cont.)

Reator	TDH (d)	T (°C)	Hidrocarboneto	Conc. (mg·L ⁻¹)	Co-substrato	Aceptor de elétrons	Conc. (mg·L ⁻¹)	Remoção (%)	Referências
UASB	24-36	27	B	2,6-3,4	Etanol	-	-	38-62	Firmino et al. (2015)
			T	2,4-3,3				75-96	
			E	2,5-3,5				67-91	
			o-X	2,2-3,1				59-85	
			m,p-X	5,0-6,8				67-89	
UASB	48	27	B	2,5-3,8	Etanol	SO ₄ ²⁻	155-1901	35-46	Firmino et al. (2015)
			T	2,3-3,6				55-76	
			E	2,2-3,8				72-80	
			o-X	2,2-3,8				63-75	
			m,p-X	4,2-7,4				70-81	
UASB microaerado	48	27	B	2,1-3,0	Etanol	-	-	51-93	Firmino et al. (2018)
			T	2,5-3,3				90-98	
			E	2,8-3,4				86-98	
			o-X	2,4-2,9				80-90	
			m,p-X	5,5-6,7				86-91	

RAHLF, reator anaeróbio horizontal de leito fixo; EGSB, *expanded granular sludge bed*; UASB, *upflow anaerobic sludge blanket*; B, benzeno; T, tolueno; E, etilbenzeno; m,p-X, m,p-xilenos; o-X: o-xileno

Segundo Zhang e Lo (2015), com a adição de diferentes aceptores de elétrons, diferentes desempenhos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos podem ser observados. Os autores comentam que as diferenças podem ser refletidas em pelo menos três aspectos, incluindo (i) ativação de degradação, (ii) degradação preferencial com diferentes estruturas de hidrocarbonetos e cadeias de carbono e (iii) taxa de degradação. Estes resultados sugerem um papel vital de vários processos metabólicos na abordagem da degradação de BTEX, o que merece mais atenção da pesquisa.

Gusmão et al. (2007) estudaram a remoção dos compostos BTEX e etanol sob condições desnitrificantes em um biorreator anaeróbico com biomassa pura imobilizada e fluxo horizontal, utilizaram como suporte espuma de poliuretano e obtiveram bom resultados, com uma eficiência de 89% para remoção do benzeno, chegando a 99% para os demais compostos.

Martínez, Cuervo-López e Gomez (2007), semelhante aos autores do parágrafo anterior, também trabalharam com cultura pura desnitrificante alimentada com concentração de nitrato semelhante, porém na presença de apenas um hidrocarboneto, o tolueno, e com concentrações mais elevadas. Eficientemente o sistema desnitrificante no reator UASB removeu consideravelmente o hidrocarboneto, até mesmo para a concentração mais elevada estudada ($275 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), cuja eficiência foi de 98%.

Além de boas eficiências de remoção de compostos aromáticos por culturas desnitrificantes selecionadas inoculadas em reatores anaeróbios, culturas não puras foram capazes de remover BTEX em meio desnitrificante, facilitando a utilização deste reator sob condições desnitrificantes no tratamento de aquíferos contaminados com gasolina (RIBEIRO et al., 2013). Os autores utilizaram um efluente mais complexo (uma mistura de gasolina comercial e água) do que o utilizado por Gusmão et al. (2007) e Martínez, Cuervo-López e Gomez (2007) a ser tratado em reator anaeróbico desnitrificante de fluxo horizontal e biomassa imobilizada. Os resultados apresentaram valores de 99% de remoção, mesmo quando a concentração dos hidrocarbonetos foi aumentada no afluente.

A degradação anaeróbia de BTEX pode ser estimulada, também, pela adição de sulfato como aceptor alternativo de elétrons, e, conseqüentemente, elevadas eficiências de remoção podem ser alcançadas. Firmino et al. (2015) utilizaram um reator UASB com cultura mista para remover $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada hidrocarboneto na presença de SO_4^{2-} (155 a $1901 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Eles observaram que o aumento da concentração de sulfato não melhorou a remoção dos compostos BTEX no meio líquido, sugerindo que as bactérias redutoras de sulfato não estariam diretamente relacionadas à ativação inicial dos compostos aromáticos.

A biodegradação de compostos aromáticos parece, também, ser melhorada quando aceptores são disponibilizados no sítio contaminado. Cunningham et al. (2001) demonstraram que a injeção combinada de nitrato e sulfato em um aquífero contaminado por petróleo acelerou a remoção de BTEX em comparação com a remediação por atenuação natural. Corseuil et al. (1998) observaram que os padrões de degradação do tolueno foram significativamente afetados pelo etanol em microcosmos desnitrificantes quando o nitrato era limitante. Schreiber e Bahr (2002) verificaram que no interior do aquífero que contém as maiores concentrações de BTEX, a adição de nitrato estimulou a biodegradação de tolueno, etilbenzeno e m, p-xilenos, mas não de benzeno. Costa, Nunes e Corseuil (2009) observaram que a bioestimulação de nitrato é uma alternativa altamente eficiente na remediação de água subterrânea afetada por gasolina. Além de otimizar a biodegradação anaeróbia de BTEX em tratamentos *in situ*, os aceptores de elétrons aceleram a metabolização de etanol, um componente obrigatório da gasolina brasileira, sob condições anaeróbias.

A bioestimulação pela adição de co-substrato, pode ser também, considerada uma estratégia viável para melhorar a degradação anaeróbia de hidrocarbonetos. Estudos anteriores descobriram que os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), um dos importantes componentes do hidrocarboneto de petróleo, podem ser mais eficazmente removidos quando se utiliza o co-substrato como agente de bioestimulação, em comparação com os receptores de elétrons e nutrientes (ZHANG; LO, 2015).

Em biorreatores anaeróbios, os estudos relevantes focaram principalmente na viabilidade do uso de etanol, acetato ou ácidos orgânicos voláteis (AGV) para facilitar a degradação de alguns poluentes como, por exemplo os BTEX (ENRIGHT; COLLINS; O'FLAHERTY, 2007; MCKEOWN et al., 2008). Muitos estudos estudam a degradação de BTEX e etanol como co-substrato pelo fato de esses compostos estarem mais próximos a uma contaminação por vazamentos de postos de combustíveis (CORSEUIL et al., 1998, 2011).

Firmino et al. (2015), alcançaram aumento da porcentagem removida de BTEX quando a concentração afluyente do co-substrato, etanol, foi reduzido. Adicionalmente, como houve um aumento da eficiência de remoção dos compostos aromáticos logo após a redução da carga de co-substrato, os autores apontaram que algumas populações microbianas responsáveis pela fermentação inicial de etanol, também são capazes de iniciar a degradação de BTEX, embora a fermentação desses compostos para acetato e hidrogênio seja energeticamente menos favorável do que a do etanol. Já os resultados da pesquisa de Martínez, Cuervo-López e Gomez (2007) utilizando acetato como co-substrato na biorremediação de tolueno indicam que ambas as fontes de elétrons foram consumidas

simultaneamente, justificando um processo co-metabólico. Ácidos orgânicos voláteis foram misturados ao tolueno e avaliado o desempenho de um biorreator na eficiência de remoção de DQO e tolueno, e o conteúdo de metano do biogás (%). As eficiências de remoção de DQO e tolueno de 70 a 90% e 55 a 99%, respectivamente, foram alcançadas durante um período de investigação de 630 dias. Ensaio metabólico sugeriram que uma comunidade metanogênica com uso de H_2/CO_2 psicrotolerante se desenvolveu na biomassa com degradação de tolueno. Os resultados indicam a viabilidade da digestão anaeróbia a baixa temperatura para o tratamento de águas contaminadas com tolueno.

Recentemente, pesquisas com pequenas vazões de ar (microaeração) em biorreatores anaeróbios vem sendo estudada como alternativa de otimizar eficiências de remoção de hidrocarbonetos em meio líquido. Firmino et al. (2018) utilizaram um reator UASB, inoculado com lodo anaeróbio de cervejaria, operado com TDH de 48 h e microaerado com ar ($1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, equivalente a uma relação de $0,18\text{ L O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ alimentação) para degradar compostos BTEX ($3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada composto). O sistema foi operado em duas condições, anaeróbia e microaeróbia, alcançando aumento médio de 30% na eficiência de remoção de benzeno, composto considerado o mais recalcitrante, na etapa microaeróbia. Ainda foi comparado a influência do etanol na degradação de compostos BTEX em etapas anaeróbias e microaeróbias. Em condições anaeróbias e microaeróbias ao reduzir o co-substrato no meio líquido as eficiências de remoção foram mais relevantes (86 e 94%, respectivamente), em comparação às etapas em que o co-substrato esteve em maiores concentrações (80 e 88%, respectivamente).

Outro desafio de tratamentos de BTEX em biorreatores está relacionado com a característica volátil desses compostos. Contudo, Martínez, Cuervo-López e Gomez (2007) ao caracterizar o tolueno, observaram que a maior fração de tolueno estava presente no meio líquido, por conseguinte, o tolueno quantificado no gás do reator UASB apresentou valor insignificante, representando 1,7% do total de tolueno). Portanto, o reator UASB provou ser um sistema adequado para a avaliação do tolueno como fonte de elétrons no processo de desnitrificação, sem perdas por volatilização.

3. BIOENGENHARIA DE PROCESSOS APLICADA À DEGRADAÇÃO DE BTEX EM SISTEMAS DE TRATAMENTO MICROAERÓBIOS

SIQUEIRA, J. P. S. et al. Process bioengineering applied to BTEX degradation in microaerobic treatment systems. *Journal of Environmental Management*, v. 223, n. April, p. 426–432, 2018.

3.1. Introdução

Os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, geralmente conhecidos como BTEX, são hidrocarbonetos aromáticos comumente encontrados em produtos petrolíferos, como combustíveis (gasolina), solventes e intermediários de síntese de compostos orgânicos (BOLDEN; KWIATKOWSKI; COLBORN, 2015; PENG et al., 2015).

Entre as formas de contaminação da água subterrânea com BTEX, os postos de combustível são uma fonte significativa, seja por derramamento de lubrificantes ou aditivos de combustível, uso indevido de separadores de óleo ou, principalmente, vazamento de combustível de tanques de armazenamento subterrâneos (ALVES et al., 2017; CORSEUIL et al., 2011). Portanto, a contaminação da água com compostos monoaromáticos é um grave problema ambiental e de saúde pública, uma vez que esses compostos são tóxicos e potencialmente carcinogênicos para humanos (ALVES et al., 2017; CORSEUIL et al., 2011; CRUZ et al., 2017; FARHADIAN et al., 2008; TSANGARI et al., 2017).

Os hidrocarbonetos aromáticos podem ser degradados aerobiamente e anaerobiamente (VARJANI, 2017). No entanto, antes da década de 1980, as investigações envolvendo a remoção microbiológica desses compostos foram todas realizadas sob condições aeróbias, nas quais o oxigênio molecular é incorporado à molécula de hidrocarboneto pela atividade das oxigenases como a etapa inicial do processo oxidativo. Não se conhecia que organismos anaeróbios pudessem realizar uma reação semelhante (CHAKRABORTY; COATES, 2004). Contudo, as investigações atuais obtiveram descobertas importantes sobre a degradação de BTEX sob condições de nitrato, ferro, manganês, redução de sulfato e metanogênicas (FIRMINO et al., 2015b; RIBEIRO et al., 2013; STASIK; WICK; WENDT-POTTHOFF, 2015; VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

Recentemente, sistemas anaeróbios aplicados à remoção de BTEX têm sido estudados na presença de baixas concentrações de oxigênio para melhorar a remoção desses hidrocarbonetos de águas contaminadas (FIRMINO et al., 2018; WU et al., 2015), auxiliando

no processo enzimático, já que a biodegradação de BTEX envolve uma série de etapas usando diferentes enzimas (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017). Ao aplicar a microaeração, espera-se que um átomo de oxigênio seja incorporado ao hidrocarboneto aromático pela ação enzimática das mono-oxigenases, que transferem um átomo de oxigênio para o substrato enquanto reduzem o outro átomo de oxigênio à água (VARJANI; UPASANI, 2017)

Assim, sob tais condições microaeróbias, alguns microrganismos usam oxigênio apenas para introduzir grupos hidroxila no anel aromático, como nas clássicas vias aeróbicas, enquanto sua clivagem ocorre através de vias metabólicas anaeróbicas (CHAKRABORTY; COATES, 2004; FUCHS, 2008). Além disso, baixas concentrações de oxigênio suprimem a atividade enzimática das dioxigenases, impedindo a degradação pela respiração aeróbica, uma vez que não há oxigênio suficiente para atuar como receptor de elétrons (YERUSHALMI et al., 2001).

O estudo publicado recentemente mostrou a aplicabilidade bem sucedida da microaeração (em apenas uma vazão de ar e ponto de dosagem) para aumentar a remoção de BTEX em sistemas anaeróbios, particularmente para benzeno (com um aumento de remoção de 30%) (FIRMINO et al., 2018), este processo, especialmente com inóculo anaeróbio, ainda necessita ser melhor avaliado e entendido para subsidiar o projeto de um sistema de tratamento compacto para biorremediação de águas subterrâneas contaminadas ex situ ou mesmo para sua aplicação ao tratamento de efluentes petroquímicos.

Assim, o presente estudo avaliou o efeito de diferentes vazões de microaeração e pontos de dosagem e da recirculação de efluentes na degradação microaeróbia de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) em um biorreator metanogênico de fluxo contínuo. Além disso, uma análise de sensibilidade e recuperação para o sistema de tratamento foi realizada durante as simulações de falhas de microaeração.

3.2. Material e métodos

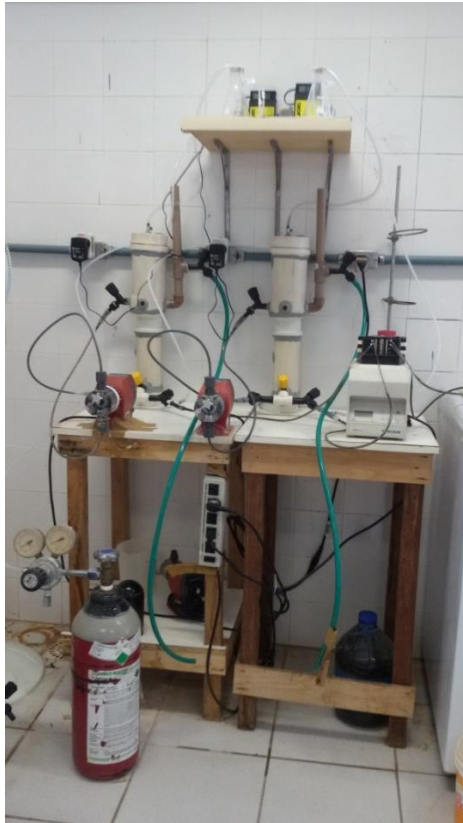
3.2.1. Configuração Experimental

O experimento de fluxo contínuo ($0,092\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) foi realizado em um reator UASB (manta de lodo anaeróbio de fluxo ascendente) (volume de trabalho de 2,2 L), em tubo de PVC para esgoto, que foi inoculado a 10% do seu volume de trabalho com lodo anaeróbio. (~

49 g VSS·L⁻¹) de um biorreator UASB em escala real para tratamento de esgoto doméstico (Fortaleza, Ceará, Brasil).

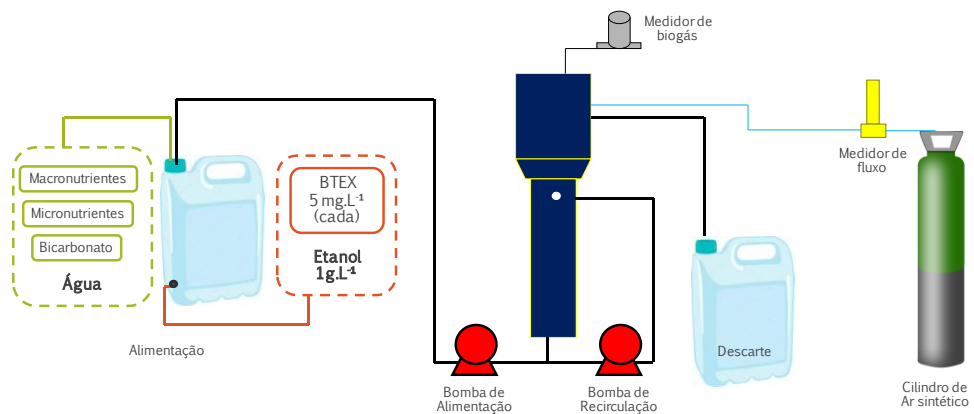
O biorreator (Figura 3.1 Biorreator UASB contínuo microaerado para remoção de BTEX. Figura 3.1e Figura 3.2) foi operado à temperatura ambiente de aproximadamente 27°C e alimentado com água sintética contaminada com BTEX por uma bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, EUA). A água contaminada sintética foi uma solução aquosa composta de BTEX (~ 4,2 mg·L⁻¹ de cada composto), benzeno (99,5%, Dinâmica, Brasil), tolueno (99,5%, Vetec, Brasil), etilbenzeno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA), o-xileno (98,0%, Fluka, EUA), m-xileno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA) e p-xileno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA), etanol (99,8 %, Dinâmica, Brasil) como co-substratos (1 g DQO·L⁻¹) e um meio basal preparado segundo (FIRMINO et al., 2010). Para manter o pH próximo de 7,0, a solução foi tamponada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) numa proporção de 1 g de NaHCO₃ para cada 1 g de DQO. A alimentação foi armazenada a aproximadamente 5°C em um tanque de polietileno de alta densidade (HDPE), que foi mantido fechado para evitar a perda de BTEX para a atmosfera por volatilização. O equilíbrio de pressão do tanque de alimentação foi mantido por uma agulha hipodérmica inserida em sua tampa.

Figura 3.1 Biorreator UASB contínuo microaerado para remoção de BTEX.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 3.2 Croqui do sistema



Fonte: elaborado pelo autor.

A fim de aumentar o contato entre o substrato e os microrganismos na manta de lodo, assim como para auxiliar na liberação de biogás e evitar a perda de biomassa devido ao efeito do pistão causado pelas bolhas de biogás retidas, o efluente foi continuamente recirculado a uma vazão média de aproximadamente $0,72 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ por uma bomba de dosagem (Concept Plus, ProMinent Dosiertechnik GmbH, Alemanha). Em alguns estágios

operacionais, ar sintético (20% O₂: 80% N₂) de um cilindro de gás (White Martins, Brasil) foi introduzido no biorreator usando um controlador de fluxo de massa com ajuste de 0 a 20 mL·min⁻¹ (GFC17, Aalborg, EUA). O biogás produzido pelo biorreator foi coletado e medido por um medidor de gás previamente calibrado (método de deslocamento de líquido).

3.2.2. Procedimento experimental

3.2.2.1. Remoção Anaeróbia BTEX

No estágio I, após a inoculação, o biorreator foi alimentado com água contaminada com BTEX sintético e operado sob condições anaeróbias, a um tempo de retenção hidráulica (TDH) de 24 horas (Tabela 3.1).

3.2.2.2. Efeito da vazão de microaeração na remoção de BTEX

Dos estágios II a IV, a fim de investigar a remoção de BTEX sob condições microaeróbicas, foi introduzido ar sintético no biorreator em sua linha de alimentação e diferentes vazões de microaeração foram testadas: 1,0, 0,5 e 2,0 mL ar·min⁻¹ (1 atm e 27 ° C), o que equivale a 0,140, 0,068 e 0,274 L O₂·L⁻¹ de alimentação, respectivamente (Tabela 3.1).

3.2.2.3. Efeito do ponto de dosagem de microaeração na remoção de BTEX

No estágio V, para verificar o efeito do ponto de dosagem, a microaeração foi movida da linha de alimentação do biorreator para seu *headspace*, e a vazão foi ajustada para 1 mL de ar·min⁻¹ (a 1 atm e 27 ° C) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Condições operacionais durante a remoção de BTEX anaeróbio e microaeróbio.

Etapa	I	II	III	IV	V	VI	VII
Dias de operação	64	49	31	39	28	28	43
Vazão de microaeração ^a (mL air·min ⁻¹)	-	1,0	0,5	2,0	1,0	1,0	1,0
Quantidade de O ₂ ^a (L O ₂ ·L ⁻¹ feed)	-	0,14	0,07	0,27	0,14	0,14	0,14
Ponto de injeção de ar	-	LA	LA	LA	HS	LA	LA
Vazão de recirculação	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	-	0,72

(L·h ⁻¹)							
Etanol (g·L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Benzeno (mg·L ⁻¹)	4,27	4,16	4,17	4,34	4,26	4,19	4,47
Tolueno (mg·L ⁻¹)	4,58	4,28	4,27	4,45	4,42	4,30	4,39
Etilbenzeno (mg·L ⁻¹)	4,38	4,29	4,30	4,11	4,12	4,18	4,20
m, p-Xilenos ^b (mg·L ⁻¹)	9,22	9,15	9,39	9,08	9,28	9,03	8,88
o-Xileno (mg·L ⁻¹)	4,60	4,69	4,49	4,71	4,58	4,56	4,70

LA, Linha de alimentação; HS, *headspace*.

^aAtmosfera de 1 atm e 27 °C.

^bOs isômeros meta- e para-xilenos foram quantificados em conjunto devido à limitação do método cromatográfico.

Fonte: elaborada pelo autor.

3.2.2.4. *Efeito da recirculação de efluentes na remoção de BTEX*

No estágio VI, a dosagem de ar no *headspace* foi movida de volta para a linha de alimentação, como nos estágios anteriores (II a IV). No entanto, embora a vazão de ar tenha sido mantida em 1 mL de ar·min⁻¹ (0,140 L O₂·L⁻¹ alimentado a 1 atm e 27 ° C), a recirculação de efluentes foi desligada para avaliar seu impacto na eficiência de remoção de BTEX (Tabela 3.1). Finalmente, no estágio VII, a recirculação do efluente foi restabelecida, ou seja, as condições operacionais foram as mesmas que no etapa II (Tabela 3.1).

3.2.2.5. *Análise de sensibilidade e tempo de recuperação em falhas de microaeração*

Após o estágio VII, foi avaliado o impacto de um desligamento por microaeração (DM1) (uma falha operacional simulada) no desempenho de remoção do biorreator BTEX. Para este propósito, a microaeração (1 mL de ar·min⁻¹ a 1 atm e 27 ° C) foi desligada por 7 dias e depois ligada novamente. Para verificar a reprodutibilidade e a adaptação da resposta do sistema, foram realizados mais dois desligamentos de 7 dias (DM2 e DM3) após o biorreator ter atingido concentrações de efluentes similares àquelas obtidas antes das falhas simuladas (DM1 e DM2, respectivamente). Os outros parâmetros operacionais do biorreator durante este experimento foram semelhantes aos do estágio VII (Tabela 3.1).

O impacto das paradas de microaeração foi avaliado pelo índice de sensibilidade dos parâmetros (IS) e tempo de recuperação (TR) (CAI; ZHENG; MAHMOOD, 2009). Embora esses parâmetros tenham sido originalmente utilizados para avaliar o efeito de choques de carga sobre o desempenho de sistemas de tratamento (CAI; ZHENG;

MAHMOOD, 2009), eles foram utilizados neste experimento porque foram adequados para visualizar o impacto dessas falhas na qualidade do efluente compostos diferentes testados.

Portanto, o IS foi calculado usando a Equação 3.1:

$$IS = \frac{O_{\max} - O_n}{O_n} \quad (3.1)$$

em que O_{\max} é a concentração máxima de composto observada no efluente durante o período de falha operacional, e O_n é a concentração normalmente observada no efluente antes da falha.

TR foi definido como o tempo necessário para o sistema alcançar valores semelhantes aos obtidos no período pré-falha após o restabelecimento da microaeração.

3.2.3. *Análise química e cromatográfica*

A DQO e o pH foram analisados de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

Os compostos BTEX foram determinados em amostras de água por extração estática de *headspace* (Triplus HS, Thermo Scientific, EUA) seguido por cromatografia gasosa - detecção de ionização por chama (HS-GC-FID) (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, EUA) de acordo com Carneiro et al. (2014). Todas as amostras foram diluídas com água ultrapura (sistema Milli-Q, EMD Millipore, EUA) para um volume final de 10 mL diretamente em frascos de vidro de borosilicato (20 mL) para extração de *headspace* (Supelco, EUA), que foram selados com PTFE / septo de silicone e selos de alumínio (Supelco, EUA) (FIRMINO et al., 2015b).

Para verificar a volatilização do BTEX, esses hidrocarbonetos também foram determinados em biogás por cromatografia gasosa - detecção por ionização por chama (GC-FID) (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, EUA).

3.2.4. *Análise estatística*

Os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, que não requerem distribuição de dados específica, foram utilizados para a análise estatística dos dados, a fim de comparar o desempenho do biorreator durante os diferentes estágios experimentais com nível de confiança de 95,0%. (FIRMINO et al., 2015a).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Remoção Anaeróbia BTEX

Após a inoculação como lodo anaeróbio de um reator UASB (*up flow anaerobic sludge blanket*) que tratava esgoto doméstico (AME de $0,55 \pm 0,16$ g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹), o sistema foi alimentado com etanol e BTEX como fonte de carbono sob condições anaeróbias (estágio I). As maiores eficiências de remoção foram obtidas para m, p-xilenos, seguido por etilbenzeno, o-xileno e tolueno, respectivamente, enquanto o benzeno foi o composto mais recalcitrante, mostrando uma eficiência média de aproximadamente 55% (Tabela 3.2).

Firmino et al. (2015b), utilizaram um biorreator UASB (TDH = 48 h) para tratar uma água contaminada com BTEX ($\sim 3,0$ mg·L⁻¹ de cada composto) e etanol ($\sim 1,8$ g COD·L⁻¹). Esses autores também relataram que a remoção de BTEX ocorreu na mesma ordem do estudo atual, no qual a maior eficiência média foi alcançada para m, p-xilenos ($\sim 87\%$), e a menor, para benzeno (53%).

Como os compostos BTEX são voláteis e, conseqüentemente, podem ser transferidos de líquido para ar, eles também foram monitorados em biogás. Valores de carga muito baixa (~ 1 µg·dia⁻¹) foram encontrados para todos os compostos (Tabela 3.3), o que representou uma perda de menos de 0,01% em relação à carga influente. Portanto, a volatilização do BTEX foi insignificante sob condições anaeróbias, o que sugere que a atividade biológica foi o principal mecanismo de remoção.

Tabela 3.2 Concentrações médias de afluentes e efluentes de benzeno (B), tolueno (T), etilbenzeno (E), m, p-xilenos (m, p-X) e o-xileno (o-X), e suas respectivas eficiências médias de remoção durante as diferentes condições operacionais.

Etapa		I	II	III	IV	V	VI	VII
Ponto de injeção		-	LA	LA	LA	HS	LA	LA
Microaeração (mL air·min ⁻¹)		-	1,0	0,5	2,0	1,0	1,0	1,0
Recirculação (L·h ⁻¹)		0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	-	0,72
B	Afluente (mg·L ⁻¹)	4,27 (0,17)	4,16 (0,20)	4,17 (0,18)	4,34 (0,24)	4,26 (0,20)	4,19 (0,17)	4,47 (0,26)
	Efluente (mg·L ⁻¹)	1,93 (0,09)	0,67 (0,05)	1,00 (0,05)	0,73 (0,08)	1,71 (0,12)	1,14 (0,12)	0,75 (0,04)
	Eficiência (%)	54,9 (1,21)	83,9 (1,41)	75,9 (0,89)	83,1 (2,29)	59,8 (2,29)	72,7 (3,62)	83,1 (1,30)
T	Afluente (mg·L ⁻¹)	4,58 (0,18)	4,28 (0,14)	4,27 (0,14)	4,45 (0,34)	4,42 (0,18)	4,30 (0,13)	4,39 (0,28)
	Efluente (mg·L ⁻¹)	1,50 (0,13)	0,49 (0,08)	0,81 (0,03)	0,46 (0,11)	0,86 (0,08)	0,44 (0,07)	0,29 (0,13)
	Eficiência (%)	67,3 (2,39)	88,6 (2,00)	81,1 (0,95)	89,9 (1,80)	80,6 (1,71)	89,8 (1,92)	93,3 (3,03)
E	Afluente (mg·L ⁻¹)	4,38 (0,24)	4,29 (0,22)	4,30 (0,17)	4,11 (0,28)	4,12 (0,23)	4,18 (0,19)	4,20 (0,18)
	Efluente (mg·L ⁻¹)	0,81 (0,04)	0,40 (0,06)	0,65 (0,03)	0,50 (0,07)	0,84 (0,04)	0,42 (0,11)	0,39 (0,05)
	Eficiência (%)	81,4 (1,11)	90,6 (1,28)	85,0 (0,92)	87,9 (1,44)	79,6 (1,20)	89,1 (3,30)	90,6 (1,27)
m,p-X	Afluente (mg·L ⁻¹)	9,22 (0,36)	9,15 (0,26)	9,39 (0,36)	9,08 (0,39)	9,28 (0,33)	9,03 (0,19)	8,88 (0,46)
	Efluente (mg·L ⁻¹)	1,65 (0,12)	0,95 (0,12)	1,00 (0,06)	1,11 (0,13)	1,88 (0,21)	2,14 (0,10)	0,93 (0,08)
	Eficiência (%)	82,1 (1,27)	89,6 (1,49)	89,4 (0,67)	87,8 (1,44)	79,7 (2,26)	76,1 (1,10)	89,5 (1,02)
o-X	Afluente (mg·L ⁻¹)	4,60 (0,25)	4,69 (0,12)	4,49 (0,31)	4,71 (0,19)	4,58 (0,16)	4,56 (0,13)	4,70 (0,16)
	Efluente (mg·L ⁻¹)	1,14 (0,07)	0,64 (0,08)	0,73 (0,04)	0,80 (0,05)	1,14 (0,13)	1,17 (0,04)	0,63 (0,02)
	Eficiência (%)	75,2 (2,09)	86,3 (1,71)	83,5 (1,81)	83,0 (1,45)	75,2 (2,73)	74,0 (1,53)	86,5 (0,84)

LA, Linha de alimentação; HS, *headspace*.

O desvio padrão é exibido entre parênteses.

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3.3 Variação da carga diária de BTEX no biogás nas diferentes condições operacionais testadas.

Etapa	Benzeno ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Tolueno ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Etilbenzeno ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)	m,p- Xilenos ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)	o-Xileno ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)
I	0,96 (0,10)	0,71 (0,18)	0,95 (0,08)	1,75 (0,11)	1,11 (0,09)
II	0,90 (0,16)	0,04 (0,03)	0,71 (0,19)	0,91 (0,23)	0,80 (0,24)
III	1,20 (0,07)	0,54 (0,21)	0,97 (0,18)	1,45 (0,30)	0,84 (0,18)
IV	1,60 (0,49)	0,19 (0,06)	2,06 (0,44)	0,91 (0,75)	1,91 (1,08)
V	0,70 (0,43)	<LD	<LD	0,12 (0,20)	0,23 (0,19)
VI	0,40 (0,07)	<LD	<LD	2,49 (0,71)	0,80 (0,20)
VII	0,25 (0,05)	<LD	0,25 (0,10)	1,82 (0,21)	0,06 (0,08)

LD: Limite de detecção

O desvio padrão é exibido entre parênteses.

Fonte: elaborada pelo autor.

3.3.2. Efeito da vazão de microaeração na remoção de BTEX

Depois que o biorreator começou a ser microaerado a uma vazão de apenas 1,0 mL de ar·min⁻¹ (a 1 atm e 27 ° C) (etapa II), as eficiências de remoção de benzeno e tolueno aumentaram, aproximadamente, de 55 e 67% para 84 e 89%, respectivamente (Tabela 3.2). Da mesma forma, os demais compostos, embora com menor aumento (7,5-11%), tiveram suas eficiências de remoção aumentadas para valores superiores a 85% (Tabela 3.2).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por (FIRMINO et al., 2018), que operou um biorreator UASB semelhante (TDH = 48 h) para tratar uma água contaminada com BTEX (~ 3,0 mg·L⁻¹ de cada composto) sob condições microaeróbicas. Quando vazão de ar de 1,0 mL·min⁻¹ foi aplicada ao biorreator na linha de alimentação, eficiências de remoção acima de 80% foram alcançadas para todos os compostos, especialmente para o benzeno (com um aumento de remoção de 30%).

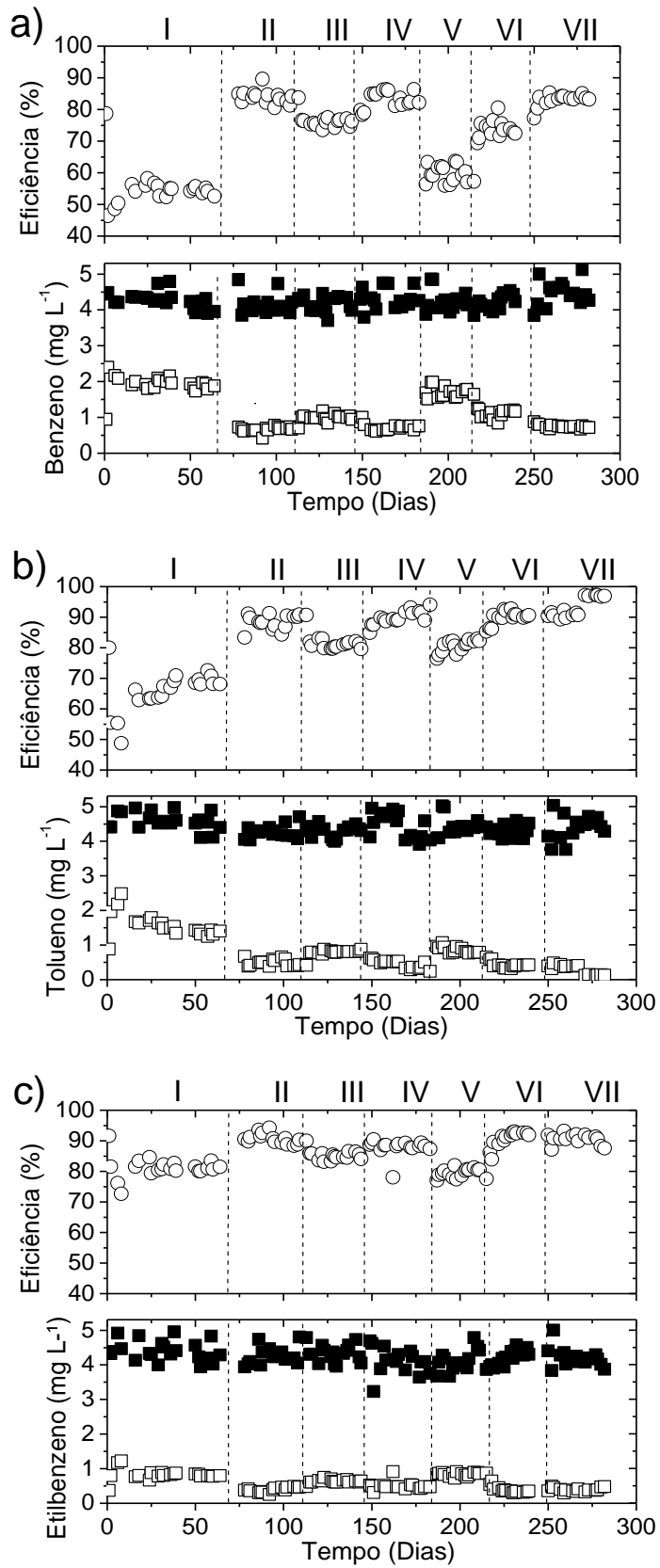
De fato, o oxigênio é um reagente chave no primeiro passo da clivagem do anel aromático, o que facilita a seguinte degradação microbiana de subprodutos com menores pesos moleculares (LIU, 2015). Assim, sob condições microaeróbicas, os microrganismos podem usar enzimas mono-oxigenases para converter monoaromáticos em fenóis inserindo um grupo hidroxila no anel aromático, reduzindo assim sua toxicidade (FUCHS, 2008; YERUSHALMI et al., 2001). Por exemplo, a mineralização aeróbia de benzeno subsequente exigiria alta saturação de oxigênio no meio líquido (8-12 mg O₂·L⁻¹ para a oxidação de 5-8 mg·L⁻¹ de benzeno). Por outro lado, sob condições microaeróbicas, após a ativação do anel aromático deste hidrocarboneto pela mono-oxigenase, o subproduto (fenol) pode ser biodegradado anaerobiamente (YERUSHALMI et al., 2001). Portanto, no presente estudo, é

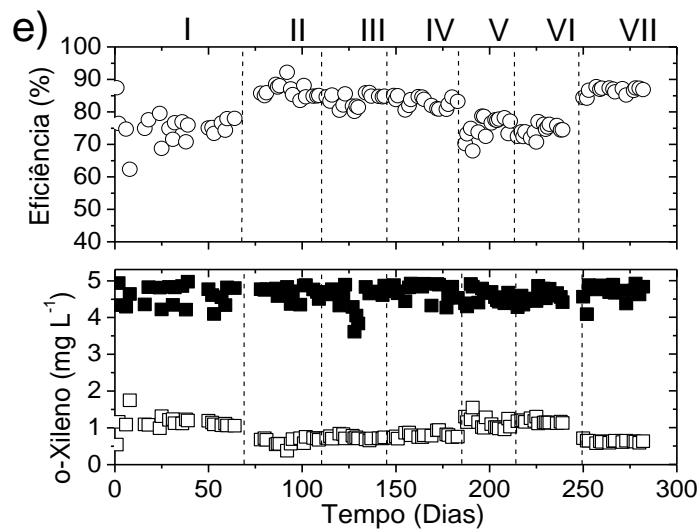
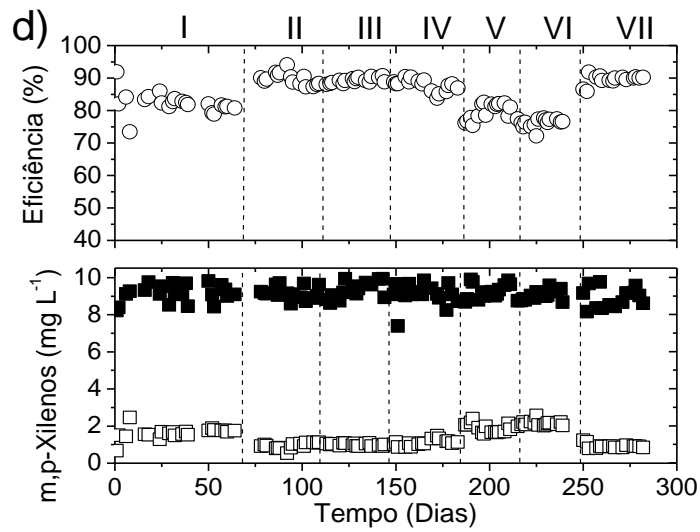
provável que a microaeração auxilie na ativação inicial dos compostos BTEX, o que geralmente é considerado o passo limitante do processo de degradação anaeróbia, principalmente para o benzeno (LIU, 2015).

No estágio III, após a redução da vazão de microaeração para $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (a 1 atm e $27 \text{ }^\circ\text{C}$), o benzeno teve sua eficiência reduzida para aproximadamente 76% (Tabela 3.2), sendo o único composto com eficiência abaixo de 80 %, enquanto a remoção de m, p-xilenos permaneceu similar a da etapa II (Figura 3.3). Os outros compostos tiveram uma pequena redução nos seus valores de eficiência (7,5%, 5,7% e 2,7% para tolueno, etilbenzeno e o-xileno, respectivamente) (Tabela 3.2).

Na etapa IV, com o aumento da vazão ar para $2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (a 1 atm e $27 \text{ }^\circ\text{C}$), esperava-se uma melhora na remoção do BTEX em relação a etapa II ($1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). No entanto, mesmo com uma vazão de ar duas vezes maior, as eficiências de remoção dos compostos em estudo apresentaram valores muito próximos aos obtidos na etapa II (Figura 3.3). De fato, não houve diferença significativa entre as concentrações de efluente e as eficiências de remoção obtidas nas etapas II e IV para os compostos benzeno, tolueno e o-xileno (Tabela 3.2). Portanto, no presente trabalho, $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ foi considerado a melhor vazão de ar em termos de eficiência de remoção de BTEX, principalmente para a remoção de benzeno, o composto mais recalcitrante sob condições anaeróbias (etapa I).

Figura 3.3 Concentrações afluentes e efluentes e eficiências de remoção de benzeno (a), tolueno (b), etilbenzeno (c), m,p-xilenos (d) e o-xileno (e).





Afluente (■); Efluente (□); Eficiência (○).
 Fonte: elaborada pelo autor.

Aumentar a vazão de ar em um sistema nem sempre favorecerá uma melhor remoção de um composto. Uma vazão de microaeração maior leva a um aumento da quantidade de oxigênio na matriz do biofilme e, conseqüentemente, maior penetração de oxigênio, que pode inibir microrganismos anaeróbios estritos, como bactérias acetoclásticas e archaea metanogênica (KHONGSUMRAN et al., 2014; WU et al., 2015).

Stephenson, Patoine e Guiot (1999) usaram dois biorreatores UASB operados continuamente em um TDH de 24 horas e 35 ° C. A taxa de oxigenação foi variada, atingindo uma concentração máxima de oxigênio dissolvido (OD) de 2,9 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O metano foi formado mesmo para a maior concentração de OD, embora em menor proporção. No entanto, no presente estudo, não houve redução significativa na remoção de BTEX na etapa IV quando

comparado aos estágios anteriores, com valores semelhantes aos do etapa II (Figura 3.3). Possivelmente, para as condições operacionais estabelecidas, a saturação da biodegradação do BTEX foi alcançada, não sendo possível uma melhora na eficiência. Assim, o uso de uma vazão de microaeração mais baixa sem uma mudança significativa no desempenho do biorreator representa menores custos operacionais.

A microaeração também foi bem sucedida e contribuiu para aumentar a eficiência de remoção de BTEX e fenol em uma pesquisa com efluentes petroquímicos de uma usina localizada na China (WU et al., 2015). Os autores compararam um biorreator totalmente anaeróbio com um outro sistema anaeróbio com aeração limitada, apresentando concentração de oxigênio dissolvido de 0,2 a 0,3 mg·L⁻¹. Os biorreatores foram inoculados com lodo aeróbio (sistema de lodo ativado). Os autores relataram que, mesmo na presença de concentrações consideráveis de BTEX e fenol (~ 45 mg·L⁻¹), o biorreator microaerado obteve eficiência de 82,1%. Em contraste, a eficiência encontrada no biorreator anaeróbio foi de apenas 38,7%.

Com relação à volatilização de hidrocarbonetos, era esperado que, pela microaeração do biorreator (etapa II), a carga de BTEX no biogás fosse maior do que no etapa I (condições anaeróbias), já que uma fração maior desses monoaromáticos poderia ter sido removida por *stripping*. No entanto, os valores médios foram ainda menores que os registrados na etapa anterior (Tabela 3.3). Portanto, esses resultados corroboram a hipótese de que a introdução de baixas quantidades de oxigênio no sistema pode ter estimulado a produção de mono-oxigenases pela microbiota do biorreator, que foi, então, capaz de biodegradar BTEX de forma mais eficaz.

Ao reduzir a microaeração para 0,5 mL de ar·min⁻¹ na etapa III, a maioria dos compostos teve sua carga aumentada no biogás (Tabela 3.3). Aparentemente, a atividade das mono-oxigenases foi reduzida, o que diminuiu as eficiências de remoção de BTEX como mencionado acima (Tabela 3.2) e permitiu o incremento desses compostos no biogás. Quando a vazão de ar foi aumentada para 2,0 mL·min⁻¹ (etapa IV), era esperado que a carga monoaromática no biogás fosse pelo menos tão baixa quanto na etapa II (1,0 mL ar·min⁻¹). No entanto, com exceção de m, p-xilenos, a quantidade de todos os hidrocarbonetos foi maior do que no estágio II, e alguns deles foram ainda maiores do que no estágio III, quando vazão de microaeração foi de apenas 0,5 mL·min⁻¹ (Tabela 3.3). Embora as eficiências de remoção de BTEX dos estágios II e IV fossem semelhantes (Tabela 3.2), uma vazão de microaeração acima de 1,0 mL de ar·min⁻¹ pareceu aumentar ligeiramente a turbulência dentro do biorreator e, portanto, favorecer a transferência de BTEX da fase líquida para a gasosa, provavelmente

por *stripping*. No entanto, a remoção desses compostos por volatilização ainda era insignificante, reforçando que a atividade microbiana teve um papel importante na remoção do BTEX, que a remoção não foi por processo físico.

3.3.3. *Efeito do ponto de aplicação da microaeração na remoção de BTEX*

Na etapa V, o biorreator começou a ser microaerado diretamente no *headspace* (1,0 mL de ar·min⁻¹ a 1 atm e 27 ° C), e uma diminuição nas eficiências de remoção dos compostos monoaromáticos foi observada (Figura 3.3). Praticamente, as eficiências médias de todos os compostos retornaram àquelas obtidas sob condições anaeróbias (etapa I), exceto o tolueno, cuja eficiência de remoção foi aproximadamente 13% maior que na primeira etapa (Tabela 3.2).

A remoção microaeróbia do H₂S em biorreatores anaeróbios indicam que o *headspace*, especificamente na interface gás-líquido, é o melhor ponto de dosagem de microaeração para a remoção deste composto. Ao aplicar ar no *headspace* do biorreator, o oxigênio pode reagir diretamente com o sulfeto de hidrogênio gasoso e, portanto, a quantidade de ar necessária para cada quantidade de sulfeto de hidrogênio é minimizada. Os resultados das análises microbianas revelaram que populações de microrganismos oxidantes de sulfeto crescem principalmente nas paredes do *headspace* ou na interface gás-líquido, sugerindo que a oxidação do sulfeto biológico ocorre nesses locais (DÍAZ et al., 2011; KRAYZELOVA et al., 2015; RAMOS; PÉREZ; FDZ-POLANCO, 2014).

No entanto, para a remoção de BTEX, o contato entre microrganismos e substratos é crucial porque a etapa inicial de degradação de hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) é geralmente mediada por reações de oxidação catalisadas por oxigenases associadas à superfície celular. Portanto, a remoção de BTEX ocorre na manta de lodo, a partir da ruptura do anel aromático (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

Para o sistema estudado, era esperado que a transferência de oxigênio para o líquido não fosse eficiente, uma vez que, provavelmente, o tempo de permanência das bolhas de ar injetadas no biorreator não seria superior a 2 segundos (FIRMINO et al., 2018). Portanto, em biorreatores microaeróbios, o oxigênio pode ser dissolvido no líquido principalmente a partir do ar armazenado no *headspace* do sistema (interface gás-líquido), sendo o tempo de permanência do biogás neste compartimento um parâmetro importante (FIRMINO et al., 2018; LOPES, 2010).

Assim, esperava-se que o oxigênio presente no ar sintético, inserido diretamente no *headspace*, fosse dissolvido no líquido (no compartimento de sedimentação do biorreator) e, auxiliado pela recirculação do efluente, atingisse os microrganismos na manta de lodo (no compartimento de digestão do biorreator). No entanto, provavelmente, isso não ocorreu. A transferência de massa de uma fase gasosa para uma fase líquida pode ser controlada pela turbulência do líquido (HERLINA; JIRKA, 2008), deformações da interface gás-líquido causada pelo movimento do gás (TURNEY; BANERJEE, 2013) e, em última análise, por difusão molecular nesta interface (HERLINA; JIRKA, 2008). Portanto, muito provavelmente, a ausência de alguma turbulência na interface gás-líquido (estágio V), causada anteriormente pela liberação de bolhas de ar do líquido para o *headspace* (como nas etapas II a IV), poderia ter impedido a dissolução de oxigênio no local.

A injeção de ar no *headspace* reduziu consideravelmente as cargas de BTEX no biogás, alcançando valores abaixo do limite de detecção, como o tolueno e o etilbenzeno (Tabela 3.3). Esta condição operacional pode ter favorecido o crescimento de uma microbiota neste compartimento capaz de consumir os hidrocarbonetos remanescentes em biogás, como verificado nas investigações acima mencionadas envolvendo a degradação do H₂S.

3.3.4. Efeito da recirculação de efluentes na remoção de BTEX

Na etapa VI, a microaeração (1,0 mL ar·min⁻¹ a 1 atm e 27 °C) foi aplicada novamente na linha de alimentação e, para avaliar o impacto da recirculação de efluente na remoção de BTEX, a bomba de recirculação foi desligada. O uso da recirculação de efluentes pode auxiliar na distribuição do líquido na entrada do sistema de tratamento, reduzindo o gradiente de concentração e a toxicidade do substrato ao longo do biorreator e proporcionando uma transferência de massa mais eficiente entre o substrato e a microbiota, o que, conseqüentemente, pode influenciar positivamente a conversão de substrato em biogás (MOHAN et al., 2007; ZUO et al., 2014). No entanto, dependendo da composição das águas residuais, da configuração do sistema de tratamento e da vazão recirculada, os resultados podem ser bem diferentes (DÍEZ-MONTERO et al., 2016; GIUSTINIANOVICH et al., 2015; RAMAKRISHNAN; GUPTA, 2008).

Comparando as eficiências de hidrocarbonetos do etapa atual com a etapa II (microaeração e recirculação), apenas tolueno e etilbenzeno não tiveram suas eficiências alteradas pela ausência de recirculação (Figura 3.3). No entanto, as eficiências dos outros compostos diminuíram consideravelmente (11-14%) (Tabela 3.2). Vale ressaltar que as

eficiências médias de remoção de xilenos foram ainda menores que as da etapa I (condições anaeróbias), sendo os menores valores registrados para esses compostos ao longo do experimento (Tabela 3.2).

Assim, os resultados indicam que a recirculação parece ter um papel fundamental na remoção de BTEX microaeróbia, uma vez que pode aumentar a solubilização de oxigênio em líquido (STEPHENSON; PATOINE; GUIOT, 1999). No presente trabalho, a ausência de recirculação de líquido diminuiu o contato líquido-ar, substrato-ar e substrato-microrganismo, reduzindo as eficiências de remoção de benzeno e xilenos (Figura 3.3). Além disso, tanto a recirculação quanto as altas velocidades ($2-4\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$) de fluxo ascendente melhoram as taxas de transferência e reação de massa (STEPHENSON; PATOINE; GUIOT, 1999; THAVEESRI et al., 1994).

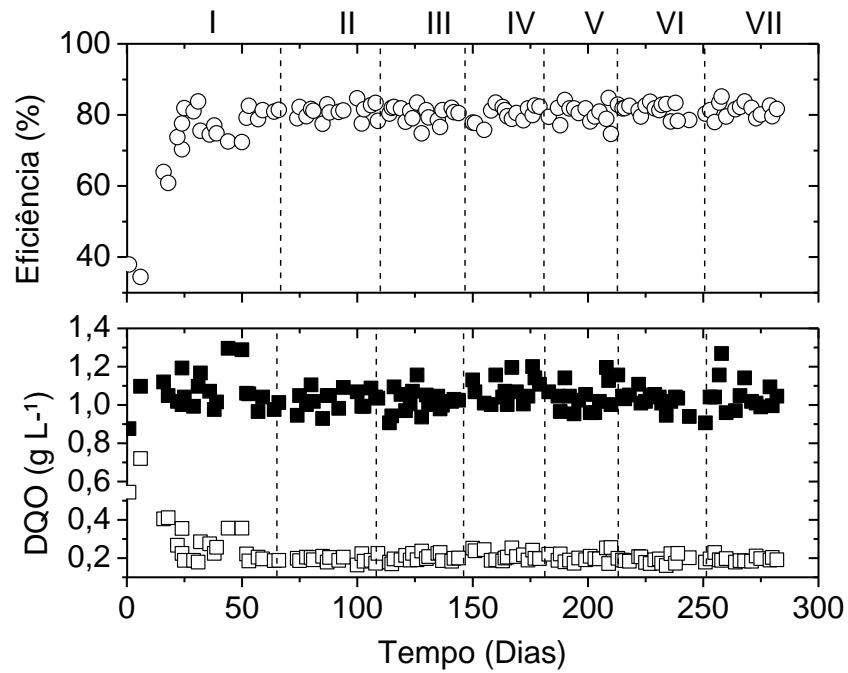
Em relação à fração BTEX no biogás, todos os hidrocarbonetos apresentaram valores reduzidos, com exceção dos m, p-xilenos, para os quais a maior carga foi registrada durante todo o experimento ($2,49\ \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$) (Tabela 3.3). No entanto, representa uma perda inferior a 0,02% em relação à carga poluente removida.

Embora houvesse variações em alguns de seus parâmetros operacionais, o biorreator permaneceu estável durante todo o experimento. De fato, ao retornar às mesmas condições operacionais da etapa II (etapa VII), que apresentou os melhores resultados para a remoção de BTEX, obtiveram-se eficiências similares para todos os compostos, com exceção do tolueno, que apresentou um aumento de quase 5% em sua composição. Esta observação reforça a importância da recirculação na remoção de BTEX microaeróbio e indica que as diferenças observadas no desempenho do biorreator durante os diferentes estágios experimentais foram devidas às mudanças operacionais feitas no sistema e não uma provável adaptação da microbiota ao longo do tempo.

Surpreendentemente, na etapa VII, os valores de carga de todos os compostos BTEX no biogás foram muito menores do que aqueles observados na etapa II, com exceção dos isômeros m, p-xilenos, que foram duas vezes maiores ($1,82\ \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$) (Tabela 3.3). Esses resultados reforçam a hipótese de crescimento de microrganismos no *headspace* após o estágio em que a microaeração foi aplicada neste ponto de dosagem (etapa V), que poderia ter sido responsável por diminuir ainda mais a já baixa carga de BTEX no biogás.

Por fim, vale ressaltar que o biorreator apresentou boa estabilidade durante todo o experimento (etapas I a VII), no qual a eficiência de remoção de DQO (Figura 3.4) e o pH (Figura 3.5) do efluente permaneceram em torno de 80,5% e 7,7, respectivamente.

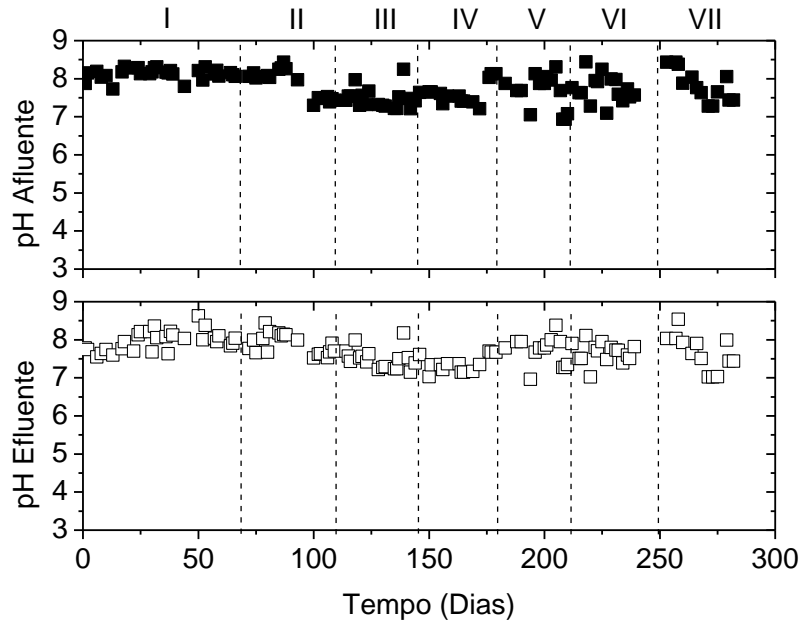
Figura 3.4 Variação da concentração de matéria orgânica (DQO) durante o experimento.



Afluente (■); Efluente (□); Eficiência (○).

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 3.5 Variação do pH afluente e efluente durante o experimento.



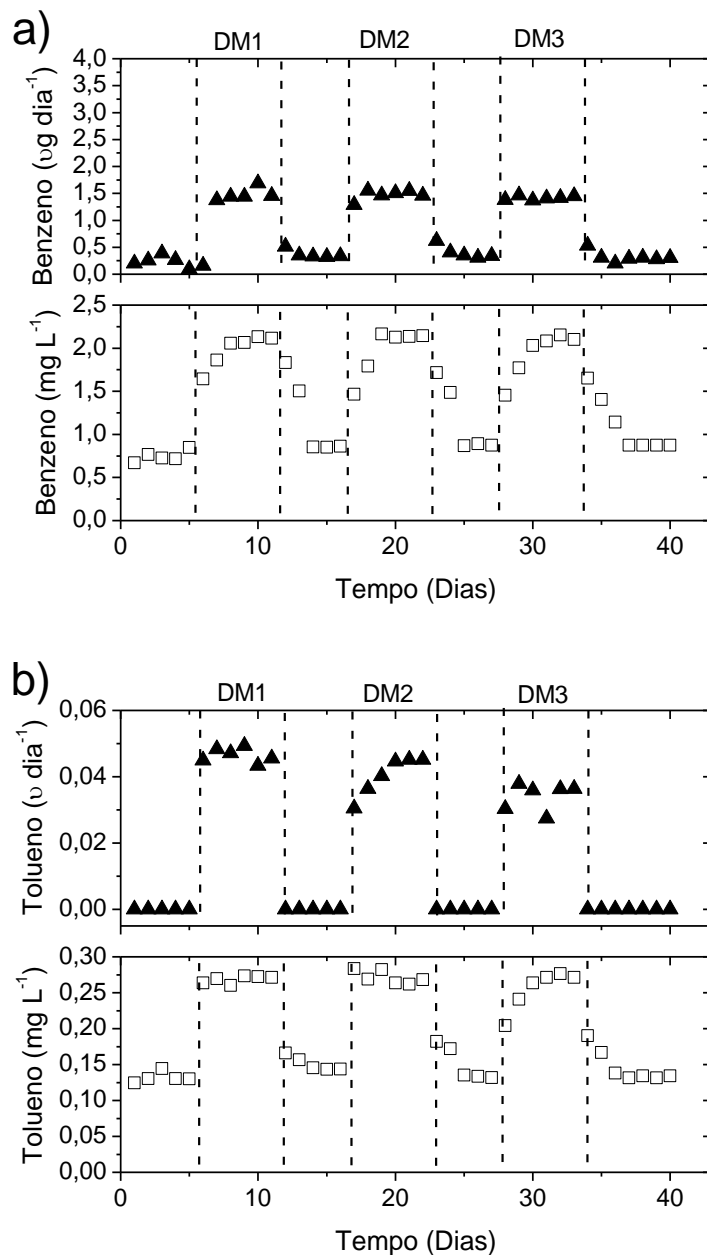
Afluente (■); Efluente (□).

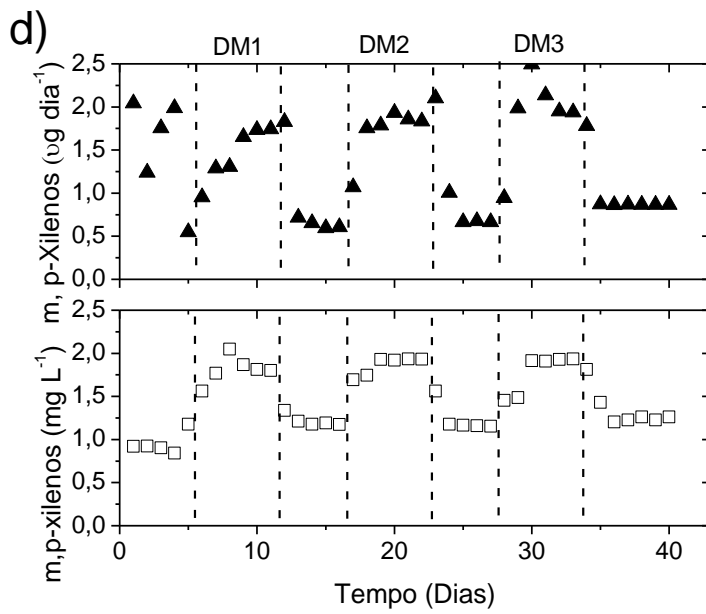
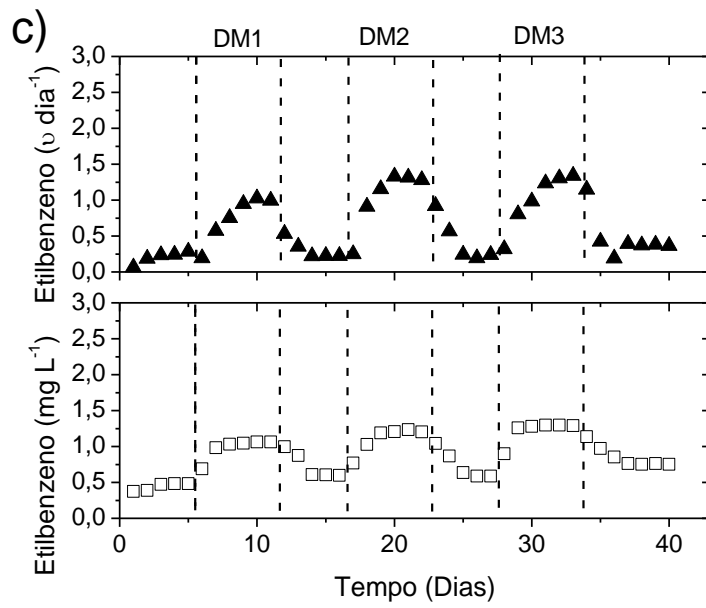
Fonte: elaborada pelo autor.

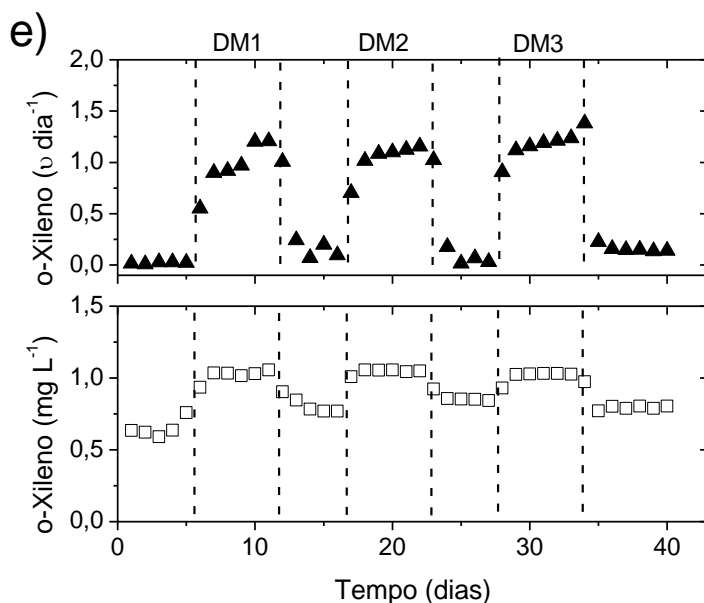
3.3.5. Análise de sensibilidade e recuperação em falhas de microaeração

A sensibilidade de um sistema de tratamento ou microrganismos na presença de BTEX pode ser verificada aumentando a carga aplicada, o que pode causar uma diminuição na eficiência de remoção (MOHAMMAD et al., 2017; RAJAMANICKAM et al., 2017). No presente estudo, como a microaeração mostrou um aumento na eficiência de remoção de BTEX, a sensibilidade do sistema foi testada durante os desligamentos de microaeração, avaliando a recuperação da eficiência após o restabelecimento da injeção de ar (Figura 3.6).

Figura 3.6 Perfil dos hidrocarbonetos durante o desligamento da microaeração: a) benzeno; b) tolueno; c) etilbenzeno; d) m,p-xileno; e) o-xileno.







Hidrocarboneto no *headspace* (▲); Hidrocarboneto no líquido - efluente (□).
Fonte: elaborada pelo autor.

Antes do primeiro período de desligamento de microaeração (DM1), as concentrações médias de efluente dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno, m, p-xilenos e o-xileno eram de aproximadamente 0,75, 0,13, 0,44, 0,95 e 0,65 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3.4). Durante o DM1, as concentrações de efluente de todos os hidrocarbonetos aromáticos aumentaram (Figura 3.6), visivelmente benzeno, que apresentou o maior índice de sensibilidade (IS), seguido por etilbenzeno e m, p-xilenos (Tabela 3.4). Embora o tolueno tenha um IS similar aos dos outros hidrocarbonetos, pode ser considerado um caso diferente (Tabela 3.4). A concentração máxima de efluente do tolueno durante o DM1 ($0,28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foi consideravelmente menor do que os valores máximos dos outros compostos (Figura 3.6). Após o restabelecimento da microaeração, o tempo de recuperação (TR) para todos os compostos BTEX foi entre 2 e 3 dias (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 Índice de sensibilidade e tempo de recuperação de cada composto BTEX durante os períodos de desligamento da microaeração.

Período	DM1			DM2			DM3		
	Conc. afllu ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IS	TR (d)	Conc. afllu ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IS	TR (d)	Conc. afllu ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IS	TR (d)
Compostos									
Benzeno	0,75	1,86	2	0,86	1,53	2	0,331	1,44	2
Tolueno	0,13	1,07	> 2	0,14	0,97	2	0,13	1,08	2
Etilbenzeno	0,44	1,42	2	0,60	1,05	2	0,60	1,16	2
m,p-Xilenos	0,95	1,15	> 2	1,18	0,64	2	1,16	0,67	2
o-Xileno	0,65	0,66	2	0,77	0,37	1	0,85	0,25	1

Legenda: DM, desligamento da microaeração; Conc._{afiu}, concentração efluente depois do período de desligamento; IS, índice de sensibilidade; TR, tempo de recuperação.
Fonte: elaborada pelo autor.

Para verificar a reprodutibilidade da resposta do sistema, a microaeração foi desligada novamente por outro período de 7 dias (DM2). O IS de todos os compostos reduziu quando comparado ao DM1, particularmente para os isômeros de xileno (~ 50% de redução), e o TR foi de 2 dias (Tabela 3.4). No terceiro período de parada (DM3), os valores de IS e TR foram semelhantes aos do DM2 (Tabela 3.4), mostrando boa reprodutibilidade.

Em geral, os isômeros dos xilenos foram os menos sensíveis ao desligamento por microaeração, enquanto o benzeno foi o mais sensível (Tabela 3.4). De fato, quando a microaeração foi desligada, as concentrações de efluente benzeno alcançaram valores semelhantes aos obtidos no estágio I ($> 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), quando o biorreator foi operado sob condições anaeróbias (Figura 3.6), reforçando que o oxigênio desempenha um papel importante na ativação inicial deste hidrocarboneto aromático. Na Tabela 3.4 é observado, também, que depois de sequências de desligamento da microaeração houve uma tendência de diminuição dos índices de sensibilidade dos compostos. Contudo, deve ser considerado que as concentrações dos compostos previamente ao desligamento da microaeração sofreram alterações. Apesar de estáveis, apresentaram concentrações um pouco maior que no primeiro desligamento, as quais acima foram influenciadas pelas médias dos pontos. Ressalta-se que apesar das mudanças operacionais o sistema tende a apresentar boa capacidade de recuperação, como foi observado na etapa VII.

Semelhante, no biogás, a carga diária de BTEX aumentou quando a microaeração foi desligada e diminuiu depois que o ar foi injetado de volta no sistema (Figura 3.6), confirmando que a remoção de BTEX foi principalmente um processo biológico e não apenas uma transferência física de líquido para biogás (*stripping*) quando o biorreator foi microaerado.

3.4. Conclusões

A microaeração ($0,5\text{-}2,0 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$) assegurou altas eficiências de remoção ($> 83\%$) para todos os compostos, e os melhores resultados foram obtidos para a vazão de $1,0 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$, particularmente para benzeno, o mais composto recalcitrante, com aumento de 30% na eficiência de remoção.

O melhor ponto para injeção de microvazões de ar é próximo a manta de lodo, não obtendo resultados significantes com injeções no *headspace*.

A recirculação de efluentes mostrou-se um fator importante para melhorar a transferência de massa e, conseqüentemente, a remoção de BTEX.

A remoção de BTEX por *stripping* foi insignificante mesmo sob condições microaeróbias, sugerindo que a atividade microbiana foi o principal mecanismo de remoção.

Finalmente, após os períodos de interrupção da microaeração, durante os quais as concentrações de efluente aumentaram, o biorreator pôde recuperar seu desempenho anterior em até 2 dias.

4. ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS BTEX EM REATOR UASB MICROAERADO SUBMETIDO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAL

4.1. Introdução

Os hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX) são os principais componentes aromáticos da gasolina (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017). Devido à sua baixa solubilidade em água e sua toxicidade aguda e genotoxicidade (PRENAFETA-BOLD et al., 2004), os BTEX são classificados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (*United States Environmental Protection Agency*) (OTENIO et al., 2005). Devido às sequências de vazamentos acidentais de hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX) são os principais componentes aromáticos da gasolina presente no solo e na água subterrânea (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

Algumas técnicas de biorremediação de BTEX em águas subterrâneas contaminadas têm sido investigada há alguns anos. Contudo, a maioria das pesquisas tem se concentrado em águas doces, as quais possuem baixo teor de sais dissolvidos (CORSEUIL et al., 2011; DE NARDI et al., 2005; FIRMINO et al., 2018; MÜLLER et al., 2017).

A salinidade pode afetar negativamente a eficiência de remoção de poluentes por via biológica, uma vez que o cloreto de sódio (NaCl), por exemplo, pode inibir a atividade de algumas espécies bacterianas (GRATTIERI; MINTEER, 2018; MILLE; BENEY; GERVAIS, 2002; SIQUEIRA; WANDERLEY; CALLADO, 2015). O desequilíbrio entre a concentração de sal dentro das células bacterianas e a da solução externa causa uma pressão osmótica. Assim, quando as células bacterianas estão em ambientes de maior concentração de sal, elas podem sofrer desidratação, o que leva à morte celular.

Siqueira, Wanderley e Callado (2015) mostraram que o aumento da proporção de água de produção de petróleo (2%, 5%, 8% e 10%), cuja concentração de cloretos (2,4-11,7g·L⁻¹) é considerável, em esgoto sanitário sintético tratado em um reator anaeróbio em batelada sequencial, operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 22 horas, resultou em uma redução na eficiência de remoção de DQO de 75% para 73%, 64%, 47% e 23%, respectivamente. A inibição do processo anaeróbio foi atribuída ao estresse osmótico causado pela alta salinidade, que chegou a 11,7 g Cl·L⁻¹ na última etapa do experimento.

O acúmulo de sais em reatores anaeróbios metanogênicos pode inibir o crescimento de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas, reduzindo sua

competitividade em relação a outros grupos microbianos, como as bactérias redutoras de sulfato, e, portanto, reduzindo a produção de metano (WU et al., 2017). No entanto, a degradação microbiana de compostos aromáticos em ambientes contendo moderadas e elevadas concentrações de sais pode ser alcançada com inóculo enriquecido com microrganismos halotolerantes e halofílicos degradadores de compostos aromáticos (HASSAN; ALY, 2018; SEI; FATHEPURE, 2009), ou com inóculo comum, como os provenientes de estações de tratamento de esgotos, após um período de aclimação (ADELAJA; KESHAVARZ; KYAZZE, 2015; SIQUEIRA; WANDERLEY; CALLADO, 2015). A grande motivação dos pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação é, sem dúvida, a busca de microrganismos versáteis capazes de degradar, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a um baixo custo operacional (FIRMINO et al., 2018; PENDASHTEH; CHAIBAKHSH; AHMADUN, 2018; SIQUEIRA; WANDERLEY; CALLADO, 2015; SURENDRA; MAHALINGAM; VELAN, 2017; TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004).

Recentemente, sistemas anaeróbios com finalidade de remoção de compostos BTEX têm sido estudados na presença de microvazões de ar para melhorar a remoção desses hidrocarbonetos em águas contaminadas (FIRMINO et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2018; WU et al., 2015), auxiliando o processo enzimático, já que a biodegradação de BTEX envolve uma série de etapas utilizando diferentes enzimas (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017). Por meio da microaeração, espera-se que um átomo de oxigênio seja incorporado ao hidrocarboneto aromático pela ação enzimática de mono-oxigenases, enquanto o outro átomo de oxigênio é reduzido a água (VARJANI; UPASANI, 2017).

Assim, sob tais condições, denominadas microaeróbias, alguns microrganismos utilizam oxigênio apenas para introduzir grupos hidroxila no anel aromático como nas rotas aeróbias clássicas, enquanto a sua clivagem acontece por meio de rotas metabólicas anaeróbias, pois não há oxigênio suficiente para atuar como acceptor de elétrons (CHAKRABORTY; COATES, 2004; FUCHS, 2008; YERUSHALMI et al., 2001).

Contudo, não há relatos de investigações avaliando a remoção de BTEX em sistemas microaeróbios tratando águas salobras (salinidade superior a 0,5% e inferior a 30%). Portanto, na presente pesquisa, foi investigada a influência de crescentes concentrações de NaCl na remoção microaeróbia de BTEX de forma a avaliar a viabilidade do uso de reatores microaeróbios para a biorremediação *ex situ* de águas salobras contaminadas com esses compostos aromáticos.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Configuração experimental

O experimento em fluxo contínuo foi realizado em um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB, *upflow anaerobic sludge blanket*), em escala laboratorial (volume útil de 2,2 L), feito a partir de tubos e conexões de PVC para esgoto. O reator foi inoculado com 10% de seu volume útil com lodo anaeróbio ($\sim 49 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$) de um reator UASB que tratava esgoto doméstico (Fortaleza, Ceará, Brasil). O sistema experimental foi o mesmo descrito do capítulo 3, inclusive com a mesma biomassa.

O reator foi alimentado com água contaminada sintética com BTEX por meio de bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, EUA) e operado com um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 h à temperatura ambiente (aproximadamente $27 \text{ }^\circ\text{C}$). No intuito de facilitar o contato entre alimento e microrganismo e auxiliar o desprendimento do biogás, evitando que houvesse a perda de biomassa pelo efeito pistão (elevação da manta de lodo pelas bolhas de biogás presas), foi adicionado um sistema de recirculação de efluente, realizado por bomba dosadora (*Concept Plus, ProMinent Dosiertechnik GmbH, Alemanha*), cuja vazão média era aproximadamente $0,72 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$.

Além disso, o reator foi microaerado junto à tubulação de alimentação, a partir de um cilindro de 1 m^3 contendo ar sintético com proporções de 20% de oxigênio e 80% de nitrogênio (White Martins, Brasil), com o auxílio de um controlador de fluxo de massa com ajuste de 0 a $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (GFC17, Aalborg, EUA). O biogás produzido era coletado e medido pelo método de deslocamento de líquido (frasco de Mariotte).

4.2.2. Água contaminada sintética

A água contaminada sintética consistia de uma solução aquosa contendo $\sim 4,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada composto BTEX: benzeno (99,5%, Dinâmica Química, Brasil), tolueno (99,5%, Vetec, Brasil), etilbenzeno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA), o-xileno (98,0%, Fluka, EUA), m-xileno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA) e p-xileno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA), um co-substrato ($1 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$), meio basal (macro e micronutrientes) e um tampão. O co-substrato era o etanol (99,8%, Dinâmica, Brasil), e o meio basal era preparado de acordo com Firmino et al. (2010). Para manter o pH próximo a 7,0, a solução era tamponada com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) na proporção de 1 g de NaHCO_3 para cada 1 g DQO. Além

desses compostos, em algumas etapas, foi adicionado cloreto de sódio (NaCl) para aumentar a salinidade da água. O afluyente foi armazenado a aproximadamente 5 °C em embalagem fabricada em polietileno de alta densidade e alto peso molecular (HDPE). A fim de evitar a volatilização de BTEX para o meio externo e manter o equilíbrio da fração volátil, o tanque de alimentação foi mantido fechado e, com auxílio de uma agulha, foi favorecido e equilíbrio de pressão do recipiente.

4.2.3. Procedimento experimental

O experimento foi dividido em quatro etapas (Tabela 4.1). Inicialmente, o reator foi operado sob condições microaeróbias e alimentado com água contaminada com BTEX sem a adição de NaCl (etapa I). Em seguida, após o reator atingir estabilidade operacional, nas etapas II a IV, foram adicionadas diferentes concentrações de NaCl à água contaminada (0,98, 1,82 e 3,64 g·L⁻¹, respectivamente) de forma a avaliar o impacto do aumento da salinidade no desempenho de remoção microaeróbia de BTEX.

Tabela 4.1 Condições operacionais aplicadas ao reator microaeróbio.

Etapa	I	II	III	IV
Dias de operação	22	44	42	45
Microaeração (mL ar·min ⁻¹)	1	1	1	1
Relação vazão de O ₂ /vazão de alimentação (L O ₂ ·L ⁻¹ alimentação)	0,14	0,14	0,14	0,14
Vazão de recirculação (L·h ⁻¹)	0,72	0,72	0,72	0,72
Concentração de NaCl (g·L ⁻¹)	0,15*	0,98	1,82	3,64
Etanol (g·L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5
Benzeno (mg·L ⁻¹)	4,40	4,22	4,09	4,40
Tolueno (mg·L ⁻¹)	4,48	4,54	4,19	4,22
Etilbenzeno (mg·L ⁻¹)	4,12	4,23	4,03	4,24
m,p-Xilenos (mg·L ⁻¹)	8,97	9,12	8,86	8,50
o-Xileno (mg·L ⁻¹)	4,76	4,53	4,23	4,25

*Concentração proveniente dos sais da solução de macro e micronutrientes.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.4. Análises químicas e cromatográfica

As análises de pH e alcalinidade foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), enquanto os ácidos graxos voláteis (AGV) foram determinados pelo método Kapp (BUCHAUER, 1998). Já as análises de DQO foram realizadas segundo metodologia proposta por Freire e Sant'anna

(1998), para efluentes com elevado teor de cloretos. A condutividade e a concentração de NaCl foi monitorada com auxílio de condutivímetro (DM-31, Digimed).

Os compostos BTEX foram determinados por extração por *headspace* estático (Triplus HS, Thermo Scientific, USA) seguido de cromatografia gasosa com detecção por ionização por chama (HS-GC-FID, *headspace-gas chromatography-flame ization detection*) (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, USA) segundo Carneiro et al. (2014). Todas as amostras (10 mL) eram previamente diluídas com água ultrapura (Milli-Q system, EMD Millipore, USA) diretamente em *vials* de vidro borossilicato para *headspace* (20 mL) (Supelco, EUA), os quais eram, em seguida, selados com septos de PTFE/silicone e lacres de alumínio (Supelco, EUA).

Além da análise de hidrocarbonetos no líquido (afluente e efluente), foi avaliada a fração de compostos BTEX que volatilizou e esteve presente no biogás. Para tal análise, com auxílio de uma micro seringa *Gastight*, foram coletas amostras de 0,5 mL do biogás, por meio de septo de amostragem no *headspace* do reator, e analisadas nas mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente, contudo com injeção manual.

A caracterização de biogás foi realizada, em termos de ar ($O_2 + N_2$), CO_2 e CH_4 , por cromatografia gasosa com detecção por condutividade térmica (GC-TCD, *gas chromatography-thermal conductivity detection*) (GC-17A, Shimadzu Corporation, Japão), como descrito por Firmino et al. (2015).

4.2.5. *Análises estatísticas*

O programa *Statgraphics Centurion XV* foi utilizado para a análise estatística dos dados, sendo aplicados os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis, os quais não requerem uma distribuição específica de dados, para comparar o desempenho do reator durante as diferentes etapas experimentais. Os resultados dos testes foram avaliados de acordo com o valor de p. Se $p \leq 0,05$, a hipótese nula é rejeitada, ou seja, os grupos de dados são considerados estatisticamente diferentes.

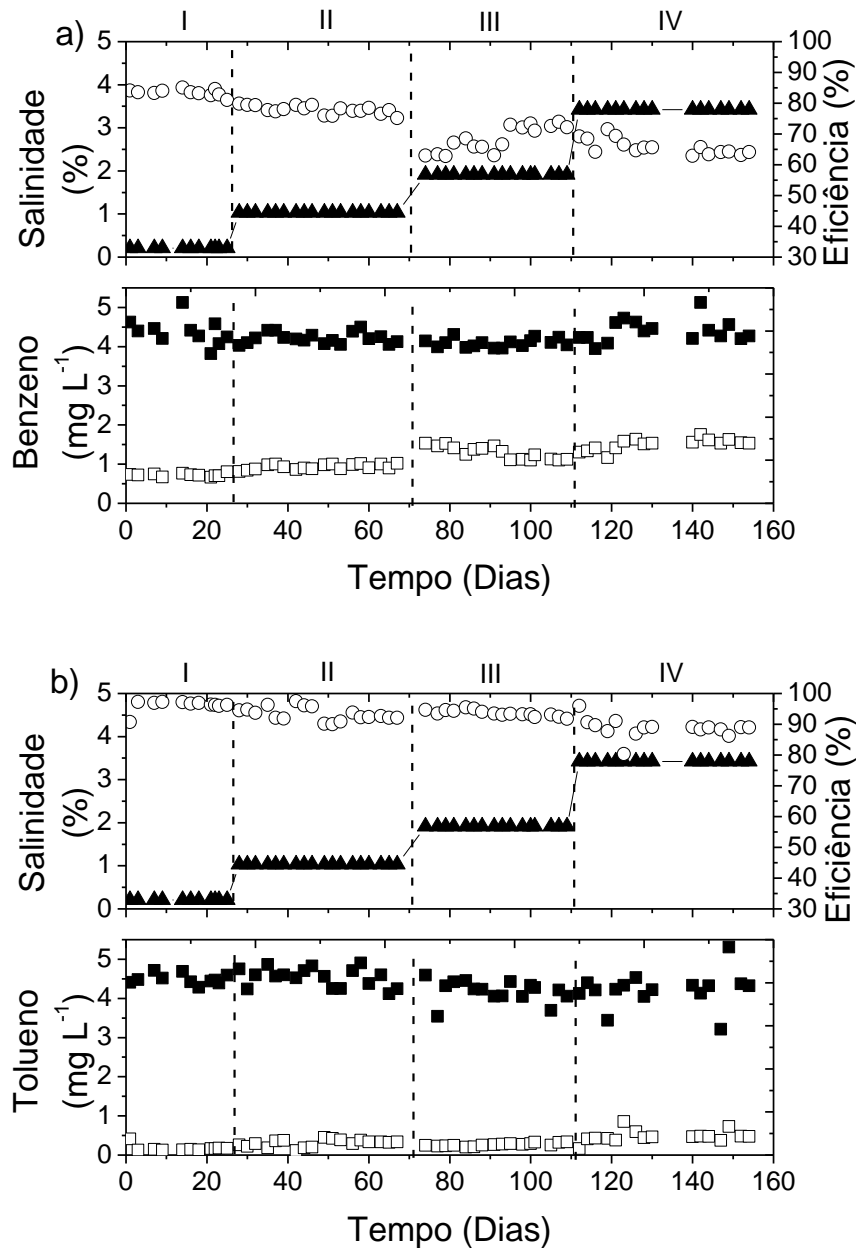
4.3. **Resultados e Discussão**

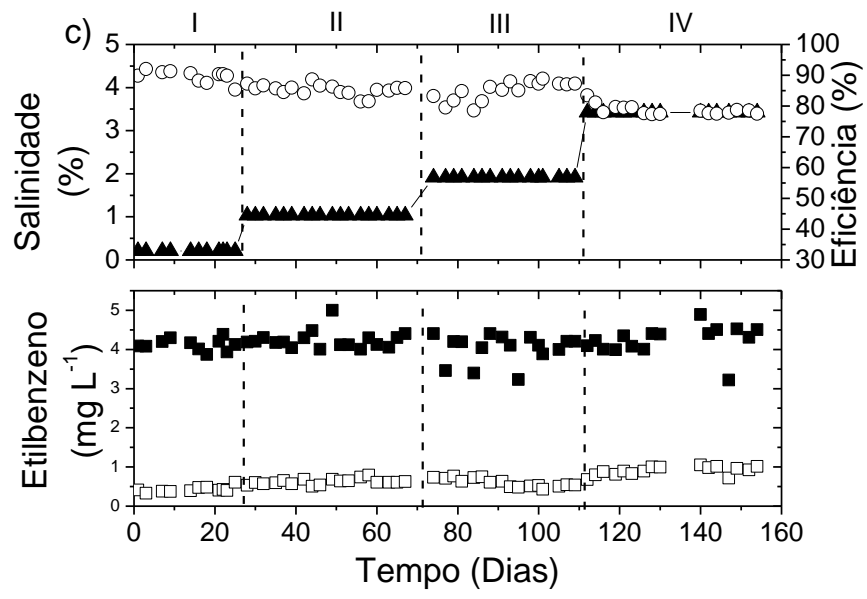
O sistema em estudo foi operado por um período total de 153 dias. Após apresentada qualidade estável do efluente, uma nova etapa era iniciada. A Figura 4.1 e a

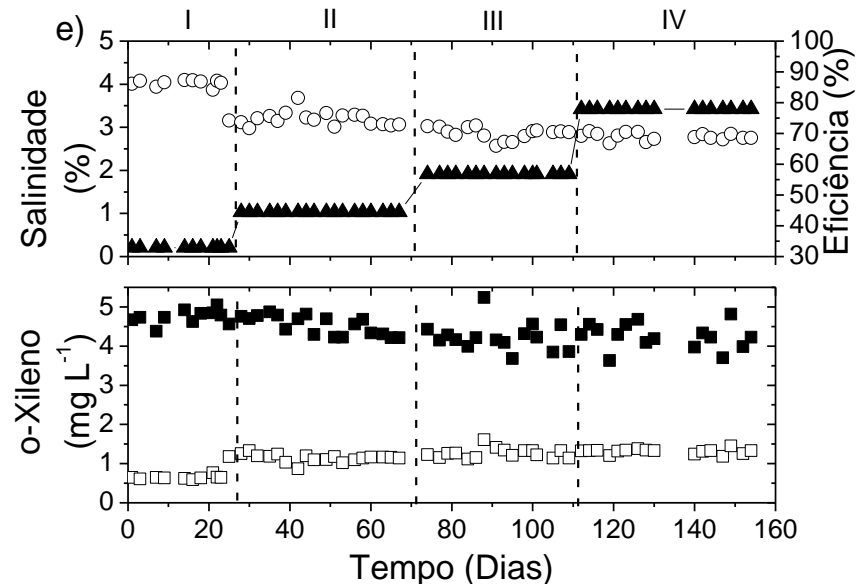
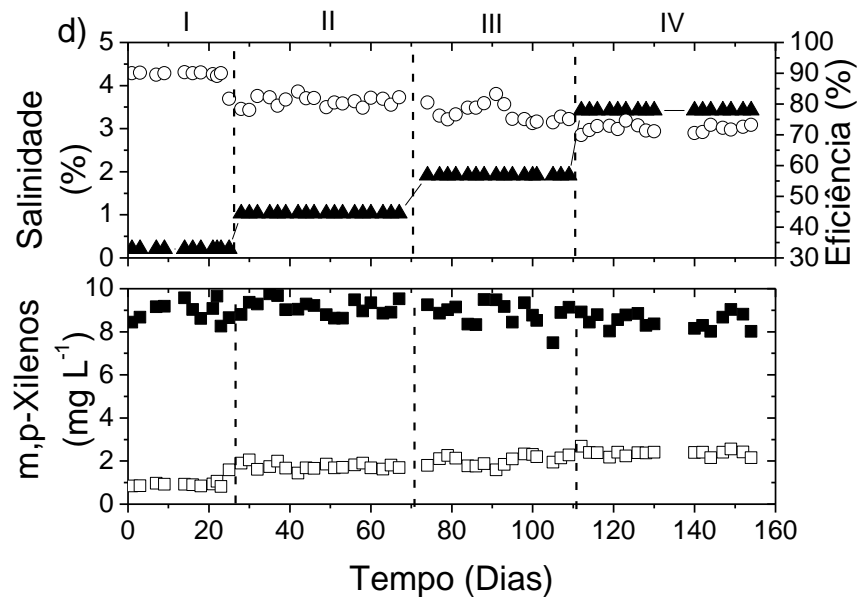
Tabela 4.2 mostram os parâmetros do afluente e do efluente coletados durante o período para o monitoramento dos compostos BTEX e a eficiência de remoção.

Sob condições microaeróbicas, sem adição de NaCl (etapa I), os compostos mais recalcitrantes foram o benzeno e o o-xileno, com eficiências de remoção de 83,7% e 86,4%, respectivamente, enquanto os demais compostos apresentaram eficiência igual ou superior a 90% (Tabela 4.2).

Figura 4.1 Variação da concentração afluente e efluente, e eficiência de remoção dos compostos BTEX no líquido: a) benzeno; b) tolueno; c) etilbenzeno; d) m,p-xileno; e) o-xileno.







Afluente (■); efluente (□); eficiência (○); salinidade em % (▲).
 Fonte: elaborada pelo autor.

Posteriormente, com o início das etapas com adição de NaCl (etapas II, III e IV), os resultados observados apresentaram decréscimo na eficiência de remoção para todos os compostos aromáticos em comparação com a etapa I. Na etapa II, com o afluente contendo uma concentração média de NaCl de $0,98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (equivalente a 1,03% de salinidade), o isômero o-xileno apresentou decréscimo de 11,7% na sua eficiência, comparando com a etapa I, apresentando-se como o composto cuja remoção foi a mais prejudicada com a presença de NaCl nessa etapa. Em contrapartida, o tolueno foi o composto com menor redução de eficiência.

Na etapa III, com uma concentração afluenta de NaCl maior (1,82 g NaCl·L⁻¹, equivalente a 1,91% de salinidade), os hidrocarbonetos o-xileno, benzeno e m,p-xilenos apresentaram decréscimos na eficiência de remoção de 16,3%, 15,3% e 12,9%, respectivamente, em relação à etapa I, enquanto o tolueno e o etilbenzeno mantiveram, praticamente, a mesma eficiência da etapa II. Por fim, na etapa IV (3,64 NaCl·L⁻¹, equivalente a 3,42% de salinidade), em comparação à etapa I, o tolueno apresentou um decréscimo de 7,5% na eficiência da biodegradação, seguido do etilbenzeno, que apresentou uma redução de pouco mais de 11,4%. Os demais compostos chegaram a apresentar ~17% de decréscimo da eficiência de remoção (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Concentração afluenta e efluente de BTEX, e eficiência de remoção do reator microaeróbio para diferentes concentrações de NaCl.

	Etapa	NaCl _{aflu} (g·L ⁻¹)	Afluente (mg·L ⁻¹)	Efluente (mg·L ⁻¹)	Eficiência (%)	Conc. Removida (mg·L ⁻¹)
Benzeno	I	0,15* (0,03)	4,40 (0,24)	0,72 (0,02)	83,7 (0,63)	3,68 (0,22)
	II	0,98 (0,05)	4,22 (0,11)	0,93 (0,06)	78,1 (1,17)	3,29 (0,10)
	III	1,82 (0,08)	4,09 (0,08)	1,29 (0,14)	68,4 (3,71)	2,80 (0,19)
	IV	3,64 (0,16)	4,40 (0,22)	1,50 (0,11)	65,8 (2,00)	2,89 (0,16)
Tolueno	I	0,15* (0,03)	4,48 (0,10)	0,17 (0,05)	96,2 (1,14)	4,31 (0,13)
	II	0,98 (0,05)	4,54 (0,19)	0,30 (0,08)	93,4 (1,88)	4,25 (0,23)
	III	1,82 (0,08)	4,19 (0,21)	0,27 (0,03)	93,6 (0,82)	3,92 (0,22)
	IV	3,64 (0,16)	4,22 (0,27)	0,48 (0,09)	88,7 (1,81)	3,74 (0,27)
Etilbenzeno	I	0,15* (0,03)	4,12 (0,13)	0,41 (0,03)	90,1 (0,99)	3,72 (0,15)
	II	0,98 (0,05)	4,23 (0,15)	0,62 (0,05)	85,3 (1,24)	3,61 (0,16)
	III	1,82 (0,08)	4,03 (0,27)	0,60 (0,10)	85,0 (2,55)	3,43 (0,28)
	IV	3,64 (0,16)	4,24 (0,26)	0,90 (0,09)	78,7 (1,20)	3,34 (0,19)
m,p-Xilenos	I	0,15* (0,03)	8,97 (0,38)	0,91 (0,05)	89,9 (0,29)	8,06 (0,32)
	II	0,98 (0,05)	9,12 (0,30)	1,74 (0,12)	80,9 (1,36)	7,38 (0,31)
	III	1,82 (0,08)	8,86 (0,40)	2,03 (0,20)	77,0 (2,41)	6,83 (0,42)
	IV	3,64 (0,16)	8,50 (0,30)	2,37 (0,10)	72,1 (0,97)	6,13 (0,24)
o-Xileno	I	0,15* (0,03)	4,76 (0,13)	0,65 (0,03)	86,4 (0,76)	4,11 (0,12)
	II	0,98 (0,05)	4,53 (0,21)	1,14 (0,07)	74,7 (1,64)	3,39 (0,20)
	III	1,82 (0,08)	4,23 (0,25)	1,27 (0,10)	70,1 (1,52)	2,97 (0,20)
	IV	3,64 (0,16)	4,25 (0,24)	1,31 (0,05)	69,0 (0,94)	2,93 (0,21)

*Concentração proveniente dos sais da solução de macro e micronutrientes.

O desvio padrão é exibido entre parênteses.

Fonte: elaborada pelo autor.

As concentrações elevadas de sal podem ter impacto sobre o desempenho físico-químico e microbiológico do sistema, que, por sua vez, estão mutuamente envolvidos numa interação dinâmica (LAY; LIU; FANE, 2010). O sucesso do tratamento depende, essencialmente, da capacidade dos microrganismos em manter o crescimento e desempenhar a sua função de biodegradar os poluentes presentes na água utilizada sob condição de elevada salinidade. Os autores explicam que a concentração elevada de sal causa *stress* osmótico considerável sobre os microrganismos, gerado pela pressão osmótica do meio ambiente.

Entretanto, alguns microrganismos utilizam a estratégia de solutos compatíveis (*compatible solutes*), a qual envolve a acumulação de solutos osmóticos orgânicos compatíveis, tais como glicerol, glicina, betaína, e álcoois de açúcar e vários aminoácidos no interior do citoplasma, também chamados de osmólitos, para o equilíbrio osmótico (VENTOSA et al., 1998). Os autores explicam que a adaptação ao aumento da salinidade pode ocorrer em três fases, dependendo da concentração de sais no meio. Inicialmente, observa-se o encolhimento das células e inibição do crescimento microbiano e da síntese de fosfolipídios (presente na composição da membrana). Em poucas horas, o crescimento pode ser retomado, contudo a síntese de fosfolipídio pode demorar a ser retomada. A duração desse período de latência vai depender da extensão da mudança de salinidade. A síntese de novas proteínas não é necessária durante as duas primeiras fases da adaptação e, somente quando a composição correta da membrana for alcançada, o organismo pode retomar o crescimento. Durante a terceira fase, o crescimento e a biossíntese da membrana foram totalmente adaptados à nova concentração de sal. Dessa forma, a alteração na composição da membrana fosfolipídica pode ser uma resposta fisiológica necessária para a adaptação às alterações da salinidade.

Na presente pesquisa, o período operacional extenso de cada etapa (42-45 dias) favoreceu a adaptação dos microrganismos à concentrações de NaCl diferentes, respeitando, dessa forma, o mecanismos dos solutos compatíveis e as etapas de adaptação celular.

Acikgoz e Ozcan (2016) investigaram a capacidade de microrganismos halofílicos isolados de degradar fenol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e encontraram uma eficiência máxima de 80% quando a cultura continha 20% (m/v) de NaCl, decrescendo a eficiência para a metade quando investigado a degradação de fenol a 25% (m/v) de NaCl.

Pendashteh, Chaibakhsh e Ahmadun (2018), ao avaliarem o potencial de microrganismos halofílicos em degradar petróleo bruto em efluente de elevada salinidade (água de produção sintética) para diferentes concentrações de NaCl ($11\text{-}246 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), obtiveram a maior eficiência de remoção de petróleo bruto ($> 60\%$) para a concentração de $\sim 31 \text{ g}$

$\text{NaCl} \cdot \text{L}^{-1}$. Os microrganismos apresentaram metabolismo ótimo nas salinidades próximas à da água do mar onde foram coletados, e sua atividade diminuiu em salinidades mais altas e/ou mais baixas. Foi observado, ainda, que, com o aumento da concentração de NaCl, houve uma diminuição significativa no crescimento de microrganismos.

Hassan et al. (2012) relataram o isolamento de *Alcanivorax* sp. HA03 de lagos alcalinos em Wadi El Natrun, capaz de degradar benzeno, tolueno e clorobenzeno como as únicas fontes de carbono em salinidade variando de 3 a 15% (m/v) de NaCl. Com concentração de 3% (m/v) de NaCl, as taxas iniciais foram de 2,85, 2,5 e 0,75 $\mu\text{mol} \cdot \text{frasco}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, decrescendo com a adição de NaCl, chegando a 0,74 $\mu\text{mol} \cdot \text{frasco}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ para o benzeno, quando este esteve sob 15% de salinidade.

Em comparação à presente pesquisa, as supracitadas investigações utilizaram microrganismos tolerantes a concentrações de sais e de contaminantes mais elevadas. Contudo, neste trabalho, foi testado um lodo anaeróbio não adaptado a altos níveis de salinidade para remover BTEX em um reator UASB microaerado. Até onde se sabe, são poucos os relatos mostrando a capacidade de lodo anaeróbio doméstico com aclimação halofílica metabolizando BTEX em diferentes concentrações de sal.

Existem algumas informações na literatura sobre a degradação de compostos de petróleo com microrganismos não-halofílicos, bem como sobre vias de degradação e enzimas envolvidas no metabolismo anaeróbio e microaeróbio (ou com aeração limitada) (FIRMINO et al., 2018; WANG et al., 2014; WU et al., 2015; YERUSHALMI et al., 2001). Sob condições microaeróbias, as mono-oxigenases iniciam a degradação de hidrocarbonetos pela adição de átomos de oxigênio ao anel aromático (hidroxilação), os quais são posteriormente mineralizados anaerobiamente (ABURTO et al., 2009; FATHEPURE, 2014; FIRMINO et al., 2018; LIU, 2015; YERUSHALMI et al., 2001). Entretanto, atualmente, poucas são as informações na literatura sobre as vias e enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos em ambientes com maior concentração de sais. Contudo, acredita-se que a degradação de hidrocarbonetos nesses ambientes ocorre usando enzimas semelhantes às descritas para muitos microrganismos não-halofílicos (FATHEPURE, 2014).

Com relação à remoção de matéria orgânica, os valores médios de eficiência após a adição do sal diminuíram de 81,3% (etapa I) para 80,7%, 78,2% e, por fim, 75,2% nas etapas II, III e IV, respectivamente. Contudo, observando a Tabela 4.3, a concentração removida de DQO foi a mesma para essas etapas (0,83-0,84 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Percebeu-se que o pequeno decréscimo observado na eficiência de DQO deve-se ao aumento de concentração afluente. Dessa forma, a remoção de matéria orgânica parece não ter sido afetada pela adição

de sais. Em relação ao percentual de metano no biogás, embora tenha sido observada redução após a adição de NaCl (etapa II), o aumento da concentração de sal (etapas III e IV) não alterou significativamente esse percentual (19,8-21,4%) (Tabela 4.3). Salienta-se que o reator era microaerado com ar, e esse processo contribuiu para a diluição de metano.

Em contraste, Gagliano et al. (2017) mostraram que o lodo de um reator UASB, embora adaptado a elevada concentração de sódio ($8 \text{ g Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$) por mais 10 anos, ao ser exposto a crescentes concentração de sódio ($10\text{-}20 \text{ g Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$), teve sua capacidade de conversão de matéria orgânica reduzida. Interessantemente, esses autores observaram que a adição de potássio aliviou o efeito negativo do sódio no desempenho do reator, já que os microrganismos precisam de potássio para operar efetivamente suas bombas de sódio-potássio e manter os níveis de sódio citoplasmáticos suficientemente baixos.

A concentração de ácidos graxos voláteis (AGVs) e alcalinidade também foram monitorados (Tabela 4.3). Apesar dos maiores valores de AGV nas etapas III e IV, os níveis de alcalinidade ainda garantiam uma baixa relação AGV/AT (0,14-0,23), característica de sistemas anaeróbios estáveis.

Finalmente, é importante mencionar que a remoção microaeróbia de BTEX foi, provavelmente, resultado de atividade microbiológica e não apenas de um fenômeno físico (volatilização), como observado por Siqueira et al. (2018). Na etapa I, a carga de BTEX presente no biogás (

Tabela 4.4) correspondeu a menos do que 0,01% da carga afluyente, não havendo, portanto, perda dos compostos por stripping. Com o aumento da salinidade (etapas II a IV), houve uma tendência de aumento da carga de alguns dos compostos no biogás devido a uma provável inibição dos microrganismos responsáveis pelo ataque inicial a esses compostos aromáticos, reforçando a hipótese de que a remoção de BTEX sob condições microaeróbias é, principalmente, um fenômeno biológico. Mesmo assim, para a maior concentração de NaCl (etapa IV), a carga de BTEX no biogás não superou 0,02% da carga afluyente.

Tabela 4.3 Parâmetros de estabilidade do reator microaeróbio para diferentes concentrações de NaCl.

Etapa	DQO				Metano		Alc. Total		AGV					
	Afluente (g·L ⁻¹)		Efluente (g·L ⁻¹)		Eficiência (%)	DQO _{removida} (g·L ⁻¹)		Efluente (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)		Efluente (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)				
I	1,04	(0,02)	0,19	(0,01)	81,31	(1,28)	0,86	(0,03)	28,1	(0,01)	717,37	(37,01)	101,03	(36,40)
II	1,03	(0,03)	0,20	(0,01)	80,70	(0,94)	0,83	(0,03)	21,4	(0,03)	717,34	(10,92)	88,01	(31,64)
III	1,07	(0,06)	0,23	(0,02)	78,16	(1,46)	0,84	(0,04)	19,8	(0,02)	777,87	(27,16)	181,19	(69,22)
IV	1,12	(0,06)	0,28	(0,03)	75,09	(2,35)	0,84	(0,06)	20,9	(0,03)	776,40	(35,67)	176,31	(58,46)

O desvio padrão é exibido entre parênteses.

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 4.4 Carga de BTEX no biogás do reator microaeróbio para diferentes concentrações de NaCl.

Etapa	Benzeno (µg·dia ⁻¹)		Tolueno (µg·dia ⁻¹)		Etilbenzeno (µg·dia ⁻¹)		m,p-Xilenos (µg·dia ⁻¹)		o-Xileno (µg·dia ⁻¹)	
I	0,26	(0,06)	< LD		0,25	(0,11)	1,78	(0,20)	< LD	
II	0,22	(0,02)	< LD		0,12	(0,04)	3,36	(0,62)	0,12	(0,05)
III	0,61	(0,14)	< LD		0,13	(0,09)	2,97	(0,55)	0,21	(0,05)
IV	0,71	(0,45)	0,15	(0,17)	4,11	(7,50)	2,58	(0,24)	0,29	(0,08)

O desvio padrão é exibido entre parênteses.

LD: limite de detecção

Fonte: elaborada pelo autor.

4.4. Conclusão

Na ausência de NaCl, elevadas eficiências de remoção (> 83%) foram obtidas para todos os compostos aromáticos. Entretanto, a adição de concentrações crescentes de NaCl diminuiu gradativamente a eficiência de remoção de BTEX, chegando a decréscimos de 18% para alguns compostos, como o benzeno, quando a maior concentração de NaCl (3,64 g·L⁻¹) foi adicionada.

O reator manteve-se estável durante todo o experimento, não sendo observados problemas de remoção de matéria orgânica nem indícios de acidificação. Embora o percentual de metano tenha diminuído após a adição de NaCl, o aumento da concentração desse sal não alterou significativamente esse percentual (19,8-21,4%).

A remoção de BTEX sob condições microaeróbias é, muito provavelmente, um processo biológico, já que a perda por volatilização foi insignificante (< 0,02%), mesmo para a maior concentração de NaCl adicionada.

Assim, uso de reatores microaeróbios parece ser uma alternativa bastante viável para a biorremediação *ex situ* de águas salobras contaminadas com BTEX.

5. BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA E MICROAERÓBIA DE BENZENO: EFEITO DE IMPORTANTES INTERMEDIÁRIOS

5.1. Introdução

O benzeno é um hidrocarboneto monoaromático presente no petróleo bruto e nos subprodutos do beneficiamento desse combustível fóssil, como, por exemplo, a gasolina (CHAKRABORTY; COATES, 2004; VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017). Esse hidrocarboneto pode entrar em contato com águas subterrâneas por meio de vazamento de tanques de armazenamento ou de tubulações de transporte de combustíveis (MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016; OTENIO et al., 2005; PENG et al., 2015; VARJANI, 2017), representando um risco ambiental e sanitário, já que apresenta elevada solubilidade e mobilidade em água e ainda possui propriedades cancerígenas (FARHADIAN et al., 2008; VARJANI, 2017).

O benzeno é facilmente biodegradável sob condições aeróbias, sendo o oxigênio um reagente chave na etapa de ativação do anel aromático (COATES et al., 2002; FARHADIAN et al., 2008; EL-NAAS et al., 2014). De acordo com a estequiometria, a mineralização aeróbia completa de 1 mg de benzeno requer aproximadamente 1,4 mg de O₂, o que significa que o nível de oxigênio dissolvido saturado no ambiente (8-12 mg·L⁻¹) é suficiente para a oxidação de 5-8 mg·L⁻¹ de benzeno (LIU, 2015).

Contudo, o oxigênio presente no solo e na água subterrânea pode vir a se esgotar, uma vez que os microrganismos presentes no meio o utilizam para metabolizar os contaminantes que atingem o subsolo (KAZUMI et al., 1997; LOVLEY, 1997). Embora a adição de oxigênio na água subterrânea acelere a biodegradação, esse processo é considerado oneroso. Conseqüentemente, a otimização da degradação anaeróbia é essencial para a remoção de benzeno de tais ambientes subterrâneos com concentrações baixas ou nula de oxigênio (LOVLEY, 1997; WAALS et al., 2017).

O maior desafio da biodegradação anaeróbia de benzeno é superar a elevada estabilidade química do composto na ausência de oxigênio molecular, motivo pelo qual foi afirmado, por algum tempo, ser impossível metabolizá-lo sob condições anaeróbias (CHAKRABORTY; COATES, 2004; VARJANI, 2017). Contudo, estudos apontam que baixas concentrações de oxigênio podem favorecer a degradação inicial de hidrocarbonetos monoaromáticos, pois, sob condições microaeróbias, alguns microrganismos podem utilizar oxigênio para introduzir grupos hidroxila no anel aromático como nas rotas aeróbias clássicas,

facilitando posteriormente sua clivagem por meio de rotas metabólicas anaeróbias (FUCHS, 2008).

Firmino et al. (2018), ao microaerar um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente tratando compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros do xileno), obtiveram eficiências maiores para todos os compostos, principalmente para o benzeno, que aumentou ~30% na presença da microaeração, em comparação às etapas anaeróbias.

Outro desafio é compreender a rota de degradação do benzeno. A literatura propõe três rotas principais para a degradação inicial do anel aromático sob condições anaeróbias: a hidroxilação, a carboxilação e a metilação, levando à formação de fenol, benzoato e tolueno, respectivamente (CHAKRABORTY; COATES, 2004; DOU et al., 2010; MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016).

Entretanto, poucos estudos detalham a rota de degradação do benzeno sob condições microaeróbias. Yerushalmi et al. (2001), a partir de experimentos em batelada de degradação de benzeno com culturas aeróbias adaptadas a baixas concentrações de oxigênio, observaram a conversão desse composto aromático a fenol, composto menos recalcitrante produzido a partir da hidroxilação inicial do benzeno por meio de mono-oxigenases. Alternativamente, esses autores propõem que, após o esgotamento completo de oxigênio, o fenol pode ser degradado anaerobiamente a benzoato pela ação de microrganismos anaeróbios apropriados.

Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a degradação microaeróbia de benzeno em um reator metanogênico em fluxo contínuo sob diferentes condições operacionais (diferentes vazões e pontos de microaeração, e uso de recirculação de efluente) para otimizar o processo, bem como avaliar o efeito da presença de importantes intermediários da degradação anaeróbia do benzeno (fenol, benzoato e tolueno).

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Configuração experimental

O experimento em fluxo contínuo foi realizado em um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB, *up-flow anaerobic sludge blanket*), em escala laboratorial (volume útil de 2,2 L), feito a partir de tubos e conexões de PVC para esgoto. O reator foi inoculado, em 10% de seu volume útil, com lodo anaeróbio ($\sim 49 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) de um reator UASB que tratava esgoto doméstico (Fortaleza, Ceará, Brasil).

O reator foi alimentado com água contaminada com benzeno por meio de bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, EUA) e operado com um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 h à temperatura ambiente de aproximadamente 27 °C. A água contaminada sintética consistia de uma solução aquosa contendo o hidrocarboneto benzeno em concentração média de aproximadamente 4,2 mg·L⁻¹ (benzeno 99,5%, Dinâmica Química, Brasil), um co-substrato (1 g DQO·L⁻¹), meio basal (macro e micronutrientes) e um tampão. O co-substrato era o etanol (99,8%, Dinâmica, Brasil), e o meio basal era preparado de acordo com Firmino et al. (2010). Para manter o pH próximo a 7,0, a solução era tamponada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) na proporção de 1 g de NaHCO₃ para cada 1 g DQO. O afluente foi armazenado a aproximadamente 5 °C em embalagem fabricada em polietileno de alta densidade e alto peso molecular (HDPE). A fim de evitar a volatilização de benzeno para o meio externo e manter o equilíbrio da fração volátil, o tanque de alimentação foi mantido fechado, e, com auxílio de uma agulha, foi favorecido o equilíbrio de pressão do recipiente.

No intuito de facilitar o contato entre alimento e microrganismo e auxiliar o desprendimento do biogás, evitando que houvesse a perda de biomassa pelo efeito pistão (elevação da manta de lodo pelas bolhas de biogás presas), foi adicionado um sistema de recirculação de efluente, realizado por bomba dosadora (*Concept Plus, ProMinent Dosiertechnik GmbH, Alemanha*), cuja vazão média era aproximadamente 0,72 L·h⁻¹. Em algumas etapas, o reator foi microaerado, a partir de um cilindro de 1 m³ contendo ar sintético com proporções de 20% de oxigênio e 80% de nitrogênio (White Martins, Brasil), com o auxílio de um controlador de fluxo de massa com ajuste de 0 a 20 mL·min⁻¹ (GFC17, Aalborg, EUA). O biogás produzido era coletado e medido por um medidor de gás previamente calibrado (método de deslocamento de líquido).

5.2.2. Procedimento experimental

O experimento foi dividido em duas fases (1 e 2), apresentados na Tabela 5.1. Na fase 1, foi avaliada a degradação microaeróbia de benzeno sob diferentes condições operacionais de forma a otimizar o processo. Na fase 2, foram adicionados, individualmente, à alimentação possíveis compostos intermediários da degradação anaeróbia do benzeno (fenol, benzoato e tolueno) para avaliar sua interferência na degradação desse hidrocarboneto aromático sob condições anaeróbias e microaeróbias.

Tabela 5.1 Condições operacionais aplicada no reator durante a remoção de benzeno em condições anaeróbias e microaeróbias.

Etapa	Fase 1							Fase 2							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Dias de operação	64	49	31	39	28	28	43	49	35	31	32	37	34	18	16
Microaeração na alimentação (mL ar·min ⁻¹)	-	1	0,5	2	-	1	1	1	-	-	1	1	-	-	1
Relação vazão de O ₂ / vazão de alimentação (L O ₂ ·L ⁻¹ alimentação)	-	0,14	0,07	0,27	-	0,14	0,14	1,14	-	-	0,14	0,14	-	-	1,14
Microaeração <i>headspace</i> (mL ar·min ⁻¹)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vazão de recirculação (L·h ⁻¹)	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	-	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
Etanol (g·L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Benzeno (mg·L ⁻¹)	4,37	4,12	4,2	4,36	4,24	4,23	4,42	4,22	4,33	4,39	4,2	4,31	4,2	4,09	4,23
Fenol (mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	4,28	4,70	-	-	-	-	-	-
Benzoato (mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,23	4,2	-	-	-	-
Tolueno (mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,27	4,26	-	-

Fonte: elaborada pelo autor.

5.2.2.1. *Fase 1 – Otimização do processo de degradação microaeróbia de benzeno*

Após a inoculação com lodo doméstico, o reator foi alimentado com a água contaminada sintética e operado sob condições anaeróbias (etapa I). A partir da etapa II, ar sintético passou a ser inserido na tubulação de alimentação, sendo testadas diferentes vazões de microaeração. Na etapa II, foi inserido $1 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,140 \text{ L O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ alimentação); na etapa III, a vazão de ar foi reduzida pela metade ($0,068 \text{ L O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ alimentação); e, na etapa IV, a vazão de ar foi de $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,274 \text{ L O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ alimentação).

Nessa fase, foi estudado ainda o efeito do local de injeção da microaeração e da recirculação do líquido no sistema. Na etapa V, a microaeração foi deslocada para o *headspace* na vazão de $1 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$, e, na etapa VI, a tubulação de ar foi reinstalada junto à tubulação de alimentação, na posição semelhante às etapas anteriores (etapas II a IV). A vazão de ar sintético foi de $1 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,140 \text{ L O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ alimentação), mas sem a recirculação de efluente. Por fim, na etapa VII, retomaram-se as condições operacionais da etapa II (religamento da recirculação).

5.2.2.2. *Fase 2 – Efeito da presença de compostos intermediários na eficiência remoção de benzeno*

A segunda fase foi operada, inicialmente, com a presença de fenol na alimentação sob condições microaeróbias ($1 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$), caracterizando a etapa VIII. Na etapa IX, foi pesquisada sob condições anaeróbias a degradação de benzeno na presença de fenol.

Na etapa X, o sistema continuou anaeróbio, no entanto o intermediário adicionado na alimentação foi o benzoato. Posteriormente (etapa XI), foi retomada a microaeração no sistema, ainda na presença de benzoato. O último intermediário estudado foi o tolueno que, na etapa XII, foi monitorado sob microaerobiose, e, na etapa XIII, a injeção de ar no sistema foi desligada.

Por fim, as etapas XIV e XV foram operadas apenas com benzeno, ou seja, sem intermediário na alimentação, em regime anaeróbio e microaeróbio, a fim de comparar com etapas anteriores a essa fase.

5.2.3. *Análises químicas e cromatográficas*

As análises de DQO e pH foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Os compostos benzeno e tolueno foram determinados por extração por *headspace* estático (Triplus HS, Thermo Scientific, USA) seguido de cromatografia gasosa com detecção por ionização por chama (HS-GC-FID, *headspace-gas chromatography flame ionization detection*) (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, USA) conforme Carneiro et al. (2014). Todas as amostras (10 mL) eram previamente diluídas com água ultrapura (Milli-Q system, EMD Millipore, USA) diretamente em *vials* de vidro borossilicato para *headspace* (20 mL) (Supelco, EUA), os quais eram, em seguida, selados com septos de PTFE/silicone e lacres de alumínio (Supelco, EUA).

Além da análise de hidrocarbonetos no líquido (afluente e efluente), foi observada a fração de compostos aromáticos que volatilizou e esteve presente no biogás. Para tal análise, com auxílio de uma micro seringa com válvula *On/Off*, tipo *Gastight*, foram coletadas amostras de 0,5 mL do biogás e analisadas nas mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente, contudo com injeção manual.

A caracterização de biogás foi realizada, em termos de ar ($O_2 + N_2$), CO_2 e CH_4 , por cromatografia gasosa com detecção por condutividade térmica (GC-TCD, *gas chromatography-thermal conductivity detection*) (GC-17A, Shimadzu Corporation, Japão), como descrito por Firmino et al. (2015).

O monitoramento de fenol e benzoato foi realizado por cromatografia líquida (Shimadzu Corporation, Japão). Os compostos em questão foram separados e detectados através de um método com eluição isocrática em proporção de 30%/70% de acetonitrila/tampão fosfato (0,05 M de fosfato, pH 2,8) e vazão de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. A coluna utilizada foi uma C18 (150 x 4,6 mm diâmetro interno), e a temperatura da coluna no forno foi mantida a 30 °C. O detector utilizado foi o UV-vis em um comprimento de onda de detecção de 210 nm. Antes da análise, as amostras foram filtradas através das membranas Millipore HA (poro 0,45 μm).

5.2.4. *Análises estatísticas*

O programa *Statgraphics Centurion XV* foi utilizado para a análise estatística dos dados, sendo aplicados os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis, os

quais não requerem uma distribuição específica de dados, para comparar o desempenho do reator durante as diferentes etapas experimentais. Os resultados dos testes foram avaliados de acordo com o valor de p . Se $p \leq 0,050$, a hipótese nula é rejeitada, ou seja, os grupos de dados são considerados estatisticamente diferentes.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Fase 1 – Otimização do processo de degradação microaeróbia de benzeno

Após sua inoculação com lodo doméstico (AME de $0,55 \pm 0,16$ g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹), o reator foi alimentado com a água contaminada com benzeno e operado sob condições anaeróbias (etapa I), sendo obtida uma eficiência média de remoção de aproximadamente 56% (Tabela 5.2). Resultados semelhantes foram obtidos por Siqueira et al. (2018), os quais, ao avaliarem a remoção de BTEX (~4,2 mg·L⁻¹ de cada composto) em um reator metanogênico operado sob condições metanogênicas (TDH = 24 h), obtiveram uma eficiência média de remoção de benzeno de aproximadamente 55%. É interessante mencionar que a presença dos outros hidrocarbonetos aromáticos não interferiu na remoção de benzeno.

Tabela 5.2 Variação das concentrações afluente e efluente, e eficiências de remoção de benzeno estudado, nas diferentes condições operacionais testadas

	Etapa	Afluente (mg·L⁻¹)		Efluente (mg·L⁻¹)		Eficiência (%)	
Fase 1	I	4,4	(0,24)	1,9	(0,08)	56,2	(2,75)
	II	4,1	(0,12)	0,6	(0,05)	86,6	(0,99)
	III	4,2	(0,20)	1,0	(0,05)	76,6	(1,17)
	IV	4,4	(0,23)	0,6	(0,09)	85,6	(1,84)
	V	4,2	(0,18)	1,5	(0,12)	63,5	(3,14)
	VI	4,2	(0,12)	0,9	(0,13)	77,3	(3,86)
	VII	4,4	(0,36)	0,6	(0,10)	86,9	(3,04)
Fase 2	VIII	4,2	(0,14)	1,0	(0,06)	76,6	(1,67)
	IX	4,3	(0,21)	1,9	(0,23)	55,8	(4,54)
	X	4,4	(0,19)	1,8	(0,12)	59,0	(2,22)
	XI	4,2	(0,17)	1,8	(0,06)	58,3	(1,48)
	XII	4,3	(0,25)	1,1	(0,11)	72,5	(3,05)
	XIII	4,2	(0,23)	2,0	(0,27)	51,3	(6,67)
	XIV	4,1	(0,16)	1,7	(0,04)	63,5	(0,60)
	XV	4,2	(0,10)	0,6	(0,01)	81,2	(0,43)

O desvio padrão é exibido entre parênteses.

Fonte: elaborada pelo autor.

A Figura 5.1 apresenta a variação da concentração afluenta, efluente e eficiência de benzeno no líquido.

Como o benzeno é um hidrocarboneto aromático volátil, pode ser transferido da fase líquida para a gasosa durante o processo de tratamento. Portanto, a concentração desse composto também foi avaliada no biogás de forma a verificar se era efetivamente biodegradado pelos microrganismos presentes no reator ou apenas removido fisicamente por volatilização. Observando a **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, foram verificados valores próximos a $3,58 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$, o que representa uma perda menor que 0,01% em relação à carga afluenta, para todos os compostos. Portanto, os resultados indicam que a remoção de benzeno foi, muito provavelmente, resultado de atividade microbiológica.

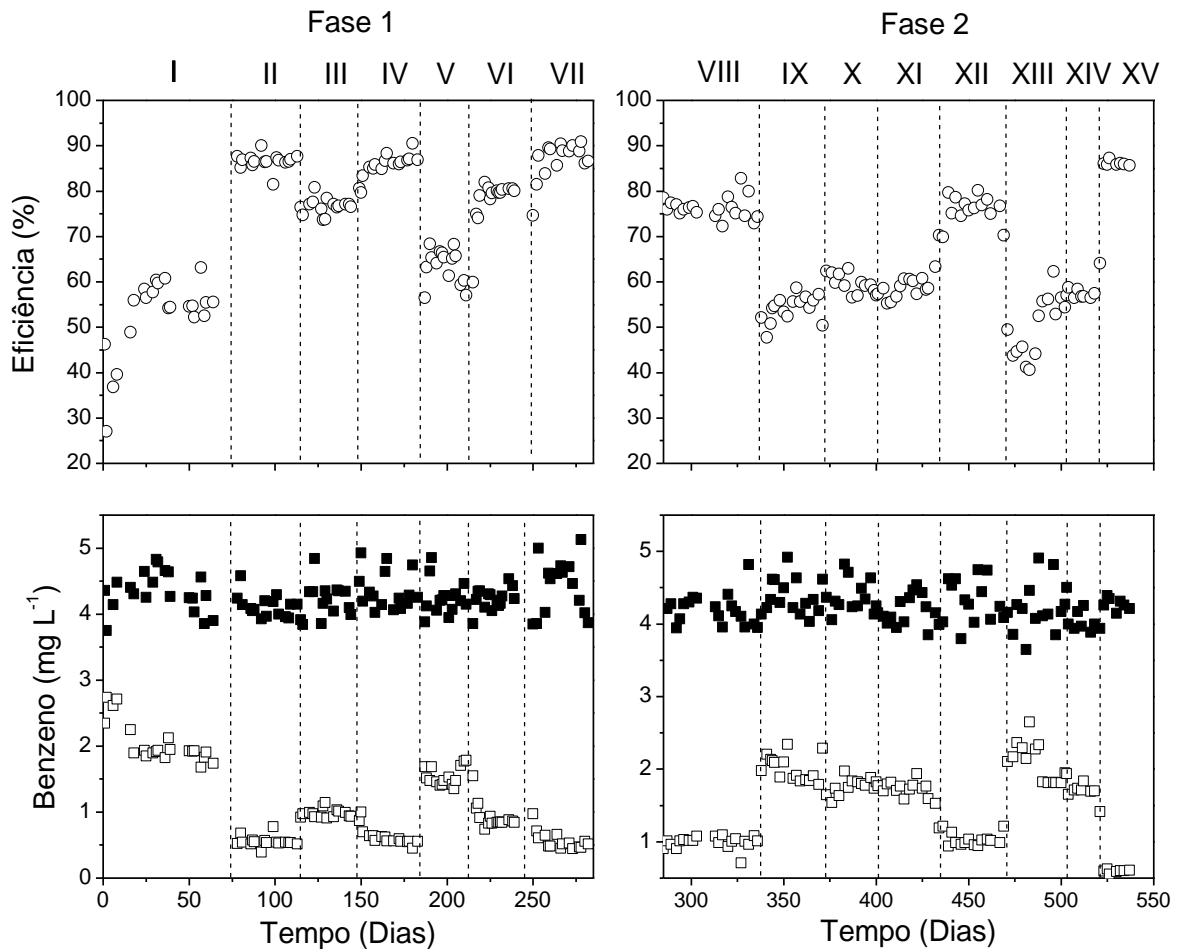
Após 64 dias de operação, o reator foi considerado estável, e foram iniciadas as demais etapas com injeção de ar. Com o início da microaeração (etapa II), como esperado, a eficiência média de remoção de benzeno foi superior à da etapa anaeróbia, com 86,6% para uma vazão de $1 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$ (Tabela 5.2). Na etapa III, após reduzir a vazão de microaeração para $0,5 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$, o benzeno teve sua eficiência reduzida para 76,6%, mas ainda com um aumento na remoção de hidrocarboneto de 27% em comparação com a etapa anaeróbia (etapa I). Na etapa IV, com o aumento da vazão de ar para $2,0 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$, esperava-se uma melhora na remoção de benzeno no reator em relação à etapa II ($1,0 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$). No entanto, a eficiência apresentou valores estatisticamente semelhantes aos obtidos na etapa II (Tabela 5.2).

Tabela 5.3 Variação da carga diária de benzeno no biogás nas diferentes condições operacionais testadas.

	Etapa	Benzeno ($\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)		Tolueno ($\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)	
Fase 1	I	3,58	(0,55)	-	-
	II	1,62	(0,24)	-	-
	III	3,94	(1,42)	-	-
	IV	1,60	(0,50)	-	-
	V	0,71	(0,52)	-	-
	VI	0,48	(0,12)	-	-
	VII	0,28	(0,06)	-	-
Fase 2	VIII	0,13	(0,02)	-	-
	IX	3,47	(0,39)	-	-
	X	3,63	(0,46)	-	-
	XI	2,06	(0,18)	-	-
	XII	0,81	(0,06)	1,26	(0,71)
	XIII	2,22	(0,29)	0,55	(0,16)
	XIV	2,54	(0,16)	-	-
	XV	1,09	(0,19)	-	-

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 5.1 Variação da concentração afluente, efluente e eficiência de benzeno no líquido



Afluente (■); efluente (□); eficiência (○)
 Fonte: elaborada pelo autor.

Sob condições microaeróbias (baixas concentrações de O₂), os microrganismos, auxiliados por uma enzima mono-oxigenase, podem converter o benzeno a fenol, inserindo um grupo hidroxila no anel aromático, diminuindo a toxicidade do composto. É importante mencionar que, sob tais condições, o composto não é mineralizado pelas vias aeróbias clássicas, já que não há oxigênio suficiente para atuar como aceptor de elétrons. De fato, estequiometricamente, para a mineralização aeróbia completa de benzeno, seria necessária alta saturação de oxigênio no meio líquido (8-12 mg O₂·L⁻¹ para a oxidação de 5-8 mg·L⁻¹ de benzeno). Portanto, após a ativação inicial do anel aromático pela mono-oxigenase, o subproduto gerado (fenol), menos recalcitrante, pode ser degradado mais facilmente por via anaeróbia, aumentando a eficiência de remoção do sistema de tratamento (YERUSHALMI et al., 2001).

Observando a Tabela 5.2, foi constatado que, entre as etapas II e IV, em que foi variada a vazão de ar, mesmo com $2 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$ (etapa IV), não houve melhora na remoção de benzeno em comparação com a etapa II, que foi operada com a metade da vazão de ar da etapa IV e apresentou valores de eficiência bem semelhantes. De fato, não houve diferença significativa entre os valores médios de concentração efluente, concentração removida e eficiência de remoção, o que auxiliou a tomada de decisão da melhor vazão de ar para o sistema em uso. Portanto, a vazão de $1 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$ foi utilizada nas etapas posteriores por ter sido a melhor vazão de ar para a remoção de benzeno neste estudo.

Conforme observado por Siqueira et al. (2018), o aumento da vazão de microaeração (de 1 para $2 \text{ mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$) também não melhorou significativamente a remoção de BTEX. De fato, esse aumento nem sempre irá favorecer a remoção de um composto em um sistema microaeróbio, já que o aumento da vazão de ar na matriz do lodo granular leva a uma penetração mais profunda do oxigênio, o que pode inibir os microrganismos anaeróbios estritos do interior do grânulo (bactérias acetoclásticas e arqueias metanogênicas) (KHONGSUMRAN et al., 2014; WU et al., 2015). Portanto, como a degradação de BTEX, sob condições metanogênicas, é reportada como resultado de relações sintróficas entre bactérias fermentativas e arqueias metanogênicas (GIEG; FOWLER; BERDUGO-CLAVIJO, 2014; VOGT; KLEINSTEUBER; RICHNOW, 2011), a inibição destas pode dificultar o processo.

Com o início da microaeração, a carga de benzeno no biogás diminuiu, em comparação com a etapa anaeróbia (etapa I). Observando a **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, as etapas II, III e IV apresentaram carga média diária de benzeno entre 1,62 e $3,94 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$. Os valores evidenciam que a introdução de ar no reator não aumentou a volatilização do benzeno, mesmo para a maior vazão, ou seja, o aumento da eficiência de remoção de benzeno no líquido não se deve ao *stripping* pelas bolhas de ar, mas, provavelmente, pela melhoria no processo de biodegradação.

Na etapa V, avaliou-se a microaeração ($1 \text{ mL ar} \cdot \text{min}^{-1}$) em um ponto diferente, no *headspace*, ainda com o intuito de otimizar o processo de degradação microaeróbia de benzeno. Foi verificado um decréscimo na eficiência de remoção de benzeno em comparação com as etapas microaeróbias anteriores (Figura 5.1), embora tenha se mantido 12% acima da etapa I, anaeróbia. Contudo, foi a menor eficiência de remoção de benzeno entre as etapas operadas com microaeração. Por outro lado, a carga de benzeno no biogás reduziu consideravelmente, chegando a valores abaixo dos detectados nas etapas anteriores ($0,71 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Na etapa V, com injeção de ar no *headspace*, esperava-se que a eficiência de remoção de benzeno fosse semelhante à da etapa II ($1 \text{ mL ar} \cdot \text{min}^{-1}$). Pressupunha-se que a solubilização do oxigênio presente no ar sintético aconteceria a partir do *headspace*, já que o tempo de permanência das bolhas de ar na coluna d'água do reator ($< 2 \text{ s}$), ao serem injetadas junto à linha de alimentação, seria insuficiente para uma efetiva transferência de massa. Então, pelo tempo de residência do gás no *headspace*, o oxigênio difundiria no líquido da zona de decantação, que seria recirculado para a zona de digestão e, conseqüentemente, disponibilizando para os microrganismos (SIQUEIRA et al., 2018).

A ineficiência da transferência de massa do oxigênio presente no ar sintético para o líquido observada nessa etapa também foi observada por Siqueira et al. (2018), contudo na presença não só de benzeno, mas de outros hidrocarbonetos aromáticos. Dessa forma, a turbulência (perturbação na interface líquido-gás) pode ser um requisito para que haja uma boa difusão do oxigênio a partir do *headspace*. Porém, ressalta-se que isso merece mais investigações, mas acredita-se que tal efeito é muito mais evidente em processos aeróbios tradicionais em que os níveis de aeração são muito maiores quando comparado aos processos microaeróbios investigados na presente pesquisa.

Na etapa VI, a recirculação foi desligada, e o reator voltou a ser microaerado ($1 \text{ mL ar} \cdot \text{min}^{-1}$) junto à tubulação de alimentação. Conseqüentemente, houve uma redução considerável na eficiência de benzeno ($\sim 10\%$) em relação à etapa II (com recirculação) (Tabela 5.2). Provavelmente, a ausência de recirculação de líquido pode ter prejudicado o contato líquido-ar, substrato-ar e substrato-microrganismo, reduzindo a mistura entre os componentes citados.

De fato, a literatura reporta que reatores operados com recirculação tendem a reduzir a estratificação da concentração e a toxicidade do substrato ao longo do reator, otimizando a mistura, bem como a transferência de massa entre substrato e microbiota (MOHAN et al., 2007; ZUO et al., 2014). Assim, os resultados indicam que a recirculação

parece ter um papel fundamental na remoção microaeróbia de BTEX, já que pode aumentar a transferência de massa e, logo, a solubilização do oxigênio no líquido (STEPHENSON et al., 1999, GOTTARDO et al., 2017), não sendo a microaeração e a produção de biogás suficientes para conferir a turbulência necessária.

Com relação à fração de benzeno no biogás, a remoção por volatilização também foi considerada desprezível (0,05%) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Ainda que tenham ocorrido variações em alguns parâmetros operacionais do reator, este se manteve estável durante todo o experimento. De fato, ao retornar a condições operacionais similares às da etapa II (etapa VII), foram obtidas eficiências semelhantes à daquela etapa (Tabela 5.2). Tal observação reforça a importância da recirculação na remoção microaeróbia de BTEX e indica que as diferenças observadas no desempenho do reator, durante as diferentes etapas experimentais, eram decorrentes das modificações operacionais realizadas no sistema e não de uma provável adaptação da microbiota ao longo do tempo.

Ao analisar os valores de carga de benzeno no biogás, foi constatado que, surpreendentemente, foram bem menores do que os valores obtidos na etapa II, o que pode ser resultado de um aumento na atividade microbiana ou, talvez, de crescimento de microrganismos microaerofílicos oxidadores de benzeno no *headspace* do reator.

Por fim, é importante mencionar que o reator apresentou boa estabilidade operacional durante todas as etapas dessa fase, não sendo observado problema na conversão de matéria orgânica (remoção de DQO entre 78,3 e 81,5%) nem indícios de acidificação (pH entre 7,5 e 8,5).

5.3.2. Fase 2 – Efeito da presença de compostos intermediários na eficiência remoção de benzeno

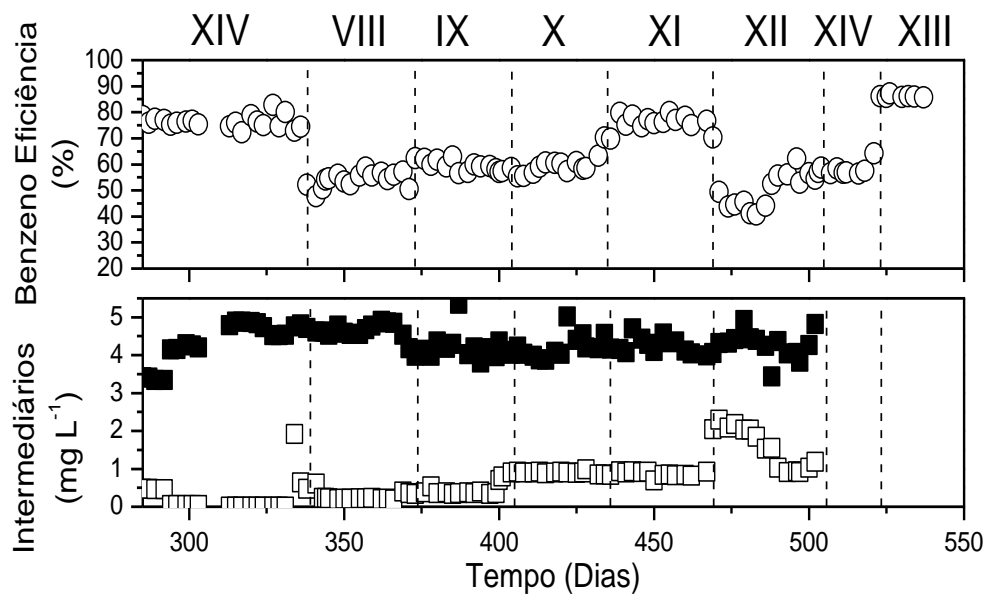
Após a otimização do processo (fase 1), foi avaliado o efeito da adição de diferentes compostos intermediários da biodegradação anaeróbia do benzeno (fenol, benzoato e tolueno) (CALDWELL; SUFLITA, 2000; DOU et al., 2010; MASUMOTO et al., 2012; YERUSHALMI et al., 2001; ZHANG et al., 2013) na remoção desse hidrocarboneto sob condições anaeróbias e microaeróbias (fase 2).

A Figura 5.2 apresenta a variação da concentração afluenta, efluente dos intermediários adicionados e eficiência de benzeno no líquido.

Na etapa VIII, o reator foi operado sob as mesmas condições de microaeração da etapa VII (1 mL ar·min⁻¹), porém suplementado com aproximadamente 4,3 mg·L⁻¹ de fenol, o

que causou uma redução de aproximadamente 10% na remoção média de benzeno em relação à etapa anterior (Tabela 5.2). Esse fato pode estar relacionado ao aumento da carga de compostos aromáticos presentes no reator. Com relação ao fenol, nessa etapa, foi observada uma remoção média de 93,7%. Sob condições anaeróbias (etapa IX), ainda na presença de fenol ($4,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a eficiência de remoção de benzeno diminuiu, como esperado, alcançando um valor médio semelhante ao obtido na etapa I da fase 1 (anaeróbia sem intermediários) (Tabela 5.2), já o fenol apresentou uma remoção média próxima ao da etapa VIII (Tabela 5.4). Tal comportamento sugere que a degradação desse composto parece ser mais favorável que a degradação do benzeno, provavelmente devido à maior instabilidade do fenol, causada pela presença de um grupo hidroxila, o que facilita o ataque microbiano.

Figura 5.2 Variação da concentração afluenta, efluente dos intermediários adicionados e eficiência de benzeno no líquido.



Afluenta (■); efluente (□); eficiência (○).

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 5.4 Variação das concentrações afluente e efluente do benzeno e intermediários fenol, benzoato e tolueno

Etapa		VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Condição		Microaer.	Anaer.	Anaer.	Microaer.	Microaer.	Anaer.	Anaer.	Microaer.
Fenol	Afluente (mg·L ⁻¹)	4,28 (0,45)	4,70 (0,10)	-	-	-	-	-	-
	Efluente (mg·L ⁻¹)	0,24 (0,16)	0,39 (0,26)	-	-	-	-	-	-
	Eficiência (mg·L ⁻¹)	93,7 (4,65)	91,8 (5,48)	-	-	-	-	-	-
	B+F _{afluente} (mg·L ⁻¹)	8,4	9	-	-	-	-	-	-
	B+F _{efluente} (mg·L ⁻¹)	1,24	2,29	-	-	-	-	-	-
	B+F _{eficiência} (%)	85,2	74,6	-	-	-	-	-	-
Benzoato	Afluente (mg·L ⁻¹)	-	-	4,23 (0,23)	4,20 (0,22)	-	-	-	-
	Efluente (mg·L ⁻¹)	-	-	0,38 (0,03)	0,89 (0,04)	-	-	-	-
	Eficiência (mg·L ⁻¹)	-	-	91,0 (0,98)	78,8 (1,80)	-	-	-	-
	B+B _{afluente} (mg·L ⁻¹)	-	-	8,63	8,40	-	-	-	-
	B+B _{efluente} (mg·L ⁻¹)	-	-	2,18	2,69	-	-	-	-
	B+B _{eficiência} (%)	-	-	74,7	68,0	-	-	-	-
Tolueno	Afluente (mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	4,27 (0,18)	4,26 (0,26)	-	-
	Efluente (mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	0,86 (0,05)	1,57 (0,47)	-	-
	Eficiência (mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	79,8 (1,21)	63,2 (10,73)	-	-
	B+T _{afluente} (mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	8,57	8,46	-	-
	B+T _{efluente} (mg·L ⁻¹)	-	-	-	-	1,96	3,57	-	-
	B+T _{eficiência} (%)	-	-	-	-	77,1	57,8	-	-

O desvio padrão é exibido entre parênteses.

Fonte: elaborada pelo autor.

Nas etapas X e XI, o reator passou a ser suplementado com benzoato ($\sim 4,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), em substituição ao fenol, para que fosse verificada a influência desse composto na degradação do benzeno sob condições anaeróbias e microaeróbias, respectivamente. As eficiências de remoção de benzeno, nessas duas etapas, foram bem semelhantes (58-59%) (Tabela 5.2), ou seja, o efeito da microaeração na degradação de benzeno foi inibido na presença de benzoato. Conforme mencionado anteriormente, o benzoato é um intermediário presente na degradação dos compostos aromáticos. Assim, a adição desse composto ao reator pode ter deslocado o equilíbrio nas reações de degradação do benzeno, inibindo parcialmente a remoção de benzeno (WEELINK; VAN EEKERT; STAMS, 2010). Por outro lado, o benzoato apresentou remoção de 91% na etapa X (anaeróbia), enquanto, na etapa XI (microaeróbia), a remoção foi de apenas 78% (Tabela 5.4). Esse fato pode ser um indicativo de que os microrganismos que realizam a degradação do benzoato possuem metabolismo estritamente anaeróbio, sendo inibidos na presença de oxigênio, mesmo em concentrações muito pequenas.

O último intermediário avaliado junto com o benzeno foi o tolueno. Sob condições microaeróbias (etapa XII), na presença de tolueno ($\sim 4,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), foi obtida uma eficiência média de remoção de benzeno de 75,2%, porém, na ausência de microaeração (etapa XIII), essa eficiência diminuiu quase 25% para o benzeno (Tabela 5.2). A remoção de tolueno foi quase 80% na etapa microaerada (etapa XII) e, em seguida decresceu para 63% na etapa sem microaeração (etapa XIII). Observando a Tabela 5.4, o tolueno foi o intermediário que teve as menores eficiências de remoção, tanto sob condições anaeróbias quanto microaeróbias.

Como observado anteriormente, na etapa XII, obteve-se uma boa eficiência média de remoção do benzeno, porém, na etapa XIII, obteve-se a menor taxa de remoção média entre todas as etapas de operação do reator (Tabela 5.2). Esse fato está relacionado ao fato de que o benzeno é o composto mais recalcitrante (CORSEUIL et al., 1998; EL-NAAS; ACIO; EL TELIB, 2014) e que sua degradação é inibida na presença de outros hidrocarbonetos como o tolueno, o qual é reportado como o composto BTEX mais facilmente degradado sob condições anaeróbias e microaeróbias (FIRMINO et al., 2015a; 2018).

Para concluir a fase 2, o reator voltou a ser alimentado sem compostos intermediários de forma a confirmar o seu impacto no processo de degradação de benzeno sob condições anaeróbias (etapa XIV) e microaeróbias (etapa XV), sendo, portanto, obtidas eficiências médias de remoção próximas a 57 e 86%, respectivamente (Tabela 5.2). Vale ressaltar que a eficiência da etapa XIV (anaeróbia) foi semelhante à da etapa I (Tabela 5.2), e

a da etapa XV (microaeróbia), às das etapas II e VII. Portanto, as diferentes eficiências obtidas ao longo do experimento foram resultado das alterações operacionais impostas ao sistema, e não decorrentes de adaptação microbiana. Além disso, esses resultados também indicam boa estabilidade do reator estudado, o qual, mesmo após ter sido submetido a diferentes condições operacionais, conseguiu retornar a eficiências semelhantes às obtidas no início do experimento.

Nos ensaios com todos os intermediários, a eficiência do benzeno diminuiu. Em contrapartida, os compostos adicionados como intermediários apresentaram eficiência maior do que a do benzeno, tanto sob condições anaeróbias quanto microaeróbias. A comparação dos perfis de degradação microaeróbia do benzeno revelou que a eficiência foi menor quando o mesmo esteve na presença de benzoato (etapa VIII), seguido do tolueno (etapa XII) e, por fim, do fenol (etapa VIII). Já entre as etapas anaeróbias, o intermediário que mais influenciou negativamente na remoção de benzeno foi o tolueno (etapa XIII), seguido do fenol (etapa IX) e, por último, do benzoato (etapa X). A eficiência de remoção foi avaliada, também, a partir da soma das concentrações afluente e efluente de benzeno e intermediários (Tabela 5.4). Os resultados apontaram semelhança na comparação dos perfis de degradação microaeróbia e anaeróbia do benzeno com os já apresentados anteriormente considerando a eficiência de remoção individual do intermediário.

A diminuição da eficiência de remoção de benzeno pode ser explicada pelo deslocamento do equilíbrio da reação causado pelo acúmulo dos compostos intermediários. Além disso, há preferência dos microrganismos em degradar os intermediários, já que são menos estáveis do que o benzeno. Ao estudar a relação e degradação binária de benzeno na presença de fenol e benzoato, Dou et al. (2010), utilizando uma cultura bacteriana isolada de *Bacillus cereus*, demonstraram que tanto o fenol como o benzoato foram degradados sem uma fase *lag*, independentemente de cada um deles ter sido adicionado isoladamente ou acompanhado de benzeno. O consumo imediato observado de fenol e benzoato foi atribuído a uma adaptação da cultura de degradação de benzeno isolada, semelhante à presente pesquisa, considerando ainda que o fenol e benzoato podem ser compostos intermediários da degradação do benzeno, favorecendo a hipótese de adaptação aos compostos adicionados na presente pesquisa. Outro fator que pode ter contribuído para a redução da eficiência da degradação de benzeno no meio foi o aumento da carga de compostos aromáticos para o qual a microbiota não estava ambientada. O reator estudado por Siqueira et al. (2018), por exemplo, não sofria isso, pois já estava adaptado a maior carga de compostos aromáticos desde o início dos experimentos.

Masumoto et al. (2012) estudaram a degradação do benzeno na presença de tolueno, fenol e benzoato como intermediários. O inóculo foi enriquecido a partir de solo não contaminado de Tsuchiura (Ibaraki, Japão) e mantido sob anaerobiose em biorreatores (72 mL). Os intermediários foram rapidamente degradados, contudo a degradação do benzeno ocorreu mais lentamente quando o fenol esteve presente. De uma forma geral, a cinética de degradação do benzeno na presença do tolueno, como também do benzoato, foi quase idêntica quando os testes foram conduzidos com o benzeno sozinho, mesmo quando as concentrações de tolueno e benzoato foram aumentadas até 90 µM.

Phelps, Zhang e Young (2001) estudaram a inibição da degradação do benzeno por microrganismos presentes em sedimentos da bacia de Guaymas (Golfo do México) na presença de alguns compostos. O inóculo enriquecido apresentou capacidade de mineralizar o benzeno na presença de sulfato e quando foi adicionado benzoato (40 mM) não foi observado efeito negativo na utilização de benzeno.

Na presente pesquisa, contrariamente aos supracitados autores, o composto que mais interferiu na degradação do benzeno foi o benzoato, que, mesmo na etapa microaeróbia, resultou em remoção do benzeno semelhante às de outras etapas anaeróbias. Mesmo alternado entre etapas anaeróbias e etapas microaeróbias, o biorreator da presente pesquisa pode ter estimulado uma biomassa mais adaptada para a realização da hidroxilação do benzeno, convertendo benzeno a fenol auxiliado pelas monoxigenases e depois convertendo o fenol por anaerobiose transformando em benzoato (YERUSHALMI et al., 2001).

A detecção de benzoato como um intermediário de benzeno é bem fundamentado, ainda mais com a compreensão atual do metabolismo de fenol anaeróbio (CALDWELL; SUFLITA, 2000; FOWLER et al., 2012; YERUSHALMI et al., 2001). Segundo Caldwell e Suflita (2000), a carboxilação do fenol em p-hidroxibenzoato e a subsequente desidroxilação deste último em benzoato é uma via bem estabelecida para culturas anaeróbias metanogênicas. Observando a rota de conversão do benzeno até o benzoato, a presença de uma concentração maior deste composto pode ter interferido nas etapas anteriores por deslocamento do equilíbrio, favorecendo o consumo do benzoato. Dessa forma, para a presente pesquisa, o benzoato pode ser um intermediário importante, e sua presença, no meio contendo benzeno, pode ter maior influência no deslocamento do equilíbrio químico do que os demais compostos, fenol e tolueno.

Caldwell e Suflita (2000) concluíram, ainda, que a formação de benzoato estava envolvida na mineralização do benzeno sob condições redutoras de ferro e redutoras de sulfato. Adicionalmente, foi demonstrado que tal composto foi provavelmente metabolizado

por uma hidroxilação inicial para formar fenol, o qual era convertido em benzoato. Assim, o benzoato é reportado como um intermediário em comum para todos os substratos (benzeno, fenol e tolueno) da presente pesquisa.

Assim como na fase 1, a carga de benzeno no biogás também foi medida na fase 2, a qual variou de 0,1 a 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), representando menos de 0,04 % da carga afluyente desse hidrocarboneto. Portanto, mesmo na presença dos intermediários testados, a remoção de benzeno continuou acontecendo de forma biológica. Um comportamento semelhante foi observado para o composto tolueno.

Finalmente, o reator continuou a apresentar elevada estabilidade operacional durante toda a fase 2, em que o pH variou de 7,2 a 7,8, e os valores encontrados de eficiência de remoção de DQO se situaram entre 81 e 83%.

5.4. Conclusão

Verificou-se uma eficiência de remoção de benzeno de 52,6% quando o sistema operou sob condições anaeróbias. Todavia, a adição de baixas concentrações de oxigênio (0,5-2 $\text{mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$) garantiu elevadas eficiências de remoção (~76-86%), sendo os melhores resultados obtidos para a vazão de 1 $\text{mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$, na qual houve um aumento de 35% na eficiência de remoção em relação à da etapa anaeróbia. O aumento da dosagem de ar para 2 $\text{mL ar}\cdot\text{min}^{-1}$ não aumentou as eficiências de remoção de benzeno.

Foi constatado ainda que, embora o tempo de contato entre as bolhas de ar seja curto, o melhor ponto de aplicação é junto à alimentação, e a recirculação de efluente é necessária para manter uma boa transferência de massa e, logo, elevadas eficiências de remoção de benzeno.

A perda do hidrocarboneto monoaromático por *stripping* foi considerada negligenciável, mesmo nas fases microaeróbias, comprovando a remoção biológica desse composto.

Por fim, os intermediários adicionados na água contaminada reduziram a eficiência de remoção do benzeno, sendo o benzoato o composto que mais influenciou negativamente o processo de remoção de benzeno, mesmo sob condições microaeróbias, se configurando como um intermediário chave no processo de biodegradação anaeróbia e microaeróbia do benzeno.

6. EFEITO DA PRESENÇA DE ETANOL E OXIGÊNIO DISSOLVIDO NA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE BTEX

6.1. Introdução

Os hidrocarbonetos aromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX), são alguns dos compostos orgânicos voláteis (COV) facilmente encontrados no petróleo bruto e em seus derivados, e estão entre os poluentes mais importantes do solo e das águas subterrâneas (PENG et al., 2015). Possuem caráter volátil, elevada solubilidade em água (DOU; LIU; HU, 2008; FARHADIAN et al., 2008) e alta mobilidade em sistemas solo-água, facilitando a contaminação de águas superficiais e subterrâneas (NAKHLA, 2003; TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004).

No Brasil, a gasolina é misturada com 27% v/v de etanol anidro, o que contribui para mudar a volatilidade dos BTEX e reduzir as emissões desses compostos para a atmosfera (CRUZ et al., 2017). Entretanto, isso pode agravar o problema de contaminação de aquíferos subterrâneos, já que o etanol pode exercer um efeito de cossolvência, aumentando a solubilidade em água dos BTEX e, conseqüentemente, resultando em concentrações mais elevadas (CORSEUIL et al., 2011).

Devido aos efeitos prejudiciais do BTEX no ambiente e na saúde humana, há uma necessidade urgente de desenvolver tecnologias de tratamento com boa relação custo-benefício capazes de minimizar ou reduzir as emissões desses poluentes (EL-NAAS; ACIO; EL TELIB, 2014).

Entre as várias tecnologias de remediação disponíveis para o tratamento de água contaminada com monoaromáticos, métodos biológicos ou processos de biorremediação parecem ser uma abordagem potencialmente econômica, energeticamente eficiente e ambientalmente correta (FARHADIAN et al., 2008; SHIM; YANG, 2002).

Os hidrocarbonetos aromáticos podem ser degradados aerobiamente e anaerobiamente (VARJANI, 2017). No entanto, antes da década de 1980, as investigações envolvendo a remoção microbiológica desses compostos foram todas realizadas sob condições aeróbias, nas quais o oxigênio molecular é incorporado à molécula de hidrocarboneto pela atividade das oxigenases como a etapa inicial do processo oxidativo. Não se conhecia, ou mesmo se esperava, que organismos anaeróbios pudessem realizar uma reação semelhante (CHAKRABORTY; COATES, 2004). Contudo, as investigações atuais obtiveram descobertas importantes sobre a degradação de BTEX sob condições de redução de nitrato, ferro, manganês e sulfato, e metanogênicas (FIRMINO et al., 2015b; RIBEIRO et al., 2013;

STASIK; WICK; WENDT-POTTHOFF, 2015; VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

No entanto, ainda não há estudo definitivo sobre a natureza do mecanismo de ativação do anel benzênico, pois a mineralização dos hidrocarbonetos se inicia com a clivagem do anel aromático (KUNAPULI et al., 2008). A bioquímica de conversão de hidrocarbonetos aromáticos, tais como BTEX, é frequentemente iniciada por uma das quatro seguintes reações: (i) adição de fumarato, pela atividade de síntese do benzilsuccinato; (ii) metilação, pela transferência de um grupo metil antes da adição de fumarato; (iii) carboxilação, que é a conversão do composto químico à benzoato, observado no metabolismo do benzeno; e (iv) hidroxilação, que é a adição de um grupo hidroxila no anel aromático (DOU et al., 2010; GHATTAS et al., 2017; KUNAPULI et al., 2008; MASUMOTO et al., 2012; MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016).

Recentemente, sistemas anaeróbios aplicados à remoção de BTEX têm sido estudados na presença de baixas concentrações de oxigênio para melhorar a remoção desses hidrocarbonetos de águas contaminadas (FIRMINO et al., 2018; WU et al., 2015), auxiliando no processo enzimático, já que a biodegradação de BTEX envolve uma série de etapas usando diferentes enzimas (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017). Dessa forma, na microaeração, enzimas mono-oxigenases auxiliam na ativação do anel aromático dos hidrocarbonetos incorporando um átomo de oxigênio, facilitando o ataque microbiano posteriormente (VARJANI; UPASANI, 2017).

Assim, sob tais condições microaeróbias, alguns microrganismos usam oxigênio apenas para introduzir grupos hidroxila no anel aromático, como nas clássicas vias aeróbias, enquanto sua clivagem ocorre através de vias metabólicas anaeróbias (CHAKRABORTY; COATES, 2004; FUCHS, 2008).

O presente capítulo avaliou o efeito da presença do cossustrato etanol, de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e da aclimatação do lodo de inóculo na degradação anaeróbia de BTEX.

6.2. Material e métodos

6.2.1. Compostos químicos

Foram utilizados, conjuntamente, os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno (99,5%, Dinâmica Química, Brasil), tolueno (99,5%, Vetec, Brasil), etilbenzeno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA), o-xileno (98,0%, Fluka, EUA), m-xileno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA) e p-xileno (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA) ($\sim 4,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada composto). Quando necessário, foi utilizado etanol (99,8%, Dinâmica, Brasil) como cossustrato ($1 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$). Todos os compostos químicos foram utilizados como adquiridos, sem purificação adicional.

6.2.2. Inóculo e meio basal

Foram utilizados, separadamente, dois lodos de inóculo (L1 e L2). O L1, não aclimatado a BTEX, foi coletado de um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB, *upflow anaerobic sludge blanket*) (AME de $0,55 \pm 0,16 \text{ g DQO}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), em escala real, de uma estação de tratamento de esgoto doméstico (Fortaleza, Ceará, Brasil). O L2, aclimatado a BTEX, foi coletado de um reator microaeróbio, em escala laboratorial, que tratava água contaminada com BTEX ($\sim 4,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada composto) e etanol ($1 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$) há 130 dias (Siqueira et al., 2018).

O meio basal (macro e micronutrientes) foi preparado de acordo com Firmino et al. (2010). Para manter o pH próximo a 7,0, o meio basal foi tamponado com bicarbonato de sódio ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

6.2.3. Procedimento experimental

Os ensaios foram mantidos em batelada, 70 mL de meio basal foram adicionados em garrafas de vidro borossilicato de 115 mL, as quais foram inoculadas com lodo em uma concentração final de $2 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ e, posteriormente, seladas com septos de Viton® e lacres de alumínio. Em seguida, para o estabelecimento de condições anaeróbias no interior das garrafas, seu *headspace* foi purgado com gás nitrogênio por 1 minuto. Posteriormente, as garrafas foram mantidas sob agitação mecânica (150 rpm) por 20 minutos à temperatura de 30 °C de forma a garantir o consumo total de oxigênio dissolvido remanescente no meio basal. Por fim, com auxílio de uma seringa de vidro, foram adicionados, ao meio basal, os compostos BTEX e, quando necessário, o cossustrato etanol, dando-se início aos ensaios sob

as mesmas condições de agitação e temperatura já mencionadas. Adicionalmente, para avaliar possíveis perdas de BTEX por volatilização, foi realizado um ensaio abiótico (controle), cujas garrafas não foram inoculadas com lodo, sendo adicionados apenas os compostos BTEX e o cossustrato etanol em água previamente esterilizada. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e com repetição (reinjeção dos compostos avaliados).

A remoção dos BTEX foi avaliada segundo os modelos de ordem zero, primeira e segunda ordem, cujas equações são apresentadas a seguir (6.1, 6.2 e 6.3, respectivamente). O modelo de segunda ordem resultou no melhor ajuste com os dados experimentais e foi utilizado para representar os resultados cinéticos.

$$C_A = C_{A0} - kt \quad (6.1)$$

$$\ln C_A = \ln C_{A0} - kt \quad (6.2)$$

$$\frac{1}{C_A} = \frac{1}{C_{A0}} + kt \quad (6.3)$$

em que C é a concentração do reagente ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para qualquer tempo t , C_0 é concentração do reagente ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no tempo $t = 0$, k é a constante cinética ($\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{dia}^{-1}$), t é o tempo do ensaio (dias).

6.2.3.1. *Efeito da presença de cossustrato e oxigênio dissolvido, e da aclimação do lodo de inóculo na degradação anaeróbia de BTEX*

Inicialmente, foram realizados ensaios com o lodo não aclimatado L1 e com o lodo aclimatado L2, sendo avaliados, para ambos, os efeitos da presença de etanol (cossustrato) e de oxigênio dissolvido (OD) na degradação anaeróbia de BTEX. Para isso, foram utilizadas três séries de garrafas para cada lodo: a primeira contendo apenas BTEX, a segunda contendo BTEX e etanol, e a terceira contendo BTEX, etanol e OD (concentração inicial de $1,77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). O OD foi obtido a partir da adição de ar atmosférico (10 mL) no *headspace* das garrafas com o auxílio de uma seringa *Gastight*. A concentração inicial de OD foi calculada a partir da constante de Henry do oxigênio para $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ($1,18\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$), assumindo o equilíbrio entre as fases líquida e gasosa.

6.2.3.2. *Efeito de diferentes concentrações iniciais de oxigênio dissolvido na degradação anaeróbia de BTEX por lodo aclimatado*

Posteriormente, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de OD (0, 0,88, 1,77 e 2,65 mg·L⁻¹) na degradação anaeróbia de BTEX na presença de etanol apenas para o lodo aclimatado L2. Para isso, foram utilizadas quatro séries de garrafas contendo BTEX e etanol: a primeira sem a adição de ar atmosférico, e as demais com a adição de diferentes volumes de ar atmosférico (5, 10 e 15 mL, respectivamente) no *headspace* das garrafas com o auxílio de uma seringa *Gastight*. As concentrações iniciais de OD foram calculadas conforme mencionado no item anterior.

6.2.4. Análises cromatográficas

Os compostos BTEX foram determinados por extração por *headspace* estático (Triplus HS, Thermo Scientific, USA) seguido de cromatografia gasosa com detecção por ionização por chama (HS-GC-FID, *headspace-gas chromatography flame ionization detection*) (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, USA) conforme Carneiro et al. (2014). Todas as amostras (1 mL) eram previamente diluídas com água ultrapura (Milli-Q system, EMD Millipore, USA) diretamente em *vials* de vidro borossilicato para *headspace* (20 mL) (Supelco, EUA), as quais eram, em seguida, seladas com septos de PTFE/silicone e lacres de alumínio (Supelco, EUA).

O monitoramento de fenol e benzoato foi realizado por cromatografia líquida (High performance liquid chromatography, HPLC Shimadzu Corporation, Japão). Os compostos em questão foram separados e detectados através de um método com eluição isocrática em proporção de 30%/70% de acetonitrila/tampão fosfato (0,050M de fosfato, pH 2,8) e taxa de fluxo de 1 ml·min⁻¹. A coluna utilizada foi uma C18 (150 x 4,6 mm diâmetro interno, marca Shim-pack). O comprimento de onda de detecção foi de 210 nm. Antes da análise, as amostras foram filtradas através das membranas Millipore HÁ (0,45 µm).

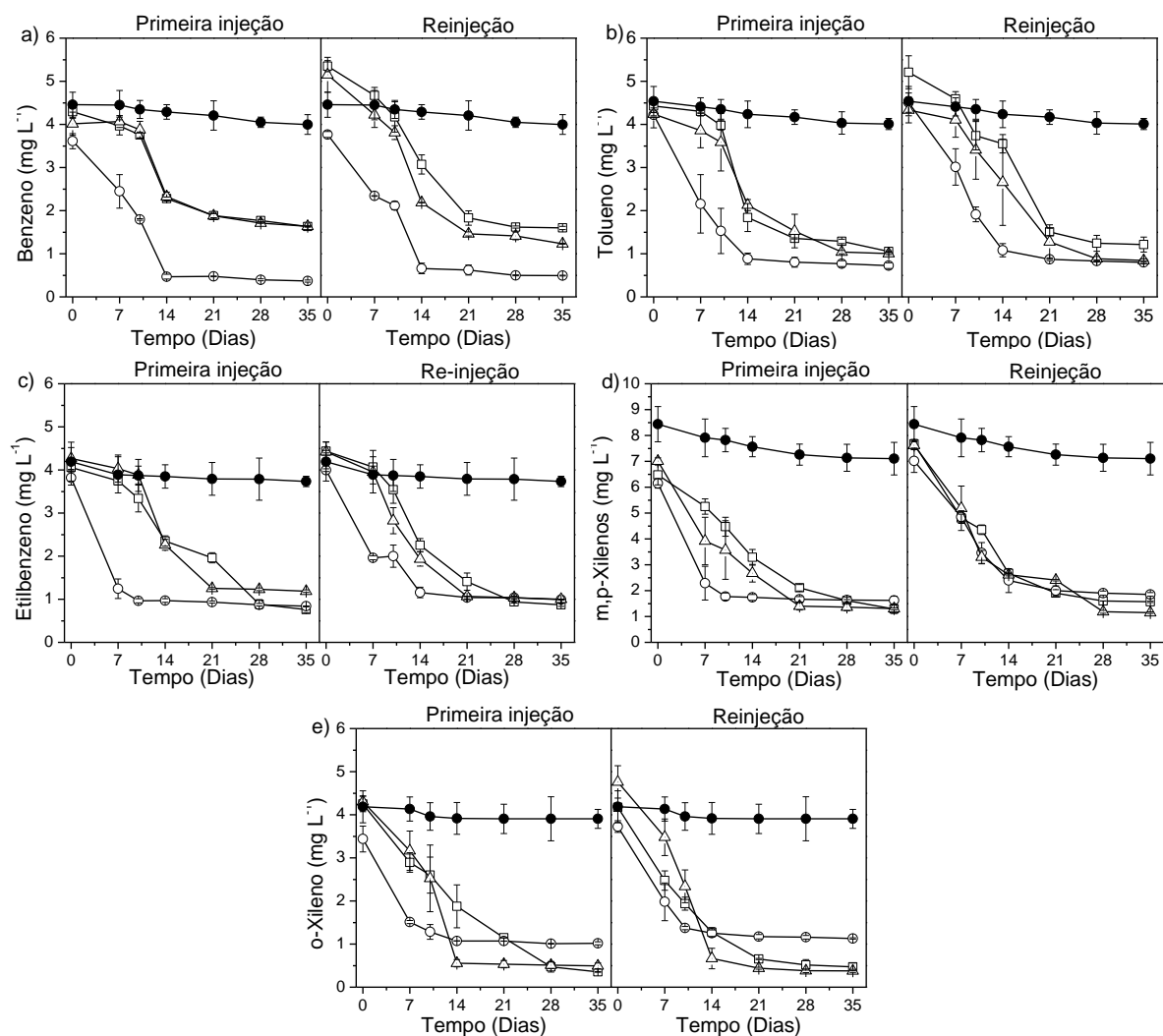
6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Efeito da presença de cossustrato e oxigênio dissolvido, e da aclimação do lodo de inóculo na degradação anaeróbia de BTEX

No ensaio abiótico, observou-se uma remoção de apenas 10% para todos os compostos BTEX ao final do experimento (35 dias) (Figura 6.1).

Nos ensaios com lodo não aclimatado (L1), para todas as condições testadas, a remoção dos compostos BTEX tendeu a estabilizar-se após 21 dias. Entretanto, especificamente para as séries contendo etanol, observou-se baixa remoção nos sete primeiros dias de ensaio (Figura 6.1). Mesmo assim, a presença de cossustrato parece ter afetado negativamente apenas a degradação anaeróbica de tolueno e, principalmente, benzeno, para o qual foi registrada uma constante cinética (k) 6,15 vezes menor sob essa condição (Tabela 6.1). Os demais compostos apresentaram menores constantes cinéticas quando os hidrocarbonetos eram a única fonte de carbono, destacando-se o o-xileno, cujo valor de k foi 4,6 vezes menor na ausência de cossustrato (Tabela 6.1).

Figura 6.1 Efeito da presença de etanol e de oxigênio dissolvido na degradação anaeróbica de BTEX pelo lodo não aclimatado L1



Legenda: BTEX (○); BTEX + etanol (□); BTEX + etanol + OD (Δ); controle abiótico (●).
Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 6.1 Constante cinética e tempo de meia vida dos compostos BTEX para L1 e L2

Composto	BTEX				BTEX + EtOH				BTEX + EtOH + OD			
	Ensaio		Repetição		Ensaio		Repetição		Ensaio		Repetição	
	k*	t _{1/2} **	k*	t _{1/2} **	k*	t _{1/2} **	k*	t _{1/2} **	k*	t _{1/2} **	k*	t _{1/2} **
L1												
Benzeno	0,080	3,48	0,058	4,54	0,013	18,54	0,015	12,23	0,013	19,47	0,020	9,69
Tolueno	0,034	6,88	0,033	6,71	0,023	9,66	0,022	8,68	0,026	9,13	0,033	7,02
Etilbenzeno	0,021	12,35	0,022	11,26	0,034	7,34	0,031	7,31	0,022	10,75	0,027	8,39
m,p-Xilenos	0,010	15,58	0,012	11,52	0,019	8,12	0,017	7,87	0,020	6,98	0,023	5,65
o-Xileno	0,017	16,78	0,016	16,74	0,078	3,03	0,062	3,88	0,061	3,82	0,061	3,43
L2												
Benzeno	0,044	5,47	0,036	6,36	0,043	5,42	0,040	5,88	0,055	4,24	0,052	4,49
Tolueno	0,044	5,47	0,041	5,49	0,029	8,07	0,027	8,74	0,044	5,3	0,051	4,39
Etilbenzeno	0,030	7,46	0,026	8,82	0,030	7,81	0,032	7,09	0,043	5,55	0,062	3,83
m,p-Xilenos	0,026	5,19	0,022	6	0,029	4,27	0,029	4,51	0,042	3,33	0,053	2,58
o-Xileno	0,057	4,33	0,081	2,83	0,026	9,83	0,028	8,86	0,036	6,55	0,054	4,26

* k em mg⁻¹·L·dia⁻¹** t_{1/2} em dias

Fonte: elaborada pelo autor.

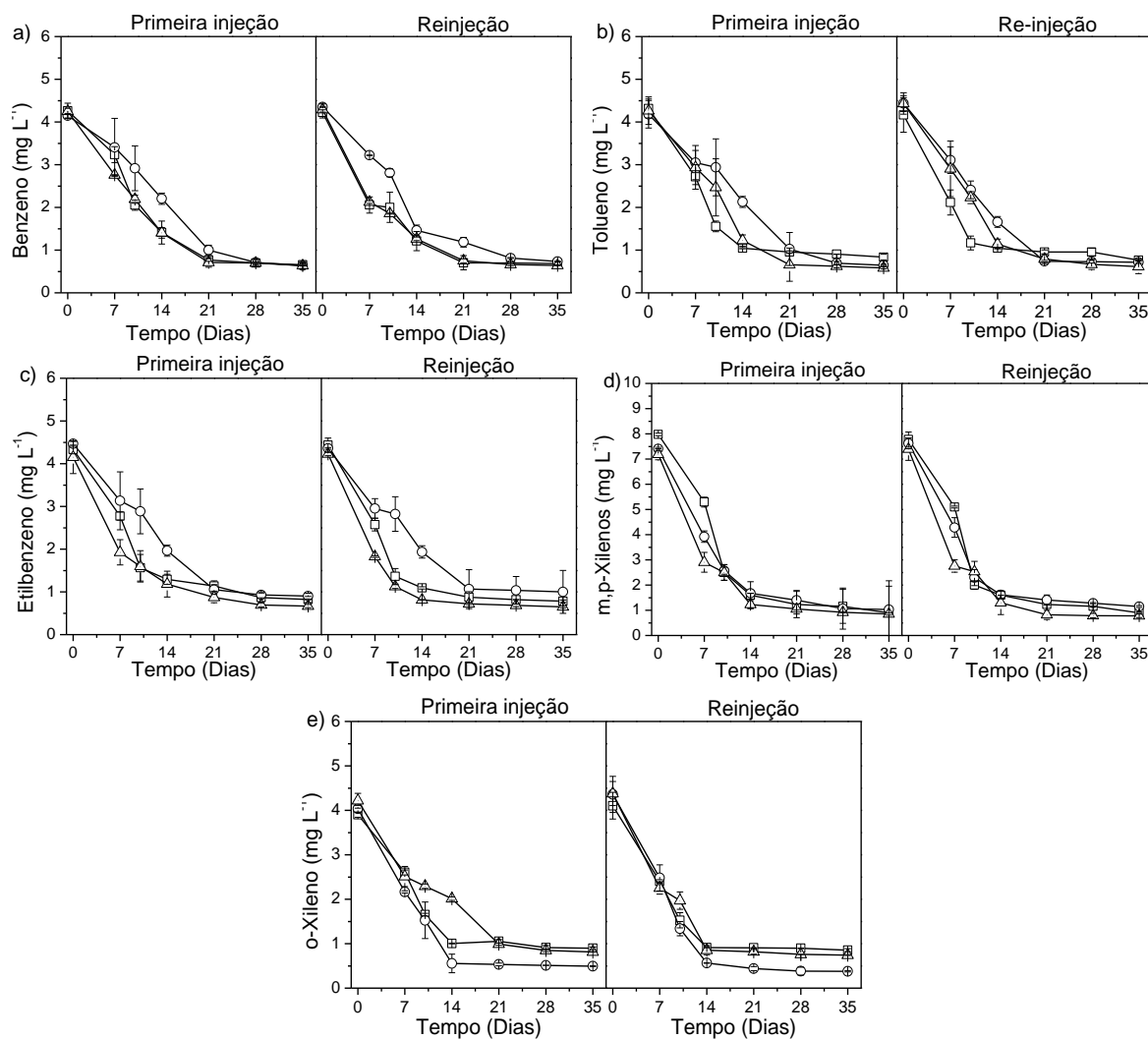
A literatura reporta que o etanol é um substrato preferencial em relação aos BTEX sob diversas condições redox (aeróbia, desnitrificante, sulfetogênica e metanogênica), dificultando a degradação desses compostos aromáticos (CHEN; BARKER; GUI, 2008; CORSEUIL et al., 1998; CORSEUIL et al., 2011; DA SILVA; RUIZ-AGUILAR; ALVAREZ, 2005; FIRMINO et al., 2015b; FIRMINO et al., 2018). Além disso, geralmente, sob condições metanogênicas, a degradação de hidrocarbonetos aromáticos ocorre por meio de interações sintróficas entre bactérias fermentativas, que convertem esses compostos em intermediários, como acetato e hidrogênio, e arqueias metanogênicas, que produzem metano a partir de tais intermediários (GIEG; FOWLER; BERDUGO-CLAVIJO, 2014; VOGT; KLEINSTEUBER; RICHNOW, 2011). Logo, a degradação de elevadas concentrações de etanol pode resultar em um acúmulo transiente de acetato e hidrogênio, podendo inibir a degradação sintrófica de BTEX, já que o processo passaria a ser energeticamente desfavorável (EDWARDS et al., 1992; ROSSANO; RAKOCZY; TOMASELLO, 2011). Portanto, no presente trabalho, esperava-se que a presença de etanol tivesse afetado negativamente a degradação de todos os compostos BTEX, fato que não foi observado.

Por outro lado, alguns estudos afirmam que o cossustrato possibilita o crescimento da comunidade microbiana, aumentando a capacidade de degradação dos compostos aromáticos (CORSEUIL et al., 1998; CORSEUIL et al., 2011; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009).

Porém, ainda para L1, na presença de OD ($1,77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), não foi observada diferença expressiva nos valores de k em relação aos obtidos no ensaio realizado na ausência de OD, ainda que se tenha realizado a reinjeção de compostos BTEX no meio basal (Tabela 6.1).

Nos ensaios com lodo aclimatado (L2) (Figura 6.2), não se observou diferença expressiva entre os valores de k obtidos na ausência e na presença de etanol, com exceção do tolueno e do *o*-xileno, cujas constantes cinéticas foram, respectivamente, 1,5 e 2 vezes maiores na série sem cossustrato (Tabela 6.2.). Contudo, com a adição de oxigênio, houve um aumento na constante cinética dos compostos, a qual foi, ainda, um pouco maior na repetição do ensaio (Tabela 6.1).

Figura 6.2 Efeito da presença de etanol e de oxigênio dissolvido na degradação anaeróbica de BTEX pelo lodo aclimatado L2



Legenda: BTEX (○); BTEX + etanol (□); BTEX + etanol + OD (Δ).

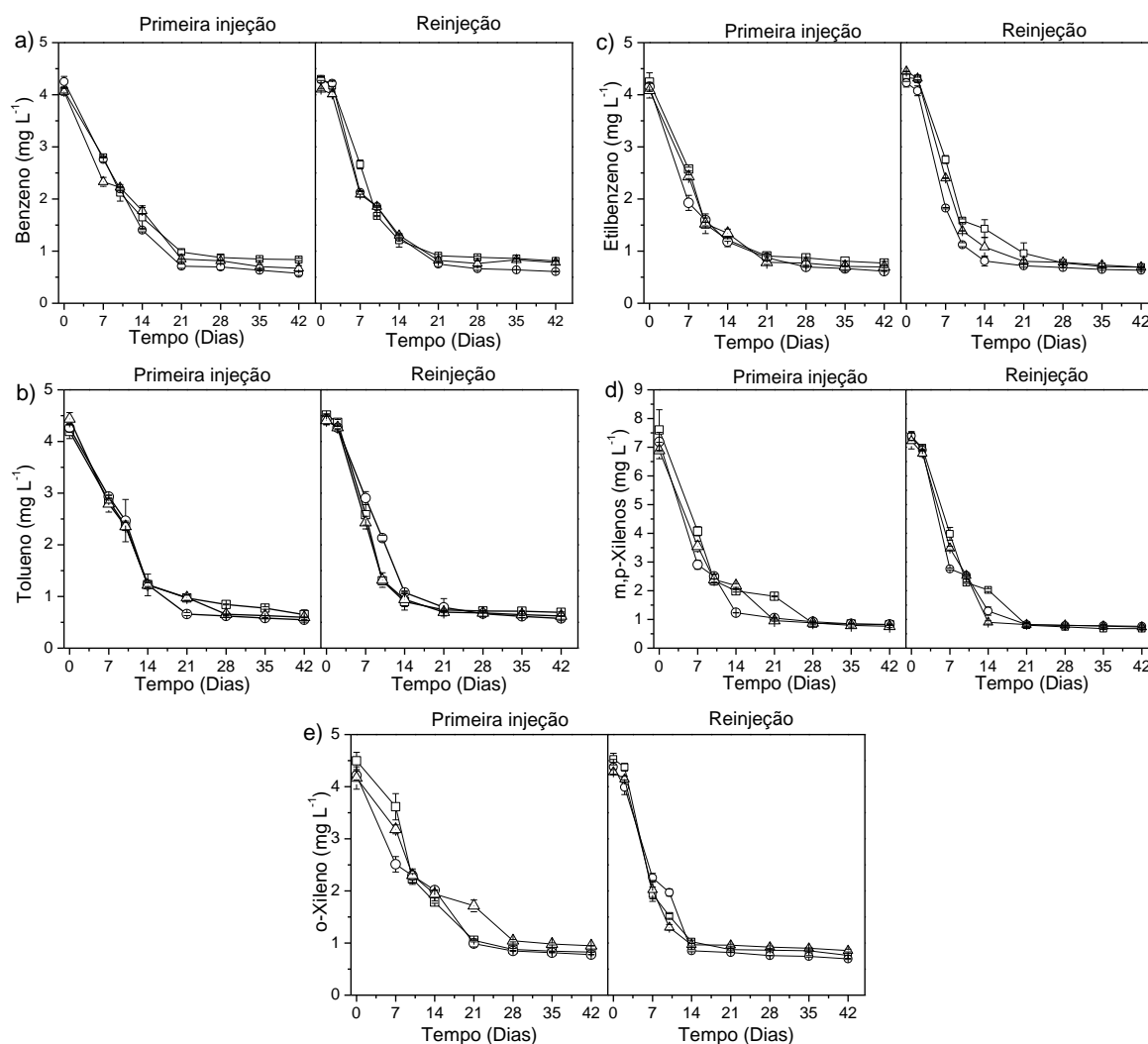
Fonte: elaborada pelo autor.

Provavelmente, devido ao fato de L2 ser proveniente de um reator que tratava água contaminada com BTEX e etanol sob condições microaeróbicas, a comunidade microbiana já deveria conter um número considerável de microrganismos capazes de produzir as enzimas específicas pelo ataque inicial aos compostos BTEX, particularmente as mono-oxigenases, ativadas na presença de oxigênio. Portanto, isso justificaria o comportamento observado durante os ensaios com L2.

6.3.2. Efeito de diferentes concentrações iniciais de oxigênio dissolvido na degradação anaeróbia de BTEX por lodo aclimatado

Com o lodo aclimatado (L2), foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de OD na degradação anaeróbia dos compostos aromáticos adicionados (Figura 6.3).

Figura 6.3 Efeito de diferentes concentrações iniciais de OD na degradação anaeróbia de BTEX pelo lodo aclimatado L2



Legenda: a) benzeno; b) tolueno; c) etilbenzeno; d) m,p-xilenos; e) o-xileno. OD = 0,88 mg·L⁻¹ (□); OD = 1,77 mg·L⁻¹ (○); OD = 2,65 mg·L⁻¹ (Δ).

Fonte: elaborada pelo autor.

Para a concentração inicial de OD de 0,88 mg·L⁻¹, os valores de k foram semelhantes aos obtidos no ensaio sem a adição de oxigênio. Entretanto, para a concentração inicial de OD duas vezes maior (1,77 mg·L⁻¹), observou-se um aumento na constante cinética

de todos os compostos. Por outro lado, para $OD = 2,65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, inesperadamente, não houve diferença considerável para todos os compostos em relação à série com $OD = 1,77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, tendo sido, até mesmo, registrado valores de k menores para alguns compostos quando a maior concentração de OD foi testada (Tabela 6.2).

Os resultados corroboram a hipótese de que a adição de pequenas quantidades de oxigênio em sistemas anaeróbios pode ativar genes ligados às enzimas mono-oxigenases, facilitando a degradação inicial de compostos aromáticos, como os BTEX. Aparentemente, deve haver um limite mínimo de concentração de OD para que essas enzimas sejam devidamente ativadas, já que, com OD inicial inferior a $1,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, não foi observada um impacto positivo no processo de degradação de BTEX. Por outro lado, um limite máximo também parece existir, já que, para OD superior a $2,50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, de maneira geral, não foram obtidos melhores resultados, sendo observado, até mesmo, um leve impacto negativo na degradação de alguns compostos. Isso pode ser um indício de saturação, como observado por Siqueira et al. (2018) em experimento em fluxo contínuo, no qual não foram detectadas melhores eficiências de remoção de BTEX quando a vazão de microaeração foi aumentada de 1 para $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ou de inibição de microrganismos estritamente anaeróbios, importantes para simbiose do processo de degradação sob condições metanogênicas.

No presente estudo, foram monitorados a formação de possíveis intermediários da degradação de BTEX ao longo dos ensaios, tendo sido detectados, inicialmente, fenol e, posteriormente, benzoato (Figura 6.4). Este último sempre em uma maior concentração em comparação com o fenol, já que é um intermediário chave da degradação de BTEX, enquanto o fenol é um intermediário mais comum para o benzeno, já que uma de suas possíveis reações iniciais de degradação anaeróbia e microaeróbia é a hidroxilação (KUNAPULI et al., 2008; VOGT et al., 2011; YERUSHALMI et al., 2001).

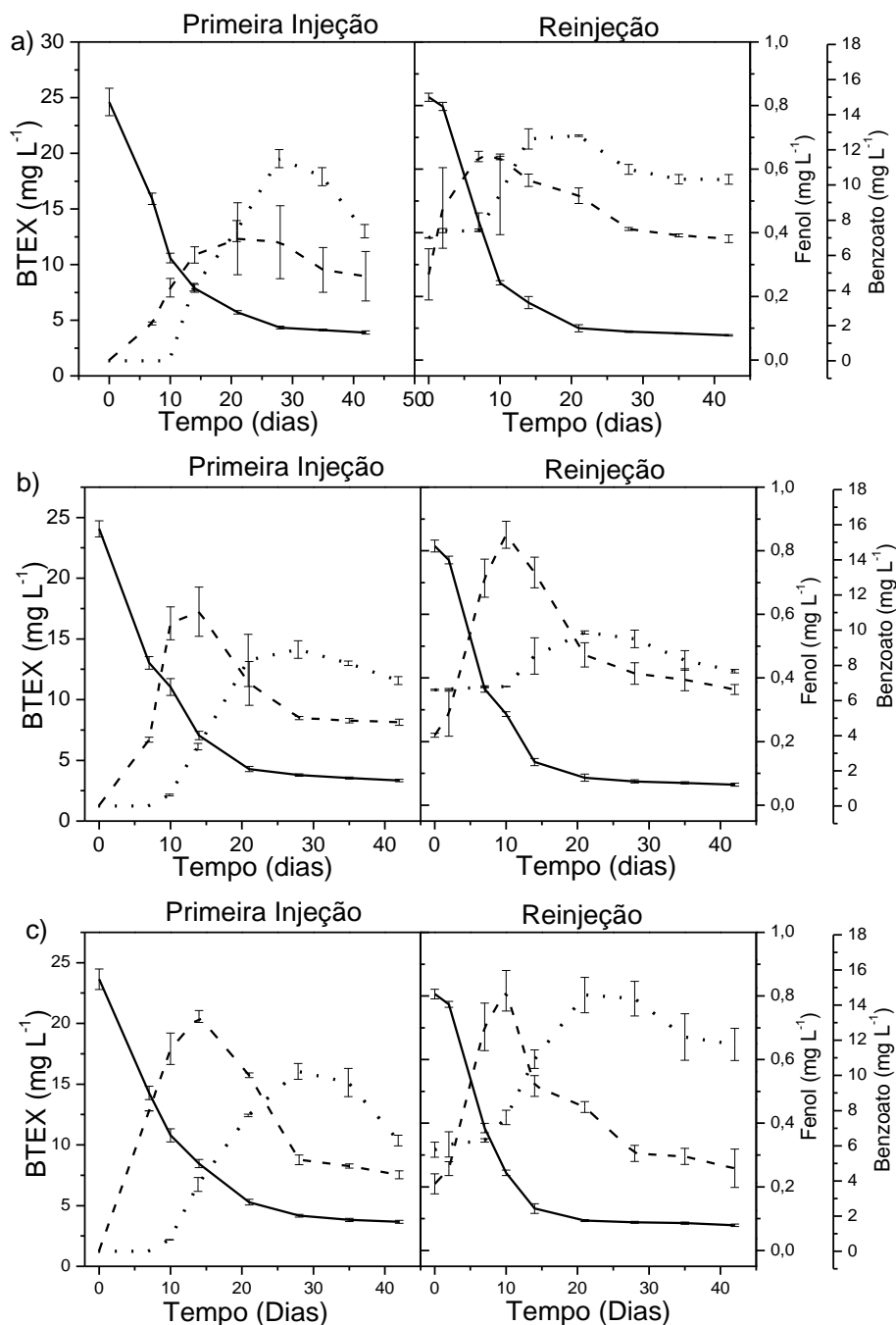
Tabela 6.2 Constante cinética e tempo de meia vida dos compostos BTEX para diferentes concentrações de OD

Composto	OD = 0		OD = 0,88 mg·L ⁻¹		OD = 1,77 mg·L ⁻¹		OD = 2,65 mg·L ⁻¹									
	Ensaio		Repetição		Ensaio		Repetição									
	k [*]	t _{1/2} ^{**}	k [*]	t _{1/2} ^{**}	k [*]	t _{1/2} ^{**}	k [*]	t _{1/2} ^{**}								
Benzeno	0,043	5,42	0,040	5,88	0,046	5,41	0,041	5,84	0,055	4,24	0,052	4,49	0,033	7,38	0,046	5,28
Tolueno	0,029	8,07	0,027	8,74	0,032	7,36	0,032	6,85	0,044	5,3	0,051	4,39	0,040	5,68	0,062	3,67
Etilbenzeno	0,030	7,81	0,032	7,09	0,026	9,01	0,033	7,04	0,043	5,55	0,062	3,83	0,031	7,87	0,052	4,33
m,p-Xilenos	0,029	4,27	0,029	4,51	0,030	4,46	0,038	3,56	0,042	3,33	0,053	2,58	0,032	4,59	0,058	2,37
o-Xileno	0,026	9,83	0,028	8,86	0,028	8,05	0,026	8,34	0,036	6,55	0,054	4,26	0,022	10,97	0,045	5,19

* k em mg⁻¹·L·dia⁻¹** t_{1/2} em dias

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 6.5 Comportamento dos intermediários fenol e benzoato na degradação dos BTEX



Legenda: OD = 0,88 mg·L⁻¹ (a); OD = 1,77 mg·L⁻¹ (b); OD = 2,65 mg·L⁻¹ (c). BTEX (—); fenol (- -); benzoato (···).

Fonte: elaborada pelo autor.

Yerushalmi et al. (2001), a partir de experimentos em batelada de degradação de benzeno com culturas aeróbias adaptadas a baixas concentrações de oxigênio, observaram que, sob condições microaeróbias, a oxidação adicional de fenol – composto menos recalcitrante, produzido a partir da hidroxilação inicial do benzeno por meio de mono-oxigenases – a catecol, por vias aeróbias, só acontece quando quantidades adequadas de

oxigênio estão disponíveis. Alternativamente, esses autores propõem que, após o esgotamento completo de oxigênio, o fenol pode ser degradado anaerobiamente a benzoato pela ação de microrganismos anaeróbios apropriados.

Os dados dos intermediários obtidos corroboram, ainda, o estudo de Caldwell e Suflita (2000), no qual foi observado o acúmulo transitório de fenol e benzoato como intermediários da degradação anaeróbia de benzeno em condições metanogênicas e de redução de sulfato com o uso de uma cultura microbiana mista proveniente de um aquífero contaminado com petróleo. Segundo os autores, esses resultados são os primeiros a confirmar a importância do benzoato durante o metabolismo anaeróbio do benzeno, assim como comentam que não há uma decisão sólida em relação aos intermediários da degradação do benzeno.

6.4. Conclusão

De maneira geral, **para o lodo não aclimatado**, a presença de cossustrato afetou negativamente a degradação anaeróbia de BTEX, enquanto a adição de oxigênio não aumentou a velocidade de remoção desses hidrocarbonetos.

Para o lodo aclimatado, remoções de BTEX semelhantes foram obtidas tanto na ausência quanto na presença de cossustrato, e, de forma geral, houve melhora na velocidade de remoção desses compostos com a adição de oxigênio, evidenciando a importância da aclimação da microbiota a condições microaeróbias.

Aparentemente, há limites mínimo e máximo de oxigênio a ser adicionado a sistemas anaeróbios para que maiores velocidades de remoção de BTEX sejam alcançadas, tendo sido os melhores resultados obtidos, neste trabalho, na concentração de OD de 1,77 mg·L⁻¹.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, F. et al. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 670–699, 2015.
- ABU LABAN, N. et al. Anaerobic benzene degradation by gram-positive sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 3, p. 300–311, 2009.
- ABU LABAN, N. et al. Identification of enzymes involved in anaerobic benzene degradation by a strictly anaerobic iron-reducing enrichment culture. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 2783–2796, 2010.
- ABURTO, A. et al. Mixed aerobic and anaerobic microbial communities in benzene-contaminated groundwater. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 317–328, 2009.
- ACIKGOZ, E.; OZCAN, B. International biodeterioration & biodegradation phenol biodegradation by halophilic archaea. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 107, p. 140–146, 2016.
- ADELAJA, O.; KESHAVARZ, T.; KYAZZE, G. The effect of salinity, redox mediators and temperature on anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in microbial fuel cells. **Journal of hazardous materials**, v. 283, p. 211–217, 2015.
- ALVES, R. N. et al. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 178, p. 224–230, 2017.
- ANDREONI, V.; GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 76, p. 287–308, 2007.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 2005.
- BALL, H. A. et al. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5755–5761, 1996.
- BOLDEN, A. L.; KWIATKOWSKI, C. F.; COLBORN, T. New look at BTEX: Are ambient levels a problem? **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 9, p. 5697–5703, 2015.
- BOZINOVSKI, D. et al. Metaproteogenomic analysis of a sulfate-reducing enrichment culture reveals genomic organization of key enzymes in the m-xylene degradation pathway and metabolic activity of proteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 488–501, 2014.
- BUCHAUER, K. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge. **Water Sa Pretoria**, v. 24, n. November, p. 49–56, 1998.
- CAI, J.; ZHENG, P.; MAHMOOD, Q. Bioresource technology simultaneous sulfide and nitrate removal in anaerobic reactor under shock loading. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 12, p. 3010–3014, 2009.

CALDWELL, M. E. AND; SUFLITA, J. M. Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions. **Environmental science & Technology**, v. 34, n. 7, p. 1216–1220, 2000.

CALLAGHAN, A. V. Metabolomic investigations of anaerobic hydrocarbon-impacted environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 506–515, 2013.

CAMILLI, R. et al. Tracking hydrocarbon plume transport and biodegradation at deepwater horizon. **American Association for the Advancement of Science**, v. 330, n. 6001, p. 201–204, 2010.

CARNEIRO, P. M. et al. Multivariate optimization of headspace-GC for the determination of monoaromatic compounds (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes) in waters and wastewaters. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 3, p. 265–271, 2014.

CETESB. **Management of contaminated areas in the State of São Paulo**, 2009.

CHAKRABORTY, R.; COATES, J. D. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 437–446, 2004.

CHAKRABORTY, R.; COATES, J. D. hydroxylation and carboxylation - two crucial steps of anaerobic benzene degradation by dechloromonas strain RCB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5427–5432, 2005.

CHIU, H. Y. et al. Using intrinsic bioremediation for petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater cleanup and migration containment: Effectiveness and mechanism evaluation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 72, p. 53–61, 2017.

COATES, J. D.; CHAKRABORTY, R.; MCINERNEY, M. J. Anaerobic benzene biodegradation — a new era. v. c, p. 621–628, 2002.

CORSEUIL, H. X. et al. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Research**, v. 32, n. 7, p. 2065–2072, 1998.

CORSEUIL, H. X. et al. BTEX plume dynamics following an ethanol blend release: Geochemical footprint and thermodynamic constraints on natural attenuation. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 8, p. 3422–3429, 2011.

COSTA, A. H. R.; NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 2, p. 265–274, 2009.

CRUZ, L. P. S. et al. Assessment of BTEX concentrations in air ambient of gas stations using passive sampling and the health risks for workers. **Journal of Environmental Protection**, v. 4, p. 12–25, 2017.

CUNNINGHAM, J. A. et al. enhanced in situ bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 8, p. 1663–1670, 2001.

DENG, Y.; YANG, F.; DENG, C. Biodegradation of BTEX aromatics by a haloduric

microbial consortium enriched from a sediment of Bohai Sea , China. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, p. 893–905, 2017.

DÍAZ, I. et al. Effect of oxygen dosing point and mixing on the microaerobic removal of hydrogen sulphide in sludge digesters. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3768–3775, 2011.

DÍEZ-MONTERO, R. et al. Performance evaluation of a novel anaerobic-anoxic sludge blanket reactor for biological nutrient removal treating municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 195–204, 2016.

DIGIULIO, D. C.; JACKSON, R. B. Impact to underground sources of drinking water and domestic wells from production well stimulation and completion practices in the pavillion, wyoming, field. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 8, p. 4524–4536, 2016.

DOTT, W. et al. Comparison of ex situ and in situ techniques for bioremediation of hydrocarbon-polluted soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 35, p. 301–316, 1995.

DOU, J. et al. Anaerobic benzene biodegradation by a pure bacterial culture of *Bacillus cereus* under nitrate reducing conditions. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 5, p. 709–715, 2010.

DOU, J.; LIU, X.; HU, Z. Substrate interactions during anaerobic biodegradation of BTEX by the mixed cultures under nitrate reducing conditions. v. 158, p. 264–272, 2008.

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

EL-NAAS, M. H.; ACIO, J. A.; EL TELIB, A. E. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 1104–1122, 2014.

ENRIGHT, A. M.; COLLINS, G.; O'FLAHERTY, V. Low-temperature anaerobic biological treatment of toluene-containing wastewater. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1465–1472, 2007.

ERSAHIN, M. E. et al. Treatment of produced water originated from oil and gas production wells: a pilot study and cost analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, n. Veil 2011, p. 1–9, 2017.

FARHADIAN, M. et al. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors-A review. **Water Research**, v. 42, n. 6–7, p. 1325–1341, 2008.

FATHEPURE, B. Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. April, p. 1–16, 2014.

FAYEMIWO, O.; DARAMOLA, M.; MOOTHI, K. BTEX compounds in water – future trends and directions for water treatment. **Water SA**, v. 43, n. 4, p. 602–613, 2017.

FIRMINO, P. I. M. et al. Bioresource technology colour removal of dyes from synthetic and

real textile wastewaters in one- and two-stage anaerobic systems. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7773–7779, 2010.

FIRMINO, P. I. M. et al. Understanding the anaerobic BTEX removal in continuous-flow bioreactors for ex situ bioremediation purposes. **Chemical Engineering Journal**, v. 281, p. 272–280, 2015a.

FIRMINO, P. I. M. et al. Engineering and microbiological aspects of BTEX removal in bioreactors under sulfate-reducing conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 503–512, 2015b.

FIRMINO, P. I. M. et al. Applicability of microaerobic technology to enhance BTEX Removal from Contaminated Waters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1187–1199, 2018.

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

FOWLER, S. J. et al. Identification of toluene degraders in a methanogenic enrichment culture. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 89, n. 3, p. 625–636, 2018.

FREIRE, D. D. C.; SANT'ANNA, G. L. A proposed method modification for the determination of cod in saline waters. **Environmental Technology**, v. 19, n. 12, p. 1243–1247, 1998.

FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 82–99, 2008.

GAGLIANO, M. C. et al. Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity. **Water Research**, v. 121, p. 61–71, 2017.

GHATTAS, A. K. et al. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. **Water Research**, v. 116, p. 268–295, 2017.

GIEG, L. M.; FOWLER, S. J.; BERDUGO-CLAVIJO, C. Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 21–29, 2014.

GIUSTINIANOVICH, E. A. et al. Simultaneous removal of C and N from fish effluents in filter reactors: Effect of recirculation ratio on the axial distribution of microbial communities. **Journal of Environmental Management**, v. 161, p. 366–374, 2015.

GOTTARDO, M. et al. Pilot scale fermentation coupled with anaerobic digestion of food waste - Effect of dynamic digestate recirculation. **Renewable Energy**, v. 114, p. 455–463, 2017.

GRABOWSKI, A.; BLANCHET, D.; JEANTHON, C. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 814–821, 2005.

GRATTIERI, M.; MINTEER, S. D. Microbial fuel cells in saline and hypersaline environments: Advancements, challenges and future perspectives. **Bioelectrochemistry**, v. 120, p. 127–137, abr. 2018.

- GRBIC-GALIC, D.; VOGEL, T. M. Transformation of Toluene and Benzene by Mixed Methanogenic Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 254–260, 1987.
- GUSMÃO, V. R. et al. Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. **Journal of Hazardous Materials**, v. 139, n. 2, p. 301–309, 2007.
- HASSAN, H. et al. Isolation and characterization of halophilic aromatic and chloroaromatic degrader from wadi el-natron soda lake. **Life Science Journal**, v. 9, p. 1565–1570, 2012.
- HASSAN, H. A.; ALY, A. A. Isolation and characterization of three novel catechol 2,3-dioxygenase from three novel haloalkaliphilic BTEX-degrading *Pseudomonas* strains. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1107–1114, 2018.
- HEIDER, J. et al. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p. 459–473, 1998.
- HERLINA; JIRKA, G. H. Experiments on gas transfer at the air-water interface induced by oscillating grid turbulence. **Journal of Fluid Mechanics**, v. 594, p. 183–208, 2008.
- JIN, H. M.; CHOI, E. J.; JEON, C. O. Isolation of a BTEX-degrading bacterium, *Janibacter* sp. sb2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 57–64, 2013.
- JUÁREZ, J. F. et al. Characterization of the *mbd* cluster encoding the anaerobic 3-methylbenzoyl-CoA central pathway. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 148–166, 2013.
- KAZUMI, J. et al. anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. **American Chemical Society**, v. 31, n. 3, p. 813–818, 1997.
- KHODAEI, K. et al. BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 234–242, 2017.
- KHONGSUMRAN; O. et al. Enhancement of anaerobic digestion of cellulosic fraction in cassava production wastewater by microaeration. **Chemical engineering transactions**, v. 39, p. 553–558, 2014.
- KNIEMEYER, O. et al. anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 2, p. 760–768, 2003.
- KRAYZELOVA, L. et al. Microaeration for hydrogen sulfide removal during anaerobic treatment: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 703–725, 2015.
- KÜHNER, S. et al. Substrate-dependent regulation of anaerobic degradation pathways for toluene and ethylbenzene in a denitrifying substrate-dependent regulation of anaerobic degradation pathways for toluene and ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain Ebn. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 4, p. 1493, 2005.

- KUNAPULI, U. et al. Identification of intermediates formed during anaerobic benzene degradation by an iron-reducing enrichment culture. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1703–1712, 2008.
- LAY, W. C. L.; LIU, Y.; FANE, A. G. Impacts of salinity on the performance of high retention membrane bioreactors for water reclamation: A review. **Water Research**, v. 44, n. 1, p. 21–40, 2010.
- LEUTHNER, B.; HEIDER, J. Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: The bbs operon codes for enzymes of β oxidation of the intermediate benzylsuccinate. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 2, p. 272–277, 2000.
- LIU, Z. **Benzene and Toluene Biodegradation with Different Dissolved Oxygen Concentrations**. [s.l.] Arizona State University, 2015.
- LOPES, A. C. **Tratamiento anaerobio y microaerobio de aguas ricas en sulfato**. [s.l.] Universidad de Valladolid, Valladolid, 2010.
- LOVLEY, D. R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers contaminated aquifers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, n. November 1995, p. 75–81, 1997.
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, S. et al. Acetate enhances the specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, n. 4, p. 679–687, 2009.
- MARTÍNEZ, S.; CUERVO-LÓPEZ, F. M.; GOMEZ, J. Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1717–1723, 2007.
- MASUMOTO, H. et al. Chemosphere complete mineralization of benzene by a methanogenic enrichment culture and effect of putative metabolites on the degradation. **Chemosphere**, v. 86, n. 8, p. 822–828, 2012.
- MCKEOWN, R. M. et al. Low temperature anaerobic biotreatment of priority pollutants. **Water Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 499–503, 2008.
- MECKENSTOCK, R. U.; MOUTTAKI, H. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal Molecular Microbiology an Biotechnology**, v. 118, p. 92–118, 2016.
- MELLO, J. M. M. DE. **Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- MENICONI, M. D. F. G.; GABARDO, I. T. Brazilian oil spills chemical characterization case studies. **Environmental Forensics**, v. 3, n. 2002, p. 303–321, 2010.
- MILLE, Y.; BENEY, L.; GERVAIS, P. Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: A plasma membrane implication. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1567, p. 41–48, 2002.

- MOHAMMAD, B. T. et al. Performance of a thermophilic gas-phase bio filter treating high BTEX loads under steady- and transient-state operation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 119, p. 289–298, 2017.
- MOHAN, S. V. et al. Influence of recirculation on the performance of anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) treating hypersaline composite chemical wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1373–1379, 2007.
- MUKHERJEE, A. K.; BORDOLOI, N. K. Biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated bacterial consortium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 8, p. 3380–3388, 2012.
- MÜLLER, J. B. et al. Combined iron and sulfate reduction biostimulation as a novel approach to enhance BTEX and PAH source-zone biodegradation in biodiesel blend-contaminated groundwater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 326, p. 229–236, 2017.
- NAKHLA, G. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds - Impact of process variables and scaleup implications. **Water Research**, v. 37, n. 6, p. 1296–1307, 2003.
- NARDI, I. R. et al. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 587–592, 2005.
- NARDI, I. R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Kinetics of BTEX degradation in a packed-bed anaerobic reactor. **Biodegradation**, v. 18, n. 1, p. 83–90, 2007.
- OLAJIRE, A. A.; ESSIEN, J. P. Aerobic degradation of petroleum components by microbial consortia. **Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 1–22, 2014.
- OTENIO, M. H. et al. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 258–261, 2005.
- PENDASHTEH, A. R.; CHAIBAKHSH, N.; AHMADUN, F.-R. Biological treatment of high salinity produced water by microbial consortia in a batch stirred tank reactor: Modelling and kinetics study. **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 3, p. 387–401, 2018.
- PENG, C. et al. Toxic effects of individual and combined effects of BTEX on *Euglena gracilis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 284, p. 10–18, 2015.
- PHELPS, C. D.; ZHANG, X.; YOUNG, L. Y. Use of stable isotopes to identify benzoate as a metabolite of benzene degradation in a sulphidogenic consortium. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 600–603, 2001.
- PRENAFETA-BOLD, F. X. et al. Bioremediation of BTEX hydrocarbons : Effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp . strain T1. **Biodegradation**, v. 15, p. 59–65, 2004.
- RAJAMANICKAM, R. et al. Batch biodegradation of toluene by mixed microbial consortia and its kinetics. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 119, p. 282–288, 2017.

- RAMAKRISHNAN, A.; GUPTA, S. K. Effect of effluent recycling and shock loading on the biodegradation of complex phenolic mixture in hybrid UASB reactors. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3745–3753, 2008.
- RAMOS, I.; PÉREZ, R.; FDZ-POLANCO, M. The headspace of microaerobic reactors: Sulphide-oxidising population and the impact of cleaning on the efficiency of biogas desulphurisation. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 63–73, 2014.
- RIBEIRO, R. et al. BTEX removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor under denitrifying conditions. **Biodegradation**, v. 24, n. 2, p. 269–278, 2013.
- ROSSANO, F.; RAKOCZY, H.; TOMASELLO, M. Young children's understanding of violations of property rights. **Cognition**, v. 121, n. 2, p. 219–227, 2011.
- SCHMIDT, T. C. et al. Occurrence and fate modeling of MTBE and BTEX compounds in a Swiss Lake used as drinking water supply. **Water Research**, v. 38, n. 6, p. 1520–1529, 2004.
- SCHREIBER, M. E.; BAHR, J. M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: Parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 55, n. 1–2, p. 29–56, 2002.
- SEI, A.; FATHEPURE, B. Z. Biodegradation of BTEX at high salinity by an enrichment culture from hypersaline sediments of Rozel Point at Great Salt Lake. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 2001–2008, 2009.
- SERRANO, A.; GALLEGRO, M.; SILVA, M. Enhancing sensitivity in headspace-mass spectrometric determination of BTEX in drinking water. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 7, p. 2997–3002, 2007.
- SHIM, H.; YANG, S. T. BTEX removal from contaminated groundwater by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a continuous fibrous-bed bioreactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 12, p. 1308–1315, 2002.
- SIQUEIRA, J. P. DA S.; WANDERLEY, E. L.; CALLADO, N. H. The influence of the addition of pre-ozonated water production in the performance of an. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica.**, v. 8, n. 3, p. 344–359, 2015.
- SIQUEIRA, J. P. S. et al. Process bioengineering applied to BTEX degradation in microaerobic treatment systems. **Journal of Environmental Management**, v. 223, n. April, p. 426–432, 2018.
- SOARES-GOMES, A. et al. An environmental overview of Guanabara Bay , Rio de Janeiro. **Regional Studies in Marine Science**, v. 8, p. 319–330, 2016.
- SPERFELD, M. et al. Microbial community of a gasworks aquifer and identification of nitrate-reducing *Azoarcus* and *Georgfuchsia* as key players in BTEX degradation. **Water Research**, v. 132, p. 146–157, 2018.
- STASIK, S.; WICK, L. Y.; WENDT-POTTHOFF, K. Anaerobic BTEX degradation in oil sands tailings ponds: Impact of labile organic carbon and sulfate-reducing bacteria.

Chemosphere, v. 138, p. 133–139, 2015.

STEPHENSON, R. J.; PATOINE, A.; GUIOT, S. R. Effects of oxygenation and upflow liquid velocity on a coupled anaerobic/aerobic reactor system. **Water Research**, v. 33, n. 12, p. 2855–2863, 1999.

SURENDRA, S. V.; MAHALINGAM, B. L.; VELAN, M. Degradation of monoaromatics by *Bacillus pumilus* MVSV3. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, n. December, p. 1–18, 2017.

THAVEESRI, J. et al. Organic and ammonium nitrogen and oxygen in relation to granular sludge growth in lab-scale UASB reactors. **Water Science and Technology**, v. 30, n. 12, p. 43, 1994.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTEX e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 441–446, 2004.

TIERNEY, M.; YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 925–934.

TSANGARI, X. et al. Spatial characteristics of urinary BTEX concentrations in the general population. **Chemosphere**, v. 173, p. 261–266, 2017.

TURNEY, D. E.; BANERJEE, S. Air–water gas transfer and near-surface motions. **Journal of Fluid Mechanics**, v. 733, n. October, p. 588–624, 2013.

ULRICH, A. C.; BELLER, H. R.; EDWARDS, E. A. Metabolites detected during biodegradation of ¹³C 6-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 17, p. 6681–6691, 2005.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, 2017.

VARJANI, S. J.; GNANSOUNOU, E.; PANDEY, A. Comprehensive review on toxicity of persistent organic pollutants from petroleum refinery waste and their degradation by microorganisms. **Chemosphere**, v. 188, p. 280–291, 2017.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 120, p. 71–83, 2017.

VOGEL, T. M.; GRBIC-GALIC, D. Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 200–202, 1986.

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

WAALS, M. J. VAN DER et al. Benzene degradation in a denitrifying biofilm reactor : activity and microbial community composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**,

v. 101, p. 5175–5188, 2017.

WANG, W. et al. Oxygen-limited aeration for relieving the impact of phenolic compounds in anaerobic treatment of coal gasification wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PA, p. 110–116, 2014.

WANG, Z. et al. Characterization and source identification of hydrocarbons in water samples using multiple analytical techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 971, p. 173–184, 2002.

WEELINK, S. A. B.; VAN EEKERT, M. H. A.; STAMS, A. J. M. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: Physiology and application. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 359–385, 2010.

WILKES, H.; SCHWARZBAUER, J. **Hydrocarbons: An Introduction to Structure, Physico-Chemical Properties and Natural Occurrence**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010.

WU, C. et al. Improving hydrolysis acidification by limited aeration in the pretreatment of petrochemical wastewater. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 256–262, 2015.

WU, Y. et al. Metagenomic insights into the influence of salinity and cytostatic drugs on the composition and functional genes of microbial community in forward osmosis anaerobic membrane bioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 326, p. 462–469, 2017.

YAGHMAEIAN, K.; YOUSEFI, Z. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the drinking water of the. **Afinidad**, v. 80, n. 568, p. 354–363, 2014.

YERUSHALMI, L. et al. Detection of intermediate metabolites of benzene biodegradation under microaerophilic conditions. **Biodegradation**, v. 12, n. 6, p. 379–391, 2001.

ZHANG, T. et al. Anaerobic Benzene Oxidation via Phenol in *Geobacter metallireducens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7800–7806, 2013.

ZHANG, Z.; LO, I. M. C. Biostimulation of petroleum-hydrocarbon-contaminated marine sediment with co-substrate: involved metabolic process and microbial community. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5683–5696, 2015.

ZUO, Z. et al. **Performance of two-stage vegetable waste anaerobic digestion depending on varying recirculation rates**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2014.