

II-238 - EFEITO DA PRESENÇA DE COSSUBSTRATO E OXIGÊNIO DISSOLVIDO E DA ACLIMATAÇÃO DO LODO DE INÓCULO NA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE BTEX

André Bezerra dos Santos⁽¹⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). PhD em Environmental Sciences pela Wageningen University, Holanda. Professor Associado do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da UFC.

João Paulo da Silva Siqueira

Tecnólogo em Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará. Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Doutor em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

Andrey Marco Pereira

Graduando em Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

Amanda Maria Meneses Dutra

Engenheira Química pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

Paulo Igor Milen Firmino

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental pela UFC. Doutor em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental pela UFC. Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da UFC.

Endereço⁽¹⁾: Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Campus do Pici, Bloco 713, Pici – Fortaleza – CE - CEP: 60455-900 - Brasil - e-mail: andre23@ufc.br

RESUMO

O presente trabalho avaliou o efeito da presença de etanol (cossustrato) ($1 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$) e de oxigênio dissolvido ($1,77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), assim como da aclimação do lodo de inóculo, na degradação anaeróbia de BTEX ($\sim 4,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cada composto). Para isso, foram avaliados, em experimentos em batelada, dois lodos: um proveniente de reator anaeróbio de uma estação de tratamento de esgoto sanitário (L1) e outro de um reator microaeróbio, em escala laboratorial, aclimatado a BTEX (L2). De maneira geral, para o lodo não aclimatado (L1), 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 (L2), 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.

PALAVRAS-CHAVE: Cossustrato, hidrocarboneto, intermediário, microaeração.

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 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). 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, consequentemente, 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). Nesse sentido, técnicas biológicas são preferidas aos processos químicos tradicionais, como absorção, adsorção ou combustão, devido a seus custos operacionais mais baixos e sua natureza ambientalmente correta (FARHADIAN et al., 2008).

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).

Portanto, o presente trabalho avaliou o efeito da presença de etanol (cossubstrato) e de oxigênio dissolvido, assim como da aclimação do lodo de inóculo, na degradação anaeróbia de BTEX.

MATERIAL E MÉTODOS

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) (~4,2 mg·L⁻¹ de cada composto). Quando necessário, foi utilizado etanol (99,8%, Dinâmica, Brasil) como cossubstrato (1 g DQO·L⁻¹). Todos os compostos químicos foram utilizados como adquiridos, sem purificação adicional.

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 ± 0,16 g DQO·g SSV⁻¹·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 (~4,2 mg·L⁻¹ de cada composto) e etanol (1 g DQO·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 g·L⁻¹).

Procedimento experimental

Nos ensaios 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 g SSV·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 cossubstrato 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 cossubstrato 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 o modelo cinético de segunda ordem, o qual apresentou o melhor ajuste para os dados experimentais obtidos e cuja constante cinética (k) foi obtida pela Equação 1:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt, \quad (1)$$

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).

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°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.

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 (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), as quais eram, em seguida, seladas com septos de PTFE/silicone e lacres de alumínio (Supelco, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio abiótico, observou-se uma remoção de apenas 10% para todos os compostos BTEX ao final do experimento (35 dias). Logo, a perda por volatilização foi muito pequena.

Nos ensaios com lodo não aclimatado (L1), em geral, 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 (Tabela 1). Mesmo assim, a presença de cossustrato parece ter afetado negativamente apenas a degradação anaeróbia de tolueno e, principalmente, benzeno, para o qual foi registrada uma constante cinética (k) 6,15 vezes menor sob essa condição (Tabela 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 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., 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; GRBIĆ-GALIĆ, 1994; RAKOCZY et al., 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).

A adição de baixas concentrações de oxigênio pode favorecer a degradação inicial dos compostos BTEX, pois, sob condições microaeróbias, alguns microrganismos podem utilizar oxigênio para introduzir grupos hidroxila no anel aromático, por meio de enzimas mono-oxigenases, como nas rotas aeróbias clássicas, facilitando posteriormente sua clivagem por meio de rotas metabólicas anaeróbias (FUCHS, 2008). 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 1).

Tabela 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												
B	0,080	3,48	0,058	4,54	0,013	18,54	0,015	12,23	0,013	19,47	0,020	9,69
T	0,034	6,88	0,033	6,71	0,023	9,66	0,022	8,68	0,026	9,13	0,033	7,02
E	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-X	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-X	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												
B	0,044	5,47	0,036	6,36	0,043	5,42	0,040	5,88	0,055	4,24	0,052	4,49
T	0,044	5,47	0,041	5,49	0,029	8,07	0,027	8,74	0,044	5,3	0,051	4,39
E	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-X	0,026	5,19	0,022	6	0,029	4,27	0,029	4,51	0,042	3,33	0,053	2,58
o-X	0,057	4,33	0,081	2,83	0,026	9,83	0,028	8,86	0,036	6,55	0,054	4,26

B: benzeno; T: tolueno; E: etilbenzeno; m,p-Xilenos; o-X: o-Xileno

*k em mg⁻¹·L·dia⁻¹

**t_{1/2} em dias

Nos ensaios com lodo aclimatado (L2) (Tabela 1), 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 maior na série sem cossubstrato (Tabela 1.). 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 1).

Provavelmente, devido ao fato de o L2 ser proveniente de um reator que tratava água contaminada com BTEX e etanol sob condições microaeróbias, 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.

CONCLUSÃO

De maneira geral, para o lodo não aclimatado, a presença de cossubstrato afetou negativamente a degradação anaeróbia de BTEX, enquanto que 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 cossubstrato, 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.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 445054/2014-0), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo apoio financeiro e pela bolsa de doutorado concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. CHAKRABORTY, R.; COATES, J. D. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, n. 4, p. 437–446, 2004.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. FARHADIAN, M. et al. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors-A review. *Water Research*, v. 42, n. 6–7, p. 1325–1341, 2008.
8. 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.
9. 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.
10. FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1125, p. 82–99, 2008.
11. 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.
12. 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.
13. TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 441–446, 2004.
14. VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, v. 223, p. 277–286, 2017.
15. 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.
16. WU, C. et al. Improving hydrolysis acidification by limited aeration in the pretreatment of petrochemical wastewater. *Bioresource Technology*, v. 194, p. 256–262, 2015.