



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

ANDREY MARCOS PEREIRA

**DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE BENZENO NA PRESENÇA DE ETANOL,
OXIGÊNIO E IMPORTANTES INTERMEDIÁRIOS**

FORTALEZA

2021

ANDREY MARCOS PEREIRA

DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE BENZENO NA PRESENÇA DE ETANOL,
OXIGÊNIO E IMPORTANTES INTERMEDIÁRIOS

Monografia apresentada ao curso de Engenharia Ambiental do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino

FORTALEZA

2021

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)

Marcos Pereira, Andrey.

Degradação Anaeróbia de Benzeno na Presença de Etanol, Oxigênio e Importantes Intermediários /
Andrey Marcos Pereira. – 2021.
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,
Curso de Engenharia Ambiental, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino.

1. Benzeno. 2. Fenol. 3. Benzoato. 4. Tolueno. 5. Tratamento anaeróbio. I. Título.

CDD 628

ANDREY MARCOS PEREIRA

DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE BENZENO NA PRESENÇA DE ETANOL,
OXIGÊNIO E IMPORTANTES INTERMEDIÁRIOS

Monografia apresentada ao curso de Engenharia Ambiental do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino

Aprovada em: 06/04/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino (Orientador)

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Patrícia Marques Carneiro Buarque

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará

Prof. Dr. João Paulo da Silva Siqueira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, André Marcos Pereira e Elia Maria da Rocha Pereira, que são pilares da minha formação pessoal e profissional, que me deram todo apoio ao longo da minha caminhada e sempre serviram de suporte nos bons e maus momentos.

A minha companheira, Sofia Chagas Pinheiro, que esteve presente em toda minha jornada universitária e sempre demonstrou apoio e incentivo nesses anos.

Aos meus familiares Rocha e Pereira pelas alegrias e pelos bons momentos compartilhados em família.

Aos professores do Laboratório de Saneamento da UFC, Dr. Paulo Igor Milen Firmino e Dr. André Bezerra dos Santos, que abriram as portas para minha prática científica dentro da universidade.

Ao meu companheiro e grande amigo de pesquisas, Dr. João Paulo da Silva Siqueira, pela orientação, motivação, ensinamentos e amizade.

Ao meu cachorrinho, Tchuco, que serviu sempre de alegria mesmo nos momentos mais obscuros da vida.

Aos meus companheiros de curso e muitos que ficarão para a vida, João Pedro, João Paulo, João Batista, Pedro Henrique, Lucas Macário e Tiago Ellery.

Ao CNPQ e à FUNCAP pelo incentivo a bolsas de iniciação científica para mim e para toda a ciência do país.

Aos meus professores da graduação, especialmente os do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, pelos conhecimentos compartilhados durante essa importante etapa da minha vida.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a interferência da adição de diferentes compostos intermediários da degradação anaeróbia de benzeno (fenol, benzoato e tolueno) e do cossustrato etanol na remoção desse hidrocarboneto monoaromático sob condições anaeróbias e microaeróbias. O experimento foi dividido em duas fases. Na Fase 1, foi investigado o efeito da presença de etanol ($1 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$) e oxigênio ($1,77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) na degradação anaeróbia de benzeno. Na Fase 2, foi investigado o efeito da presença de importantes intermediários (fenol, benzoato e tolueno, testados individualmente a $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) na degradação anaeróbia e microaeróbia ($1,77 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) de benzeno. Todos os ensaios foram realizados em batelada (em duplicata, 150 rpm e $30 \text{ }^\circ\text{C}$), com volume reacional de 70 mL (meio basal + inóculo), em garrafas de vidro borossilicato (115 mL) inoculadas com lodo anaeróbio ($2 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$) adaptado a benzeno e condições microaeróbias. De maneira geral, a presença de cossustrato afetou negativamente a degradação anaeróbia de benzeno, enquanto a adição de oxigênio não melhorou significativamente a remoção desse composto. Ao final de todas os ensaios, verificou-se que a adição dos intermediários influenciou negativamente a degradação do benzeno, sendo o benzoato o intermediário que apresentou maior interferência e o tolueno o que menos interferiu. Em todas as bateladas com a presença dos intermediários fenol, benzoato e tolueno, a principal rota de degradação foi a hidroxilação, mostrando que, muito provavelmente, benzeno foi convertido, primeiramente, a fenol e, posteriormente, a benzoato, o intermediário chave da degradação anaeróbia de compostos aromáticos.

Palavras-chave: benzeno; fenol; benzoato; tolueno; tratamento anaeróbio; tratamento microaeróbio.

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the interference of the addition of different intermediate compounds of the anaerobic benzene degradation (phenol, benzoate, and toluene) and the co-substrate ethanol in the removal of this monoaromatic hydrocarbon under anaerobic and microaerobic conditions. The experiment was divided into two phases. In Phase 1, the effect of the presence of ethanol ($1 \text{ g COD}\cdot\text{L}^{-1}$) and oxygen ($1.77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) on the anaerobic benzene degradation was investigated. In Phase 2, the effect of the presence of important intermediates (phenol, benzoate, and toluene, individually tested at $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) on anaerobic and microaerobic ($1.77 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) benzene degradation was investigated. All tests were carried out in batch (in duplicate, 150 rpm and $30 \text{ }^\circ\text{C}$), with a reaction volume of 70 mL (basal medium + inoculum), in borosilicate glass bottles (115 mL) inoculated with anaerobic sludge ($2 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$) adapted to benzene and microaerobic conditions. In general, the presence of co-substrate negatively affected the anaerobic benzene degradation, while the addition of oxygen did not significantly improve the removal of this compounds. At the end of all tests, it was found that the addition of the intermediates negatively influenced the degradation of benzene, with benzoate being the intermediate that presented the greatest interference and toluene the least interfering. In all batch tests with the presence of the intermediates phenol, benzoate, and toluene, the main degradation pathway was hydroxylation, showing that, most likely, benzene was converted, first, to phenol and, subsequently, to benzoate, the key intermediate of anaerobic degradation of aromatics.

Keywords: benzene; phenol; benzoate; toluene; anaerobic treatment; microaerobic treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de degradação do benzeno.	17
Figura 2 – Rota metabólica de degradação de benzeno sob condições microaeróbias proposta por Yerushalmi <i>et al.</i> (2001).....	18
Figura 3 – Variação da concentração benzeno nas bateladas da Fase 1. Reinjeção no 42º dia experimental	22
Figura 4 – Variação da concentração benzeno nas bateladas da Fase 2. Reinjeção no 42º dia experimental.	25
Figura 5 – Variação da concentração benzeno, fenol e benzoato na batelada B5. Reinjeção no 42º dia experimental.	27
Figura 6 – Variação da concentração benzeno, fenol e benzoato na batelada B6. Reinjeção no 42º dia experimental.	29
Figura 7 – Variação da concentração benzeno, fenol e benzoato na batelada B7. Reinjeção no 42º dia experimental.	30
Figura 8 – Variação da concentração benzeno, fenol e benzoato na batelada B8. Reinjeção no 42º dia experimental.	31
Figura 9 – Variação da concentração benzeno, fenol, benzoato e tolueno na batelada B9. Reinjeção no 42º dia experimental.	32
Figura 10 – Variação da concentração benzeno, fenol, benzoato e tolueno na batelada B10. Reinjeção no 42º dia experimental.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das bateladas por fase.	19
Tabela 2 – Descrição das variáveis cinéticas k ($\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{dia}^{-1}$) e t (dias) das bateladas da Fase 1.	23
Tabela 3 – Descrição das variáveis cinéticas k ($\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{dia}^{-1}$) e t (dias) das bateladas da Fase 2.	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 Benzeno.....	13
3.2. Digestão anaeróbia	14
3.3. Biodegradação aeróbia do benzeno	15
3.4. Biodegradação anaeróbia do benzeno	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Compostos químicos	19
4.2 Inóculo e meio basal	19
4.3 Procedimento experimental	19
4.4 Análises cromatográficas	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Fase 1 – Efeito da presença de etanol e oxigênio na degradação anaeróbia de benzeno	22
5.2. Fase 2 – Efeito da presença de importantes intermediários na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno.....	25
5.2.1 Efeito de fenol na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno	26
5.2.2 Efeito de benzoato na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno.....	29
5.2.3 Efeito de tolueno na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno	32
6. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos maiores problemas ambientais presentes no mundo é a contaminação das águas subterrâneas por hidrocarbonetos aromáticos do petróleo e seus derivados. Os compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e orto, meta e para-xilenos) estão presentes tanto no petróleo bruto como em seus derivados, e tais hidrocarbonetos podem 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).

Entre os hidrocarbonetos aromáticos do petróleo, o benzeno é um dos contaminantes mais prejudiciais e cancerígenos, além de ser altamente solúvel em água (MOSMERI et al., 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).

Além disso, no Brasil, etanol é adicionado à gasolina (20-25%, em volume) de forma a minimizar a dependência de importações de petróleo e atenuar as emissões atmosféricas automotivas prejudiciais ao meio ambiente natural. 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).

Embora o benzeno seja considerado um dos compostos mais recalcitrantes em ambientes anaeróbios, as evidências coletadas nas duas últimas décadas indicam que a sua degradação pode ocorrer em condições anaeróbias, tendo sido demonstrada sob condições metanogênicas e ligada à redução de diferentes aceptores de elétrons, como sulfato, nitrato, Fe(III) e Mn(IV) (CERVANTES et al., 2011).

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).

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). 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, já que esse contaminante é passível de evaporação dando origem à contaminação atmosférica.

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). 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 fenol e seus derivados constituem uma importante classe de contaminantes ambientais pela sua presença em muitos efluentes industriais (SANTOS; LINARDI, 2004). 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. Ainda, a literatura também reporta a metilação (conversão de benzeno a tolueno) como etapa inicial da degradação anaeróbia de benzeno (COATES et al., 2002). Portanto, a presença ou o acúmulo de fenol, tolueno, e, principalmente, benzoato, intermediário chave da degradação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos (FOGHT, 2008), pode afetar negativamente a degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a interferência da adição de diferentes compostos intermediários da degradação anaeróbia de benzeno (fenol, benzoato e tolueno) e do cossustrato etanol na remoção desse hidrocarboneto monoaromático sob condições anaeróbias e microaeróbias.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o impacto do etanol como cossustrato na degradação anaeróbia e microaeróbia do benzeno.

Avaliar a remoção de benzeno na presença dos intermediários fenol, benzoato e tolueno sob condições anaeróbias e microaeróbias.

Avaliar a remoção dos intermediários fenol, benzoato e tolueno sob condições anaeróbias e microaeróbias.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Benzeno

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).

Escoamento e infiltração direta dos derivados do petróleo presentes nos postos de combustíveis e, principalmente, vazamentos em tanques de armazenamento de combustíveis subterrâneos são as principais causas de contaminação das águas de lençóis freáticos com benzeno e outros compostos aromáticos (ALVES et al., 2017). Anualmente, grandes quantidades desse composto impactam tanto ambientes aeróbios quanto anaeróbios, tais como aquíferos, corpos hídricos superficiais, solos e sedimentos terrestres e marinhos (FOGHT, 2008), 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).

Os hidrocarbonetos aromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX), 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 em água a 25 °C do benzeno é 1785,5 mg/L, do tolueno é 532,6 mg/L, do m-xileno é 161,5 mg/L, do o-xileno é 171,5 mg/L, do p-xileno é 181,6 mg/L e do etilbenzeno é 161,5 mg/L (FARHADIAN et al., 2008).

A alta mobilidade desses hidrocarbonetos nos sistemas solo-água é relacionada ao baixo coeficiente de partição octanol-água deles, o que leva a uma absorção lenta do solo e, conseqüentemente, uma preferência pelo transporte na água, favorecendo a contaminação dos aquíferos, uma vez que migram rápido nesse meio (NAKHLA, 2003).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), o Programa Toxicológico Nacional (NTP) e a Agência de Proteção Ambiental (EPA), ambos dos Estados Unidos, classificam o benzeno como agente cancerígeno, e deve haver regulamentação específica para

esse composto. Além disso, estudos indicam o benzeno como um disruptor endócrino, podendo alterar a forma natural de regulação hormonal do organismo (ECYCLE, 2010).

A exposição dos seres humanos ao benzeno pode causar leucemia e câncer de pulmão, fígado, linfoma, estômago, esôfago, nasofaringe e intestino (MEHLMAN,1992). O benzeno é classificado como cancerígeno devido ao dano persistente à medula óssea e ao risco de alterações neoplásicas que levam à leucemia mieloide (HEIBATI et al.,2017).

3.2. Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo metabólico complexo que requer condições anaeróbias (potencial redox < -200 mV) e depende da atividade conjunta de uma associação de microrganismos para transformar material orgânico em dióxido de carbono e metano. O processo pode ser dividido em quatro fases, sendo: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Cada etapa é realizada por diferentes grupos de microrganismos, em sintrofia, e podem requerer diferentes condições ambientais (AMARAL; STEINMETZ; KUNZ, 2019).

A digestão anaeróbia ocorre em um sistema ecológico balanceado com uma sequência de processo metabólicos complexos. Essas etapas ocorrem graças a, pelo menos, três grupos: bactérias fermentativas ou acidogênicas, bactérias sintróficas ou acetogênicas e microrganismos metanogênicos. A digestão anaeróbia pode ser simplificada como um processo de duas fases, acidogênese e metanogênese, mas pode haver mais subdivisões. Em cada uma delas, as substâncias são convertidas a espécies mais simples (Chernicharo, 2007).

A etapa da hidrólise degrada compostos de alta massa molecular como os lipídios, polissacarídeos e proteínas em substâncias orgânicas mais simples (monômeros) e solúveis. Esse processo ocorre pela ação de enzimas extracelulares excretadas pelas bactérias hidrolíticas. A importância da etapa de hidrólise na velocidade de degradação é dependente da característica do substrato envolvido. Quando a matéria orgânica presente é complexa e de difícil degradação, a hidrólise tem grande importância na velocidade global de degradação, podendo ser considerada como etapa limitante da velocidade da digestão anaeróbia (AMARAL; STEINMETZ; KUNZ, 2019).

Após a hidrólise, ocorre a acidogênese, no interior dos microrganismos fermentativos, por meio do processo fermentativo. As substâncias fermentadas costumam ser açúcares, aminoácidos e ácidos graxos. Essas substâncias são convertidas, por exemplo, em ácidos orgânicos, como acético, propiônico e butírico, álcoois (etanol), cetonas (acetona), gás carbônico e hidrogênio, sendo esses dois últimos úteis para a etapa metanogênica. Essa etapa é

considerada acidogênica porque o principal produto são os ácidos orgânicos das bactérias fermentativas acidogênicas (Chernicharo, 2007).

A etapa seguinte é a acetogênese. Nela, compostos orgânicos intermediários, por exemplo, butirato e propionato, são oxidados pelas bactérias sintróficas acetogênicas. Os produtos dessa etapa, acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, são substrato para os microrganismos responsáveis pela metanogênese (Chernicharo, 2007).

A metanogênese é a etapa final da conversão anaeróbia, os microrganismos responsáveis são pertencentes ao domínio Archea e se dividem em dois grupos: metanogênicas acetoclásticas e metanogênicas hidrogenotróficas. O primeiro grupo é responsável por aproximadamente 60 a 70% da produção de metano a partir do acetato. Poucas espécies pertencem a esse grupo, entretanto são predominantes no processo anaeróbio e por isso são responsáveis pela maior parte da produção de CH₄. O grupo das hidrogenotróficas possui maior número de arqueias metanogênicas, sendo capazes de produzir metano a partir de hidrogênio e gás carbônico (Chernicharo, 2007).

3.3. Biodegradação aeróbia do benzeno

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).

Os hidrocarbonetos aromáticos são menos biodegradáveis que os hidrocarbonetos saturados. Eles representam riscos maiores para o meio ambiente e para as formas de vida, assim são poluentes que têm prioridade nos processos de biorremediação (SALLEH et al., 2003). O ataque oxidativo inicial seguido pela clivagem do anel benzênico são os principais passos na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos (HENDRICKX et al., 2006).

O processo utiliza o oxigênio dissolvido (OD) na ativação do anel aromático, na oxidação dos subprodutos formados e como o aceptor 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).

O anel benzênico é quebrado pelos microrganismos de diferentes maneiras por enzimas apropriadas (LI; LIU, 2002): orto ou meta clivagem conduzem à formação de intermediários centrais, como protocatecol e catecol, que são ainda convertidos em ácido tricarbóxico (ABBASIAN et al., 2015). As vias de orto e meta clivagem diferem no local em que ocorre a clivagem. O benzeno, através da dioxigenase, é convertido em catecol, 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).

3.4. Biodegradação anaeróbia do benzeno

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 (nitrito, ferro, sulfato e manganês) para fornecer a maior energia potencial da degradação de hidrocarbonetos (VARJANI, 2017).

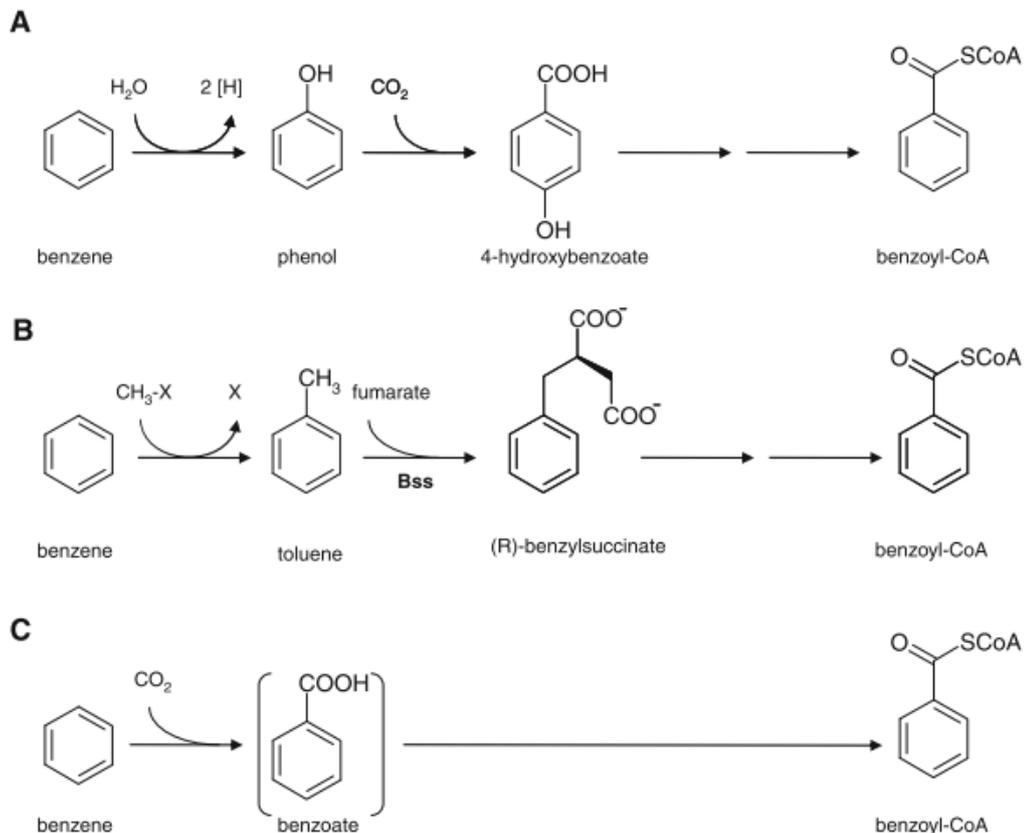
Os compostos aromáticos, como o benzeno e o tolueno, são doadores de elétrons termodinamicamente favoráveis para o crescimento, devido à alta troca de energia livre Gibbs da oxidação desses compostos com diferentes aceptores de elétrons. Entretanto, todos os estudos relativos à degradação anaeróbia de BTEX indicaram que a degradação do benzeno é mais difícil de ocorrer e que o tolueno é o composto aromático que é relativamente mais fácil de degradar anaerobiamente (WEELINK; VAN EEKERT; STAMS, 2010).

Ghattas et al. (2017) comentam que hidrocarbonetos aromáticos também podem ser degradados sob condições metanogênicas. No entanto, os microrganismos metanogênicos

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.

As vias de degradação anaeróbica 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 1) (WEELINK et al., 2010; MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2016).

Figura 1 – Vias de degradação do benzeno.



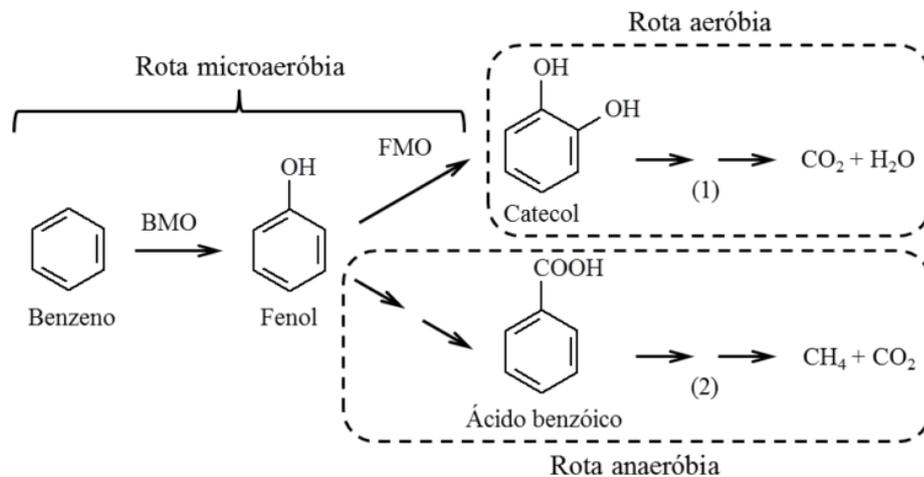
Fonte: Weelink, van Eekert e Stams (2010). A - Hidroxilação, B - Metilação e C - Carboxilação.

A literatura reporta que a adição de baixas concentrações de oxigênio pode favorecer a degradação inicial do benzeno, pois, sob condições microaeróbicas, alguns microrganismos podem utilizar o oxigênio para introduzir um ou mais grupos hidroxila no anel aromático através das enzimas mono-oxigenases ou dioxigenases (monohidroxilação e di-hidroxilação, respectivamente) como nas rotas aeróbicas clássicas, ativando bioquimicamente os

hidrocarbonetos aromáticos, para sua posterior clivagem por meio de rotas metabólicas anaeróbias (FUCHS, 2008).

Yerushalmi et al. (2001), em 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, um composto menos recalcitrante produzido pela hidroxilação inicial do benzeno por enzimas mono-oxigenases, em catecol, por caminhos aeróbios, só acontece quando quantidades adequadas de oxigênio estão disponíveis. Alternativamente, esses autores propõem que, após a depleção total do oxigênio, o fenol pode ser degradado anaerobiamente em benzoato pela ação de microrganismos anaeróbios apropriados, como pode ser visto na Figura 2. De fato, o fenol é considerado um dos principais intermediários da degradação anaeróbia do benzeno (FIRMINO et al., 2018).

Figura 2 – Rota metabólica de degradação de benzeno sob condições microaeróbias proposta por Yerushalmi *et al.* (2001).



Fonte: Firmino (2017). Legenda: BMO, benzeno mono-oxigenase; FMO, fenol mono-oxigenase. A completa mineralização do benzeno é condicionada a presença de adequadas quantidades de oxigênio (1) ou na presença de microrganismos apropriados (2).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos químicos

Os compostos aromáticos (benzeno, fenol, benzoato e tolueno) e o etanol (utilizado como co substrato) foram adquiridos com grau analítico e utilizados sem purificação adicional.

4.2 Inóculo e meio basal

Nos ensaios, foi utilizado lodo aclimatado a benzeno, coletado de um reator microaeróbio, em escala laboratorial, que tratava água contaminada com benzeno ($\sim 4,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 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 ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.3 Procedimento experimental

O experimento foi dividido em duas fases (Tabela 1). Na Fase 1, foi investigado o efeito da presença de etanol e oxigênio na degradação anaeróbia de benzeno. Na Fase 2, foi investigado o efeito da presença de importantes intermediários (fenol, benzoato e tolueno) na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno.

Tabela 1 – Descrição das bateladas por fase.

Batelada	Descrição
<i>Fase 1</i>	
B1	Benzeno
B2	Benzeno + etanol
B3	Benzeno + O ₂
B4	Benzeno + etanol + O ₂
<i>Fase 2</i>	
B5	Benzeno + etanol + fenol
B6	Benzeno + etanol + fenol + O ₂
B7	Benzeno + etanol + benzoato
B8	Benzeno + etanol + benzoato + O ₂
B9	Benzeno + etanol + tolueno
B10	Benzeno + etanol + tolueno + O ₂

Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: B, batelada.

Todos os ensaios foram realizados em batelada (em duplicata), com volume reacional de 70 mL de meio basal e inóculo, em garrafas de vidro borossilicato de 115 mL. A concentração inicial de lodo em cada garrafa foi de 2 g SSV·L⁻¹. Em seguida, para o estabelecimento de condições anaeróbias no interior das garrafas, elas foram seladas com septos de Viton® e lacres de alumínio, e 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 reacional, benzeno (~5 mg·L⁻¹) e, quando necessário, o cossustrato etanol (1 g DQO·L⁻¹) e os intermediários fenol, benzoato e tolueno (testados individualmente, 5 mg·L⁻¹), dando-se início aos ensaios sob as mesmas condições de agitação e temperatura já mencionadas. Adicionalmente, para os ensaios sob condições microaeróbias, o oxigênio foi adicionado a partir do ar atmosférico (10 mL) no *headspace* das garrafas com o auxílio de uma seringa *Gastight*. A concentração inicial de oxigênio dissolvido (OD) (1,77 mg·L⁻¹) foi calculada a partir da constante de Henry do oxigênio para 30 °C (1,18·10⁻³ mol·L⁻¹·atm⁻¹), assumindo o equilíbrio entre as fases líquida e gasosa. Após quarenta e dois dias de experimento, foi feita uma replicata de todas as bateladas, em que os compostos foram reinjetados, totalizando, assim, oitenta e quatro dias experimentais.

A remoção dos compostos aromáticos foi avaliada segundo o modelo de segunda ordem (Equação 4.1), pois resultou no melhor ajuste com os dados experimentais.

$$1/C = 1/C_0 + kt, \quad (4.1)$$

em que C é a concentração do reagente (mg·L⁻¹) para qualquer tempo t, C₀ é concentração do reagente (mg·L⁻¹) no tempo t = 0, k é a constante cinética (mg⁻¹·L·dia⁻¹), t é o tempo do ensaio (dias).

4.4 Análises cromatográficas

Os compostos benzeno e tolueno foram determinados por extração por *headspace* estático (Triplus HS, Thermo Scientific, USA) seguida 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).

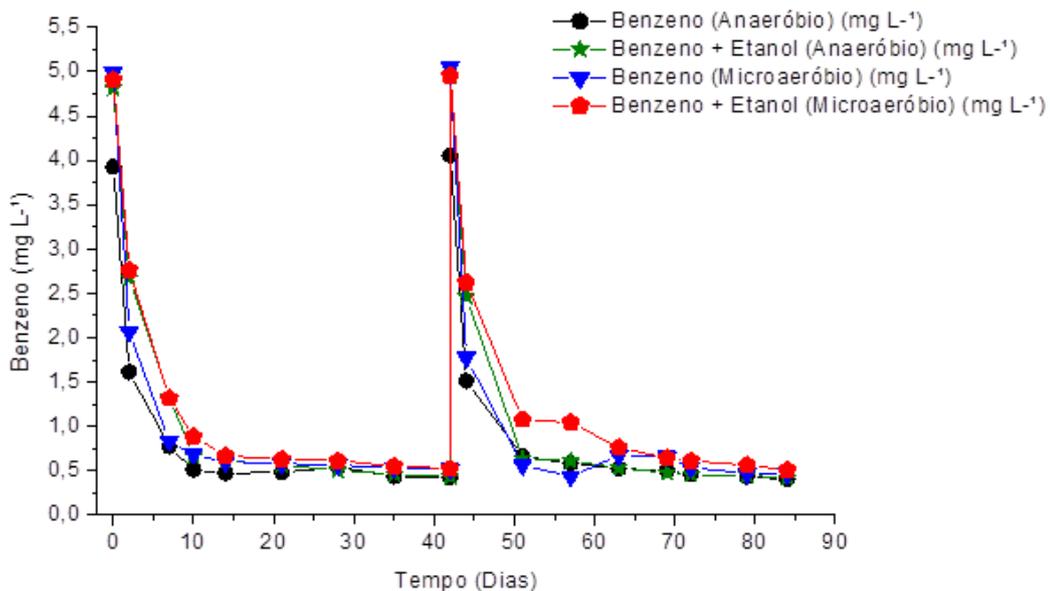
O monitoramento de fenol e benzoato foi realizado por cromatografia líquida (*high performance liquid chromatography*) (HPLC Shimadzu Corporation, Japão). Os compostos em questão foram separados e detectados através de um método com eluição isocrática em proporção de 30%/70% de acetonitrila/tampão fosfato (0,050M de fosfato, pH 2,8) e taxa de fluxo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. 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 HA (0,45 μm).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fase 1 – Efeito da presença de etanol e oxigênio na degradação anaeróbia de benzeno

Inicialmente, foi testada a influência do etanol na eficiência de remoção de benzeno através das bateladas B1 (apenas benzeno) e B2 (benzeno + etanol). Dessa forma, como mostra a Figura 3, nos primeiros dias, houve uma melhor remoção de benzeno na batelada em que os microrganismos foram expostos apenas ao hidrocarboneto aromático. Dessa forma, supõe-se que, inicialmente, houve uma preferência de assimilação metabólica pelo etanol em comparação ao benzeno.

Figura 3 – Variação da concentração benzeno nas bateladas da Fase 1. Reinjeção no 42º dia experimental.



Fonte: elaborado pelo autor

Observa-se que a velocidade de reação da batelada B2 com etanol foi ligeiramente maior do que na batelada B1 sem o co-substrato (Tabela 2). Isso pode estar relacionado ao fato de que o etanol serviu de combustível para os microrganismos iniciarem a degradação do composto aromático. Além disso, o tempo de meia vida foi maior na batelada apenas com o benzeno (Tabela 2), mostrando que os microrganismos demoraram a atingir sua máxima degradação. Esses resultados se repetiram na mesma proporção após a reinjeção no dia 42 de experimento.

Tabela 2 – Descrição das variáveis cinéticas k ($\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{dia}^{-1}$) e t (dias) das bateladas da Fase 1.

Batelada	Composto	1ª injeção (dias 1 - 42)			2ª injeção (dias 42 - 84)		
		k	R^2	t	k	R^2	t
B1 - Benzeno	Benzeno	0,044	0,73	5,84	0,045	0,77	5,54
B2 - Benzeno + etanol	Benzeno	0,059	0,85	4,31	0,056	0,73	4,42
B3 - Benzeno + O ₂	Benzeno	0,043	0,71	5,65	0,052	0,76	4,63
B4 - Benzeno + etanol + O ₂	Benzeno	0,048	0,84	5,24	0,048	0,89	5,13

Fonte: elaborado pelo autor

Esses resultados podem estar associados aos microrganismos presentes no lodo aclimatado, pois já estavam ambientados à remoção de benzeno. De fato, a estabilização da remoção de benzeno aconteceu por volta do décimo dia em ambas as bateladas da Fase 1.

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 do benzeno, porém esse fato só foi observado nos primeiros dias, onde houve preferência dos microrganismos pelo cossustrato.

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, essa relação é mais comum em solos e aquíferos subterrâneos, já que, em lodo de esgoto, há alta concentração de microrganismos.

Além da interferência do etanol, foi injetado O₂ (1,77 mg/L), e, em seguida, avaliada a influência na eficiência de remoção de benzeno. Dessa maneira foram comparadas

as bateladas B1 (apenas benzeno) e B3 (benzeno + O₂). 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 microaeróbias, 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 microaeróbias, após a ativação do anel aromático desse hidrocarboneto pela mono-oxigenase, o subproduto (fenol) pode ser biodegradado anaerobiamente (YERUSHALMI et al., 2001).

Os resultados observados na Figura 3 indicam estabilização semelhante aos processos anteriores, quando foi avaliada a presença do etanol. Contudo, não há demonstração de melhoria na remoção de benzeno quando o oxigênio dissolvido foi adicionado aos frascos com microrganismos e benzeno. Isso fica ainda mais evidente ao verificar, na Tabela 2, os valores de k e t, os quais, em ambas as bateladas, foram praticamente idênticos.

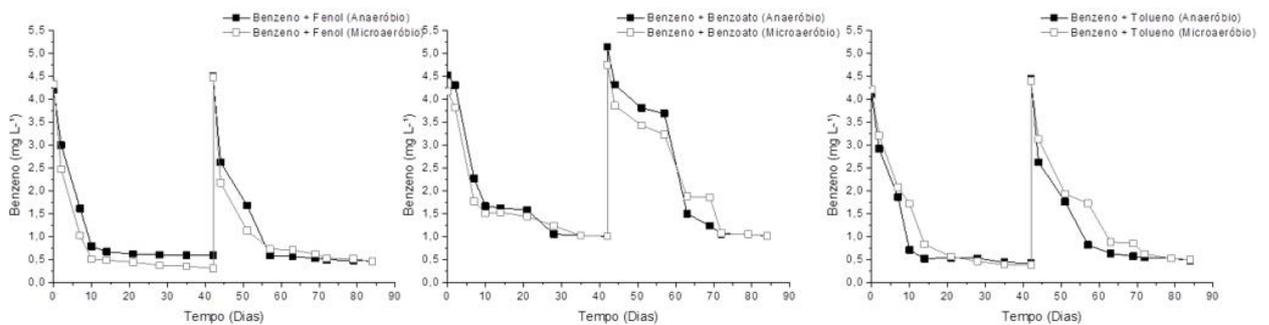
Assim, esperava-se que o oxigênio inserido nos frascos da batelada, fosse dissolvido no líquido e, auxiliado pela agitação da mesa agitadora, atingisse o lodo que ficava misturado no líquido. No entanto, provavelmente, isso não ocorreu. Dessa forma para a remoção de benzeno, o contato entre microrganismos 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 hidrocarbonetos ocorre na manta de lodo a partir da ruptura do anel aromático (VARJANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

Finalizando a Fase 1, buscando melhorar a degradação de benzeno foi realizado um ensaio contendo dentro de um frasco microrganismos, benzeno, etanol e O₂ (B4). Comparando B3 e B4, observa-se que a eficiência de remoção de benzeno, ainda que na presença de etanol como cossustrato, estabilizou aos 7 dias como os demais lotes de batelada. Além disso, analisando os valores obtidos da análise cinética das bateladas (Tabela 2), a velocidade de reação k e o tempo de meia vida t foram equivalentes, mesmo que na batelada 4 tivesse presente o O₂. Portanto, não houve melhorias na porcentagem de remoção de benzeno quando foi adicionado O₂, ainda na presença de cossustrato.

5.2. Fase 2 – Efeito da presença de importantes intermediários na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno

As primeiras bateladas mostraram a preferência dos microrganismos em degradar o etanol ao invés do benzeno (remoção de ~77%) nos primeiros 7 dias. Com a adição dos intermediários, juntamente com o cossustrato, essa preferência foi ainda mais nítida já que a eficiência de remoção diminuiu em média 19% nesse mesmo período, como mostra a Figura 4.

Figura 4 – Variação da concentração benzeno nas bateladas da Fase 2. Reinjeção no 42º dia experimental.



Fonte: elaborado pelo autor.

Comparando as duas fases, a remoção total da segunda foi apenas 5% menor do que a primeira, como mostra a Figura 4. Além disso, como mostra a Tabela 3, os valores de k do benzeno obtidos na Fase 2, no geral, foram menores do que os valores da Fase 1. Além disso, o tempo de meia vida t dessa mesma fase, foi maior que o da fase anterior, mostrando que, na presença dos intermediários, a degradação do benzeno foi retardada.

Portanto, os intermediários fenol, benzoato e tolueno interferiram diretamente na degradação do benzeno, pois, como são compostos menos estáveis, foram preferidos na degradação. Além disso, o oxigênio dissolvido, adicionado nas bateladas, novamente, não mostrou grandes influências, ressaltando que a adição de oxigênio no *headspace* das garrafas não provocou grandes interações com os microrganismos e, dessa forma, não auxiliou a desestabilização do benzeno.

Nos ensaios com todos os intermediários, a eficiência do benzeno diminuiu. A comparação dos perfis de degradação (Figura 4) do benzeno revelou que a eficiência foi menor quando ele esteve na presença de benzoato (~80%), seguido do fenol (~89%) e, por fim, do tolueno (~89%).

Tabela 3 – Descrição das variáveis cinéticas k ($\text{mg}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{dia}^{-1}$) e t (dias) das bateladas da Fase 2.

Batelada	Composto	1ª injeção (dias 1 - 42)			2ª injeção (dias 42 - 84)		
		k	R^2	t	k	R^2	t
B5 - Benzeno + etanol	Benzeno	0,035	0,73	6,82	0,045	0,73	4,91
+ fenol	Fenol	0,052	0,88	4,00	0,056	0,92	3,85
B6 - Benzeno + etanol	Benzeno	0,068	0,88	3,40	0,043	0,88	5,21
+ fenol + O ₂	Fenol	0,051	0,77	4,19	0,049	0,77	4,52
B7 - Benzeno + etanol	Benzeno	0,019	0,92	11,43	0,022	0,88	8,87
+ benzoato	Benzoato	0,062	0,95	3,40	0,070	0,95	2,18
B8 - Benzeno + etanol	Benzeno	0,017	0,88	14,10	0,021	0,93	10,12
+ benzoato + O ₂	Benzoato	0,064	0,97	3,37	0,050	0,98	3,42
B9 - Benzeno + etanol	Benzeno	0,051	0,81	4,82	0,044	0,83	5,11
+ tolueno	Tolueno	0,039	0,90	5,72	0,031	0,91	6,65
B10 - Benzeno + etanol	Benzeno	0,065	0,96	3,65	0,045	0,97	5,05
+ tolueno + O ₂	Tolueno	0,075	0,97	2,97	0,041	0,94	5,27

Fonte: elaborado pelo autor.

A diminuição da eficiência de remoção de benzeno pode ser explicada pelo deslocamento do equilíbrio da reação causada pelo acúmulo dos compostos intermediários. Além disso, há preferência dos microrganismos em degradar os intermediários, já que são menos estáveis do que o benzeno, como mostra os tempos de meia vida na Tabela 3. No geral, todos os intermediários apresentam essa variável menor que o benzeno, notadamente o benzoato.

5.2.1 Efeito de fenol na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno

Nessa etapa, foi adicionado fenol (4,83 mg/L), juntamente com benzeno e etanol, nas bateladas B5 (benzeno + etanol + fenol) e B6 (benzeno + etanol + fenol + O₂).

Foi observado nas bateladas com adição de fenol, B5 e B6, que, em ambas, a presença do intermediário influenciou negativamente a eficiência de remoção de benzeno nos sete primeiros dias de 10% e 6% para as B5 (benzeno + etanol + fenol) e B6 (benzeno + etanol + fenol + O₂), respectivamente, em comparação com as bateladas sem adição de intermediários. Observou-se também que a constante cinética k do fenol em relação a do benzeno é maior (Tabela 3), o que significa que a velocidade de degradação do intermediário foi maior que a do benzeno. Além disso, o tempo de meia vida t (Tabela 3) é maior para o benzeno, mostrando que esse composto teve uma degradação dificultada pela presença do fenol.

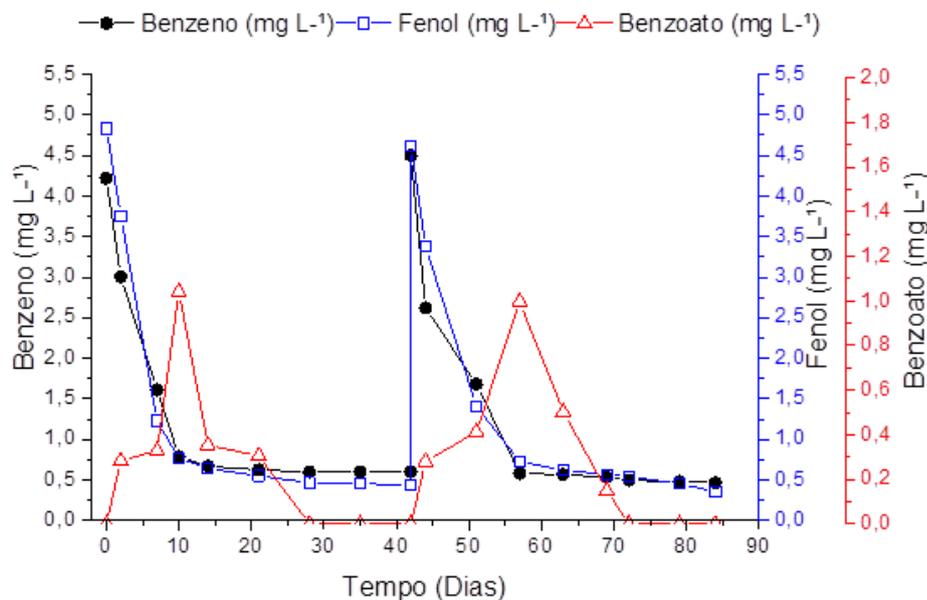
Esses fatos podem estar relacionados à preferência em remover o fenol pelos microrganismos, pois é um composto com taxa de assimilação maior que o benzeno pelos

microrganismos, bem como o aumento da carga de compostos aromáticos presentes nas bateladas.

Siqueira (2018) observou uma remoção média de 93,7% de fenol em um reator operado com benzeno sob condições anaeróbias. Esse mesmo estudo 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.

Na degradação do benzeno, observou-se também como se comportou a concentração dos intermediários fenol e benzoato (Figura 5). 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 monooxigenases – 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.

Figura 5 – Variação da concentração benzeno, fenol e benzoato na batelada B5. Reinjeção no 42º dia experimental.



Fonte: elaborado pelo autor

A Figura 5 mostra que, sob essas mesmas condições, a variação da concentração do benzoato era inicialmente 0, ou seja, não há presença desse intermediário. Porém, quanto mais

se degrada os dois compostos iniciais, mais gera-se uma concentração do segundo intermediário, principalmente nos dias 10 e 57 de experimento. Sendo assim, esses resultados mostram que o benzeno pode ter sido convertido a fenol, e, posteriormente, o fenol ter sido convertido anaerobiamente a benzoato.

Observa-se também, na Figura 5, que, ao atingir as maiores concentrações de benzoato, a eficiência de remoção do benzeno e do fenol, justamente nesse mesmo período, permanece estagnada, mostrando uma preferência dos microrganismos em degradar esse outro intermediário.

Esses mesmos cenários se repetem após a reinjeção de benzeno e fenol, pois, à medida que a degradação desses dois compostos aromáticos é iniciada, mais rapidamente nos sete primeiros dias, benzoato é gerado a partir da conversão de fenol e benzeno, e ambas as eficiências diminuem novamente desses dois compostos.

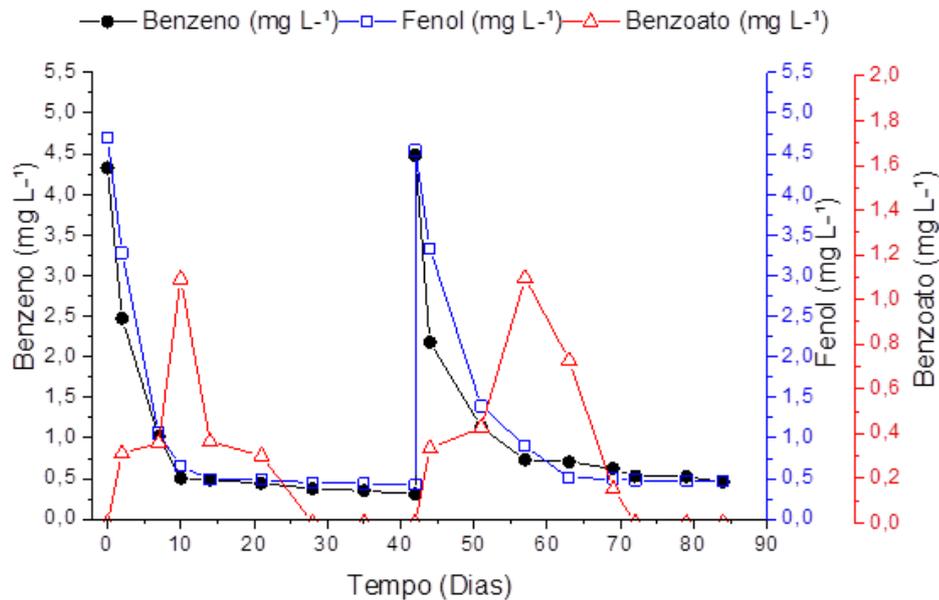
Além da interferência do intermediário, foi injetado O_2 (1,77 mg/L), e avaliada a influência na eficiência de remoção de benzeno. Dessa maneira, foram comparadas as bateladas B5 (benzeno + etanol + fenol) e B6 (benzeno + etanol + fenol + O_2). Esperava-se que o oxigênio inserido nos frascos da batelada fosse dissolvido no líquido e, auxiliado pela agitação da mesa agitadora, atingisse o lodo que ficava misturado no líquido. Embora, ao final dos dias de análise, as bateladas B5 e B6 tenham apresentado eficiência de remoção (ER) final de benzeno muito parecidas, notou-se que, com a presença do oxigênio, a remoção do composto aromático nos primeiros dois dias foi muito maior, já que atingiu 43% na microaeróbia e apenas 26% na anaeróbia. Nessa batelada microaeróbia, também foi verificada a concentração do fenol e do benzoato, como mostra a Figura 6, e os resultados foram semelhantes aos da batelada anaeróbia (B5), na qual o benzeno foi convertido a fenol e posteriormente a benzoato.

Em ambas as bateladas de benzeno e fenol, o benzoato, que é um dos intermediários da biorremediação desses compostos aromáticos, também foi convertido. Notou-se que esse segundo intermediário foi o único que foi removido totalmente do sistema, seja no início ou após a reinjeção no 42º dia, e com a presença de oxigênio ou não.

Masumoto et al. (2012) observaram, em todos os experimentos realizados com benzeno, tolueno, fenol e benzoato para a comparação de perfis de degradação do benzeno na presença desses diferentes intermediários, que a degradação ocorreu mais lentamente na cultura com fenol como cossustrato. No presente trabalho, a degradação anaeróbia e microaeróbia do benzeno também ocorreu de forma mais lenta com a presença do fenol como intermediário, como mostram os valores de k do benzeno na Tabela 3. Portanto, é provável que os

microrganismos tenham degradado o fenol prioritariamente devido à instabilidade causada pela presença do grupo hidroxila e se voltando para o benzeno, após a degradação do intermediário.

Figura 6 – Variação da concentração benzeno, fenol e benzoato na batelada B6. Reinjeção no 42º dia experimental.



Fonte: elaborada pelo autor

5.2.2 Efeito de benzoato na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno

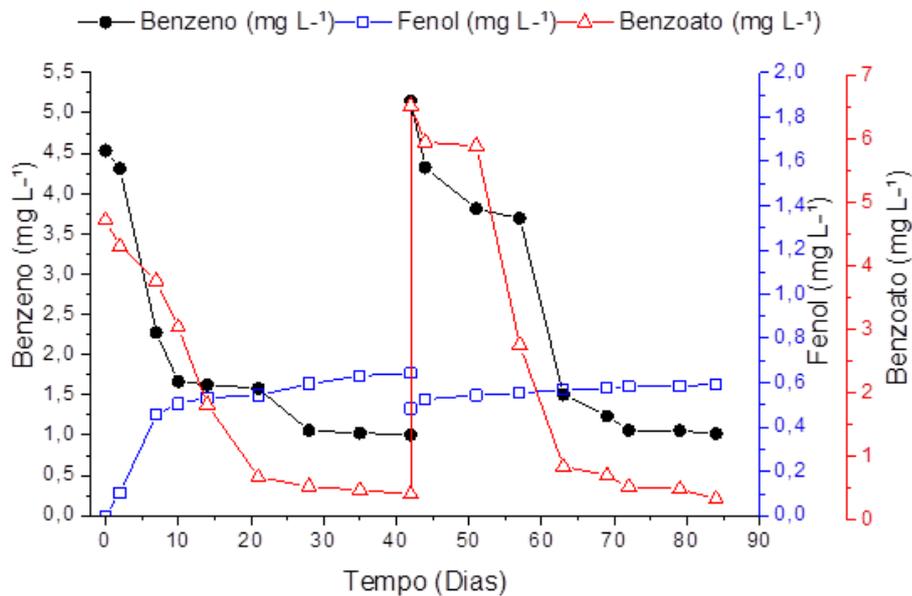
Nessa etapa, foi adicionando benzoato (4,70 mg/L), juntamente com benzeno e etanol, às bateladas B7 (benzeno + etanol + benzoato) e B8 (benzeno + etanol + benzoato + O₂). Semelhante às bateladas com adição de fenol, as bateladas com benzoato e benzeno (B7 e B8) também apresentaram uma menor eficiência de remoção. No entanto, o decréscimo foi bem mais acentuado, como mostra a Figura 3. As concentrações de benzeno na presença do benzoato foram maiores ao longo de todo o experimento em comparação à presença de todos os outros intermediários. Além disso, a ER final do benzeno foi ~10% menor que as bateladas com os demais intermediários.

Na Tabela 3, os valores de *k* da batelada B7 evidenciam que a presença do benzoato inibiu a degradação do benzeno, assim como seu tempo de meia vida (*t*) é cerca de 5 vezes maior que a do intermediário, mostrando, assim, que a degradação do benzoato ocorreu de forma mais rápida e a do benzeno bem mais lentamente. Esses fatos podem estar relacionados ao aumento da carga de compostos aromáticos presentes nas bateladas.

Adicionalmente, conforme mencionado anteriormente, o benzoato é um intermediário chave na degradação dos compostos aromáticos. Assim, a adição desse composto pode ter deslocado o equilíbrio nas reações de degradação do benzeno, inibindo parcialmente a remoção de benzeno (WEELINK; VAN EEKERT; STAMS, 2010).

Além da presença do benzoato nessas bateladas, também foi analisado a presença do fenol ao longo do experimento. A Figura 7 mostra que, no dia 0, não há presença do intermediário que não foi injetado, porém, ao longo da degradação dos dois compostos iniciais, notou-se a produção desse segundo intermediário.

Figura 7 – Variação da concentração benzeno, fenol e benzoato na batelada B7. Reinjeção no 42º dia experimental.



Fonte: elaborada pelo autor.

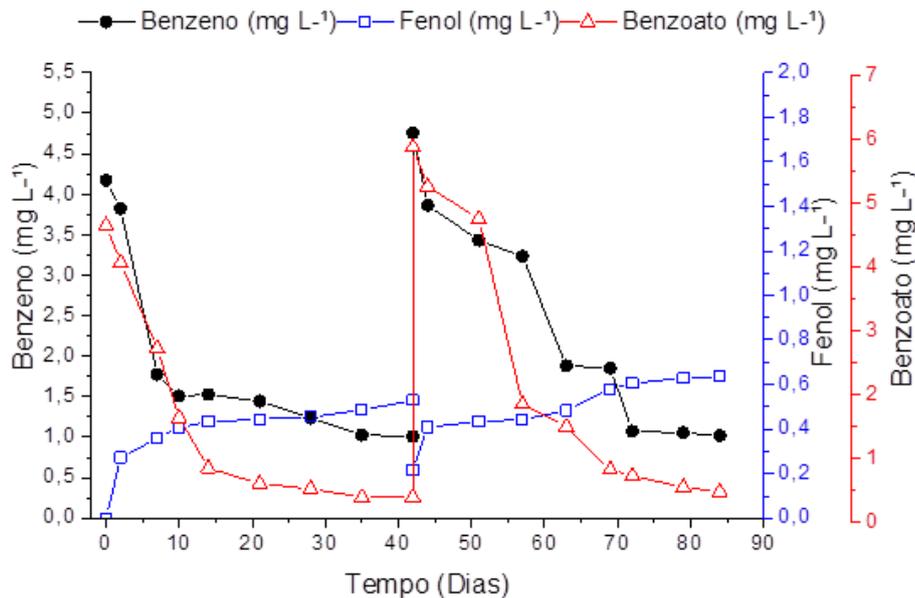
O caminho de hidroxilação do benzeno em ambiente anaeróbico é mais recorrente, justificando as concentrações de fenol nos primeiros dias de experimento, que se mantiveram relativamente constantes em todos os dias de medições. Provavelmente, a presença de benzoato diminuiu a velocidade de conversão de fenol a benzoato, promovendo um acúmulo transiente. Quando as concentrações dos dois compostos iniciais diminuíram, houve uma leve tendência de consumo de fenol (dia 42). Porém, após a reinjeção, esse composto aromático teve a sua concentração aumentada novamente no experimento (Figura 7).

Ao final do experimento o composto que teve a melhor ER foi o benzoato, sendo consumido preferencialmente. Porém, é importante salientar que, ao longo de toda a remoção,

a concentração de fenol aumenta, e, ao fim, ainda havia benzeno para sofrer hidroxilação, ou seja, enquanto houver o benzeno no sistema, haverá também a conversão a fenol.

Além da interferência do intermediário, foi injetado O_2 (1,77 mg/L), e avaliada a influência na eficiência de remoção de benzeno. Dessa maneira, foram comparadas as bateladas B7 (benzeno + etanol + benzoato) e B8 (benzeno + etanol + benzoato + O_2). O oxigênio novamente injetado não interferiu significativamente na eficiência de remoção de benzeno, já que, ao final do experimento, as ER do benzeno foram similares, na B7 (80%) (anaeróbia) e na B8 (79%) (microaeróbia). Portanto, o oxigênio injetado não influenciou na degradação do composto mais recalcitrante. Já se tratando dos dois intermediários presentes na B8, observou-se que o benzoato foi o que teve uma maior degradação ao longo dos dias, como mostra a Figura 8.

Figura 8 – Variação da concentração benzeno, fenol e benzoato na batelada B8. Reinjeção no 42º dia experimental.



Fonte: elaborada pelo autor

Já o fenol foi convertido em ambas as bateladas, à medida que os compostos iniciais iam-se degradando. Nessa batelada microaeróbia, o fenol se fez presente em todos os dias, mostrando que o benzeno pode ter sofrido hidroxilação, ou seja, convertido a fenol. Porém, ao final do experimento, novamente o composto preferido pelos microorganismos foi o benzoato que chegou às menores concentrações no experimento.

5.2.3 Efeito de tolueno na degradação anaeróbia e microaeróbia de benzeno

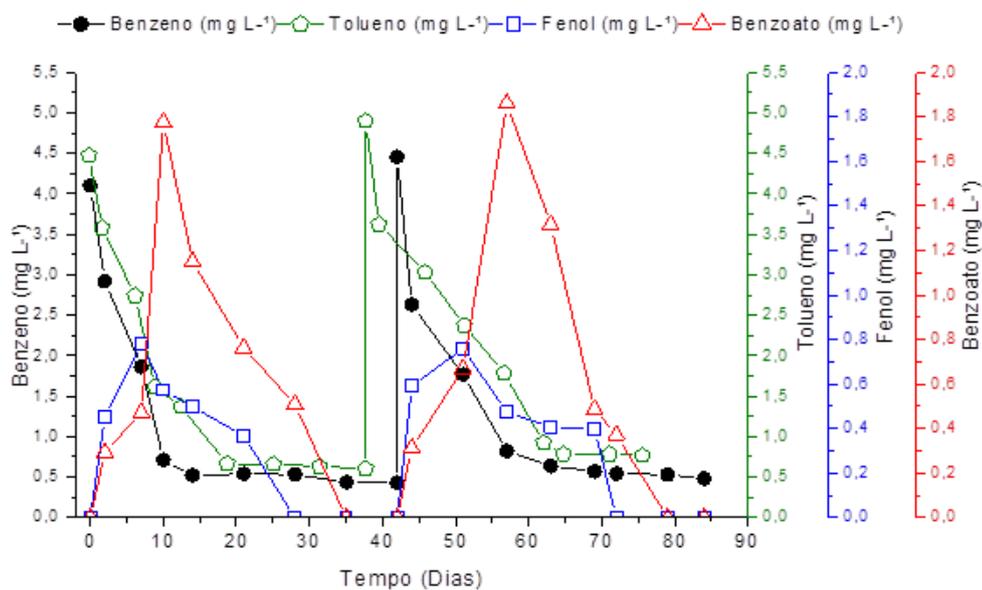
Finalizando a Fase 2, o tolueno foi avaliado como intermediário da degradação do benzeno. Nessa etapa, foi adicionado tolueno (4,48 mg/L), juntamente com benzeno e etanol, nas bateladas B9 (benzeno + etanol + tolueno) e B10 (benzeno + etanol + tolueno + O₂).

Foi observado que a presença do tolueno interferiu negativamente na eficiência de remoção do benzeno em aproximadamente 17% nos primeiros sete dias da batelada B9 em relação a batelada B2 (benzeno + etanol). Já nas bateladas com oxigênio, foi observada uma diminuição de 22% na batelada B10 em relação à batelada B4 (benzeno + etanol + O₂) no mesmo período.

Porém, como mostra a Figura 3, a remoção total do benzeno foi mantida em 90%, resultados compatíveis com as das bateladas que não incluíram o composto benzoato (B2, B4, B5, B6, B9 e B10).

A Tabela 3 mostra que os valores de k para o benzeno foram maiores, tanto na injeção quanto na reinjeção, do que os do tolueno, assim como os valores de tempo de meia vida t do benzeno foram menores do que os do tolueno. Portanto, a presença do tolueno fez com que os microrganismos presentes no experimento degradassem mais rapidamente o composto mais recalcitrante, como mostra a Figura 9.

Figura 9 – Variação da concentração benzeno, fenol, benzoato e tolueno na batelada B9. Reinjeção no 42º dia experimental.



Fonte: elaborado pelo autor

Além de analisar as concentrações dos dois compostos injetados, também foi feito o acompanhamento das concentrações dos intermediários fenol e benzoato. A Figura 9 mostra que, com a presença de tolueno, os intermediários não se formaram com tanta incidência como nas bateladas anteriores B5, B6, B7 e B8. Nas primeiras 24 horas, houve a formação de fenol, tendo ocorrido também uma redução considerável em 21 dias. O mesmo comportamento foi observado com o benzoato. Esse fenômeno também ocorreu na mesma proporção de tempo após a reinjeção de benzeno e tolueno no dia 42.

Segundo Coates et al. (2002), um dos intermediários na degradação do benzeno é o tolueno através da metilação, porém, como visto nas bateladas anteriores, não ocorreu metilação ao longo dos dias experimentais, já que não houve formação de tolueno. Sendo assim, os compostos injetados degradaram-se paralelamente formando os mesmos intermediários (fenol e benzoato), como visto na Figura 9.

Além disso, os microrganismos utilizados nesses experimentos eram provenientes de um reator aclimatado com lodo a benzeno, portanto é possível que a microbiota ali presente estivesse mais adaptada a esse composto. Como visto, houve formação de fenol e benzoato, sendo assim, fica evidente que primeiramente o benzeno é convertido a fenol e posteriormente a benzoato.

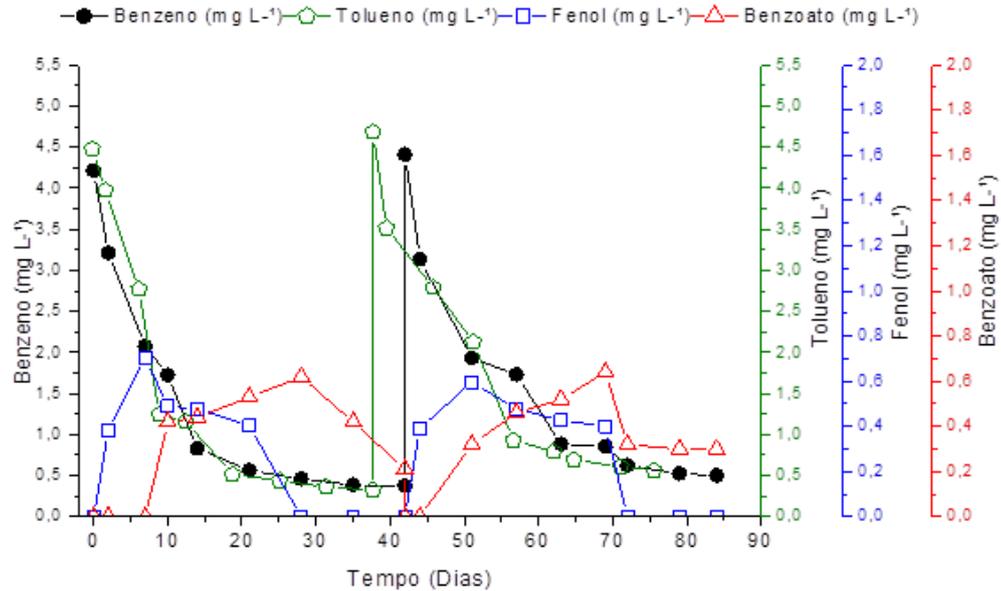
Portanto, além do benzeno mostrar melhores ER na presença do tolueno, fica claro a origem dos outros intermediários. Além disso, nota-se a clara preferência, neste trabalho, dos microrganismos por todos os outros compostos aromáticos ao invés do tolueno, que possui um outro mecanismo de ativação (adição de fumarato) (Foght, 2008).

Já na batelada B10, com a presença de pequenas injeções de oxigênio, os resultados obtidos foram parecidos com a batelada anaeróbia (B9), mostrando ER de benzeno semelhantes nos cenários anaeróbio e microaeróbio. Porém, no cenário microaeróbio, o tolueno foi mais degradado do que no cenário anaeróbio.

Além disso, as constantes cinéticas k e t do benzeno (Tabela 3) foram similares tanto na batelada anaeróbia quanto na microaeróbia, porém os valores dessas constantes para o tolueno melhoraram na batelada microaeróbia B10, mostrando que a presença do oxigênio ajudou a degradar o composto intermediário mais rapidamente. Portanto, o oxigênio inserido garantiu uma maior ER desse composto.

Analisando o comportamento dos intermediários fenol e benzoato mostrados na Figura 10, é visível o mesmo comportamento da batelada B9, pois, enquanto houve presença considerável tanto de benzeno quanto de tolueno, houve produção desses dois intermediários.

Figura 10 – Variação da concentração benzeno, fenol, benzoato e tolueno na batelada B10. Reinjeção no 42º dia experimental.



Fonte: elaborada pelo autor.

Como mostra a Figura 10, o comportamento do benzeno foi similar nas bateladas B9 e B10, porém, na batelada B10, o tolueno possui um maior decaimento de sua concentração nos primeiros dias, justificando assim o aumento do valor de k na batelada com O_2 (Tabela 3). Nessa batelada, a concentração final do tolueno chegou praticamente ao mesmo patamar do benzeno. Portanto, novamente os dois compostos degradaram-se paralelamente formando os mesmos intermediários (fenol e benzoato). Além disso, houve uma maior formação de fenol comparada com a batelada anaeróbia, mostrando mais um indício que o oxigênio auxilia na ativação do anel benzênico por hidroxilação. Portanto, o oxigênio dissolvido ajudou na degradação do tolueno, visto que sua ER final foi maior do que na batelada B9 anaeróbia.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral, a presença de cossustrato afetou negativamente a degradação anaeróbia de benzeno, enquanto a adição de oxigênio não melhorou significativamente a remoção desses compostos.

Ao final de todas as etapas de operação, verificou-se que a adição dos intermediários influenciou negativamente a degradação do benzeno, sendo o benzoato o intermediário que apresentou maior interferência e o tolueno o que menos interferiu.

Em todas as bateladas com a presença dos intermediários fenol, benzoato e tolueno, a principal rota de degradação foi a hidroxilação, mostrando que, muito provavelmente, benzeno foi convertido, primeiramente, a fenol e, posteriormente, a benzoato, o intermediário chave da degradação anaeróbia de compostos aromáticos.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, F.; LOCKINGTON, R.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 176, p. 670-699, 2015.
- ALVES, R. N.; MARIZ JÚNIOR, C. F.; DE PAULO, D. V. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 178, p. 224-230, 2017.
- AMARAL; STEINMETZ; KUNZ. **O processo de biodigestão**. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197604/1/final9154.pdf> > Acesso em: 25 ago. 2020
- ANDREONI, V.; GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 76, p. 287–308, 2007.
- CERVANTES, F. J.; MANCILLA, A. R.; RIOS-DEL TORO, E. E.; ALPUCHE-SOLIS, A. G.; MONTOYA-LORENZANA, L. Anaerobic degradation of benzene by enriched consortia with humic acids as terminal electron acceptors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 195, p. 201-207, 2011.
- 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.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. SEGRAC, Belo Horizonte, 246 p., 1997.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. IWA Publishing, 2007.
- 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.
- 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.
- ECYCLE. **Benzeno, o que é e seus perigos**. 2010. Disponível em: < <https://www.ecycle.com.br/2213-benzeno.html> > Acesso em: 21 abr. 2020

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.

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

FIRMINO, P. I. M.; FARIAS, R. S.; BARROS, A. N.; LANDIM, P. G. C.; HOLANDA, G. B. M, RODRÍGUEZ, E.; LOPES, A. C.; DOS SANTOS, A. B. Applicability of Microaerobic Technology to Enhance BTEX Removal from Contaminated Waters. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017.

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.

FOGHT, J. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 15, n. 2-3, p. 93-120, 2008.

FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 82–99, 2008.
Fundamentos da Gigestão Anaeróbia, Purificação do Biogás, Uso e Tratamento do Digestato. Airton Kunz, Ricardo Luiz Radiz Steinmetz, André Cestonaro do Amaral. 2019

LI, X. W.; LIU, Z. P. Microbial biodegradation of petroleum hydrocarbons. **Acta Microbiol. Sin.**, v. 42, p. 764-767, 2002.

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

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

HEIBATI, B.; POLLITT, K. J. G.; KARIMI, A.; CHARATI, J. Y.; DUCATMAN, A.; SHOKRZADEH, M.; MOHAMMADYAN, M. BTEX exposure assessment and quantitative risk assessment among petroleum product distributors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 445-449, 2017.7

HENDRICKX, B.; JUNCA, H.; VOSAHLOVA, J.; LINDNER, A.; RUEGG, I.; BUCHELI-WITSCHER, M.; FABER, F.; EGLI, T.; MAU, M.; SCHLOMANN, M.; BRENNEROVA, M.; BRENNER, V.; PIEPER, D. H.; TOP, E. M.; DEJONGHE, W.; BASTIAENS, L.; SPRINGAEL, D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p. 250-265, 2006.

KAZUMI, J. et al. Anaerobic Degradation of Benzene in Diverse Anoxic Environments. **American Chemical Society**, v. 31, n. 3, p. 813–818, 1997

MASUMOTO, Hiroki et al. Complete mineralization of benzene by a methanogenic enrichment culture: effect of putative metabolites on the degradation. **Elsevier Chemosphere**, vol. 86, p. 822–828, fev. 2012.

MECKENSTOCK, R. U.; MOUTTAKI, H. **Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. *Journal Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 118, p. 92–118, 2016.

MEHLMAN, M. A. Dangerous and Cancer-Causing Properties of Products and Chemicals in the Oil Refining and Petrochemical Industry. **Environmental Research**, v. 59, p. 238–249, 1992.

MELLO, J. M. M. DE. **BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS BTEX EM UM**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO, 2007.
MOSMERI, H.; ALAIE, E.; SHAVANDI, M.; DASTGHEIB, S. M. M.; TASHARROFI, S. Bioremediation of benzene from groundwater by calcium peroxide (CaO₂) nanoparticles encapsulated in sodium alginate. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 78, p. 299–306, 2017.

NAKHLA, G. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds—impact of process variables and scale-up implications. **Water Research**, v. 37, n. 6, p. 1296–1307, 2003.

SALLEH, A. B.; GHAZALI, F.M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; BASRI, M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. **Indian Journal Biotechnology**, v. 2, p. 411–425, 2003.

SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungus isolated from industrial effluents—identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1001–1006, 2004

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.

SURENDRA, S. V.; MAHALINGAM, B. L.; VELAN, M. Degradation of monoaromatics by *Bacillus pumilus* MVS3. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, n. December, p. 1–18, 2017.

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

VARJANI, S. J.; GNANSOUNOU, E.; PANDEY, A. **Chemosphere 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.

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.

YERUSHALMI, L.; LASCOURREGES, J.-F.; RHOFIR, C.; GUIOT, S. R. **Detection of intermediate metabolites of benzene biodegradation under microaerophilic conditions.** Biodegradation, v. 12, n. 6, p. 379-391, 2001.