



**COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**CETESB ESCOLA SUPERIOR DA CETESB**  
**CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO: "CONFORMIDADE AMBIENTAL COM**  
**REQUISITOS TÉCNICOS E LEGAIS"**

**Marco Antonio de Brito**

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS 2,4 e 2,6 DI-NITRO-TOLUENO**  
**EM ÁGUA SUBTERRÂNEA ATRAVÉS DE BIORREMEDIAÇÃO EM REATOR (*EX***  
***SITU*)**

**São Paulo**

**2021**





**Marco Antonio de Brito**



**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS 2,4 e 2,6 DI-NITRO-TOLUENO  
EM ÁGUA SUBTERRÂNEA ATRAVÉS DE BIORREMEDIAÇÃO EM REATOR (*EX  
SITU*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Conformidade Ambiental com Requisitos Técnicos e Legais, da Escola Superior da CETESB, como requisito para obtenção do título de especialista em Conformidade Ambiental

Orientador: Prof. Ricardo Marques Taccola

São Paulo

2021

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO

(CETESB – Biblioteca, SP, Brasil)

B876e	<p>Brito, Marco Antonio de Estudo de degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno em água subterrânea através de biorremediação em reator (<i>Ex Situ</i>) / Marco Antonio de Brito. – São Paulo, 2021. 162 p. : il. color. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Ricardo Marques Taccola. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Conformidade Ambiental) – Pós-Graduação Lato Sensu Conformidade Ambiental com Requisitos Técnicos e Legais, Escola Superior da CETESB, São Paulo, 2021. Disponível também em: &lt;<a href="http://cetesb.sp.gov.br/escolasuperior/producao-tecnico-cientifica/">http://cetesb.sp.gov.br/escolasuperior/producao-tecnico-cientifica/</a>&gt;.</p> <p>1. Águas subterrâneas - poluição 2. Biorremediação 3. Produtos químicos 4. São Paulo (SP) 5. Tolueno I. Taccola, Ricardo Marques, Orient. II. Escola Superior da CETESB (ESC). III. Título.</p>
CDD (21. ed. Esp.)	628.114 02868161 363.739 402868161
CDU (2. ed. Port.)	556.388:547.533 (815.6)

Catalogação na fonte: Hilda Andriani de Lima – CRB 8.1861  
Margot Terada – CRB 8.4422

Direitos reservados de distribuição e comercialização.  
Permitida a reprodução desde que citada a fonte.

© CETESB.  
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345  
Pinheiros – SP – Brasil – CEP 05459900  
Site: <<http://cetesb.sp.gov.br/escolasuperior/producao-tecnico-cientifica/>>



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CONFORMIDADE AMBIENTAL COM REQUISITOS TÉCNICOS E LEGAIS



AVALIAÇÃO DOS TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aluno(a):	Marco Antonio de Brito	
Título do trabalho:	Estudo de Degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno em Água Subterrânea através de Biorremediação em Reator (Ex Situ)	Turma: 2018

Avaliadores	Nota	Assinatura
Avaliador 1 Nome: Ana Lucia Pinto de Faria	9,0	
Avaliador 2 Nome: Fernando Ricardo S. Pereira	9,0	
Orientadora Nome: Ricardo Marques Taccola	8,0	
Nota final	9,0	
Aprovado em São Paulo, de outubro de 2021		

Ciência do aluno(a) nome: MARCO A. BRITO	Assinatura 
---	----------------

A aprovação do Trabalho de Conclusão de Curso não significa aprovação, endosso ou recomendação, por parte da CETESB, de produtos, serviços, processos, metodologias, técnicas, tecnologias, empresas, profissionais, ideias ou conceitos mencionados no trabalho.



Dedico este trabalho a minha Família, pelo apoio incondicional e por serem minha fonte de inspiração.

“Se feliz não é ter uma vida perfeita, mas deixar de ser vítima dos problemas e se tornar o autor da sua própria história”

Abrahan Lincoln



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, ao corpo docente da Escola Superior da CETESB, pessoas com quem aprendi muito durante o curso. Em especial ao meu orientador, Ricardo Marques Taccola, que me ajudou revisando, orientando e sugerindo melhorias para apresentação deste trabalho. Às Professoras Lina Ache e Tania Gasi pela orientação na condução deste estudo e pela oportunidade ímpar de aprendizado durante todo o curso. À sempre presente Sonia Ritt, pelo apoio durante o curso, em especial, durante as visitas técnicas, me orientado como chegar às empresas.

Aos meus amigos do grupo de “Veteranos”: Alexandro Welikow (Alemão), Alessandra Lopes, Inácia Sousa e Mario Bove pela parceria de 2 anos. Aos colegas da Turma 3 pelas conversas, discussões, troca de opiniões e experiências.

Aos meus filhos, Vitor e Livia, que sempre me apoiaram e jamais reclamaram dos sábados que não pudemos desfrutar juntos devido às aulas.

A Empresa Dow Brasil, na figura do seu Diretor Global de Remediação, Dr. Paul Van Riet, por ter autorizado o uso dos dados privados da empresa para este trabalho.

Aos profissionais da Consultoria Green Soil pela amostragem de campo, preparação e apoio logístico na condução experimento.

A Deus, pelo dom da vida e por conceber-me o privilégio de estar sempre aprendendo...

Muito Obrigado!



## RESUMO

O objetivo deste trabalho consiste em avaliar se ocorre a degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno pela ação de micro-organismos presentes na água subterrânea contaminada, busca-se uma técnica alternativa, economicamente viável e sustentável para a reabilitação de uma área industrial, atualmente desativada. Para tanto, realizou-se um estudo de laboratório realizado com o objetivo de validar o conceito de biodegradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno, bem com identificar as condições mais favoráveis para esta degradação, deste modo, utilizou-se 3 condições no experimento de bancada: condição anaeróbia/aeróbia; condição anaeróbio/aeróbio (transição anaeróbio para aeróbio) e condição totalmente aeróbica. Os resultados obtidos em teste de bancada comprovaram a biodegradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno, e de seus subprodutos nas condições utilizadas no estudo, por micro-organismos nativos. A conclusão final é que tais resultados sugerem ser viável a biodegradação estimulada de tais compostos em escala industrial.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Água Subterrânea. 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno.



## **ABSTRACT**

The objective of this work is to evaluate if the degradation of compounds 2,4 and 2,6 Di-Nitro-Toluene occurs by the action of microorganisms present in the contaminated groundwater, an alternative, economically viable and sustainable technique is sought for the rehabilitation of an industrial area, deactivated. To this end, a laboratory study was carried out with the aim of validating the biodegradation concept of compounds 2,4 and 2,6 Di-Nitro-Toluene, as well as identifying the most favorable conditions for this degradation, thus, 3 conditions were used in the bench experiment: anaerobic / aerobic condition; anaerobic / aerobic condition (anaerobic to aerobic transition) and totally aerobic condition. The results obtained in a bench test proved the biodegradation of compounds 2,4 and 2,6 Di-Nitro-Toluene, and their by-products under the conditions used in the study, by native microorganisms. The final conclusion is that such results obtained will be viable to stimulated biodegradation of such compounds on an industrial scale.

**Keywords:** Bioremediation. Groundwater. 2,4 and 2,6 Di-Nitro-Toluene.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Técnicas de remediação declaradas no cadastro de áreas contaminadas da CETESB.....	3
Figura 2 – Ciclo de Degradação Anaeróbica do 2,4 Di-Nitro-Tolueno .....	8
Figura 3 – Ciclo de Degradação Aeróbica do Di-Nitro-Tolueno .....	9
Figura 4 – Reação de Degradação do Etanol.....	10
Figura 5 – Ciclo de Degradação Anaeróbica do DNT .....	11
Figura 6 – Ciclo de Degradação Completo do 2,4 Di-Nitro-Tolueno Utilizando Metanol como Doador de Elétron .....	11
Figura 7 – Água subterrânea analisada em laboratório.....	19
Figura 8 – Preparação das amostras pelos técnicos .....	21
Figura 9 – Biorreatores – Processo Anaeróbio Fase I .....	24
Figura 10 – Biorreatores – Processo Anaeróbio Fase II (aeróbia) .....	30
Figura 11 – Biorreatores Incubados – Processo Aeróbio.....	32
Figura 12 – Degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno – Condição Anaeróbia/Aeróbia .....	36
Figura 13 – Degradação do 2,6 Di-Nitro-Tolueno – Condição Anaeróbia/Aeróbia .....	37
Figura 14 – Degradação do 2 Nitro Tolueno (Condição Anaeróbia/Aeróbia) .....	39
Figura 15 – Degradação do 3 Nitro Tolueno (Condição Anaeróbia/Aeróbia) .....	39
Figura 16 – Degradação do 4 Nitro Tolueno (Condição Anaeróbia/Aeróbia) .....	40
Figura 17 – Comparativo resultados 2,4 e 2,6 Di-Nitro Tolueno com produtos de degradação para condição Anaeróbia AN3 (Doador de elétrons Dehalo-GS) ...	42
Figura 18 – Comparativo resultados 2,4 e 2,6 Di-Nitro Tolueno com produtos de degradação para condição Anaeróbia AN4 (Doador de elétrons Dehalo-GS + pH ajustado) .....	43
Figura 19 – Comparativo resultados Nitro Tolueno x Amino Tolueno para condição Anaeróbia AN4 (Doador de elétrons Dehalo-GS + pH ajustado) .....	44
Figura 20 – Resultados pH para os biorreatores sob condições Anaeróbia/Aeróbia .....	45
Figura 21 – Resultados Oxigênio Dissolvido para os biorreatores sob condições Anaeróbia/Aeróbia.....	46
Figura 22 – Resultados Potencial Oxidação/Redução para os biorreatores sob condições Anaeróbia/Aeróbia.....	48
Figura 23 – Resultados 2,4 Di-Nitro Tolueno para os biorreatores sob condição .....	49
Figura 24 – Resultados 2,6 Di-Nitro Tolueno para os biorreatores sob condição Aeróbia.....	51
Figura 25 – Resultados do 2 Nitro Tolueno.....	52
Figura 26 – Resultados do 3 Nitro Tolueno.....	53
Figura 27 – Resultados do 4 Nitro Tolueno.....	54
Figura 28 – Resultados da formação de Nitrito sob condição Aeróbia.....	55
Figura 29 – Resultados pH para os biorreatores sob condição Aeróbia.....	56
Figura 30 – Resultados Oxigênio dissolvido para o experimento Aeróbio.....	57
Figura 31 – Resultados Potencial de Oxidação / Redução Experimento sob condição Aeróbia .....	58

Figura 32 – Rota Oxidativa de Degradação do 2,4 Di Nitro Tolueno.....	59
Figura 33 – Rota Redutiva Regradação do 2,4 Di Nitro Tolueno .....	60
Figura 34 – Ciclo de Degradação Aeróbia do 2,6 DNT por <i>Achromobacter xylosoxidans</i> .....	60
Figura 35 – Dioxigenase do Naftaleno.....	61
Figura 36 – Biorreator AN2 (Branco) .....	63
Figura 37 – Biorreator AN3 (Dehalo-GS) – Fase I - Condição Anaeróbia .....	64
Figura 38 – Biorreator AN4 (Dehalo-GS + pH Ajustado) - Fase I - Condição Anaeróbia.....	66
Figura 39 – Biorreator AN3 (Dehalo-GS) - Fase II - Condição Aeróbia .....	68
Figura 40 – Biorreator AN4 (Dehalo-GS + pH Ajustado) - Fase II - Condição Aeróbia.....	69
Figura 41 – Biorreator AE1 (Esterilizado) - Condição Aeróbia .....	72
Figura 42 – Biorreator AE2 (Branco) .....	73
Figura 43 – Biorreator AE3 (Fósforo) - Condição Aeróbia.....	76
Figura 44 – Biorreator AE4 (Fósforo + Nitrogênio + pH ajustado) - Condição Aeróbia.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades Físico Químicas do 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno .....	7
Tabela 2 – Micro-Organismos Capazes de Degradar Di-Nitro-Toluenos .....	14
Tabela 3 – Toxicidade de Nitrotoluenos .....	16
Tabela 4 – Critérios de classificação de Carcinogenicidade .....	17
Tabela 5 – Carcinogenicidade dos Dinitrotoluenos e Produtos de Degradação .....	17
Tabela 6 – Indicadores, Aditivos e Parâmetros de Monitoramento .....	20
Tabela 7 – Condições definidas para biorreatores do Processo Anaeróbio-Fase I .....	23
Tabela 8 – Preparação dos Biorreatores para condições Anaeróbia/Aeróbia ...	25
Tabela 9 – Parâmetros de Monitoramento e Controle do Processo Anaeróbio Fase I .....	25
Tabela 10 – Compostos de Interesse (CDI) .....	27
Tabela 11 – Plano de Amostragem do Processo Anaeróbio Fase I e Fase II .....	27
Tabela 12 – Condições definidas para biorreatores do Processo Anaeróbio Fase II .....	28
Tabela 13 – Parâmetros de Monitoramento e Controle do Processo Anaeróbio-Fase II .....	29
Tabela 14 – Plano de Amostragem do Processo Anaeróbio Fase I e Fase II .....	29
Tabela 15 – Condições definidas para biorreatores do Processo Aeróbio .....	31
Tabela 16 – Preparação dos Biorreatores para condição Aeróbia .....	32
Tabela 17 – Parâmetros de Monitoramento e Controle do Processo Aeróbio ...	33
Tabela 18 – Parâmetros de Monitoramento e Controle do Processo Totalmente Aeróbio .....	34
Tabela 19 – Plano de Amostragem do Processo Anaeróbio .....	34
Tabela 20 – Resultados de Análises da Amostra “Bruta” .....	35
Tabela 21 – Seleção dos Biorreatores para Avaliação Bacteriológica NGS .....	62



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas  
AN – Amino Tolueno  
Atm-M<sub>3</sub>/mol – Atmosféra-Métro Cúbico por Mol  
*Cas Number* – Registro de Produto Químico  
CDI – Compostos de Interesse  
CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo  
CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> - Íon Acetato  
CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono (gás carbônico)  
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente  
COT – Carbono Orgânico Total  
DAT - Diamino Tolueno  
DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano  
Dehalo-GS – Agente doador de elétrons (Marca Comercial)  
DMOHA - Ácido 2,4 Dienóico-2-Hidroxi-5-Nitro-6-Oxohepta  
DQO – Demanda Química de Oxigênio  
*Ex Situ* – Fora do local de origem  
g/mol – Gramas por Mol  
H<sub>2</sub> – Gás Hidrogênio  
HgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Mercúrio  
*In Situ* – No local de origem  
L - Litro  
Log K<sub>oc</sub> – Coeficiente de Partição  
Log K<sub>ow</sub> – Potencial de bioacumulação  
*Love Chanel* – Antiga área de disposição de resíduos – Estados Unidos  
mg/L – Miligramas por litro  
ml - Mililitros  
mmHg – Milímetros de Mercúrio  
N – Nitrogênio  
N<sub>2</sub> – Gás Nitrogênio  
NGS – Sequenciamento de Próxima Geração (*Next Generation Sequencing*)  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Íon Nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Íon Nitrato  
NT - Nitrotolueno  
°C – Graus Celsius  
OD – Oxigênio Dissolvido  
ODCB - Orto-Diclorobenzeno  
P- Fósforo  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
PO<sub>4</sub><sup>-2</sup> – Íon Fosfato  
Redox – Potencial de Oxidação e redução  
TDI - Tolueno Diisocianato  
TNT – Tri Nitro Tolueno  
USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	OBJETIVO .....	5
	2.1 OBJETIVO GERAL .....	5
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	6
	3.1 CONCEITOS E PESQUISAS .....	6
	3.2 BIODEGRADAÇÃO E BIOREMEDIAÇÃO .....	12
	3.3 BIOESTIMULAÇÃO E BIOAUGUMENTAÇÃO .....	12
	3.4 MICRO ORGANISMOS DEGRADADORES DE DNT's .....	13
	3.5 DOADORES DE ELÉTRONS NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO .....	15
	3.6 TOXICIDADE DOS 2,4 E 2,6 DINITRO-TOLUENOS E SUB PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO .....	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
	4.1 CONDIÇÃO ANAERÓBIA/AERÓBIA – FASE I (ANAERÓBIA) .....	21
	4.1.1 Preparação dos Ensaios de Bancada .....	21
	4.1.2 Preparação dos Biorreatores e Parâmetros de Controle .....	25
	4.1.3 Compostos de Interesse e Plano e Amostragem para Análises .....	26
	4.2 Processo Anaeróbio/Aeróbio – Fase II (Transição Anaeróbio Para Aeróbio) .....	27
	4.2.1 Parâmetros de Monitoramento e Controle .....	28
	4.2.2 Plano De Amostragem Para Análises .....	29
	4.3 CONDIÇÃO TOTALMENTE AERÓBIA .....	30
	4.3.1 Preparação dos Biorreatores .....	32
	4.3.2 Parâmetros de Monitoramento e Controle .....	33
	4.3.3 Plano de Amostragem para Análises .....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
	5.1 PROCESSO ANAERÓBIO/AERÓBIO .....	35
	5.1.1 2,4 Di-Nitro Tolueno .....	36
	5.1.2 2,6 Di-Nitro Tolueno .....	37
	5.1.3 Nitro Tolueno (Isômeros) .....	38
	5.1.4 Comparativo dos Resultados 2,4 e 2,6 Di-Nitro Tolueno com Produtos de Degradação para Condição Anaeróbia – Biorreatores AN3 E AN4. ....	41
	5.1.5 pH para os Biorreatores Sob Condições Anaeróbia/Aeróbia. ....	44
	5.1.6 Oxigênio Dissolvido para os Biorreatores Sob Condições Anaeróbias/Aeróbias .....	45
	5.1.7 Íon Nitrato para os Biorreatores Sob Condições Anaeróbias/Aeróbias .....	46
	5.2 PROCESSO TOTALMENTE AERÓBIO .....	48

5.2.1	2,4 Di-Nitro Tolueno .....	48
5.2.2	2,6 Di-Nitro Tolueno para os Biorreatores Sob Condição Aeróbia .....	50
5.2.3	Isômeros do Nitro Tolueno .....	52
5.2.4	Formação de Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) Sob Condição Aeróbia .....	55
5.2.5	pH para os Biorreatores Sob Condição Aeróbia .....	55
5.2.6	Oxigênio Dissolvido.....	57
5.2.7	Potencial de Oxidação/Redução. Experimento Sob Condição Aeróbia ....	57
5.3.	ANÁLISE BACTERIOLÓGICA NGS ( <i>Next Generation Sequencing</i> ).....	58
5.3.1	Biorreator AN2 (Branco).....	62
5.3.2	Biorreator AN3 (Dehalo-GS) – Fase I – Condição Anaeróbia .....	64
5.3.3	Biorreator AN4 (Dehalo-GS + pH Ajustado) - Fase I – Condição Anaeróbia .....	65
5.3.4	Biorreator AN3 (Dehalo-GS) E AN4 (Dehalo-GS + pH Ajustado) - Fase II – Condição Anaeróbia/Aeróbia .....	67
5.3.5	Biorreator AE1 Esterilizado (Cloreto de Mercúrio) – Condição Aeróbia ....	70
5.3.6	Biorreator AE2 (Branco).....	72
5.3.7	Biorreator AE3 (Fósforo) – Condição Aeróbia.....	75
5.3.8	Biorreator AE4 (Fósforo + Nitrogênio + pH Ajustado) – Condição Aeróbia. ....	77
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

No último século, principalmente, a partir da segunda guerra mundial, houve um grande desenvolvimento da sociedade. A população mundial mais que triplicou neste período, gerando uma demanda crescente de bens e serviços.

A revolução industrial seguiu na esteira deste crescimento, desenvolvendo, produzindo e oferecendo, cada vez mais, produtos manufaturados à sociedade. Impacto desta produção crescente de bens e serviços sobre o meio ambiente estava fora de questão, aliás, o meio ambiente era considerado um meio de descarte. Resíduos de todos os tipos eram despejados nos rios ou enterrados, bem como emissões de produtos químicos altamente tóxicos liberados na atmosfera sem nenhum critério. O meio ambiente vem pagando um preço alto pelo desenvolvimento da sociedade e passivos ambientais espalhados pelo planeta evidenciam isto.

Nas últimas décadas, entretanto, a sociedade tem voltado sua atenção as questões ambientais, haja vista realização de diversas convenções e iniciativas voltadas a preservação do meio ambiente (Protocolo de Estocolmo, Kyoto, Montreal, Rio +20, entre outros). Com isso atualmente verifica-se a implementação de esforços científicos e sociais para a implementação de programas para reabilitar áreas contaminadas.

Os passivos ambientais históricos tornaram-se uma preocupação para a sociedade, uma vez que as práticas de disposição de resíduos adotadas no passado, por exemplo, enterrar tais materiais, não eliminava o problema, ao contrário, criava-se um tipo de bomba relógio a ser acionada no futuro. Muitos produtos produzidos no passado com o objetivos de trazer benefícios à sociedade, descobriu-se, tempos depois, tinham efeitos muito mais nocivos que os benefícios a eles atribuídos, por exemplo, a família dos Dicloro-difenil-tricloroetano, popularmente, conhecidos como DDTs, apresentados à sociedade com um inseticida, mas, que, anos depois, descobriu-se serem extremamente tóxicos aos seres humanos, além de mutagênico e Carcinogênico (USEPA, 2013).

Além da toxicidade, muitos produtos apresentam características de persistência no meio ambiente, ou seja, não degradam rapidamente e contaminam o meio ambiente por décadas, às vezes, séculos. Uma vez que os contaminantes

atingem o solo e água subterrânea pode ocorrer um espalhamento vertical e horizontal da contaminação, atingindo rios, córregos, nascentes e etc. Gerando impacto negativo para a fauna, flora e sociedade como um todo.

Os países mais industrializados foram os que mais geraram passivos ambientais. Existem estudos de caso famosos, como por exemplo, “Love Chanel”, nos Estados Unidos, onde uma antiga área de disposição de resíduos, utilizada por diversas indústrias, foi abandonada e, posteriormente, convertida em área residencial. Os efeitos desta ocupação foram devastadores para os residentes do local. Várias pessoas desenvolveram doenças de efeito agudo e crônico relacionadas à exposição aos produtos químicos. Algumas pessoas vieram a óbito.

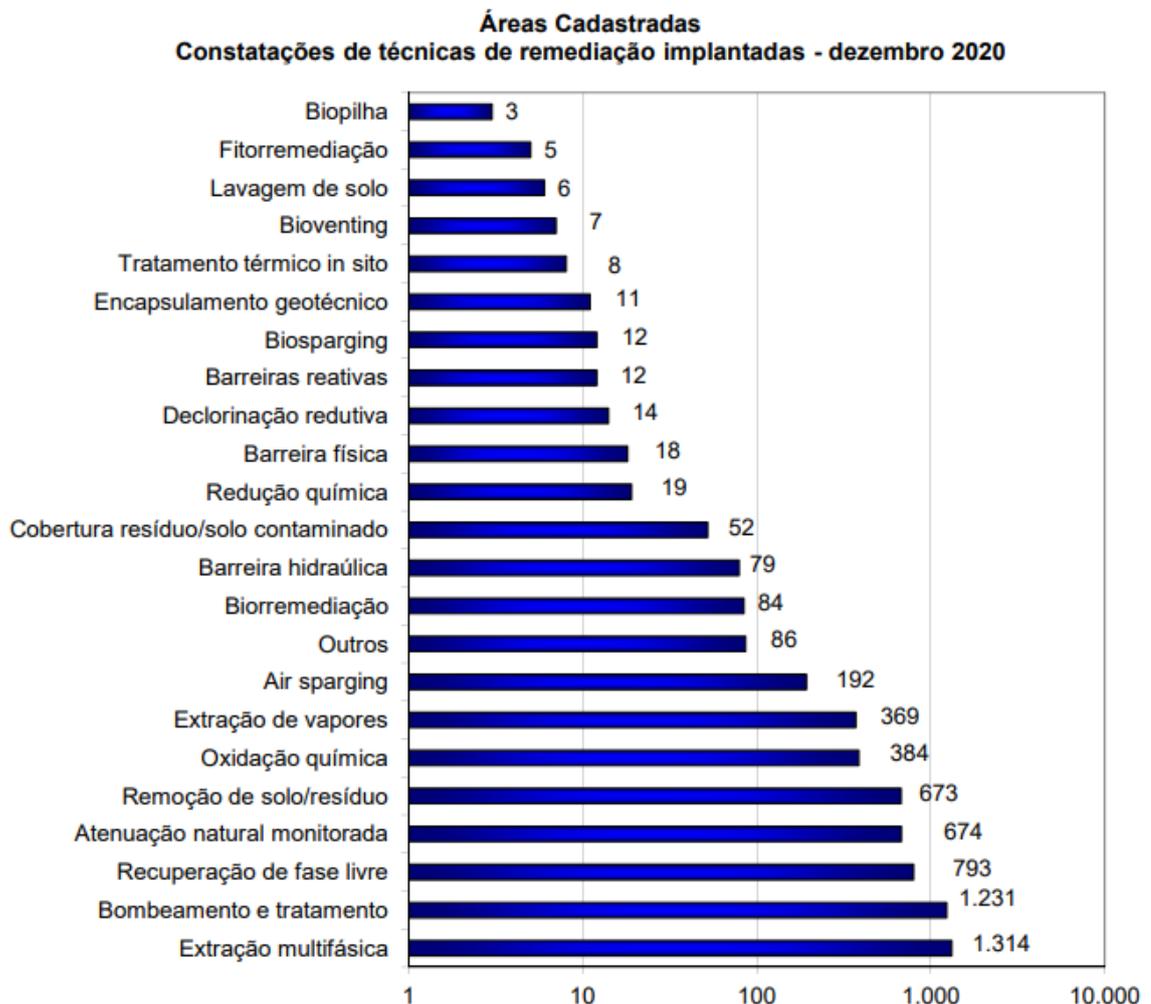
Outro caso icônico foi o caso “Minamata”, que faz referência ao nome de uma cidade localizada na província de Kumamoto, Japão. A doença de Minamata foi descoberta pela primeira vez em 1956 e foi causada pela liberação de metilmercúrio nas águas residuais industriais da fábrica química da Chisso Corporation, despejadas na baía da cidade de 1932 a 1968. Como uma típica cidade costeira japonesa os habitantes de Minamata viviam da atividade pesqueira. Os resíduos contendo mercúrio eram despejados no mar e contaminavam peixes e outros organismos marinhos que eram consumidos pelos habitantes locais. O envenenamento da população pelo mercúrio trouxe um agravamento do quadro neurológico deflagrando diversos sintomas como ataxia, dormência nas mãos e pés, fraqueza muscular geral, perda da visão periférica e danos à audição e à fala. Em casos extremos, insanidade, paralisia, coma e morte ocorrem algumas semanas após o início dos sintomas. Efeitos mutagênicos também foram observados na população de Minamata (TSUDA et al., 2009).

Nas últimas décadas países como Holanda, Estados Unidos, Japão, Canada e Austrália tem liderado iniciativas como objetivo de recuperar áreas contaminadas através de pesquisas, regulamentação/normatização, desenvolvimento de tecnologias de remediação, publicação de guias de orientação, padrões de referência, entre outros, incluindo a criação de fundos para o financiamento de áreas abandonadas/órfãs, cujas empresas que contaminaram não existem mais, não

podem arcar com os custos de remediação ou onde o poluidor é simplesmente desconhecido.

As técnicas de remediação de áreas contaminadas são muito diversas e utilizam princípios e conceitos da química, física, hidrologia, geologia, biologia, entre outros, associadas à aos conceitos de engenharia (CETESB, 2013). Podem ser implementadas no local da contaminação (*In Situ*) ou em outro local (*Ex situ*) (HUDCOVA et al., 2001). Muitas das técnicas de remediação desenvolvidas em outros países já são aplicadas no Brasil. A figura 1 ilustra as técnicas mais utilizadas no Estado de São Paulo pela CETESB.

**Figura 1 – Técnicas de remediação declaradas no cadastro de áreas contaminadas da CETESB**



Fonte: CETESB (2020)

Dentre as diversas técnicas disponíveis para remediação de áreas contaminadas é necessária a realização de estudos de viabilidade, testes de bancada e pilotos de campo. Tais estudos visam selecionar a técnica mais adequada ao(s) composto(s) químico(s) contaminante(s), às condições do meio físico (hidrogeologia do local, temperatura, interferência abaixo e acima do solo, corpos d'água e meios de recarga do aquífero, requisitos regulamentares, disponibilidade de tecnologia, prazos, custos, etc...) para uma implementação exitosa da remediação.

Este trabalho está diretamente relacionado a busca de alternativa técnica, economicamente viável e sustentável para a reabilitação de uma área industrial, atualmente, desativada, mas que operou por 4 décadas, desde de 1973, produzindo matérias primas para a indústria de Poliuretanos e que apresenta um passivo ambiental, mais especificamente, solo e água subterrânea contaminados pelos produtos químicos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno .

Com custo relativamente menor que as técnicas convencionais (Oxidação/Redução química, Dessorção Térmica, escavação e incineração, etc...), a Biodegradação estimulada vem se desenvolvendo e sendo aplicada mais frequentemente na remediação de área contaminadas (HUDCOVA et al., 2001; KÜCE, CORAL & KANTAR, 2015; DEBASREE, CHINMAY & AMBALAL, 2015; NISHINO, PAOLI & SPAIN, 2000; ABURTO MEDINA et al., 2017).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho consiste em avaliar se ocorre a degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno pela ação de micro-organismos presentes na água subterrânea.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A. Medir a eficácia do processo de degradação variando os cenários (adição de bioestimuladores, correção de pH e concentrações de oxigênio dos biorreatores);
- B. Avaliar quantitativa e qualitativamente os subprodutos gerados a partir da degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno;
- C. Entender as limitações do processo de biodegradação em função dos resultados obtidos;
- D. Avaliar viabilidade de aplicação em campo.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CONCEITOS E PESQUISAS

Os compostos Nitrogenados: Tri-Nitro-Tolueno (TNT), Di-Nitro-Tolueno (DNT), Nitro-Tolueno (NT) são utilizados na fabricação de diversos materiais de uso cotidiano da população, bem como em armamentos de uso militar. Os processos de síntese industrial destes materiais datam do início do século passado. Ao longo dos anos várias áreas industriais e bases militares foram contaminadas pelos Nitro-Toluenos e seus produtos de degradação (USEPA, 2013).

No Brasil, uma antiga fábrica de Tolueno Di Isocianato da Dow Brasil, que operou por décadas e manipulou as substâncias 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno, contaminou o solo e água subterrânea da unidade com estes produtos químicos.

As substâncias 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno são reconhecidamente tóxicas, sendo classificadas como potencialmente carcinogênicas aos seres humanos (USEPA, 2013; DARKO-KAGYA, KHODADOUST & REDDY, 2010). Por não serem produtos tão comuns, como os organoclorados, por exemplo, não existe literatura abundante, no Brasil, sobre a degradação destes produtos. Todavia, existem muitos casos publicados de remediação exitosa destes compostos, principalmente no Estados Unidos e as técnicas aplicadas nestes casos foram tratamentos químicos de oxidação ou redução, fotólise, ozonização, hidrólise alcalina e biodegradação (USEPA, 2013; NISHINO & SPAIN, 2001).

Os compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno são utilizados como matérias primas na síntese do 2,4 e 2,6 Tolueno Disocianato (TDI), que por sua vez é um produto utilizado, mundialmente, na produção de espumas e outros materiais de poliuretano. O DNT é um produto químico que, a temperatura ambiente, apresenta-se na forma de cristais sólidos de aparência amarelada. Possui densidade maior que a água e solubilidade relativamente baixa (USEPA, 2013), as propriedades Físico Químicas do 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1 – Propriedades Físico Químicas do 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno**

Característica	2,4 DNT	2,6 DNT
Cas number	121-14-2	606-20-2
Descrição física	Sólido Amarelo	Sólido Amarelo Avermelhado
Peso molecular (g/mol)	182,14	182,14
Solubilidade em água a 22°C (mg/L)	300	180
Ponto de Fusão (°C)	71	66
Porto de Ebulição (°C)	300	285
Pressão de Vapor a 258°C (mmHg)	$1,47 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-4}$
Gravidade Especifica/Densidade	1,32 a 71°C	1,28 a 111 °C
Coefficiente de Partição Octano-Água (Log K <sub>ow</sub> )	1,98	1,72
Coefficiente de Partição Carbono-Água (Log K <sub>oc</sub> )	1,65	1,96
Constante de lei de Henry (atm·m <sup>3</sup> /mol)	$8.79 \times 10^{-8}$	$9,26 \times 10^{-8}$

Fonte: USEPA (2013)

Para processamento na indústria (produção de TDI), os isômeros 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno são, normalmente, dissolvidos em Orto-Diclorobenzeno (ODCB). A dissolução do DNT em ODCB facilita o bombeamento, bem como as reações no processo produtivo para a obtenção do Tolueno Diisocianato (TDI). As contaminações de solo e água subterrânea por DNTs ocorrem por conta de vazamentos durante a manipulação do produto ou práticas antigas de disposição. Por serem mais densos que a água, ambos isômeros se alojam nas porções mais profundas do aquífero, caso não encontrem nenhuma barreira física ou camada de solo/argila confinante.

No Estados Unidos, existem várias áreas contaminadas por 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno (DNT) e Trinitrotolueno (TNT). Na maioria dos casos, as áreas contaminadas são bases militares ativas ou desativadas (USEPA, 2013). O Di-Nitro-Tolueno é considerado uma substância tóxica para a maioria dos organismos, potencialmente carcinogênico (USEPA, 2013; DARKO-KAGYA, KHODADOUST & REDDY, 2010).

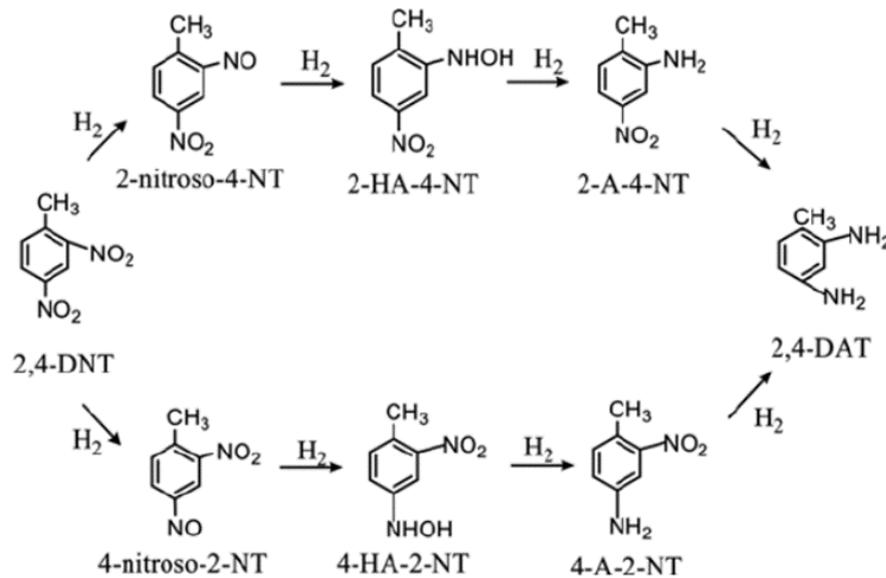
A degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno pode ocorrer em ambiente aeróbico e anaeróbico (HUANG et al., 2015; NOGUEIRA & FREEDMAN, 1996; YANG, ZHAO & HAWARI, 2009; ABURTO-MEDINA et al., 2017; NISHINO & SPAIN, 2001). Estudos revelam que o 2,4 DNT degrada mais facilmente que o 2,6 DNT no meio ambiente (NISHINO & SPAIN, 2004).

Obviamente, as concentrações dos contaminantes são determinantes para a ocorrência, bem como a velocidade da biodegradação (NISHINO & SPAIN, 2001).

Alguns estudos foram realizados para avaliar a mais alta concentração de 2,4 e 2,6 DNT na qual há uma degradação sustentada sob condições aeróbicas, todavia, tais estudos não foram definitivos, pois as condições do meio influenciam diretamente o comportamento dos micro-organismos frente às diferentes concentrações de contaminantes (HUANG et al., 2015).

Algumas publicações relatam a degradação dos DNTs de diferentes formas, sendo mais frequente a anaeróbia, sem a presença de oxigênio, gerando como produtos intermediários os compostos 2 Amino 4 Nitrotolueno (2,4 Nitrotolueno); 4 Amino 2 Nitrotolueno (4A2NT); 2 Amino 6 Nitrotolueno (2A6NT); 2,4 Amino Tolueno; 2,6 Amino Tolueno (HUANG et al., 2015).

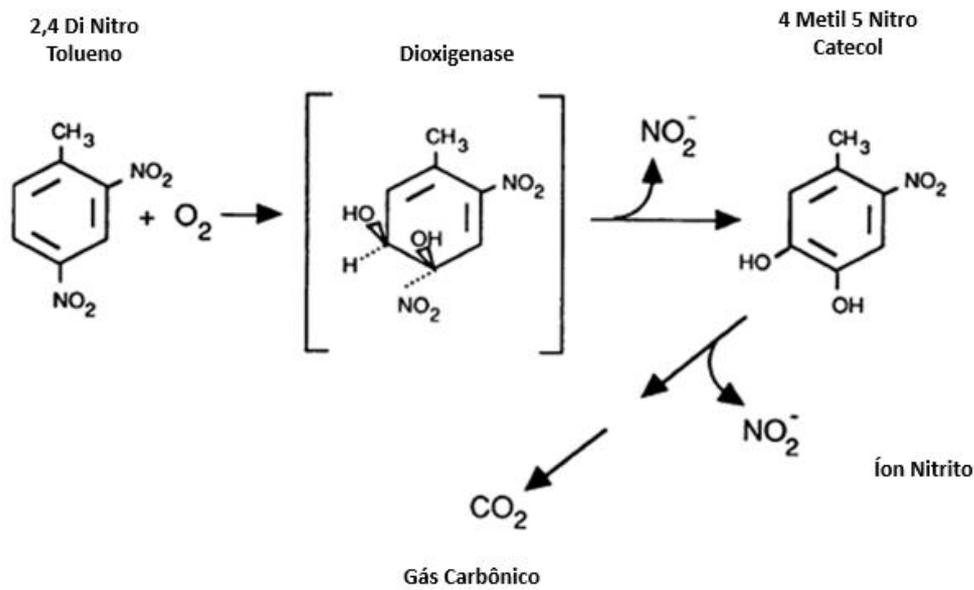
**Figura 2 – Ciclo de Degradação Anaeróbica do 2,4 Di-Nitro-Tolueno**



Fonte: HUANG et al., 2015

Outro método de degradação aplicável aos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno é o aeróbio (Figura 3), sob presença de oxigênio, cujos produtos intermediários formados são 4 Metil 5 Nitrocatecol (4M5NC), 3 Metil1,4 Catecol (3M1,4C), Ácido 2,4 Dienóico-2-Hidroxi-5-Nitro-6-oxohepta (DMOHA), Ácido 2,4 Dienóico-2-Hidroxi-5-Nitropenta (SANGGORD et al., 1991; SUEN & SPAIN, 1993; NISHINO, PAOLI & SPAIN, 2000; HAN SUNGSOO, 2008).

**Figura 3 – Ciclo de Degradação Aeróbica do Di-Nitro-Tolueno**



Fonte: HAN SUNGSOO, 2008

Dentre as publicações sobre o tema, observa-se que, além das condições relativas à presença ou ausência de oxigênio (meio anaeróbico ou aeróbico), o processo de degradação também é fortemente influenciado pelas condições do meio.

Entre as influências, o processo de biodegradação é acelerado pela presença de fontes de carbono, cuja função é doar elétrons na metabolização e co-metabolização realizada pelos microrganismos (NOGUEIRA & FREEDMAN, 1996).

Como doador de elétrons, o etanol tem sido popularmente usado na redução química de compostos não biodegradáveis (SPONZA & ATALAY, 2004). Sob condições anaeróbicas, o etanol pode ser convertido em CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> (acetato) e H<sub>2</sub> (hidrogênio) (ADRIAN & ARNETT, 2007), conforme figura 4.

**Figura 4 – Reação de Degradação do Etanol**

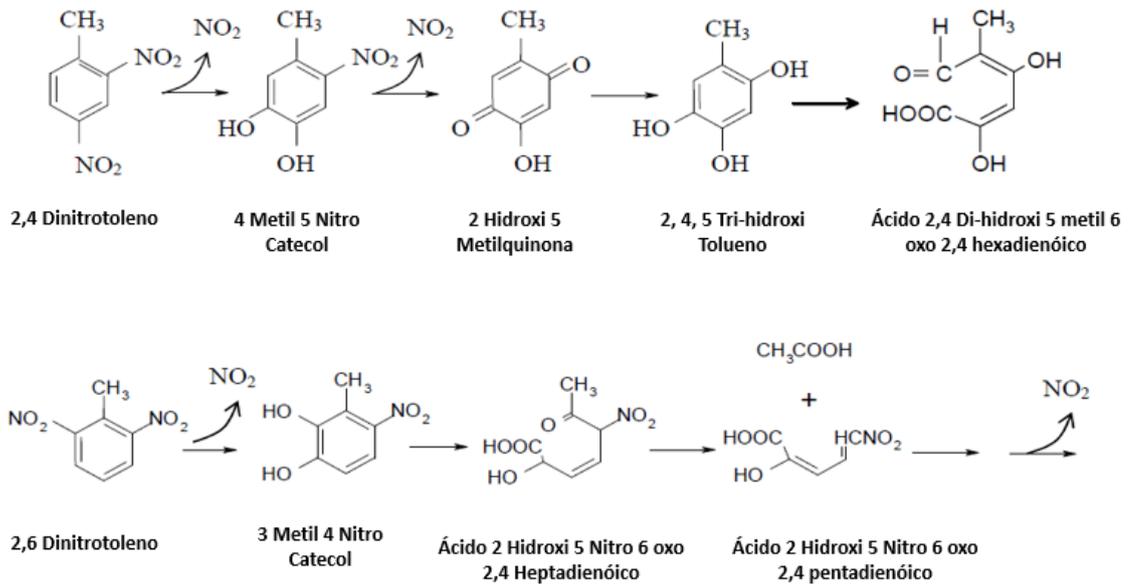


Fonte: ADRIAN & ARNETT, 2007

Além do etanol, outras fontes de carbono, tais como, lactato, óleo vegetal, propileno glicol e metanol também são citadas em estudos de biodegradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno (WANG et al., 2011; ZHANG, 2000; SPANGGOR et al., 1991; PACA et al., 2009; ADRIAN & ARNETT, 2007).

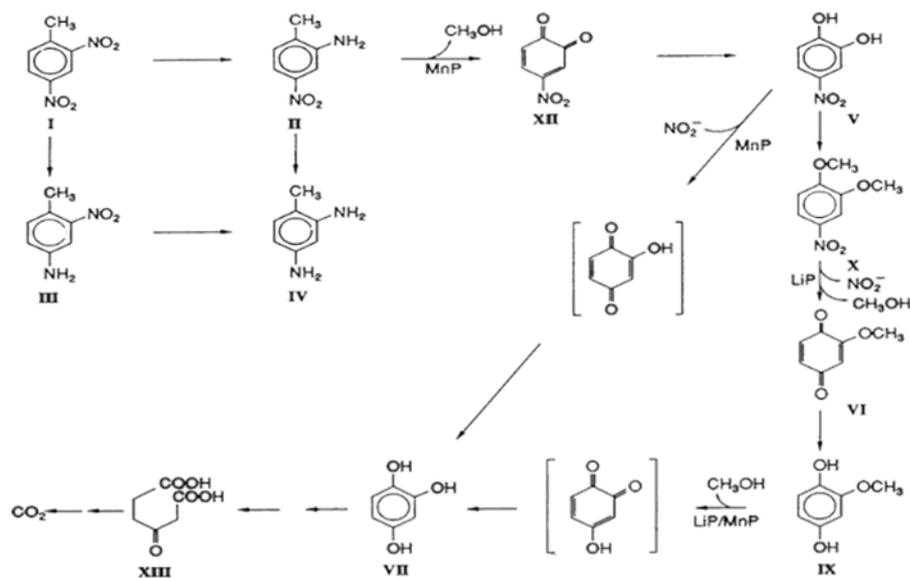
Microrganismos conhecidos como a *Pseudomonas sp* foram identificados como agentes que promovem a degradação dos DNTs por oxidação via co-metabolismo (Figura 5). Com a adição de etanol ao meio como fonte de carbono ocorre a proliferação de microrganismos capazes de realizar a degradação dos DNTs via processos de oxidação, bem como de outros microrganismos que promovem a redução dos DNTs, também, via co-metabolismo (SPONZA & ATALAY, 2004; NISHINO, SPAIN & HE, 2000). Oxidação e redução ocorrendo ao mesmo tempo promovem caminhos distintos de biodegradação dos DNTs (FREEDMAN et al., 1996). Em experimentos realizados na Base de Munição do Exército Norte Americano de Redford, contaminada por TNTs e DNTs, foi observada uma acentuada proliferação da *Pseudomona aeruginosa* após estimulação com adição de etanol. Os subprodutos resultantes da degradação dos TNTs e DNTs por *Pseudomonas* são 2-amino 4-Nitrotolueno e 4-amino 2-Nitrotolueno (FREEDMAN et al., 1996).

**Figura 5 – Ciclo de Degradação Anaeróbica do DNT**



Fonte: HANG SUNGSOO, 2008

**Figura 6 – Ciclo de Degradação Completo do 2,4 Di-Nitro-Tolueno Utilizando Metanol como Doador de Elétron**



Fonte: NISHINO, SPAIN & HE, 2000

### **3.2 BIODEGRADAÇÃO E BIOREMEDIAÇÃO**

A biodegradação ocorre quando microrganismos utilizam substâncias orgânicas naturais ou sintéticas como fonte de carbono e energia (ANTIZAR-LADISLAO, 2010).

A biorremediação é o processo no qual se empregam organismos vivos, tais como, bactérias, fungos ou plantas para degradar contaminantes que poluem solo e águas subterrâneas contaminadas (HORST et al., 2018).

Tal processo também é mencionado em algumas publicações como “*Nature Based Engineering*” (Engenharia Baseada na Natureza) e tem sido muito bem aceito pela comunidade científica como uma alternativa principal ou complementar aos processos de remediação tradicionais como oxidação/redução química, tratamento termal, entre outros para o tratamento de áreas contaminadas. Devido à complexidade química dos diferentes contaminantes, um processo de biorremediação bem-sucedido é dependente da diversidade microbiana existente (MORAES, TEIXEIRA & MAXIMIANO, 2014).

A Biorremediação também é caracterizada pela estimulação dos microrganismos que ocorrem naturalmente na área contaminada para potencializar a degradação biológica dos contaminantes orgânicos (MORAES, TEIXEIRA & MAXIMIANO, 2014).

Os processos de biorremediação podem ser aplicados *in situ* ou *ex situ*. Em ambos os casos, esses processos podem ser acelerados pela adição de substâncias que estimulem o enriquecimento da população microbiana nativa, ou seja, própria do local.

### **3.3 BIOESTIMULAÇÃO E BIOAUGUMENTAÇÃO**

A bioestimulação pode ser realizada por meio da adição de sais, fontes de carbono (doadores de elétrons), oxigênio, nitrato, sulfato e dióxido de carbono (aceptores de elétrons) e enzimas extracelulares ao ambiente a ser remediado, assim como, correção de umidade e pH, entre outras possibilidades. O objetivo da bioestimulação é desenvolver um meio favorável para a proliferação das colônias de bactérias, disponibilização e metabolização do contaminante (GAYLARDE, BELLINASSO & MANFIO, 2005).

Mais recentemente, a utilização de nanopartículas vem sendo aplicada para favorecer alguns processos de biorremediação por meio de alteração do potencial redutor do ambiente (XIU et al., 2010). A bioestimulação pode ser generalista ou específica, visando favorecer um grupo de microrganismos de interesse (RIEGER et al., 2002). A suplementação específica tende a ser mais eficiente, mas depende muito do conhecimento prévio da microbiologia local (RIEGER et al., 2002).

Já a bioaugmentação é o processo de adição de culturas bacterianas puras pré-adaptadas, adição de consórcios microbianos pré-adaptados ou introdução de bactérias geneticamente modificadas. Os microrganismos inseridos podem ter sido previamente isolados do próprio meio ambiente ou selecionados de outras culturas. Todas essas estratégias levam à adição de genes relevantes para o processo de biodegradação, que podem, eventualmente, ser transferidos para microrganismos já existentes no local por meio de processos de transferência horizontal de genes (TRIGO et al., 2009).

Uma vez comprovada a capacidade de degradação por um determinado microrganismo, ou ainda pela combinação de várias espécies (consórcios), deve-se adotar um modelo de estudo em microcosmo para verificar o potencial de adaptação/competição com a microbiota nativa, comparando-se os resultados e a cinética obtidos (MORAES, TEIXEIRA & MAXIMIANO, 2014).

Importante salientar que um processo de biorremediação por microrganismos não nativos é tecnicamente possível, mas seu uso pode trazer riscos à biodiversidade local e está sujeito à aprovação da autoridade competente. No território brasileiro a lei regulamentadora é a Lei da biodiversidade brasileira, lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015 (BRASIL, 2015).

### **3.4 MICRO ORGANISMOS DEGRADADORES DE DNT's**

A biodegradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno já foi citada como uma alternativa técnica e economicamente viável (HUDCOVA et al., 2001; JONHSON et al., 2000; KÜCE, CORAL & KANTAR, 2015; DEBASREE, CHINMAY & AMBALAL, 2015; NISHINO, PAOLI & SPAIN, 2000) sob condições anaeróbias e

aeróbias (CHENG et al., 1996; HUANG et al., 2015; HUGHES, WANG & ZHANG, 1999; WANG et al., 2011; HUN-SUNGSOO, 2008; SPANGGORD et al., 1991).

As bactérias resistentes aos compostos químicos contaminantes desenvolvem capacidade de metabolização (consumo e degradação das substâncias químicas como fonte carbono) e co-metabolização (consumo das substâncias químicas na respiração).

Alguns dos primeiros micro-organismos identificados como capazes de degradar os 2,4 e 2,6 DNTs foram as *Burkholderia sp* (SUEN & SPAIN, 1993; HUN-SUNGSOO, 2008) e *Burkholderia cepacia* (JOHNSON & SPAIN, 2003). Estudos mais recentes reportam que houve um aumento na identificação de micro-organismos capazes de degradar os 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno (ABURTO-MEDINA et al., 2017). Na tabela 2, são apresentados alguns micro-organismos cuja capacidade para degradação dos DNTs já foi comprovada.

**Tabela 2 – Micro-Organismos Capazes de Degradar Di-Nitro-Toluenos**

Micro-organismo	Condição	Referencias
<i>Pseudomonas putida</i>	Aeróbio	HUDCOVA et al. 2011/ Paca et al. 2009
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aeróbio	HUDCOVA et al. 2011/ Paca et al. 2009
<i>Arthrobacter sp</i>	Aeróbio	KÜCE, CORAL & KANTAR, 2015
<i>Shewanella marisflavi</i>	Anaeróbio	HUANG et al. 2015
<i>Achromobacter sp</i>	Aeróbio	HUDCOVA et al. 2011/ Paca et al. 2009
<i>Riemerella sp</i>	Aeróbio; anaeróbio	WANG et al. 2011
<i>Flavobacteriaceae sp</i>	Aeróbio; anaeróbio	WANG et al. 2011
<i>Agrobacterium sp</i>	Aeróbio; anaeróbio	WANG et al. 2011
<i>Pseudomonas marginalis</i>	Aeróbio	SNELLIX et al. 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aeróbio; anaeróbio	SNELLIX et al. 2003
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Aeróbio	SNELLIX et al. 2003
<i>Burkholderia cepacia</i>	Aeróbio	JOHNSON E SPAIN, 2003
<i>Burkholderia sp</i>	Aeróbio	SUEN E SPAIN, 1993
<i>Hydrogenophaga paleronii</i>	Aeróbio	NISHINO, PAOLI & SPAIN, 2000

Fonte: Aburto Medina et al. (2017)

A degradação dos compostos 2,4 e 2,6 DNTs já foi demonstrada em uma variedade de estudos de bancada e testes piloto com solo e água subterrânea, ambos em sistemas *In Situ* e *Ex Situ* (NISHINO & SPAIN, 2001). Para todos estes estudos a presença de bactérias degradadores foi fundamental, como também as condições físico-químicas e temperatura.

Como parâmetros relevantes a serem observados, são citados (NISHINO & SPAIN, 2001):

- a) Potencial Hidrogeniônico: pH entre 7,0 e 9,0
- b) Concentração de Oxigênio dissolvido: > 2 mg/L (para degradação Aeróbica)
- c) Adequada presença de macro-nutrientes: Fosfato, Sulfato, Nitrato
- d) Temperatura: 5 a 35 °C
- e) Potencial de Oxidação e Redução: -100 a – 400 milivolts

### **3.5 DOADORES DE ELÉTRONS NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO**

Os doadores de elétrons são substâncias que fornecem aos microrganismos fonte de carbono (energia) para o enriquecimento da população (ITRC, 1998). O substrato ideal para um processo de biodegradação varia de local para local, sendo dependente, por exemplo, do tipo de microrganismos, condições climáticas e parâmetros físico químicos do meio (ITRC, 1998).

Normalmente, os casos de biorremediação utilizam como doador de elétrons substâncias orgânicas, biodegradáveis, não tóxicas, tais como: Melasso, Lactato, Etanol, entre outros (ADRIAN & ARNETT, 2007).

Em alguns estudos de caso, outras substâncias chamadas de nutrientes (fosfato, nitrato, Vitamina B12 e ferro zero valente) foram adicionadas aos doadores de elétrons com o objetivo de criar um ambiente ainda mais favorável a proliferação dos microrganismos (NISHINO & SPAIN, 2001).

### **3.6 TOXICIDADE DOS 2,4 E 2,6 DINITRO-TOLUENOS E SUB PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Existem diversos artigos relatando a toxicidade dos 2,4 e 2,6 Di Nitro Toluenos e seus produtos de degradação. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Cancer, desde 1996, já existem evidências que os 2,4 e 2,6 DNTs causam tumores malignos. Estudos publicados pelo Departamento de Patologia Experimental e Toxicologia da Universidade de Stanford relatam que o 2,6 Di Nitro tolueno pode causar tumores hepáticos (Hepatocarcinogenese). Cobaias (ratos) alimentadas com cereais contendo doses controladas de 2,6 DNT por períodos de 3, 6 e 12 meses desenvolveram alterações hepatocelulares.

Os dados de toxicidade aguda dos 2,4 e 2,6 Di nitro toluenos e subprodutos foram avaliados para a via de exposição oral, a mais crítica, utilizando-se o critério de Dose Letal 50 ou DL-50 (DL-50 corresponde a dose do produto químico, em mg/Kg, administrada em um grupo de cobaias e que matou 50% desta população (CCOHS – Canadian Centre for Occupational Health and Safety - <https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>)).

Observa-se que o DL-50 das substâncias geradas no processo de degradação são, predominantemente, superiores aos DL-50 dos 2,4 e 2,6 Dinitro toluenos, o que significa um maior nível de tolerância das cobaias, portanto, menor toxicidade destas substâncias. ‘

Os dados de DL-50 utilizados para avaliação de toxicidade foram obtidos das fichas de informação sobre produtos químicos (FISPQ) de cada composto, disponível no site da empresa Sigma-Aldrich/Merck. ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

**Tabela 3 – Toxicidade de Nitrotoluenos**

Toxicidade dos Dinitrotoluenos e Produtos de Degradação			
Substâncias	CAS Number	Dose Letal 50 via Oral (mg/Kg)	Fonte
2,4 Dinitrotolueno	121-14-2	268	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2,6 Dinitrotolueno	606-20-2	177	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
4-Nitrotolueno	99-99-0	2250	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
3-Nitrotolueno	99-08-1	1784	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2-Nitrotolueno	88-72-2	891	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2,4 Diamino Tolueno	95-80-7	325	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2,6 Diamino Tolueno	823-40-5	Não Disponível <sup>1</sup>	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2-Amino 4-nitrotolueno	99-55-8	100	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2-Amino 6-nitrotolueno	603-83-8	Não Disponível <sup>1</sup>	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
4-Amino 2-nitrotolueno	119-32-4	6860	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2-Amino Tolueno	106-49-0	620	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
3-Amino Tolueno	108-44-1	922	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
4-Amino Tolueno	95-53-4	750	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>

Fonte: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Nota: (1) Fonte de pesquisa adicional <https://www.epa.gov/iris>

Segundo o Sistema de Informação Integrada sobre Risco (IRIS) da Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos (EPA), os compostos 2,4 e 2,6 Di Nitro Tolueno são carcinogênicos e apresentam um valor de toxicidade de  $6,8 \times 10^{-1}$  por mg/Kg-dia.

Os 2,4 e 2,6 Di Nitro Toluenos e seus produtos de degradação foram avaliados quanto a suas efeitos carcinogênicos, seguindo os critérios da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC).

**Tabela 4 – Critérios de classificação de Carcinogenicidade**

Grupo	Descrição
1	O agente é carcinogênico a humanos. Quando há evidências suficientes de que o agente é carcinogênico para humanos;
2A	O agente provavelmente é carcinogênico a humanos. Quando existem evidências suficientes de que o agente é carcinogênico para animais e evidências limitadas ou insuficientes de que ele é carcinogênico para humanos;
2B	O agente é possivelmente carcinogênico a humanos. Quando existem evidências limitadas de que o agente é carcinogênico para humanos e evidências insuficientes de que ele é carcinogênico para animais ou quando não há evidências suficientes em ambos os casos, mas há dados relevantes de que ele possa ser carcinogênico;
3	O agente não é classificado como carcinogênico a humanos. Quando as evidências não são adequadas para afirmar que aquele agente é carcinogênico a humanos e animais ou quando o agente não se encaixa em nenhum outro grupo;
4	O agente provavelmente não é carcinogênico. Quando faltam evidências de que o agente é carcinogênico em humanos ou animais

Fonte: //www.iarc.who.int

**Tabela 5 – Carcinogenicidade dos Dinitrotoluenos e Produtos de Degradação**

Carcinogenicidade dos Dinitrotoluenos e Produtos de Degradação			
Substâncias	CAS Number	Grupo	Fonte
2,4 Dinitrotolueno	121-14-2	2A	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2,6 Dinitrotolueno	606-20-2	2A	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
4-Nitrotolueno	99-99-0	Não Disponível	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
3-Nitrotolueno	99-08-1	Não Disponível	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2-Nitrotolueno	88-72-2	2A	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2,4 Diamino Tolueno	95-80-7	2A	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2,6 Diamino Tolueno	823-40-5	Não Disponível	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2-Amino 4-nitrotolueno	99-55-8	2B	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2-Amino 6-nitrotolueno	603-83-8	Não Disponível	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
4-Amino 2-nitrotolueno	119-32-4	Não Disponível	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
2-Amino Tolueno	106-49-0	2B	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
3-Amino Tolueno	108-44-1	Não Disponível	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
4-Amino Tolueno	95-53-4	2A	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>

Fonte: //www.iarc.who.int

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

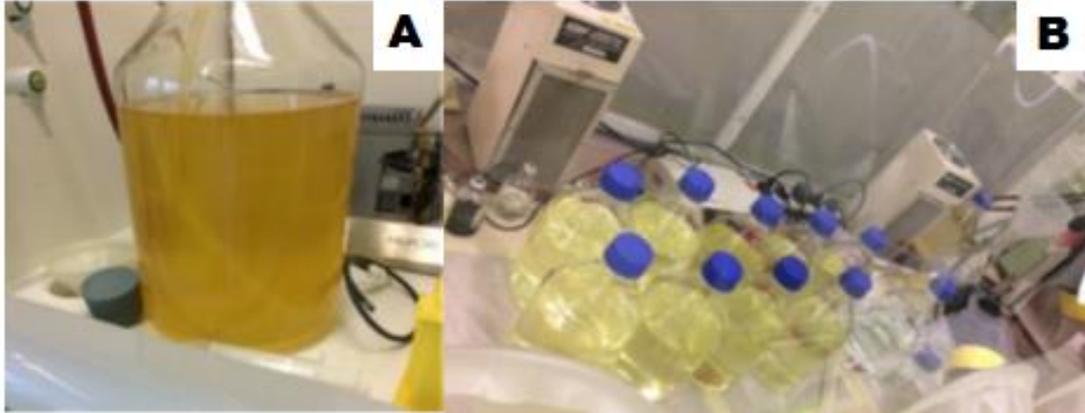
Foi realizado um experimento de laboratório no qual foi utilizada uma amostra de água subterrânea contaminada por 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno oriunda da área contaminada da Antiga fábrica de Tolueno Di-Isocianato (TDI) da Dow Brasil que patrocinou a realização dos ensaios, bem como a disponibilização do seu laboratório analítico como apoio para as análises químicas de compostos de interesse.

Foram contratadas, para desenvolvimento e condução do experimento, as empresas:

- *Green Soil* – Consultoria Ambiental localizada em São Paulo, Brasil, para a Coordenação e Logística;
- Deltares – Instituto Independente de pesquisa aplicada no campo da água subterrânea e subsuperficial para a execução do experimento em bancada e análises;
- Bioclear – Laboratório de Microbiologia localizado na Holanda, responsável pela Análise Bacteriológica (NGS).

Aproximadamente 200 L de água subterrânea da área impactada foram coletados e enviados à sede da *Green Soil*, Holanda. Este volume foi coletado e enviado em condições normais do ambiente e transportados sem nenhum pré-tratamento ou condicionamento. A amostra de água subterrânea utilizada no experimento continha 73,2 mg/L de 2,4 DNT e 37,2 mg/L de 2,6 DNT. Em função das concentrações serem consideradas elevadas (próximas ao limite de solubilidade) e observação de cristalização na superfície da amostra de água subterrânea, a amostra bruta foi diluída a 25 % com água deionizada e autoclavada para a realização do experimento. Um ambiente com concentrações muito altas dos DNTs, mesmo para bactérias sabidamente degradadoras, pode levar ao extermínio da população (ABURTO-MEDINA et al., 2017). A Figura 7 ilustra as amostras onde: A) amostra bruta; B) amostras após diluição.

**Figura 7 – Água subterrânea analisada em laboratório**



Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Apesar da degradação aeróbia ser mais frequentemente citada para os DNTs, a degradação anaeróbia dos DNTs também é descrita (ABURTO-MEDINA, 2017). Assim, realizou-se o experimento sob condições aeróbias e anaeróbias, utilizando o sistema de biorreatores (garrafas de vidro borossilicato), como segue:

1. Experimento Anaeróbio/Aeróbio (preparação inicial dos biorreatores sob condição anaeróbia e, posteriormente, conversão para aeróbio através da adição de oxigênio aos biorreatores) e;
2. Experimento Totalmente Aeróbio (preparação inicial dos biorreatores sob condição aeróbio - presença de oxigênio do início ao fim do ensaio)

Para as duas condições do experimento, anaeróbio/Aeróbio e Aeróbio, indicadores e aditivos (doadores de elétrons e nutrientes) foram adicionados aos biorreatores e parâmetros físico-químicos monitorados. A tabela abaixo apresenta estes dados.

**Tabela 6 – Indicadores, Aditivos e Parâmetros de Monitoramento**

<b>Parâmetros/compostos</b>	<b>Função/relevância</b>	<b>Referência</b>
pH	7-9 ideal para crescimento dos micro-organismos	WANG et al. (2011)
Oxigênio dissolvido	Controle do teste Anaeróbio	-
temperatura	Simulação do Ambiente Natural	-
Doador de elétrons	Fonte de carbono	ABURTO-MEDINA (2017)
nutrientes P e N	Estimula crescimento dos micro-organismos	ABURTO-MEDINA (2017)
Branco	Avaliação da Degradação Biótica	-
Resazurine (0,1% w/w)	Indicador de presença de oxigênio	-
Buffer: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5 M)	Ajuste de pH	-
Esterilizado (cloreto de mercúrio)	Avaliação da Degradação Abiótica	-
Peroxido de hidrogênio	Ajuste Oxigênio Dissolvido	-

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Os métodos de referência utilizados para determinação dos compostos de interesse e parâmetros de controle dos experimentos de bancada foram:

- USEPA 8270D, Método para determinação de compostos semi-voláteis
- SMEWW 4110B 22<sup>a</sup> edição / EPA 300.0:1993 – Método para determinação de Nitrito e Nitrato,
- SMEWW 23<sup>a</sup> Edição – *Method* 4500 Norg B - Determinação de Nitrogênio Amoniacal
- SMEWW 23<sup>a</sup> Edição – *Method* 3500-Fe - Determinação de Ferro pelo Método Colorimétrico com Fenantrolina.
- SMEWW, 4500P 22<sup>a</sup>ed. Part. C/EPA 300.0:1993 - Método para determinação para Fosfato
- SMWW Método 5310 C, 23<sup>a</sup> Edição, 2017 - Determinação de Carbono Orgânico Total
- SMWW 4500O G, 23<sup>a</sup> Edição, 2017 – Método Determinação de Oxigênio Dissolvido pelo método com eletrodo de membrana
- SMEWW 5220 D 23<sup>a</sup> Edição –Método Demanda Química de Oxigênio por Espectrofotometria
- SMEWW 4500 H+ B 23<sup>a</sup> Edição – Método Determinação de pH pelo método eletrométrico
- SMEWW 2550 B 23<sup>a</sup> Edição – Método para Determinação da Temperatura

- SMWW 2580B, 23ª Edição, 2017 - Determinação do potencial de oxi-redução  
- Faixa: -1999 à 1999mV

Para determinação dos compostos de interesse e parâmetros de controle do experimento de bancada foram utilizados os seguintes equipamentos:

- pHmetro – Modelo 913 pH Master – Fabricante Metrohm
- Medidor Multiparâmetros – Temperatura, pH, Oxigênio Dissolvido e Oxi-Redução - Modelo HI 9829 – Fabricante HANNA
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrofotômetro de massa – Análise de Semi Voláteis – Modelo Gc-MS QP 2010 – Fabricante Shimadzu
- Cromatógrafo de Íons – Determinação de íons Nitrito, Nitrato e Fosfato – Modelo Methrom 882 Compact Plus IC
- Cromatógrafo Líquido / Ultravioleta - Análise de Semi Voláteis – Modelo SPD-10A – Fabricante Shimadzu

#### **4.1 CONDIÇÃO ANAERÓBIA/AERÓBIA – FASE I (ANAERÓBIA)**

##### **4.1.1 Preparação dos Ensaios de Bancada**

Para o experimento anaeróbio/aeróbio, a preparação das amostras ocorreu no Laboratório da Deltares/Holanda, pelos técnicos da Green Soil e Deltares.

**Figura 8 – Preparação das amostras pelos técnicos**



Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Devido à alta concentração de DNTs na amostra de água bruta (73,2 mg/L de 2,4 DNT e 37,2 µg/L de 2,6 DNT) decidiu-se realizar uma diluição a 25% com água desmineralizada e esterilizada (autoclavada).

Como biorreatores (recipiente) foram utilizados frascos de vidro de borossilicato resistentes à pressão de 3 e 5 L de capacidade com tampa plástica de polietileno (Figuras 7 e 8).

A preparação dos biorreatores ocorreu em capela de laboratório com purga de nitrogênio para evitar a presença de oxigênio (condição anaeróbia). O volume total de líquido em cada biorreator foi calculado em 1800 ml. Esse volume foi calculado com base no plano de amostragem para análises, bem como na capacidade (espaço físico) do laboratório Deltares.

Visando avaliar diferentes condições de degradação foram preparados 4 cenários.

1. Biorreatores AN1A, B e C – Esterilizado: Avaliar as interações abióticas que ocorrem na amostra de água subterrânea. Neste cenário foram adicionados 3 ml de solução aquosa de Cloreto de Mercúrio 60 g/L (O Cloreto de Mercúrio possui ação inibidora para proliferação dos micro-organismos e é mais estável que o formol (LIISA TUOMINEN; TIMO KAIREVALO; AND HELINA HARTIKAINEN - 1994).
2. Biorreatores AN2A, B e C – Branco: Avaliar que alterações ocorrem, naturalmente, na amostra de água subterrânea pela ação dos micro-organismos.
3. Biorreatores AN3A, B e C – Estimulado: Avaliar que alterações ocorrem na amostra de água subterrânea pela ação dos micro-organismos na presença do doador de elétron (Dehalo-GS).
4. Biorreatores AN4A, B e C – Estimulado e pH ajustado: Avaliar que alterações ocorrem na amostra de água subterrânea pela ação dos micro-organismos na presença do doador de elétron (Dehalo GS) e com pH ajustado com solução tampão ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 M) para 7,5.

Para ter consistência e evitar desvios ao longo do ensaio, foram preparados biorreatores em triplicata para cada condição. A tabela abaixo resume as condições de preparação de cada biorreator.

**Tabela 7 – Condições definidas para biorreatores do Processo Anaeróbio-Fase I**

<b>Código biorreator</b>	<b>Descrição</b>	<b>Condição</b>	<b>Correção de pH</b>	<b>Dehalo GS</b>	<b>HgCl<sub>2</sub></b>
AN1A	Biorreator com HgCl <sub>2</sub>	Esterilizado <sup>1</sup>	não	não	sim
AN1B	Biorreator com HgCl <sub>2</sub>	Esterilizado <sup>1</sup>	não	não	sim
AN1C	Biorreator com HgCl <sub>2</sub>	Esterilizado <sup>1</sup>	não	não	sim
AN2A	Biorreator branco	Branco	não	não	não
AN2B	Biorreator branco	Branco	não	não	não
AN2C	Biorreator branco	Branco	não	não	não
AN3A	Biorreator-Dehalo-GS	Estimulado <sup>2,3</sup>	não	Sim	não
AN3B	Biorreator-Dehalo-GS	Estimulado <sup>2,3</sup>	não	Sim	não
AN3C	Biorreator-Dehalo-GS	Estimulado <sup>2,3</sup>	não	Sim	não
AN4A	Biorreator-Dehalo-GS/ pH ajustado	Estimulado/pH ajustado <sup>2,3</sup>	sim	Sim	não
AN4B	Biorreator-Dehalo-GS/ pH ajustado	Estimulado/pH ajustado <sup>2,3</sup>	sim	Sim	não
AN4C	Biorreator-Dehalo-GS/ pH ajustado	Estimulado/pH ajustado <sup>2,3</sup>	sim	Sim	não

<sup>1</sup>Adição de 3 ml de Cloreto de Mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) concentração 60 g/L

<sup>2</sup>Adição de Resazurine (0,1%) – Indicador de Oxigênio

<sup>3</sup>Adição de Dehalo GS 1,4 g e solução Tampão ajuste de pH 7,5

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Dentre as variáveis de controle do experimento, o pH do meio e concentração de oxigênio dissolvido foram monitorados e ajustados ao longo do teste. Segundo WANG et al. (2011) o pH ideal para a proliferação da população de micro-organismos situa-se entre 7 e 9. O pH dos biorreatores foi ajustado para 7,5 com solução tampão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 M).

O doador de elétrons (fonte de carbono) utilizado no ensaio foi um produto comercial chamado Dehalo-GS, que combina frações de óleo vegetal e lactato dissolvidos em água e contém de 3 a 4 % de Nitrogênio e 0,2 a 0,3 de pentóxido de difósforo. A solução também pode ser considerada como fonte de fósforo e Nitrogênio.

Foi utilizado, para a condição anaeróbia, um indicador da presença de oxigênio: Resazurine (concentração 0,1 % em peso). Este indicador apresenta coloração pink/púrpura sob condições aeróbicas (concentração de oxigênio dissolvido > 5 mg/L).

Estabeleceu-se como ponto de conversão da fase anaeróbia para a fase aeróbia a degradação > 95 % dos 2,4 e 2,6 DNTs em relação à concentração inicial.

A retirada de amostras para análises foi feita por meio de seringas e através dos retentores de borracha. Para compensar o volume de amostra retirado de cada biorreator e manter as condições anaeróbias foi adicionada uma mistura de gás  $N_2/CO_2$ .

Os biorreatores foram homogeneizados, manualmente, com frequência semanal e foram mantidos a 30°C e sob ausência de luz. Esta temperatura foi estabelecida em função da localidade da antiga fábrica/origem da amostra de água subterrânea contaminada.

**Figura 9 – Biorreatores – Processo Anaeróbio Fase I**



Fonte: Laboratório Deltares (2021)

#### 4.1.2 Preparação dos Biorreatores e Parâmetros de Controle

Os biorreatores foram preparados conforme os dados da tabela abaixo.

**Tabela 8 – Preparação dos Biorreatores para condições Anaeróbia/Aeróbia**

<b>Ingredientes (ml)</b>	<b>AN1</b>	<b>AN2</b>	<b>AN3</b>	<b>AN4</b>
Água Bruta	900	900	900	900
Água Desmineralizada	2700	2700	2700	2556
Solução Tampão 0,5 Molar de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$				144
Resazurine (0,1% em massa)	6	6	6	6
Dehalo-GS			2,8	2,8
Cloreto de Mercúrio (conc. 60 g/L)	2			

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

A quantidade de Dehalo-GS adicionada ao experimento seguiu a orientação do procedimento SV-513 (Metodologia para Determinação da Duração de Atenuação Natural de Etilenos Clorados) da Fundação para Desenvolvimento e Transferência de Conhecimento do Solo (Holanda). Para acompanhamento do desempenho do experimento foram definidos parâmetros controle e critérios de monitoramento conforme tabela abaixo.

**Tabela 9 – Parâmetros de Monitoramento e Controle do Processo Anaeróbio Fase I**

<b>Parâmetro</b>	<b>Frequência</b>	<b>Laboratório</b>
Carbono Orgânico Total -COT	Inicial	Dow Temeuzen
Compostos de Interesse - CDI	Cada 3 semanas	Dow Temeuzen
pH	Semanal	Deltares
íons ( $\text{NO}_2^-$ ; $\text{NO}_3^-$ )	Semanal	Deltares
Ferro Total	Inicial	Deltares
íon Amônio ( $\text{NH}_3^-$ )	Inicial	Deltares
íon Fósforo ( $\text{PO}_4^{2-}$ )	Inicial	Deltares
Demanda Química de Oxigênio	Inicial	Deltares
Oxigênio Dissolvido	Semanal	Deltares
Redox	Semanal	Deltares
Temperatura	Semanal	Deltares
Avaliação Bacteriológica (NGS)	*	Bioclear

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Os parâmetros utilizados para monitoramento e controle elencados na tabela 6 são descritos a seguir:

1. COT (Carbono Orgânico Total) – Quantificar a carga orgânica inicial da água bruta para estimar a quantidade necessária do agente doador de elétrons (Dehalo GS) nos biorreatores AN3 (A, B, C) e AN4 (A, B, C);
2. CDI (Compostos de Interesse) – Quantificar os compostos de interesse 2,4 e 2,6 DNTs, Nitrotoluenos e seus produtos de degradação na etapa de preparação e pelo tempo de duração do ensaio;
3. pH – Garantir a manutenção do pH ao redor de 7,5;
4. Ions ( $\text{NO}_2^-$ ;  $\text{NO}_3^-$ ) – Nitrito e Nitrato são sub-produtos de degradação dos 2,4 e 2,6 DNTs;
5. Íon Amônio ( $\text{NH}_3^-$ ) – Fonte de Nitrogênio (nutriente);
6. Íon Fósforo ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) – Fonte de Fósforo (nutriente);
7. Demanda Química de Oxigênio – Referência para manutenção do meio de incubação sob condição aeróbia – Fase II;
8. Oxigênio Dissolvido – Manutenção do meio de incubação conforme a condição e fase do experimento;
9. Redox – Verificação das condições de oxidação e redução do meio visando à manutenção do ambiente redutor;
10. Temperatura – Manutenção constante da temperatura ao redor de 30° C;
11. Análise Bacteriológica (NGS) – Identificar os micro-organismos presentes na água bruta e avaliar o comportamento destes em algumas nas condições testadas.

#### **4.1.3 Compostos de Interesse e Plano e Amostragem para Análises**

Um plano de amostragem para realização de análises químicas dos compostos de interesse, produtos de degradação, indicadores e parâmetros de controle foi elaborado com base na literatura pesquisada. A tabela abaixo elenca esses compostos e suas principais características. Os compostos de interesse são os mesmos para as condições de ensaio anaeróbia/aeróbia e anaeróbia.

**Tabela 10 – Compostos de Interesse (CDI)**

<b>Substância Química</b>	<b>Origem</b>
2,4-Di-Nitro-Tolueno	Contaminante
2,6-Di-Nitro-Tolueno	Contaminante
2,4-Diaminotolueno	Produto de degradação
2,6-Diaminotolueno	Produto de degradação
2-Amino-4-nitrotolueno	Produto de degradação
2-Amino-6-nitrotolueno	Produto de degradação
4-Amino-2-nitrotolueno	Produto de degradação
2-Nitro-Tolueno	Contaminante/ Produto de degradação
3-Nitro-Tolueno	Contaminante/ Produto de degradação
4-Nitro-Tolueno	Contaminante/ Produto de degradação
2-Aminotolueno	Produto de degradação
3-Aminotolueno	Produto de degradação
4-Aminotolueno	Produto de degradação

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

A tabela abaixo apresenta os tempos de duração para as fases anaeróbia e aeróbia do processo Anaeróbio.

**Tabela 11 – Plano de Amostragem do Processo Anaeróbio Fase I e Fase II**

<b>Legenda</b>	<b>Descrição</b>	<b>Intervalo de Tempo (semanas)</b>
T0	Amostragem antes da incubação	primeiro dia de teste
T1	Primeira amostragem após incubação	após 3 semanas
T2	Segunda amostragem após incubação	após 6 semanas
T3 <sup>1</sup>	Terceira amostragem após incubação	após 9 semanas
T4	Quarta amostragem após incubação	após 12 semanas
T5	Quinta amostragem após incubação	após 15 semanas
T6	Sexta amostragem após incubação	após 18 semanas

<sup>1</sup>Tempo estimado para início da transição da fase I (anaeróbia) para fase II (aeróbia) sombreada

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

#### **4.2 Processo Anaeróbio/Aeróbio – Fase II (Transição Anaeróbio Para Aeróbio)**

Os biorreatores utilizados na fase II foram os mesmos da fase I, sendo que a conversão para o processo aeróbio foi realizada através da adição de peróxido de hidrogênio à água remanescente.

O critério utilizado como gatilho para a transição da fase I para a fase II do processo anaeróbio foi a degradação superior a 95 % dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Toluenos. Isto ocorreu já na segunda amostragem após preparação dos

biorreatores (T2), evidenciando degradação antecipada dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Toluenos em relação às estimativas iniciais apresentadas na Tabela abaixo.

**Tabela 12 – Condições definidas para biorreatores do Processo Anaeróbio Fase II**

<b>Código biorreator</b>	<b>Descrição</b>	<b>Condição</b>	<b>Correção de pH</b>	<b>Dehalo GS</b>	<b>HgCl<sub>2</sub></b>
AN1A	Biorreator com HgCl <sub>2</sub>	Esterilizado <sup>1</sup>	não	não	sim
AN1B	Biorreator com HgCl <sub>2</sub>	Esterilizado <sup>1</sup>	não	não	sim
AN1C	Biorreator com HgCl <sub>2</sub>	Esterilizado <sup>1</sup>	não	não	sim
AN2A	Biorreator branco	Branco	não	não	não
AN2B	Biorreator branco	Branco	não	não	não
AN2C	Biorreator branco	Branco	não	não	não
AN3A	Biorreator-Dehalo-GS	Estimulado <sup>2,3</sup>	não	Sim	não
AN3B	Biorreator-Dehalo-GS	Estimulado <sup>2,3</sup>	não	Sim	não
AN3C	Biorreator-Dehalo-GS	Estimulado <sup>2,3</sup>	não	Sim	não
AN4A	Biorreator-Dehalo-GS/ pH ajustado	Estimulado/pH ajustado <sup>2,3</sup>	sim	Sim	não
AN4B	Biorreator-Dehalo-GS/ pH ajustado	Estimulado/pH ajustado <sup>2,3</sup>	sim	Sim	não
AN4C	Biorreator-Dehalo-GS/ pH ajustado	Estimulado/pH ajustado <sup>2,3</sup>	sim	Sim	não

<sup>1</sup>Adição de 3 ml de Cloreto de Mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) concentração 60 g/L

<sup>2</sup>Adição de Resazurine (0,1%) – Indicador de Oxigênio

<sup>3</sup>Adição de Dehalo GS 1,4 g e solução Tampão ajuste de pH 7,5

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

A mudança da condição anaeróbia para aeróbia ocorreu por meio da adição, em cada biorreator, de peróxido de hidrogênio.

Como o aumento da concentração de oxigênio dissolvido ocorre lentamente, as adições de peróxido foram realizadas semanalmente até que os biorreatores atingissem uma concentração de oxigênio dissolvido > 5 mg/L. Isso ocorreu após 35 dias e consumiu aproximadamente 200 mg/L de peróxido por biorreator.

#### **4.2.1 Parâmetros de Monitoramento e Controle**

Para acompanhamento do desempenho do ensaio foram definidos parâmetros de controle e critérios de monitoramento iguais à fase I, exceto pelo acréscimo da análise de OD (oxigênio dissolvido). O monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido teve por objetivo garantir o meio aeróbio dos biorreatores. Os parâmetros de monitoramento e controle são apresentados na tabela abaixo.

**Tabela 13 – Parâmetros de Monitoramento e Controle do Processo Anaeróbio-Fase II**

<b>Parâmetro</b>	<b>Frequência</b>	<b>Laboratório</b>
Carbono Orgânico Total -COT	Inicial	Dow Temeuzen
Compostos de Interesse - CDI	Cada 3 semanas	Dow Temeuzen
pH	Semanal	Deltares
ions ( $\text{NO}_2^-$ ; $\text{NO}_3^-$ )	Semanal	Deltares
Ferro Total	Inicial	Deltares
ion Amônio ( $\text{NH}_3^-$ )	Inicial	Deltares
ion Fósforo ( $\text{PO}_4^{2-}$ )	Inicial	Deltares
Demanda Química de Oxigênio	Inicial	Deltares
Oxigênio Dissolvido	Semanal	Deltares
Redox	Semanal	Deltares
Temperatura	Semanal	Deltares

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

#### 4.2.2 Plano De Amostragem Para Análises

O plano de amostragem para análise química dos compostos de interesse, sub-produtos de degradação e indicadores (Tabela abaixo) foi proposto com base na literatura pesquisada

**Tabela 14 – Plano de Amostragem do Processo Anaeróbio Fase I e Fase II**

<b>Legenda</b>	<b>Descrição</b>	<b>Intervalo de Tempo (semanas)</b>
T0	Amostragem antes da incubação	primeiro dia de teste
T1	Primeira amostragem após incubação	após 3 semanas
T2	Segunda amostragem após incubação	após 6 semanas
T3 <sup>1</sup>	Terceira amostragem após incubação	após 9 semanas
T4	Quarta amostragem após incubação	após 12 semanas
T5	Quinta amostragem após incubação	após 15 semanas
T6	Sexta amostragem após incubação	após 18 semanas

<sup>1</sup> Tempo estimado para início da transição da fase I (anaeróbia) para fase II (aeróbia).

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

**Figura 10 – Biorreatores – Processo Anaeróbio Fase II (aeróbia)**



A) final da Fase I (anaeróbia) e Transição para a fase II (aeróbia)

B) final da fase II (aeróbia)

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

### 4.3 CONDIÇÃO TOTALMENTE AERÓBIA

O processo totalmente aeróbio do experimento foi realizado utilizando-se o mesmo tipo de biorreatores (frasco de vidro de 3 L com tampa de rosca e retentores de borracha de butil acrilato).

Os frascos foram completamente preenchidos com a amostra de água subterrânea contaminada por 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno em uma capela, porém com exposição ao ar atmosférico e sem purga com os gases  $N_2/CO_2$ .

A retirada de amostras para análises foi feita por meio de seringas e através da remoção da tampa dos biorreatores. Foram testadas 4 condições nesta fase. Para cada condição foram preparados 4 biorreatores (experimento em quadruplicada) visando avaliar a consistência dos resultados.

1. Biorreatores AE1A, B, C e D– Esterilizado: Avaliar quais interações abióticas ocorrem na amostra de água subterrânea. Neste cenário foram adicionados 3 ml de solução aquosa de Cloreto de Mercúrio 60 g/L (O Cloreto de Mercúrio possui ação esterilizante e promove a eliminação dos micro-organismos).

2. Biorreatores AE2A, B, C e D – Branco: Avaliar quais alterações ocorrem, naturalmente, na amostra de água subterrânea pela ação dos micro-organismos.
3. Biorreatores AE3A, B, C e D– Adição de Di-Hidrogênio Fosfato de Potássio -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : Avaliar quais alterações ocorrem na amostra de água subterrânea pela ação dos micro-organismos na presença do nutriente Fósforo.
4. Biorreatores AE4A, B, C e D – Adição Cloreto de Amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e pH ajustado com solução tampão 0,5 Molar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/ \text{K}_2\text{HPO}_4$ : Avaliar quais alterações ocorrem na amostra de água subterrânea pela ação dos micro-organismos na presença dos nutrientes Fósforo, Nitrogênio e pH 7,5. (WANG et al., 2011). Vale ressaltar que nesta condição a solução tampão também foi considerada como fonte de Fósforo.

**Tabela 15 – Condições definidas para biorreatores do Processo Aeróbio**

Código biorreator	Condição	Correção de pH	Fósforo	Nitrogênio	$\text{H}_2\text{Cl}_2$
AE1A	Esterilizado	não	não	Não	sim
AE1B	Esterilizado	não	não	Não	sim
AE1C	Esterilizado	não	não	Não	sim
AE1D	Esterilizado	não	não	Não	sim
AE2A	Branco	não	não	Não	não
AE2B	Branco	não	não	Não	não
AE2C	Branco	não	não	Não	não
AE2D	Branco	não	não	Não	não
AE3A	Estimulado/estimulado Fósforo	não	Sim	Não	não
AE3B	Estimulado/estimulado Fósforo	não	Sim	Não	não
AE3C	Estimulado/estimulado Fósforo	não	Sim	Não	não
AE3D	Estimulado/estimulado Fósforo	não	Sim	Não	não
AE4A	Estimulado/estimulado Fósforo + N + pH	sim	Sim	Não	não
AE4B	Estimulado/estimulado Fósforo + N + pH	sim	Sim	Não	não
AE4C	Estimulado/estimulado Fósforo + N + pH	sim	Sim	Não	não
AE4D	Estimulado/estimulado Fósforo + N + pH	sim	Sim	Não	não

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Os biorreatores foram homogeneizados, manualmente, com frequência semanal e foram mantidos a 30°C e sob ausência de luz. Esta temperatura foi estabelecida em função da localidade da antiga fábrica/origem da amostra de água subterrânea contaminada.

### 4.3.1 Preparação dos Biorreatores

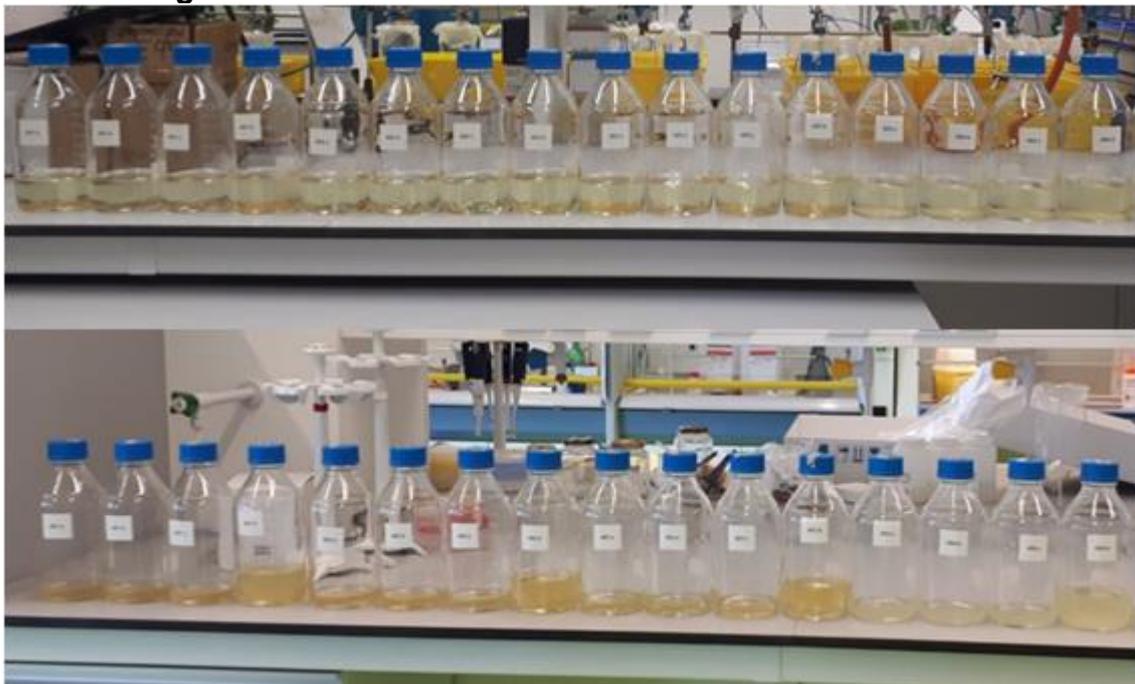
Os biorreatores foram preparados conforme os padrões ilustrados na tabela abaixo.

**Tabela 16 – Preparação dos Biorreatores para condição Aeróbia**

Ingredientes (ml)	AE1 (A, B, C, D)	AE2 (A, B, C, D)	AE3 (A, B, C, D)	AE4 (A, B, C, D)
Água Bruta	150	150	150	150
Água Desmineralizada	448	448	447,6	424
Solução Tampão 0,5 Molar de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$				24
Fosfato de Potássio (0,1 Molar)		0,24		
Cloreto de Amônio (0,5 Molar)			0,20	
Cloreto de Mercúrio (conc. 60 g/L)	1			

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

**Figura 11 – Biorreatores Incubados – Processo Aeróbio**



Fonte: Laboratório Deltares (2021)

### 4.3.2 Parâmetros de Monitoramento e Controle

Para acompanhamento do desempenho do experimento foram definidos parâmetros controle e critérios de monitoramento. Os parâmetros monitorados tiveram o seguinte objetivo:

1. CDI (Compostos de Interesse) – Quantificar os compostos de interesse 2,4 e 2,6 DNTs, Nitrotoluenos e seus produtos de degradação na etapa de preparação e pelo tempo de duração do ensaio;
2. pH – Garantir a manutenção do pH ao redor de 7,5;
3. Íons ( $\text{NO}_2^-$ ;  $\text{NO}_3^-$ ) – Nitrito e Nitrato são subprodutos de degradação dos 2,4 e 2,6 DNTs;
4. Íon Amônio ( $\text{NH}_3^-$ ) – Fonte de Nitrogênio (nutriente);
5. Íon Fósforo ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) – Fonte de Fósforo (nutriente);
6. Demanda Química de Oxigênio – Referência para manutenção do meio de incubação sob condição aeróbia;
7. Oxigênio Dissolvido – Manutenção do meio de incubação conforme a condição e fase do experimento;
8. Redox – Verificação das condições oxidação e redução do meio visando a manutenção do ambiente redutor;
9. Temperatura – Manutenção constante da temperatura ao redor de 30°C;
10. Análise Bacteriológica (NGS) – Identificar os micro-organismos presentes na água bruta e avaliar o comportamento destes em algumas das condições testadas.

**Tabela 17 – Parâmetros de Monitoramento e Controle do Processo Aeróbio**

<b>Parâmetro</b>	<b>Frequência</b>	<b>Laboratório</b>
Carbono Orgânico Total -COT	Inicial	Dow Terneuzen
Compostos de Interesse - CDI	Cada 3 semanas	Dow Terneuzen
pH	Semanal	Deltares
Íons ( $\text{NO}_2^-$ ; $\text{NO}_3^-$ )	Semanal	Deltares
Ferro Total	Inicial	Deltares
Íon Amônio ( $\text{NH}_3^-$ )	Inicial	Deltares
Íon Fósforo ( $\text{PO}_4^{2-}$ )	Inicial	Deltares
Demanda Química de Oxigênio	Inicial	Deltares
Oxigênio Dissolvido	Semanal	Deltares

Redox	Semanal	Deltares
Temperatura	Semanal	Deltares
Avaliação Bacteriológica (NGS)	*	Bioclear

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Os compostos de interesse analisados na condição totalmente aeróbia são descritos na tabela abaixo.

**Tabela 18 – Parâmetros de Monitoramento e Controle do Processo Totalmente Aeróbio**

<b>Substância Química</b>	<b>Origem</b>
2,4-Di-Nitro-Tolueno	Contaminante
2,6-Di-Nitro-Tolueno	Contaminante
2-Nitro-Tolueno	Contaminante/ Produto de degradação
3-Nitro-Tolueno	Contaminante/ Produto de degradação
4-Nitro-Tolueno	Contaminante/ Produto de degradação
2-Aminotolueno	Produto de degradação
3-Aminotolueno	Produto de degradação
4-Aminotolueno	Produto de degradação

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

#### 4.3.3 Plano de Amostragem para Análises

O plano de amostragem para análise química dos compostos de interesse, subprodutos de degradação e indicadores foi proposto com base na literatura pesquisada. A duração do processo Aeróbio foi estimada em aproximadamente 120 dias.

**Tabela 19 – Plano de Amostragem do Processo Anaeróbio**

<b>Legenda</b>	<b>Descrição</b>	<b>Intervalo de Tempo (semanas)</b>
T0	Amostragem antes da incubação	primeiro dia de teste
T1	Primeira amostragem após incubação	após 3 semanas
T2	Segunda amostragem após incubação	após 6 semanas
T3	Terceira amostragem após incubação	após 9 semanas
T4	Quarta amostragem após incubação	após 12 semanas

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises de água subterrânea bruta são apresentados na tabela 17, estes resultados foram referência inicial para a avaliação do processo de biodegradação dos compostos de interesse 2,4 e 2,6 DNTs e seus sub-produtos de degradação.

**Tabela 20 – Resultados de Análises da Amostra “Bruta”**

<b>Composto</b>	<b>Resultado (mg/l)</b>
2,4 Dinitro tolueno	73,2
2,6 Dinitro tolueno	37,2
2- Dinitro tolueno	13,8
3- Dinitro tolueno	0,8
4- Dinitro tolueno	1,3
Ferro total	6200
Amônio	0,7
Fósforo	<0,15
Demanda química de oxigênio	44
pH	6,8
Carbono orgânico total	336

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Para preparação dos biorreatores a amostra bruta foi diluída a 25 %. Os subprodutos de degradação Diamino Tolueno e Amino Tolueno não foram detectados na amostra da água bruta.

### 5.1 PROCESSO ANAERÓBIO/AERÓBIO

A seguir serão apresentados os resultados do experimento para a condição anaeróbia/aeróbia, bem como gráficos que mostram o processo de degradação dos compostos de interesse e subprodutos.

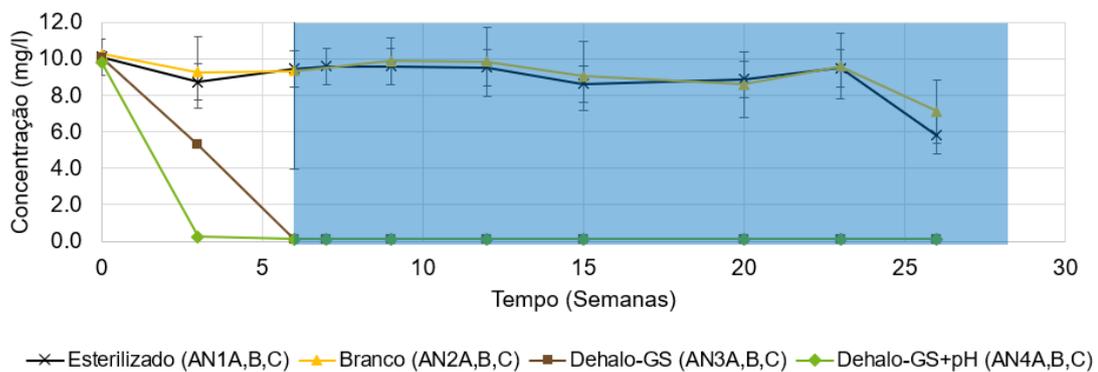
Para preparação dos gráficos foram consideradas as médias aritméticas dos resultados (duplicatas e triplicatas) para cada composto de interesse/parâmetro de controle/monitoramento.

Devido ao *lockdown* implantado para o combate à pandemia de COVID-19 não foi possível seguir o plano de amostragem definido, sendo necessário alongar o tempo de incubação. Tal fato não trouxe nenhum tipo de prejuízo ao experimento.

### 5.1.1 2,4 Di-Nitro Tolueno

Os resultados encontrados para a degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno em condição Anaeróbia/Aeróbia são apresentados na Figura 12. A imagem possui duas cores de fundo, onde a parte com fundo azul representa a fase II aeróbia.

**Figura 12 – Degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno – Condição Anaeróbia/Aeróbia**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Após incubação, já na primeira amostragem (T1), observou-se uma expressiva redução da concentração do 2,4 Di-Nitro-Tolueno nos biorreatores contendo a fonte de carbono Dehalo-GS (AN3) e com pH ajustado (AN4). As concentrações do 2,4 Di-Nitro-Tolueno sob estas condições baixaram de 18,1 mg/L (amostra Bruta diluída) para 1,2 mg/L e 1,9 mg/L, respectivamente na primeira amostragem. Este mesmo comportamento de rápida degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno já foi descrita por NISHINO & SPAIN, (2004), corroborando com os resultados encontrados. Na segunda amostragem (T2), ocorreu a degradação completa do 2,4 Di-Nitro-Tolueno, sendo que nas amostragens subsequentes não houve detecção.

Curiosamente, os biorreatores Branco (AN2) também apresentaram redução progressiva da concentração de 2,4 Di-Nitro-Tolueno. Na primeira amostragem (T1) a concentração detectada foi 12,6 mg/L; (T2) 9,7 mg/L; (T3) 4,9 mg/L. Entre os

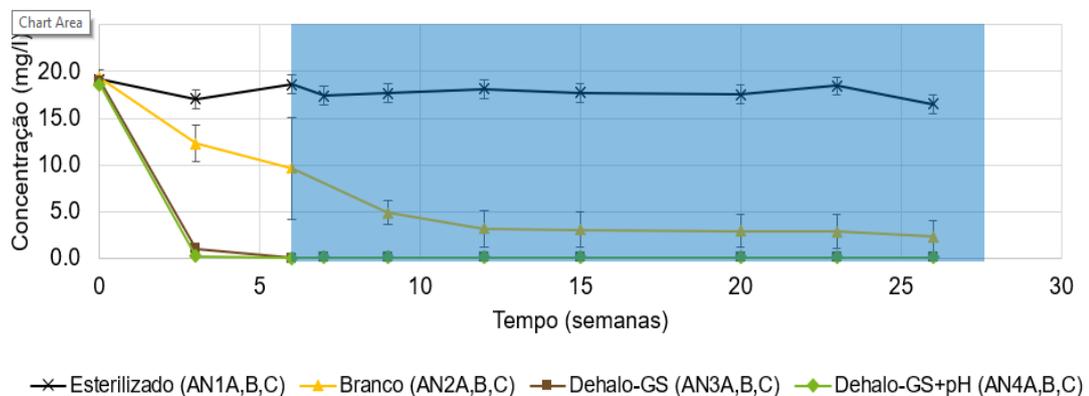
intervalos de amostragem T4 e T8 a concentração de 2,4 Di-Nitro-Tolueno variou entre 3,0 mg/L e 2,2 mg/L. A redução da concentração de 2,4 Di-Nitro-Tolueno dos biorreatores Branco ao final do teste foi da ordem de 88 %.

O biorreator esterilizado (AN1) apresentou alterações na concentração de 2,4 Di-Nitro-Tolueno pouco significativas, evidenciando que não houve atividade biótica nesta condição. Este comportamento é consistente com a expectativa para esta condição de incubação.

### 5.1.2 2,6 Di-Nitro Tolueno

Os resultados encontrados para a degradação do 2,6 Di-Nitro-Tolueno em condição Anaeróbia/Aeróbia são apresentados na figura 13. A imagem possui duas cores de fundo, onde parte com fundo azul representa a fase II aeróbia.

**Figura 13 – Degradação do 2,6 Di-Nitro-Tolueno – Condição Anaeróbia/Aeróbia**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Após 3 semanas do início do experimento, observou-se uma expressiva redução da concentração do 2,6 Di-Nitro-Tolueno nos biorreatores contendo a fonte de carbono Dehalo-GS (AN3) e com pH ajustado (AN4). Entretanto, mais lenta se comparada a degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno para o mesmo período. As concentrações do 2,6 Di-Nitro-Tolueno sob estas condições baixaram de 10.2 mg/L

para 5,3 mg/L e 0,2 mg/L, respectivamente para a primeira (T1) e segunda amostragem (T2).

A partir da terceira amostragem (T3), ocorreu a degradação completa do 2,6 Di-Nitro-Tolueno, pois não houve detecção. A degradação mais lenta do 2,6 Di-Nitro-Tolueno, comparada ao 2,4 Di-Nitro-Tolueno, foi descrita por NISHINO & SPAIN (2004), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Os biorreatores Branco (AN2), diferentemente do comportamento do 2,4 Di-Nitro-Tolueno, apresentaram estabilidade ao longo de boa parte do experimento. Somente na última amostragem (T8), houve uma redução discreta da concentração de 2,6 Di-Nitro-Tolueno (7.6 mg/L).

O biorreator esterilizado (AN1) também apresentou alterações na concentração de 2,6 Di-Nitro-Tolueno pouco significativas ao longo de boa parte do experimento. Somente na última amostragem (T8) houve redução da concentração de 2,6 Di Nitro Toluendo (5,9 mg/L). Esta degradação na última amostragem não era esperada.

Tanto para os biorreatores esterilizados (AN1) como para os biorreatores Branco (AN2), pode se concluir que, 90 % do período de incubação, não houve degradação significativa do 2,6 Di-Nitro-Tolueno, evidenciando baixa atividade biótica nestas condições.

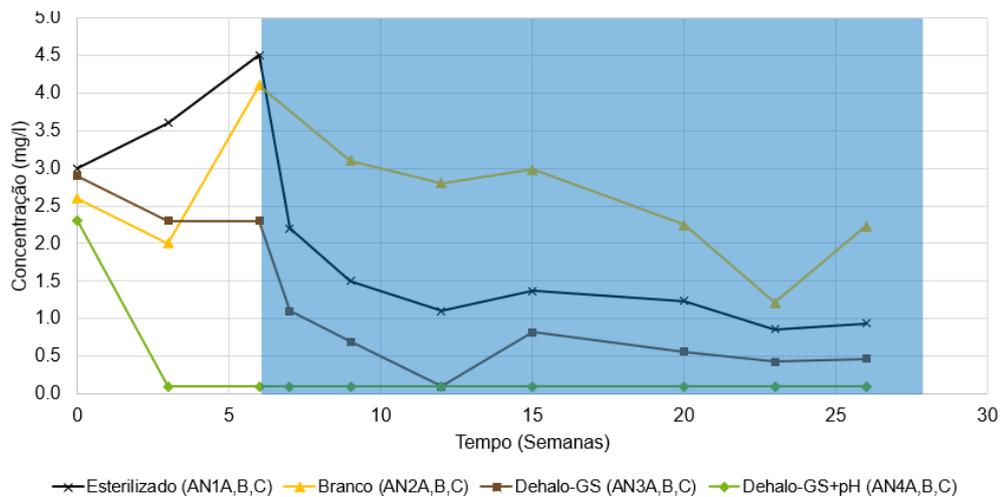
Consonante com os relatos de NOGUEIRA e FREEDMAN (1996), os biorreatores onde foi adicionada a fonte de carbono Dehalo-GS (doador de elétrons) e o pH do meio ajustado, houve degradação acelerada dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno.

### **5.1.3 Nitro Tolueno (Isômeros)**

HUANG et al. (2015) afirmam que a degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno sob condições anaeróbias e aeróbias gera diferentes compostos, dentre eles os isômeros 2 Nitro Tolueno, 3 Nitro Tolueno e 4 Nitro Tolueno. Comparando-se com os resultados obtidos no presente estudo e ilustrados na figura 14, observa-se um aumento das concentrações dos isômeros de Nitro Toluenos na condição anaeróbia (fase I), consequência da degradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-

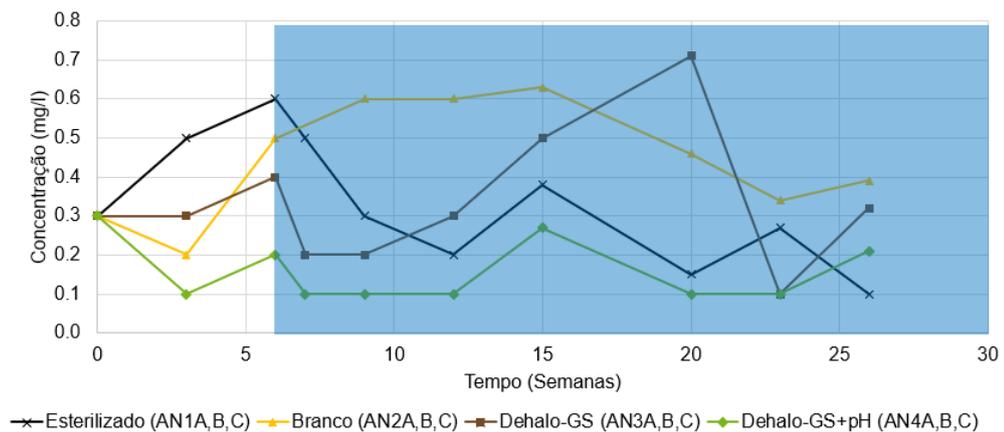
Tolueno. Este comportamento é mais evidente para o 4 Nitro Tolueno. A coloração em azul nos gráficos abaixo representa o período de incubação Fase II, condição Anaeróbia/Aeróbia, ou seja, sob a presença de oxigênio.

**Figura 14 – Degradação do 2 Nitro Tolueno (Condição Anaeróbia/Aeróbia)**



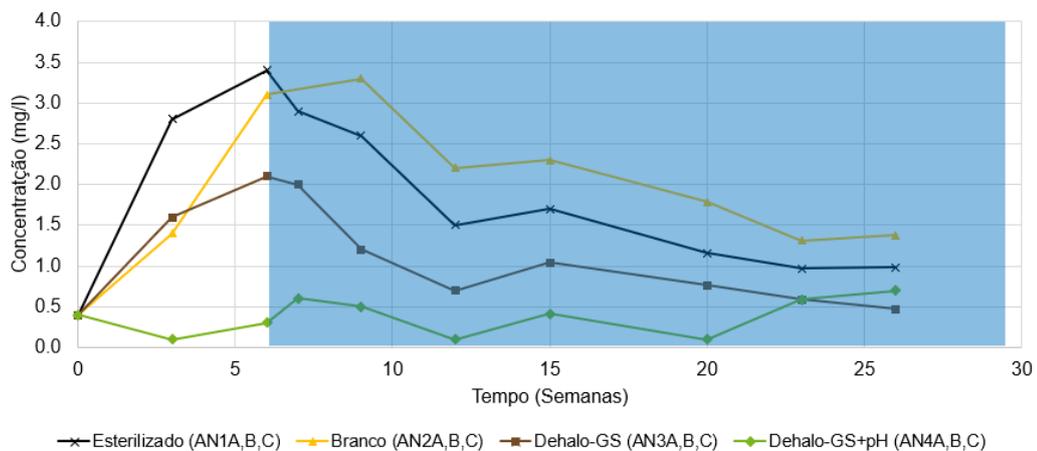
Fonte: Dow Terneuzen (2021)

**Figura 15 – Degradação do 3 Nitro Tolueno (Condição Anaeróbia/Aeróbia)**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

**Figura 16 – Degradação do 4 Nitro Tolueno (Condição Anaeróbia/Aeróbia)**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Durante a fase II aeróbia, sob a presença de oxigênio, as concentrações dos isômeros de Nitro Tolueno apresentam degradação mais acentuada. Este comportamento já foi observado por SPANGGORD et al. (1991).

Como descrito por NOGUEIRA e FREEDMAN (1996) e FREEDMAN et al. (1996), os biorreatores onde foi adicionada a fonte de carbono Dehalo-GS (doador de elétrons) e o pH do meio ajustado (AN3 e AN4), houve degradação acelerada dos Isômeros de Nitro Tolueno quando comparados com os biorreatores esterilizado (AN1) e Branco (AN2).

Os biorreatores onde foram adicionadas as fontes de carbono (Dehalo-GS) e, ajustado pH ~ 7,5, observou-se a maior taxa de degradação para os 3 isômeros de Nitro Tolueno.

Como parte de um processo dinâmico e difícil de ser controlado (HUN-SUNGSOO, 2008), a geração e degradação dos isômeros de Nitro Tolueno e degradação do 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno também ocorreu simultaneamente, tornando mais complexa a interpretação dos gráficos. Observou-se que os isômeros

2 Nitro Tolueno e 4 Nitro Tolueno foram detectados em maior concentração que o 3 Nitro Tolueno. Isso pode ter ocorrido devido a seletividade do processo de degradação. O aumento da concentração dos isômeros de Nitro Tolueno à medida que a degradação do 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno ocorre fica mais evidente no gráfico do 4 Nitro Tolueno.

#### **5.1.4 Comparativo dos Resultados 2,4 e 2,6 Di-Nitro Tolueno com Produtos de Degradação para Condição Anaeróbia – Biorreatores AN3 E AN4.**

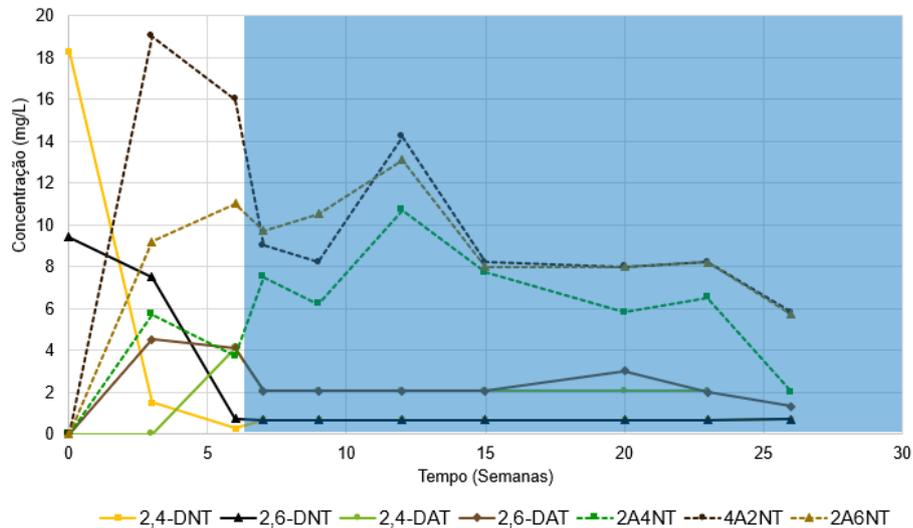
Adicionalmente aos isômeros de Nitro Tolueno, já citados nos itens anteriores, outros compostos serão gerados no processo de degradação anaeróbio do 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno, dentre eles os 2 Amino 4 Nitrotolueno (2A4NT); 4 Amino 2 Nitrotolueno (4A2NT); 2 Amino 6 Nitrotolueno (2A6NT); 2-Amino Tolueno (2AT) ; 3-Amino Tolueno (3AT) e 4-Amino Tolueno (4AT) (HUANG et al., 2015).

Como citado por HAN SUNGSOO (2008), processo de degradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno e seus compostos de degradação é dinâmico e difícil de ser controlado. Assim, estes compostos são apresentados em uma única figura para melhor entendimento, a parte com fundo azul no gráfico representa a fase II aeróbia.

A Figura 17 mostra um comparativo da concentração dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno (descendente) e concentração dos compostos de degradação 2 Amino 4 Nitrotolueno (2A4NT); 4 Amino 2 Nitrotolueno (4A2NT); 2 Amino 6 Nitrotolueno (2A6NT); 2,4 Di Amino Tolueno; 2,6 Di Amino Tolueno (ascendente até a completa degradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno).

Após atingir o pico de concentração os compostos de degradação também se degradam. Como citado por HUANG et al. (2015), a degradação encontra ambiente mais favorável sob condições aeróbias, entretanto, este cenário pode ser influenciado pelas condições do meio (NOGUEIRA & FREEDMAN, 1996). Tal observação foi comprovada quando comparamos o comportamento dos mesmos compostos sob condições similares (AN3 versus AN4).

**Figura 17 – Comparativo resultados 2,4 e 2,6 Di-Nitro Tolueno com produtos de degradação para condição Anaeróbia AN3 (Doador de elétrons Dehalo-GS)**

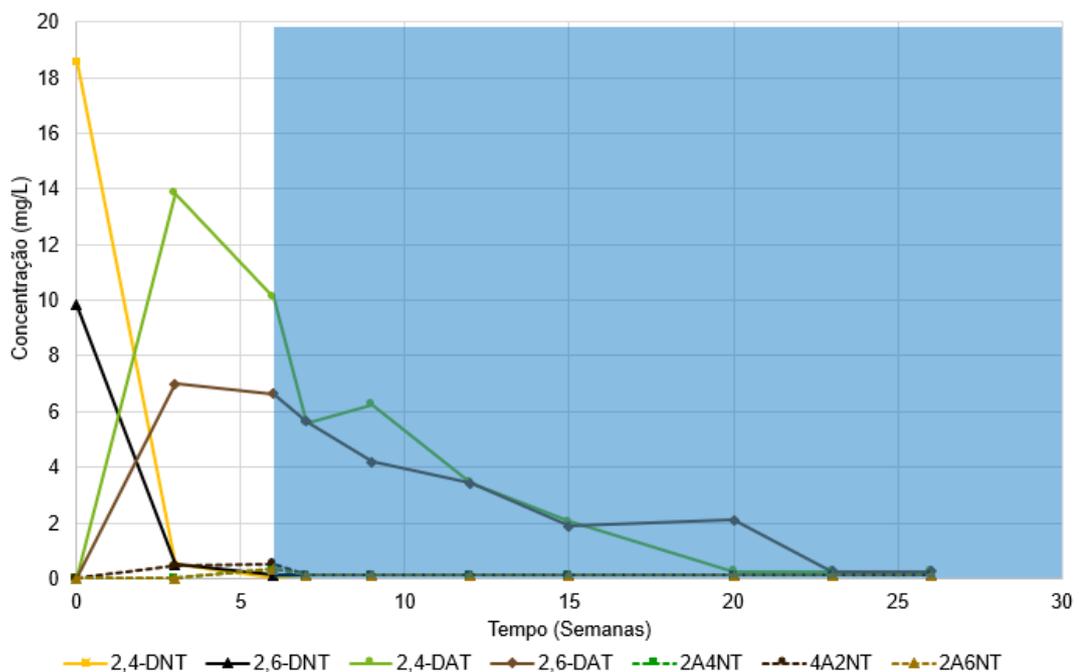


Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Os 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno são degradados rapidamente sob condições anaeróbicas (HUANG et al., 2015; NOGUEIRA & FREEDMAN, 1996; YANG, ZHAO & HAWARI, 2009; ABURTO MEDINA et al., 2017; NISHINO & SPAIN, 2001), porém, os compostos de degradação 2 Amino 4 Nitrotolueno (2A4NT); 2,4-Diaminotolueno, 2,6-Diaminotolueno, 4 Amino 2 Nitrotolueno (4A2NT); 2 Amino 6 Nitrotolueno (2A6NT); 2,4 Amino Tolueno; 2,6 Amino Tolueno encontram no ambiente aeróbio uma condição mais favorável para degradação (HUANG et al., 2015).

Na Figura 17 comparando os resultados dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro Tolueno com produtos de degradação para condição Anaeróbia AN3 (Doador de elétrons Dehalo-GS), observa-se que a degradação completa dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno ocorreu entre os intervalos de amostragem T2 e T3. Quando comparamos com a figura 18, observamos que os resultados dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro Tolueno e compostos de degradação para condição Anaeróbia AN4 (Doador de elétrons Dehalo-GS + pH ajustado), nota-se, claramente, a aceleração do processo de degradação de todos os compostos, inclusive a degradação total dos compostos no intervalo de amostragem T8. Tal comparativo confirma as conclusões de Nogueira e FREEDMAN, (1996).

**Figura 18 – Comparativo resultados 2,4 e 2,6 Di-Nitro Tolueno com produtos de degradação para condição Anaeróbia AN4 (Doador de elétrons Dehalo-GS + pH ajustado)**

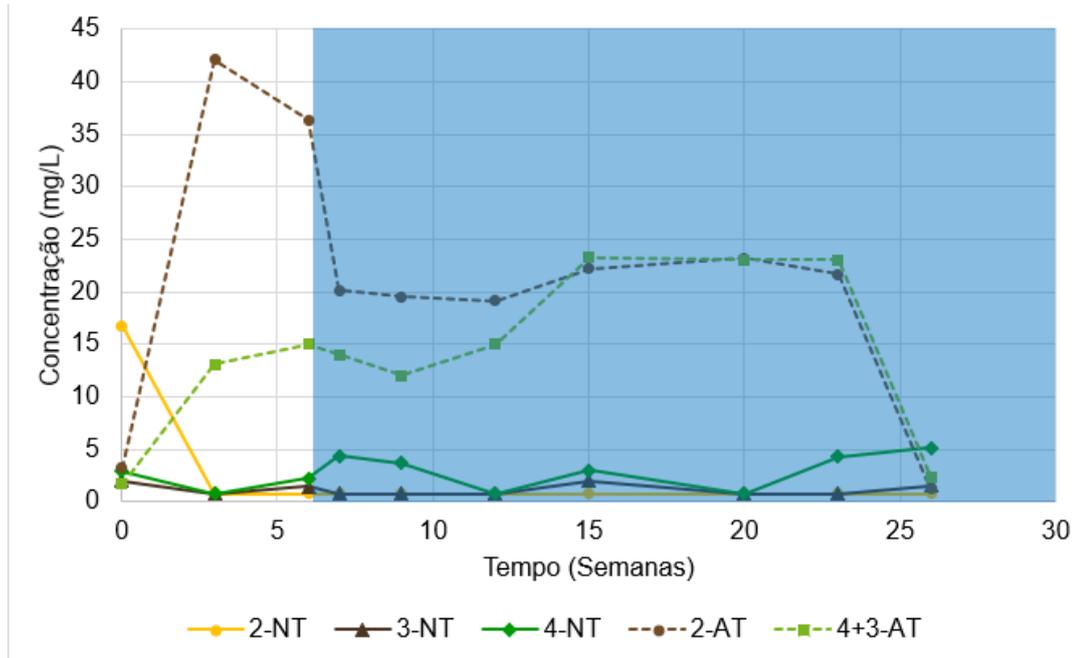


Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Segundo SPANGGORD et al. (1991) a degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno pode ocorrer de várias formas dependendo da condição do meio e gerar distintos compostos de degradação. Neste experimento observou-se que nos primeiros intervalos de amostragem (primeiras semanas de incubação) ocorre a degradação de um “radical nitroso”, convertendo-se a molécula de 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno a algum dos isômeros de Nitro Tolueno (SPANGGORD et al., 1991).

Na sequência, o segundo “radical nitroso” é convertido e forma os isômeros 2,4 e 2,6 Di Amino Tolueno. Obviamente, esta reação não é única ou isolada. Assim como foi descrito por HAN SUNGSOO, (2008) e apresentado na figura 19 outros compostos de degradação, além dos isômeros 2,4 e 2,6 Di Amino Tolueno, podem ser formados, por exemplo, os isômeros de Amino Tolueno ou Metil Nitro Catecol.

**Figura 19 – Comparativo resultados Nitro Tolueno x Amino Tolueno para condição Anaeróbia AN4 (Doador de elétrons Dehalo-GS + pH ajustado)**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

### 5.1.5 pH para os Biorreatores Sob Condições Anaeróbia/Aeróbia.

O pH é um parâmetro importante e influencia significativamente o processo de biodegradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno e seus produtos de degradação. A manutenção do pH em uma faixa ligeiramente neutra favorece a proliferação das colônias de bactérias (HUN-SUNGSOO, 2008; NOGUEIRA & FREEDMAN, 1996).

O pH dos biorreatores para a condição anaeróbia, nas fases I e II, foi monitorado semanalmente.

Exceto para os biorreatores AN4 (A,B,C), onde foi ajustado o pH com solução tampão antes da incubação e partiu de pH 7,5, todos os outros biorreatores iniciaram o período de incubação com pH variando de 5,8 a 6,2.

Os biorreatores AN4 A,B,C (Dehalo-GS + pH ajustado) apresentaram um comportamento relativamente estável em relação ao pH, variando entre pH 7,0 a 7,8.

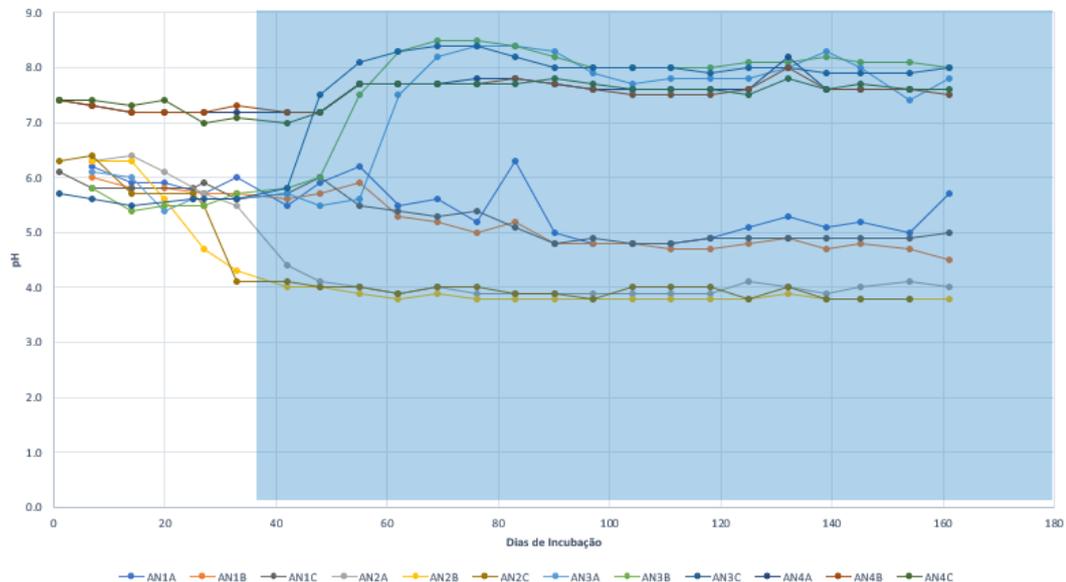
Os biorreatores AN3 A,B,C (Dehalo-GS) mantiveram o pH, pelas primeiras 5 semanas, entre 5,3 e 6,0. Após este período, houve um aumento do pH em todos os

biorreatores chegando a pH 8,5. Esta alteração coincide com o período de transição da fase I anaeróbia para a fase II aeróbia.

Similar comportamento foi observado nos biorreatores Branco (AN2 A, B, C), porém no sentido contrário, ou seja, o pH que na primeira amostragem variou entre 5,8 a 6,2 baixou a partir da quarta semana e se manteve até o final do experimento variando entre 3,9 a 4,1

Os biorreatores Esterilizado (AN1 A, B, C) também apresentaram comportamento de pH relativamente estável nas primeiras 5 semanas e descendente a partir da sexta semana, sendo a variação para esta condição de pH 6,2 (máximo) e pH 4,5 (mínimo). Não observado na literatura pesquisada nenhum estudo específico para o comportamento do pH versus o meio de incubação.

**Figura 20 – Resultados pH para os biorreatores sob condições Anaeróbia/Aeróbia**



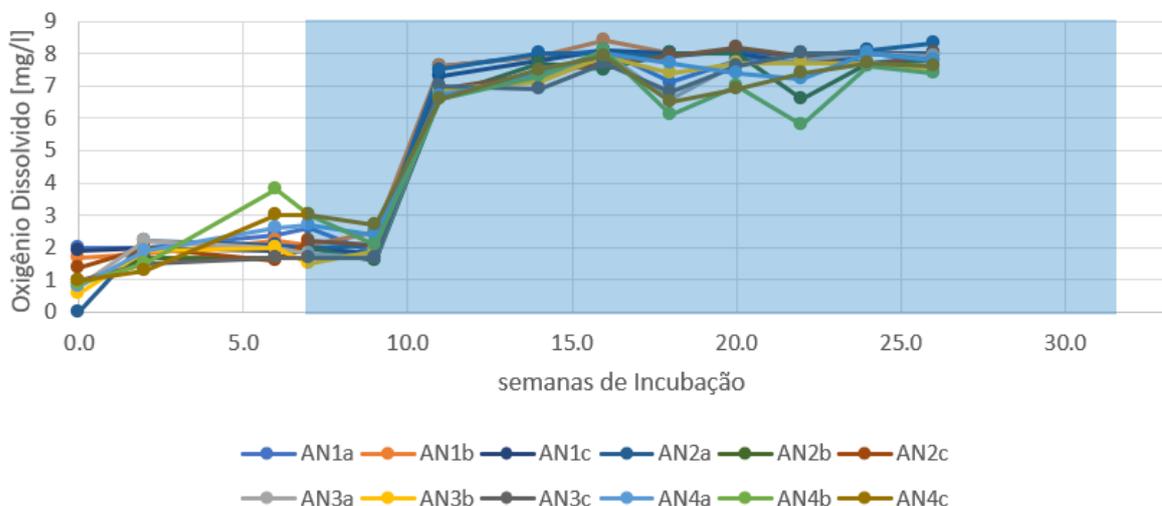
Fonte: Laboratório Deltaris (2021)

### 5.1.6 Oxigênio Dissolvido para os Biorreatores Sob Condições Anaeróbias/Aeróbias.

A concentração de oxigênio dissolvido foi medida em todos os biorreatores para todas as condições de incubação durante todo o experimento. Durante a fase I anaeróbia, o objetivo foi manter a concentração de oxigênio dissolvido o mais baixo possível. Na fase I a concentração de oxigênio dissolvido variou, para todos os biorreatores, entre zero e 4 mg/L.

Para a fase II foram adicionadas a todos os biorreatores pequenas dosagens de peróxido de hidrogênio como forma de aumentar a concentração de oxigênio dissolvido, tornando o meio aeróbio. Nesta fase o objetivo foi manter a concentração de oxigênio dissolvido acima de 5 mg/L. Tal conversão ocorreu entre a sétima e oitava semanas, sendo que concentrações superiores a 5 mg/L de oxigênio dissolvido foram atingidas a partir da décima semana. A concentração média de oxigênio dissolvido (após conversão para o meio aeróbio) foi mantida até o final do experimento em torno de 8,0 mg/L.

**Figura 21 – Resultados Oxigênio Dissolvido para os biorreatores sob condições Anaeróbia/Aeróbia.**



Fonte: Laboratório Deltaris (2021)

### 5.1.7 Íon Nitrato para os Biorreatores Sob Condições Anaeróbias/Aeróbias

Para a condição anaeróbia/aeróbia era esperada a formação de íons nitrito e nitrato durante o processo de degradação (PANTOJA et al., 2013).

Curiosamente tal fato foi observado apenas para os biorreatores Branco (AN2 A, B, C), onde não foi adicionado o doador de elétrons Dehalo-GS. As concentrações do íon nitrato foram detectadas somente após a décima segunda semana de incubação e foram inferiores a 3 mg/L.

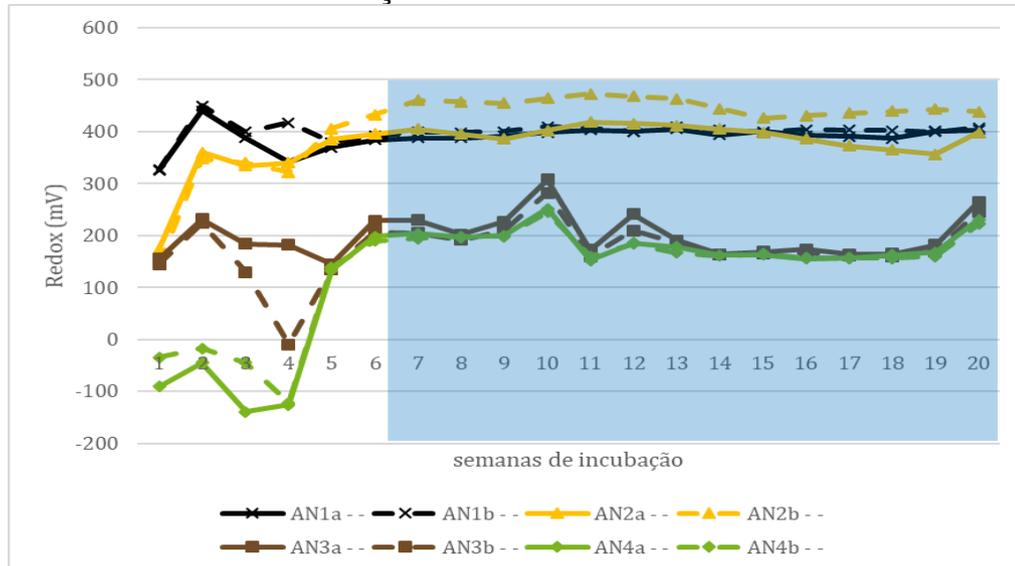
### **5.1.8 Potencial Oxidação/Redução para os Biorreatores Sob Condições Anaeróbias/Aeróbias**

A manutenção do meio redutor é um fator importante para que ocorra a redução dos compostos de interesse e seus subprodutos/compostos de degradação (XIU et al., 2010). Pode-se observar no gráfico abaixo que o ambiente oxidante foi mantido para todos os biorreatores durante todo o tempo de incubação, exceto para aqueles que tiveram adição do doador de elétrons Dehalo-GS e pH ajustado com solução tampão (AN4 A, B).

Os biorreatores AN4 apresentaram um meio ligeiramente redutor nas primeiras 4 semanas de incubação (Figura 22). Este período de tempo coincide com a fase I anaeróbia. Entre a quarta e quinta semanas o meio oxidante se estabeleceu e foi mantido até o final do experimento. Vale ressaltar que a transição para fase II aeróbia coincide com a mudança do meio para um ambiente oxidante para os biorreatores AN4 A e B.

Nota-se que na Figura 22 que a parte com fundo azul representa a fase II aeróbia, a medição do potencial de oxidação e redução foi realizada somente para os biorreatores A e B de cada condição de incubação. Ainda, segundo a publicação: *“Introduction to In Situ Bioremediation of Groundwater”* (USEPA, 2013) o potencial de oxido-redução (ORP) demonstra a tendência do meio aquoso em doar ou receber elétrons. As soluções aquosas com potencial de oxido-redução positivo apresentam ambiente com tendência oxidante enquanto soluções com potencial oxido-redução negativo apresentam tendência a um ambiente redutor.

**Figura 22 – Resultados Potencial Oxidação/Redução para os biorreatores sob condições Anaeróbia/Aeróbia**



Fonte: Laboratório Deltaris (2021)

## 5.2 PROCESSO TOTALMENTE AERÓBIO

A seguir, são apresentados os resultados do experimento para a condição exclusivamente aeróbia, bem como as figuras que ilustram o processo de degradação dos compostos de interesse e seus subprodutos.

Para preparação dos gráficos foram consideradas as médias aritméticas dos resultados (duplicatas e triplicatas) para cada composto de interesse/parâmetro de controle/monitoramento.

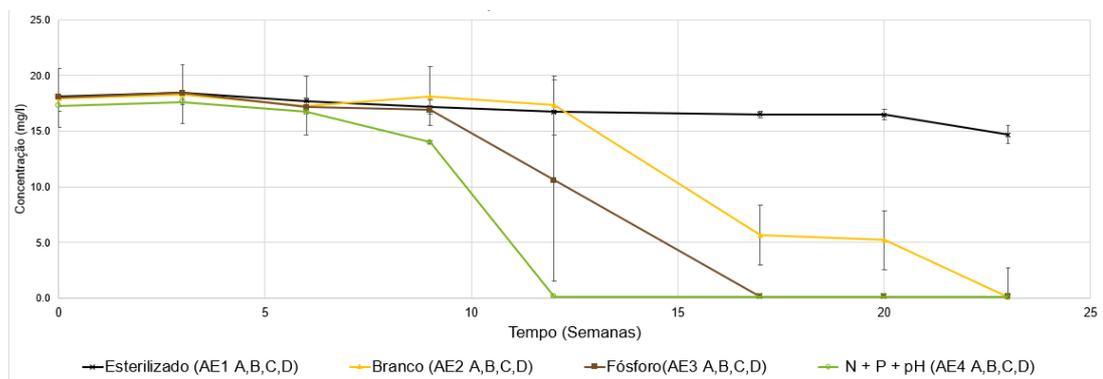
Devido ao *lockdown* implantado para combate à pandemia de COVID-19 não foi possível seguir o plano de amostragem definido, sendo necessário alongar o tempo de incubação. Tal fato não trouxe prejuízo ao experimento.

### 5.2.1 2,4 Di-Nitro Tolueno

A concentração inicial de 2,4 Di-Nitro-Tolueno, para todos os biorreatores variou de 17,3 mg/L a 17,5 mg/L. Nas primeiras 2 amostragens (T1 e T2) praticamente não houve degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno. A partir da terceira amostragem (T3), observou-se uma discreta redução da concentração do 2,4 Di-

Nitro-Tolueno para os biorreatores AE4 (A,B,C,D) 14,0 mg/L. Vale ressaltar que os biorreatores AE4 foram preparados com adição de nutrientes fósforo (P), nitrogênio (N) e pH ajustado para 7,5 com solução tampão, este comportamento está ilustrado na Figura 23.

**Figura 23 – Resultados 2,4 Di-Nitro Tolueno para os biorreatores sob condição Aeróbia**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Verifica-se ainda que na quarta amostragem (T4) ocorreu a completa degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno para os biorreatores AE4 (A,B,C,D), bem como redução da concentração para 10,7 mg/L para os biorreatores AE3 (A,B,C,D). Aos biorreatores da condição AE3 foi adicionado, apenas, o nutriente fósforo (P). Não foi observada degradação para os biorreatores AE1 Esterilizado e AE2 Branco nesta amostragem.

Na amostragem seguinte (T5), foi observada a completa degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno para os biorreatores AE3 (A,B,C,D), bem como uma redução expressiva dos biorreatores AE2 Branco. A concentração média detectada para os biorreatores AE2 (A,B,C,D) foi de 5,5 mg/L. Não foi observada degradação para os biorreatores AE1 Esterilizado nesta amostragem.

Na última amostragem (T7) observou-se a completa degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno para os biorreatores AE2 (A,B,C,D) Branco. Para os biorreatores AE1 (A,B,C,D) Esterilizado foi observada uma redução muito discreta nesta amostragem.

A concentração média detectada para os biorreatores AE1 (A,B,C,D) na amostragem T7 foi 14,8 mg/L.

Assim, podemos concluir que a degradação do composto 2,4 Di-Nitro-Tolueno também ocorre sob condição aeróbica, entretanto, a velocidade da degradação é mais lenta quando comparada com o experimento sob condição anaeróbica. Temos que ressaltar, também, que as condições de preparação foram diferentes para os biorreatores sob a condição AN3(A,B,C,D) e AN4(A,B,C,D). A degradação menos favorável do composto 2,4 Di-Nitro-Tolueno sob condição aeróbia foi citada por HAN SUNGSOO, (2008) e SPANGGORD et al. (1991).

Outra conclusão sobre a degradação do composto 2,4 Di-Nitro-Tolueno neste experimento é que as condições do meio, de fato, favorecem o processo de degradação (HANG, 2011; NOGUEIRA & FREEDMAN, 1996).

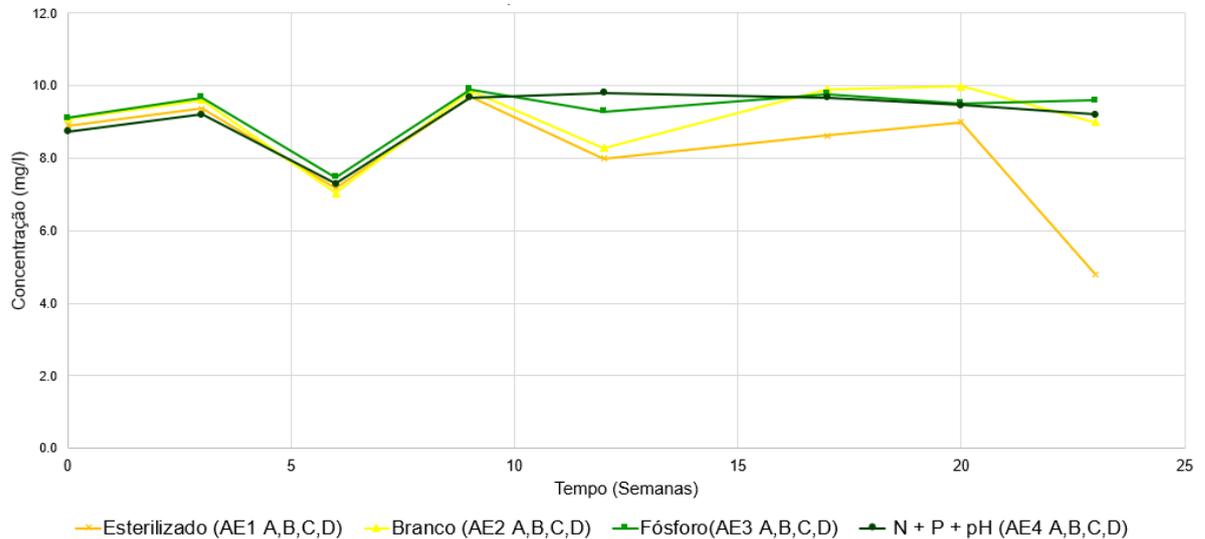
Para os biorreatores AE1 esterilizado, podemos concluir que durante a maioria do tempo de incubação, não houve degradação significativa do 2,4 Di-Nitro-Tolueno, evidenciando baixa atividade biótica nestas condições.

#### **5.2.2 2,6 Di-Nitro Tolueno para os Biorreatores Sob Condição Aeróbia**

A concentração inicial de 2,6 Di-Nitro-Tolueno, para todos os biorreatores variou de 8,4 mg/L a 8,6 mg/L durante todo processo de incubação e praticamente não houve redução significativa das concentrações do 2,6 Di-Nitro-Tolueno nos biorreatores.

Observou-se uma redução generalizada e na mesma ordem de grandeza para todos os biorreatores no intervalo de amostragem T2. Na amostragem seguinte, T3, as concentrações de todos os biorreatores subiu, também, de forma generalizada e na mesma ordem de grandeza, aproximando-se dos valores obtidos no intervalo de amostragem T1, este comportamento está ilustrado na figura 24. Hipoteticamente, pelo comportamento similar de todos os biorreatores, tal oscilação pode estar associada a uma variação do conjunto analítico (equipamento ou método).

**Figura 24 – Resultados 2,6 Di-Nitro Tolueno para os biorreatores sob condição Aeróbia**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Ao final do tempo de incubação, T7, os biorreatores AE3 (A,B,C,D) e AE4 (A,B,C,D) apresentaram valores muito similares aos valores de T0. Isso nos permite concluir que, tecnicamente, não houve degradação do composto 2,6 Di-Nitro-Tolueno nestas condições.

Curiosamente, os biorreatores AE1 (A,B,C,D) Esterilizado, apresentaram a maior variação de concentração durante o tempo de incubação. A final do experimento, T7, a concentração média do composto 2,6 Di-Nitro-Tolueno foi 4,8 mg/L. Este comportamento contraria a lógica, pois a adição de Cloreto de Mercúrio ao meio não favorece a atividade biótica.

O comportamento observado para 2,6 Di-Nitro-Tolueno quanto a sua não degradação é consistente com estudos realizados por NISHINO & SPAIN, (2004). As condições do meio não favoreceram o processo de degradação, diferentemente do que ocorreu no processo anaeróbio. Esta conclusão também é citada por NOGUEIRA & FREEDMAN, (1996).

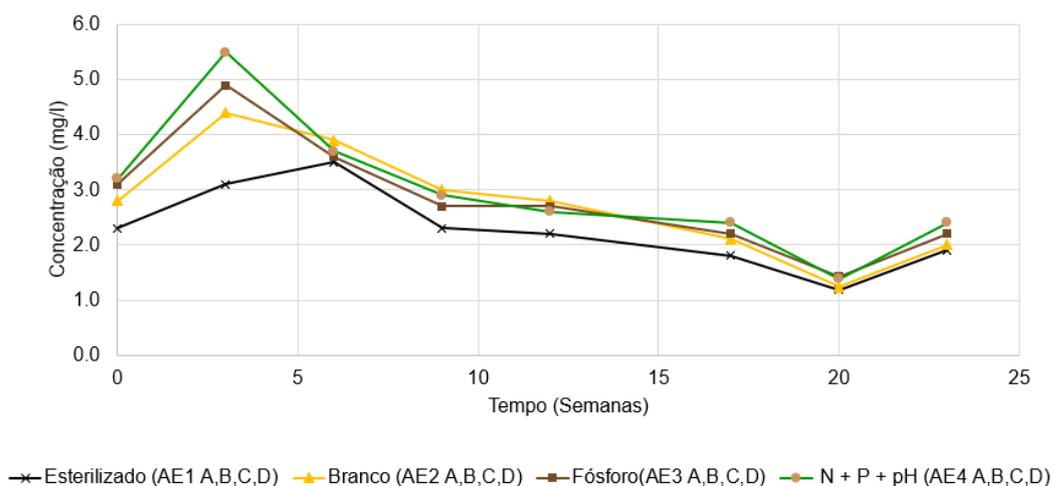
### 5.2.3 Isômeros do Nitro Tolueno

Os isômeros 2 Nitro Tolueno, 3 Nitro Tolueno e 4 Nitro Tolueno são citados na literatura como produtos de degradação do 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno sob condições aeróbias (HUANG et al., 2015)

Analisando-se as figuras 25, 26 e 27, observa-se um aumento das concentrações dos isômeros de Nitro Tolueno na fase inicial de incubação. Tal comportamento é consequência da degradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno. Este comportamento também ocorreu no experimento sob condição anaeróbia.

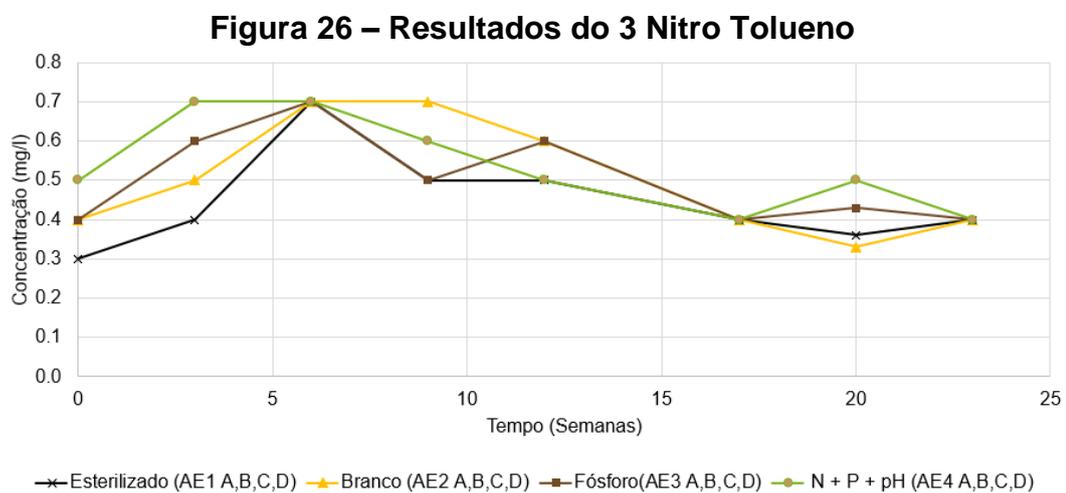
Para o isômero 2 Nitro Tolueno (Figura 25) a degradação não atingiu 100%, aliás, a degradação deste composto foi discreta e ocorreu de forma parecida para todos os biorreatores. O valor médio das concentrações dos biorreatores no início da incubação (T0) foi de 2,3 mg/L (AE1), 2,8 mg/L (AE2), 3,1 mg/L (AE3) e 3,2 mg/L (AE4), sendo que ao final do experimento, após aproximadamente 23 semanas de incubação, as concentrações detectadas foram 1,9 mg/L (AE1), 1,95 mg/L (AE2), 2,2 mg/L (AE3) e 2,4 mg/L (AE4).

**Figura 25 – Resultados do 2 Nitro Tolueno**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

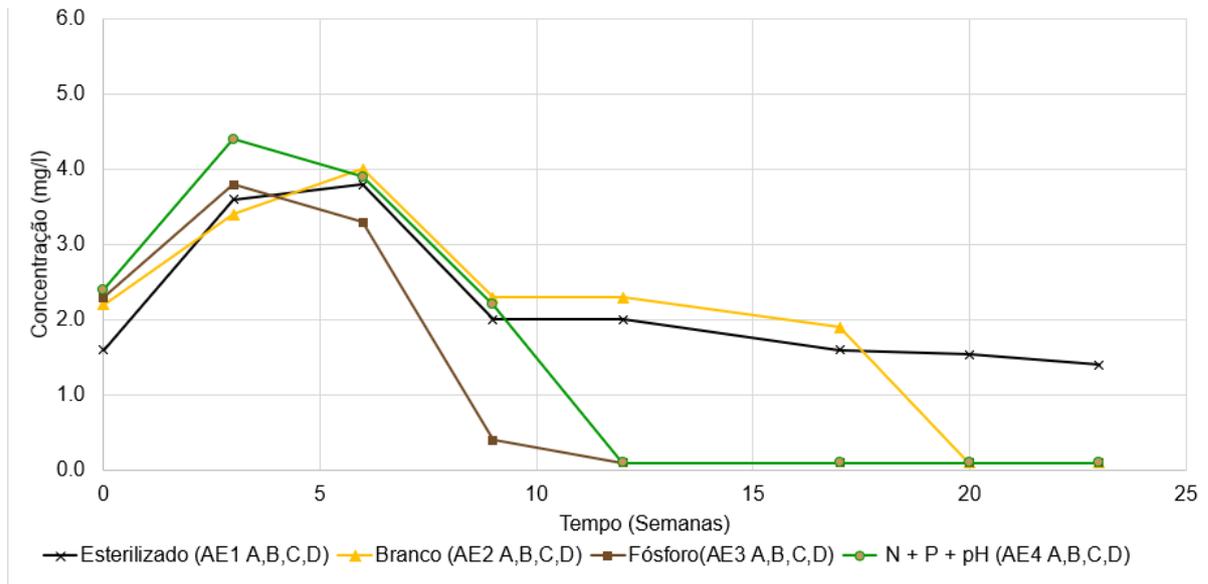
Para o isômero 3 Nitro Tolueno a degradação não ocorreu em nenhum dos biorreatores (Figura 26). O valor médio das concentrações dos biorreatores no início da incubação (T0) foi de 0,3 mg/L (AE1), 0,4 mg/L (AE2), 0,4 mg/L (AE3) e 0,5 mg/L (AE4). Apesar de um ligeiro aumento das concentrações entre T1 e T4, após aproximadamente 23 semanas de incubação (T7), as concentrações detectadas foram 0,4 mg/L (AE1), 0,4 mg/L (AE2), 0,4 mg/L (AE3) e 0,4 mg/L (AE4), ou seja, valores praticamente iguais aos valores das concentrações iniciais.



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Para o 4 Nitro Tolueno a degradação foi bem mais evidente que os outros isômeros, sendo que para os biorreatores AE3 e AE4 a degradação foi completa (Figura 27). Para os biorreatores AE2 Branco a degradação completa ocorreu após 20 semanas de incubação (T6). Para os biorreatores AE1 Esterilizado, tecnicamente, não houve degradação uma vez que a concentração dos biorreatores nesta condição foi de 1,6 mg/L em T0 e 1,5 mg/L em T7.

**Figura 27 – Resultados do 4 Nitro Tolueno**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Curiosamente, todos os biorreatores para todas as condições do experimento aeróbico apresentaram acréscimo nas concentrações no intervalo de amostragem T1. Tal comportamento era esperado para AE3 e AE4, eventualmente, para AE2, por conta da degradação do 2,4 Di Nitro Tolueno. Entretanto, isto não era esperado para os biorreatores AE1 Esterilizado.

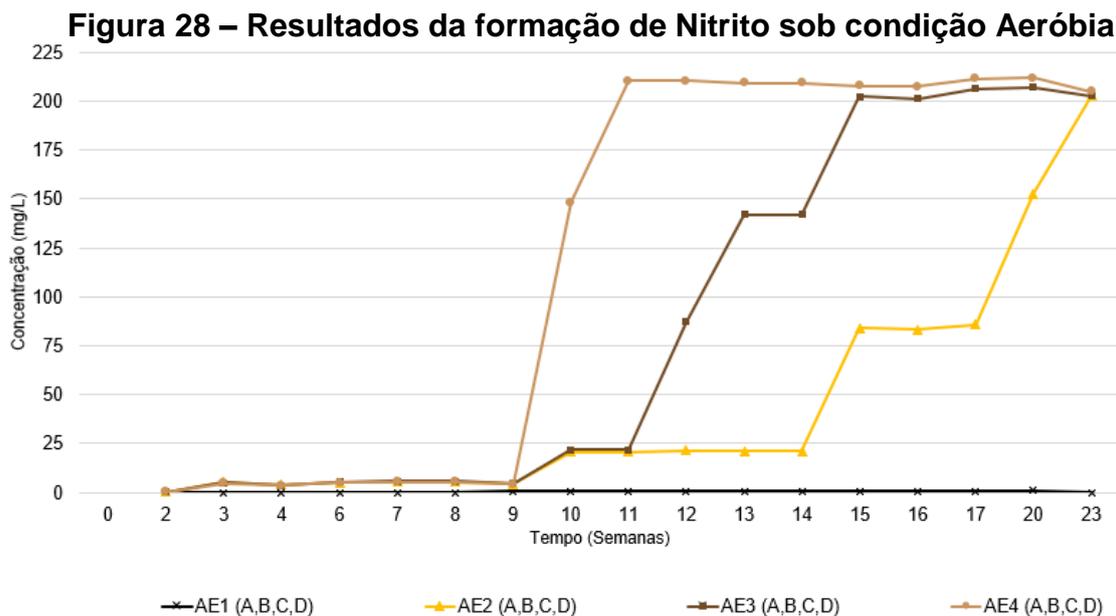
Para o isômero 4 Nitro Tolueno, a exemplo do que ocorreu no experimento anaeróbico e corroborando com as conclusões de NOGUEIRA & FREEDMAN, (1996), os biorreatores onde foram adicionados nutrientes e ajustado o pH (AE3 e AE4), apresentaram degradação acelerada quando comparados com os biorreatores esterilizado (AE1) e Branco (AE2).

Os biorreatores onde foram adicionados os nutrientes fósforo (P), AE3, apresentaram a maior taxa de detração no intervalo de amostragem T3 quando comparado aos outros biorreatores / outras condições.

### 5.2.4 Formação de Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) Sob Condição Aeróbia

Durante o processo de incubação, as análises dos íons Nitrito e Nitrato foram realizadas semanalmente. Apenas a partir da 9ª semana foi detectada a formação de Nitrito. Não foi observada a formação de Nitrato em nenhum dos biorreatores para o experimento aeróbio (Figura 28).

A formação do íon Nitrito ocorre pela degradação do radical nitroso dos 2,4 e 2,6 Nitro Tolueno e Isômeros do Nitro Tolueno (PANTOJA, 2013). Então, quando comparamos a linha temporal de formação do Nitrito com a linha temporal de degradação do 4 Nitro Tolueno é possível estabelecer uma correlação para os biorreatores AE2, AE3 e AE4.



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

### 5.2.5 pH para os Biorreatores Sob Condição Aeróbia

Tanto para o meio anaeróbio como para o aeróbio, o pH é um parâmetro importante e influencia, significativamente, o processo de biodegradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno e seus produtos de degradação (NOGUEIRA & FREEDMAN, 1996). Para o experimento aeróbio manutenção do pH dos

biorreatores AE4 foi mantido numa faixa ligeiramente neutra para favorecer a proliferação das colônias de bactérias.

O pH dos biorreatores foi monitorado semanalmente, durante o processo de incubação do experimento aeróbio. O pH dos biorreatores no início do processo de incubação variou entre 7,4 e 7,9 (Figura 29).

**Figura 29 – Resultados pH para os biorreatores sob condição Aeróbia**



Fonte: Laboratório Deltaris (2021)

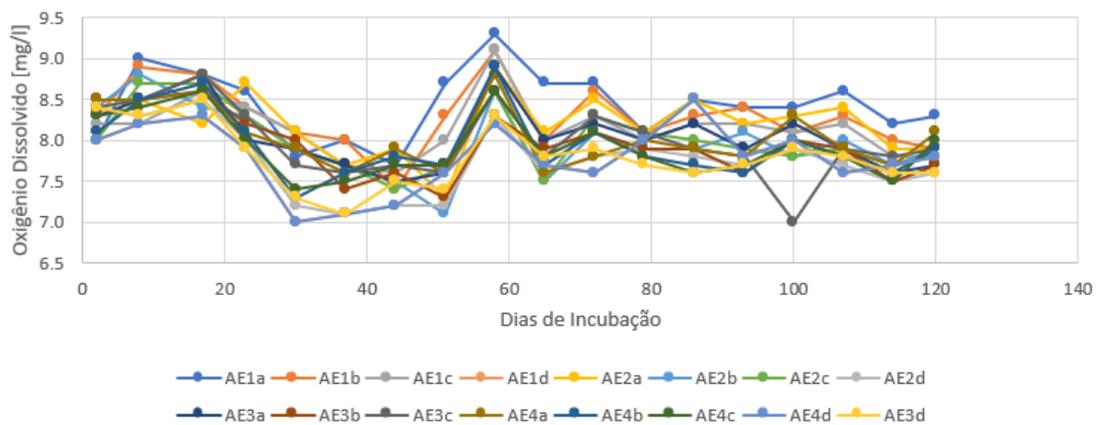
Durante o tempo de incubação alguns biorreatores apresentaram alterações de pH. Os biorreatores AE1 Esterilizado apresentaram declínio do pH a partir do 45º dia de incubação, sendo que ao final do experimento apresentou o menor valor de pH dentre todos os biorreatores/condições. Os biorreatores onde o pH foi ajustado (AE4) com solução tampão permaneceram com pH estável, ao redor de 7,5 até o final do tempo de incubação.

Os biorreatores AE2 Branco e AE3 (Fósforo) apresentaram oscilações de pH ao longo do tempo de incubação, variando entre 7,6 e 8,4.

### 5.2.6 Oxigênio Dissolvido

O objetivo desta medição para o experimento aeróbio foi manter a concentração de oxigênio dissolvido acima de 7,0 mg/L, garantindo, assim, uma concentração mínima para a ocorrência das reações de oxidação. Durante todo o tempo de incubação as concentrações de oxigênio dissolvido variaram entre 7,0 mg/L e 9,3 mg/L (Figura 30).

**Figura 30 – Resultados Oxigênio dissolvido para o experimento Aeróbio**

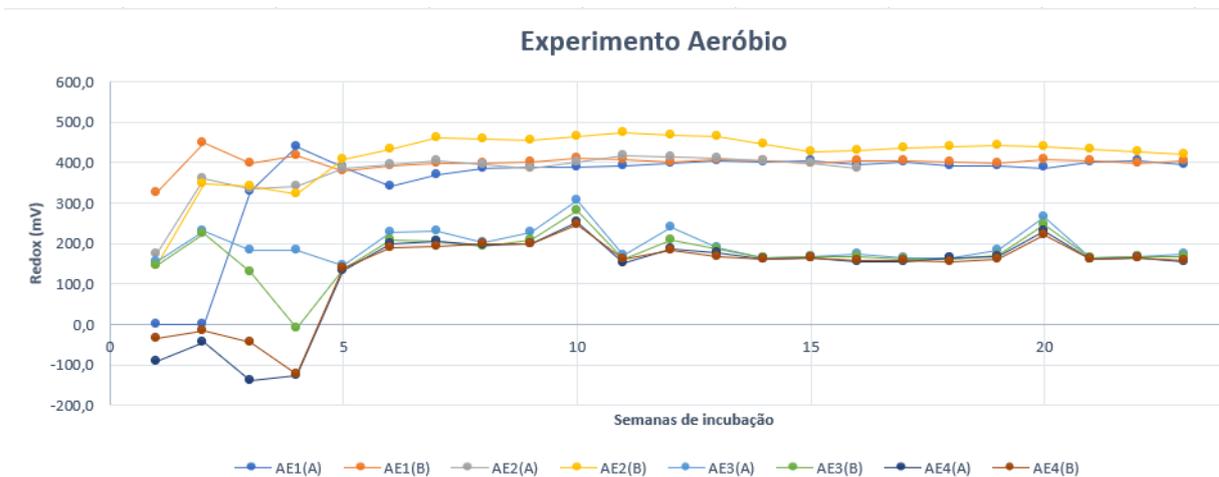


Fonte: Dow Terneuzen (2021)

### 5.2.7 Potencial de Oxidação/Redução. Experimento Sob Condição Aeróbia

A manutenção do meio redutor foi um fator importante para que ocorresse a redução dos compostos de interesse e seus compostos de degradação (XIU et al., 2010). Os resultados para este potencial de redução são apresentados na Figura 31.

**Figura 31 – Resultados Potencial de Oxidação / Redução Experimento sob condição Aeróbia**



Fonte: Dow Terneuzen (2021)

Pode-se observar que o ambiente oxidante foi mantido para todos os biorreatores durante todo o tempo de incubação, exceto para aqueles que tiveram pH ajustado com solução tampão (AE4 A,B).

Os biorreatores AE4 apresentaram um meio ligeiramente redutor nas primeiras 4 semanas de incubação. Na quinta semana o meio oxidante foi estabelecido e foi mantido até o final do experimento. Os biorreatores da condição anaeróbia que tiveram o pH ajustado com solução tampão apresentaram comportamento similar no início do processo de incubação.

### 5.3. ANÁLISE BACTERIOLÓGICA NGS (*Next Generation Sequencing*)

Adicionalmente ao acompanhamento das concentrações dos compostos de interesse 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno e seus subprodutos de degradação foi realizado um estudo da microbiologia presente em alguns biorreatores. Este estudo complementar teve o objetivo de validar o conceito de biodegradação, bem como identificar os microrganismos degradadores presentes em cada condição avaliada e seu comportamento durante a incubação.

Segundo ABURTO MEDINA et al. (2017) pesquisas de biodegradação de compostos Nitro Aromáticos tem priorizado conhecer o ciclo de degradação dos

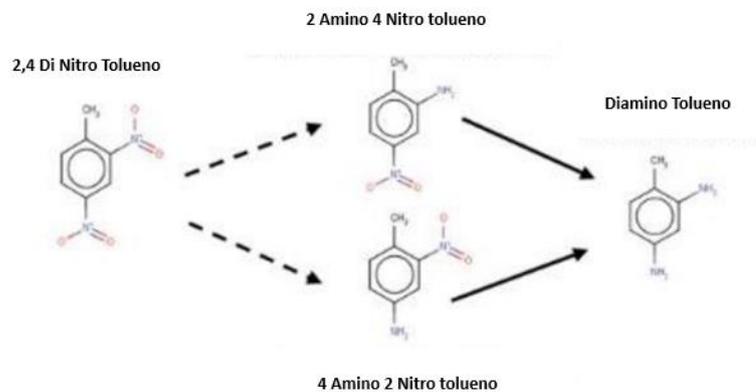
compostos 2, 4, 6 Tri Nitro Tolueno, (popularmente conhecido como TNT). Isso porque a maioria das pesquisas estão associadas com a remediação de solo e água subterrânea de áreas militares. Os isômeros do 2,4 e 2,6 Di Nitro Tolueno também são encontrados em áreas militares com áreas contaminadas. A degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno foi demonstrada, principalmente, pelas seguintes espécies de microrganismos: *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Achromobacter* and *Alcaligenes* (SMETS, & MUELLER, 2001; ABURTO MEDINA et al., 2017).

A maior parte das pesquisas encontradas sobre 2,4 Di-Nitro-Tolueno foca na via de degradação oxidativa. Duas formas de degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno foram demonstradas (SHEMER et al., 2018):

A - Rota oxidativa, na qual os Nitro Grupos são reduzidos a amino grupos e nitrito é liberado

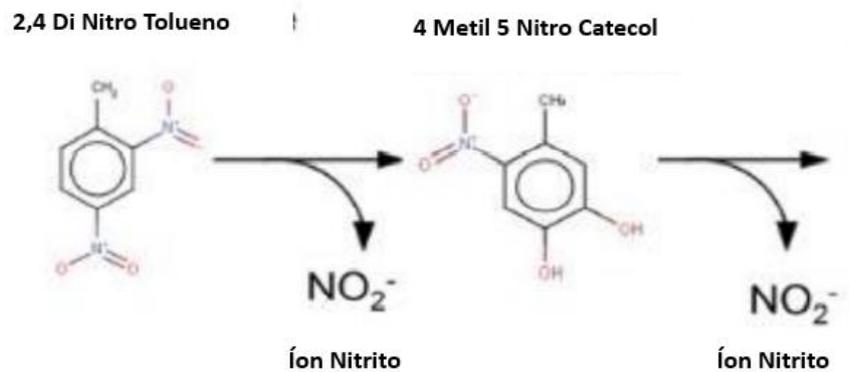
B - Rota redutiva, na qual os Nitro grupos são reduzidos a 4-methyl 5-Nitrocatecol e nitrito é liberado

**Figura 32 – Rota Oxidativa de Degradação do 2,4 Di Nitro Tolueno**



Fonte: SHEMER et al., 2018

**Figura 33 – Rota Redutiva Regração do 2,4 Di Nitro Tolueno**

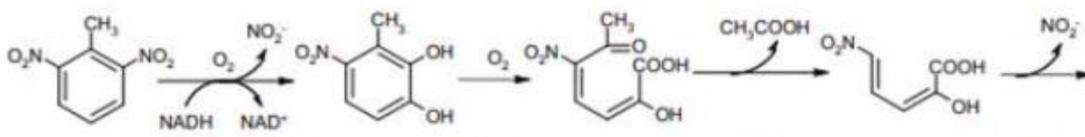


Fonte: SHEMER et al., 2018

A degradação do 2,6 Di-Nitro-Tolueno é menos caracterizada do que o 2,4 Di-Nitro-Tolueno. NISHINO PAOLI e SPAIN, (2000) demonstrou que a cepa *Burholderia cepacia* (JS850) degrada 2,6 Di-Nitro-Tolueno por um processo diferente do 2,4 Di-Nitro-Tolueno.

A via de degradação de 2,6 Di-Nitro-Tolueno pela cepa *Achromobacter xylosoxidans* (JS180) foi identificada por PARALES, SPAIN E JOHNSON, (2005). A primeira etapa deste processo ocorre por oxidação (dioxigenase), assim como com o 2,4 Di-Nitro-Tolueno, entretanto, as etapas subsequentes são diferentes, sugerindo que outras cepas são necessárias para realizar a degradação do 2,6 Di-Nitro-Tolueno (PARALES, SPAIN & JOHNSON, 2005).

**Figura 34 – Ciclo de Degradação Aeróbia do 2,6 DNT por *Achromobacter xylosoxidans***



Fonte: PARALES, SPAIN & JOHNSON, 2005

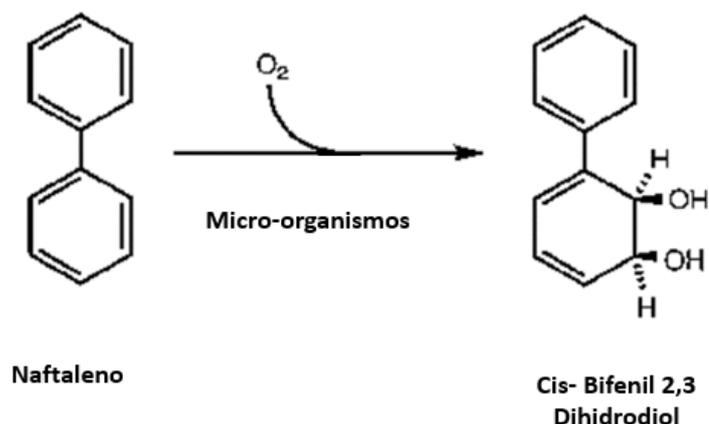
A redução 2,4 Di-Nitro-Tolueno foi mostrada em estudos com as cepas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SHEMER et al., 2018; NOGUERA & FREEDMAN, 1996).

A redução de 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno foi demonstrada em estudos com as cepas *Clostridium acetobutylicum* e *Lactococcus lactis* (SHIN et al., 2005; HUGHES, WANG & ZHANG, 1999).

A cepa *Shewanella* também mostrou ser capaz de reduzir o 2,6-DNT em condições anaeróbicas. Neste caso, a adição de um doador de elétrons (riboflavina) acelerou o processo de degradação (SHIN et al., 2005).

Várias espécies de *Ralstonia* são conhecidas por promoverem a dioxigenase do naftaleno, que é muito semelhante a dioxigenase do Di Nitro Tolueno (NISHINO & SPAIN, 2001). A degradação do naftaleno também foi demonstrada para cepas *Sphingomonas* (NISHINO & SPAIN, 2000). Em solos contaminados com compostos *nitroaromáticos*, *Ralstonia* são as cepas mais dominantes, junto com *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Variovorax* (NISHINO & SPAIN, 2000; SUEN, HAIGLER & SPAIN, 1996)

**Figura 35 – Dioxigenase do Naftaleno**



Fonte: NISHINO & SPAIN, 2001

A tabela 21 resume a seleção dos biorreatores que foram utilizados para a avaliação bacteriológica NGS.

**Tabela 21 – Seleção dos Biorreatores para Avaliação Bacteriológica NGS**

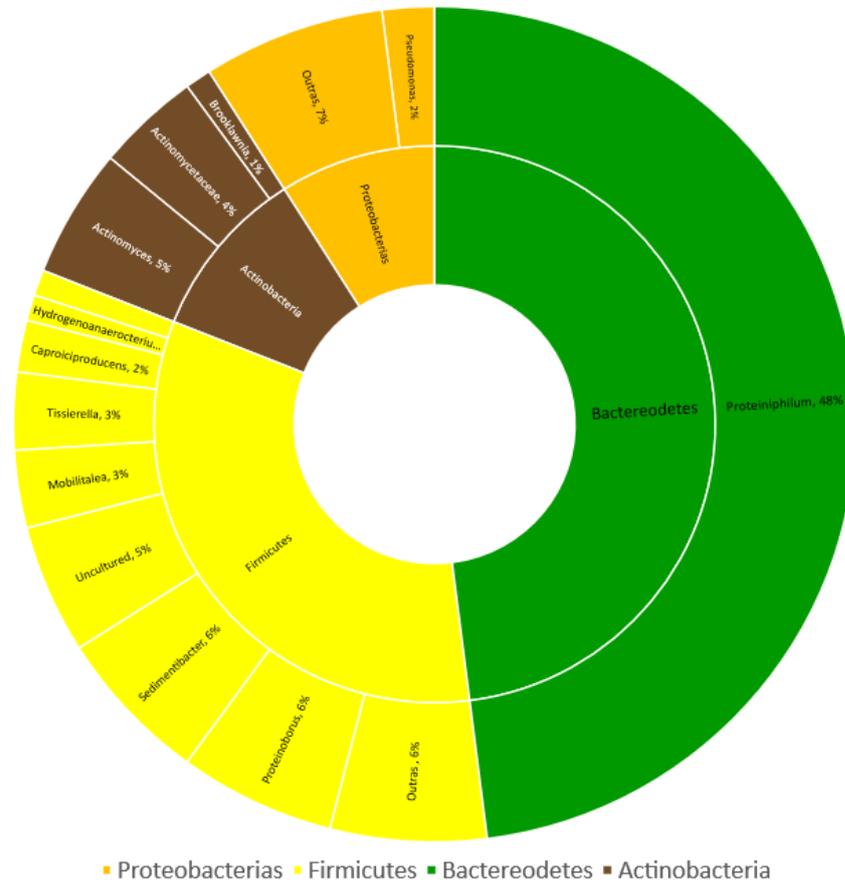
Avaliação	Biorreator	Composição da amostra	Referência	Racional de amostragem
1	AN2Branco	AN2	Inicial=T0	Identificação de microrganismos ativos
2	AN3 (Dehalo+GS)	AN3A+B	Final fase I	Desenvolvimento de microrganismo na presença de fonte de carbono
3	AN4 (Dehalo+GS+pH)	AN4A+B	Final fase I	Desenvolvimento de microrganismo na presença de fonte de carbono e pH ajustado para 7,5
4	AN3 (Dehalo+GS)	AN3A+B	Final fase II	Desenvolvimento de microrganismo na presença de fonte de carbono e sob presença de oxigênio
5	AN4 (Dehalo+GS+pH)	AN4A+B	Final fase II	Desenvolvimento de microrganismo na presença de fonte de carbono e pH ajustado para 7,5 e sob presença de oxigênio
6	AE1Esterelizado	AE1A+B+C	Final experimento aeróbio	Desenvolvimento de microrganismo na presença de fonte de cloreto de mercúrio
7	AE2 Branco	AE2A+B+C	Final experimento aeróbio	Desenvolvimento de microrganismo na presença de fonte de oxigênio
8	AE3Fosforo	AE3A+B+C	Final experimento aeróbio	Desenvolvimento de microrganismo na presença de fonte de oxigênio + Fósforo
9	AE4Fósforo+Nitrogenio+pH	AE4A+B+C	Final experimento aeróbio	Desenvolvimento de microrganismo na presença de fonte de oxigênio + Fósforo + Nitrogênio + pH ajustado

Fonte: Laboratório Deltares (2021)

### 5.3.1 Biorreator AN2 (Branco)

A composição das cepas do material inicial AN2 Branco foi altamente diversa, não sendo observada a presença dominante de degradadores DNTs ou TNTs conhecidos. Foram identificados os filos *Proteobacterias*, *Firmicutes*, *Bacteriodetes*, *Actinobacteria*, *Saccharibactéria*, *Planctomycetas* e *Chloroflexi*, conforme figura 36.

Figura 36 – Biorreator AN2 (Branco)



Fonte: Laboratório Deltares (2021)

O filo mais dominante foi o *Proteobacteria*, que também foi dominante durante os testes de degradação sob condição aeróbia. Dentro deste filo, as bactérias dominantes foram as cepas *Ralstonia* (11%), *Salinicola* (7%), *Sphingomonas* (5%) e *Curvibacter* (4%).

Em um estudo sobre a composição microbiológica de um solo contaminado com 2,4 Di-Nitro-Tolueno cepas como *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Ralstonia* foram isoladas e nenhuma dessas espécies demonstrou ser capaz de mineralizar 2,4 DNT em uma cultura pura, mas a mineralização foi alcançada quando estas espécies foram aplicadas como um consórcio (THIJS et al., 2014). A espécie *Ralstonia* não foi ativa na degradação do 2,4-DNT, mas foi capaz de degradar

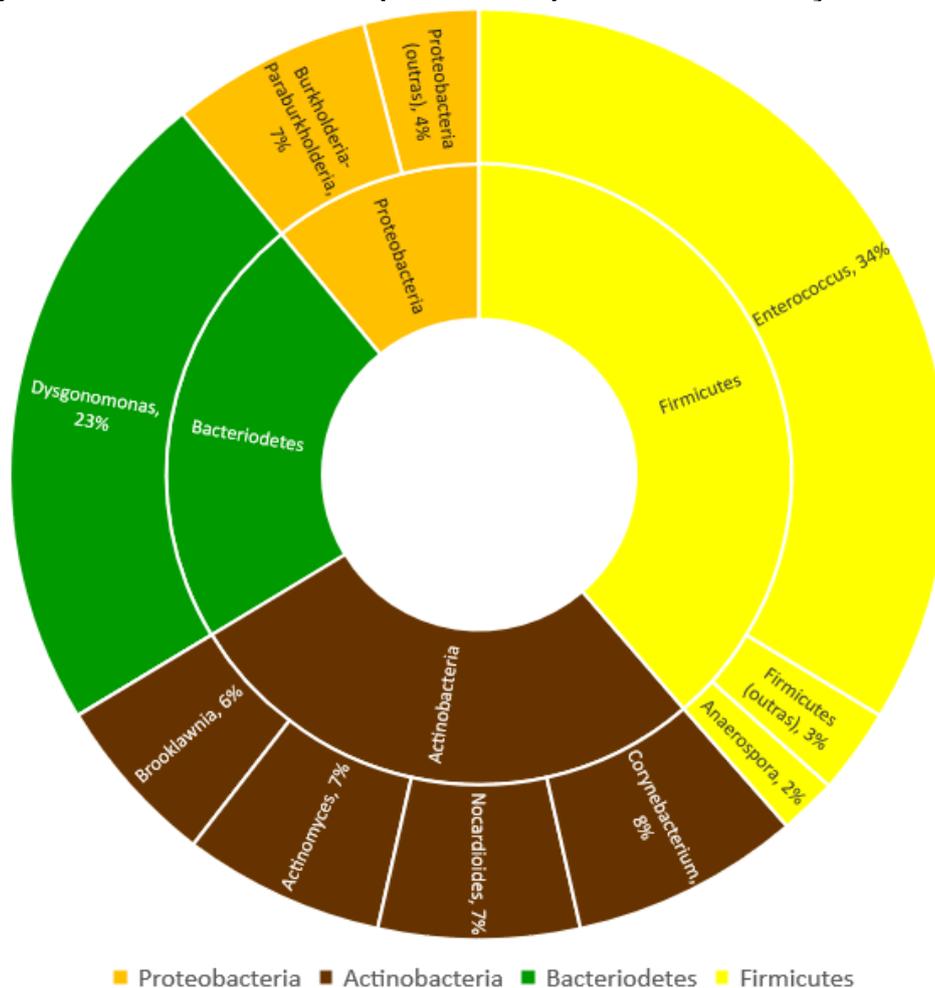
subproduto da primeira reação de oxidação, ou seja, 4 methyl 5 nitrocatecol (THIJS et al., 2014).

### 5.3.2 Biorreator AN3 (Dehalo-GS) – Fase I – Condição Anaeróbia

A amostra composta do biorreator AN3(A,B) Dehalo-GS mostrou um claro enriquecimento do número de bactérias, contrastando com o observado no biorreator AN2 Branco, o qual foi bastante diversificado.

Os filos *Proteobacterias*, *Firmicutes*, *Bacteriodetes*, *Actinobacteria* apresentaram um claro enriquecimento, ao passo que os filos *Saccharibactéria*, *Planctomycetas* e *Chloroflexi* não foram detectados nesta condição. O maior enriquecimento individual foi observado para bactéria *Enterococcus* (34%) e *Dysgonomonas* (23%). As bactérias *Dysgonomonas* e *Enterococcus* também foram encontradas na amostra AN2 Branco, figura 37.

**Figura 37 – Biorreator AN3 (Dehalo-GS) – Fase I - Condição Anaeróbia**



Fonte: Laboratório Bioclear (2021)

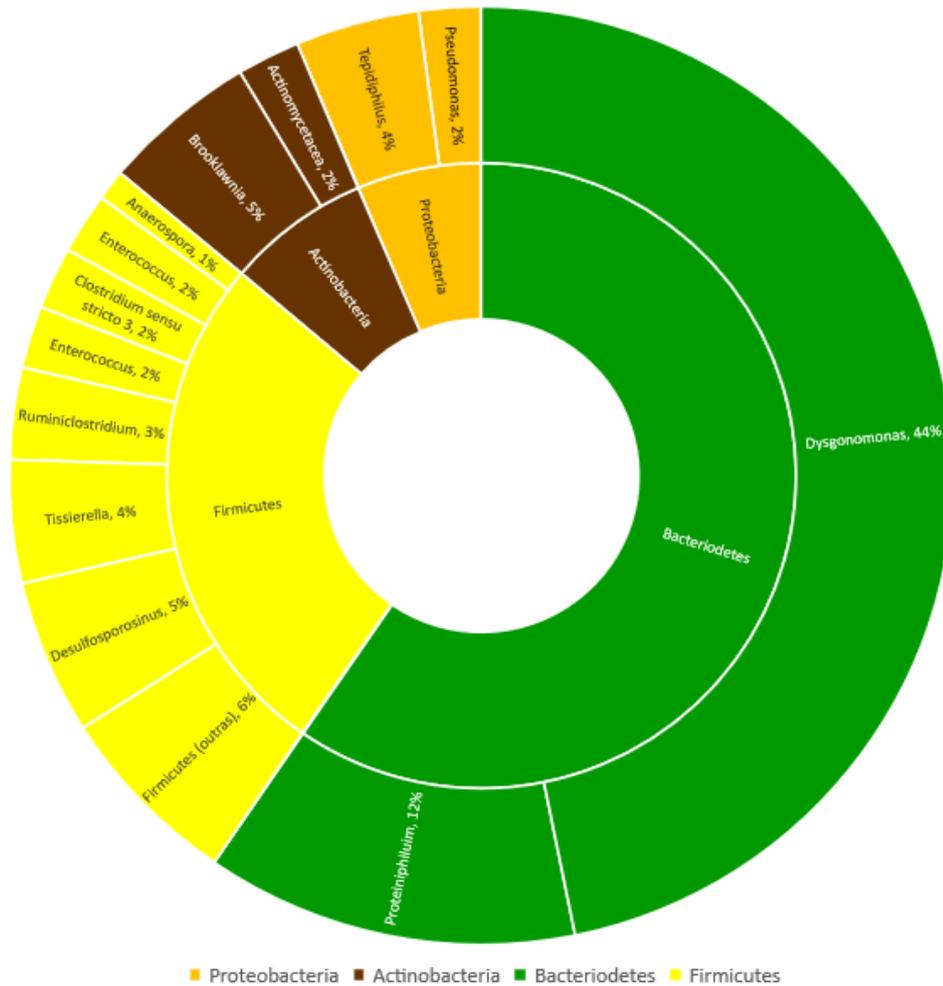
*Dysgonomonas* e *Enterococcus* são bactérias anaeróbias facultativas e a degradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno por estas bactérias não foi demonstrada na literatura científica pesquisada. Devido à presença dominante, estas bactérias são, provavelmente, degradadoras majoritárias no processo de biodegradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno para esta condição. Esta hipótese é corroborada pelos resultados analíticos de redução concentrações 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno que apresentaram degradação superior a 95% entre os intervalos de amostragem T1 e T2 (3 e 7 semanas), bem como os subprodutos de degradação (isômeros: Nitro Toluenos, Diamino Tolueno e Amino Tolueno) que também apresentaram degradação.

Observou-se, também, o enriquecimento de bactérias do grupo *Actinobacteria*, porém, de forma pulverizada se comparado às bactérias *Dysgonomonas* e *Enterococcus*.

### **5.3.3 Biorreator AN4 (Dehalo-GS + pH Ajustado) - Fase I – Condição Anaeróbia**

A amostra composta do biorreator AN4(A,B) Dehalo-GS + pH ajustado também mostrou um claro enriquecimento do número de bactérias, notadamente a *Dysgonomonas*, que representou 44 % das leituras, figura 38.

**Figura 38 – Biorreator AN4 (Dehalo-GS + pH Ajustado) - Fase I - Condição Anaeróbia**



Fonte: Laboratório Bioclear (2021)

A bactéria *Enterococcus* marcou presença, mas não de forma dominante como na composta do biorreator AN3 (A,B). Aliás, a população de *Enterococcus* despencou para 2% nesta condição quando comparada a AN3 (A,B) que foi 34%. Outra bactéria que mereceu destaque foi a *Proteiniphilum*, representando 12%. A *Proteiniphilum* também foi encontrada na amostra AN2 Branco.

Devido à presença dominante, o grupo *Bacteroidetes*, notadamente, *Dysgonomonas* e *Proteiniphylum* são, provavelmente, degradadoras majoritárias no processo de biodegradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno para esta condição.

Esta hipótese também é corroborada pelos resultados analíticos de redução concentrações 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno que apresentaram degradação superior a 95% entre os intervalos de amostragem T1 e T2 (3 e 7 semanas), bem como os subprodutos de degradação (isômeros: Nitro Toluenos, Diamino Tolueno e Amino Tolueno) que também apresentaram degradação.

Observou-se, também, o enriquecimento de bactérias do grupo *Firmicutes*, porém, de forma pulverizada se comparado às *Dysgonomonas* e *Proteiniphylum*

Para a condição anaeróbia, esta condição (doador de elétrons + pH ajustado para 7,5) foi a mais eficiente no processo de degradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno.

#### **5.3.4 Biorreator AN3 (Dehalo-GS) E AN4 (Dehalo-GS + pH Ajustado) - Fase II – Condição Anaeróbia/Aeróbia**

Os biorreatores AN3 (A,B) (Figura 39) e AN4 (A,B) (Figura 40) da Fase II representam a etapa aeróbia do experimento após período de incubação anaeróbio. Esta fase foi proposta para completar a degradação redutiva dos subprodutos de degradação (SHEMER et al., 2018).

Os resultados são claramente distinguíveis dos outros biorreatores AN3 e AN4 da fase I (anaeróbia). A população bacteriana nesta fase aeróbia consistiu, predominantemente, dos filos *Proteobacteria* (50%) e *Bacteriodetes* (44%). É importante notar que as mesmas espécies de *Proteobacteria* observadas na fase I anaeróbia estão presentes, por exemplo, a *Burkholderia-Paraburkholderia* (10%) e a *Comamonas* (17%).

Figura 39 – Biorreator AN3 (Dehalo-GS) - Fase II - Condição Aeróbia



Fonte: Laboratório Bioclear (2021)

**Figura 40 – Biorreator AN4 (Dehalo-GS + pH Ajustado) - Fase II - Condição Aeróbia**



Fonte: Laboratório Bioclear (2021)

A bactéria *Comamonas* é particularmente dominante no biorreator AN3, com 17% das leituras. A presença de uma *dixoygenase* com atividade no 2,4 Di-Nitro-Tolueno foi demonstrada para *Comamonas* sp. cepa JS765 (LESSNER et al., 2003).

Além do filo *Proteobacteria*, o filo *Bacteroidetes* também se manteve presente, especialmente, as bactérias *Cloacibacterium* (26%) e *Dysgonomonas* (18%) para condição AN3 Dehalo-GS e *Cloacibacterium* (3%), *Proteiniphilum* (9%) e

*Dysgonomonas* (17%) na condição AN4 Dehalo-GS+pH Ajustado. Essas bactérias são anaeróbias facultativas (pode crescer com ou sem oxigênio) e isso explica seu enriquecimento em um experimento em que uma fase anaeróbia é seguida por uma fase aeróbia.

Espécies de *Cloacibacterium* foram encontradas em um estudo com microcosmos usando água do mar à qual foi adicionado Naftaleno (JURELEVICIUS et al., 2013). A dioxigenase do 2,4 Di-Nitro-Tolueno é muito semelhante a dioxigenase do Naftaleno (JURELEVICIUS et al., 2013).

As bactérias *Stenotrophomonas* também são encontradas em ambas as condições. Em uma pesquisa utilizando-se um consórcio de bactérias que degradou completamente o 2,4 Di-Nitro-Tolueno, descobriu-se que a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* degradou os produtos intermediários (SNELLINX et al., 2003)

As bactérias *Burkholderia-Paraburkholderia* e *Stenotrophomonas* também foram observadas nas amostras AE2, AE3 e AE4 do experimento aeróbio.

Comparando-se AN3 e AN4, o efeito do pH é, novamente, claramente visível na composição da população microbiana. No biorreator AN4, cerca de 36% das leituras pertencem as *Pseudomonas*, enquanto em AN3 isso é menos de 1% das leituras. AN4 é a condição em que tanto o 2,4 quanto o 2,6-diaminotolueno (DAT) foram completamente degradados. Dado o forte enriquecimento de espécies de *Pseudomonas* na condição AN4, parece razoável atribuir a degradação dos isômeros de Diamino Tolueno a esta cepa. Essa conclusão é consistente com um estudo sobre a degradação de 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno com bactérias previamente aclimatadas, onde as *Pseudomonas*, especificamente, a cepa *auruginosa* foi a única bactéria capaz de usar Di Amino Tolueno como única fonte de carbono (PESCE & WUNDERLIN, 1997).

### **5.3.5 Biorreator AE1 Esterilizado (Cloreto de Mercúrio) – Condição Aeróbia**

Todas as amostras colhidas durante o experimento de degradação sob condição Anaeróbia/aeróbia continham bactérias para as quais a degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno já foi demonstrada.

Por outro lado, em todos biorreatores do experimento de degradação sob condição aeróbia também foram identificadas algumas bactérias cuja comprovação no processo de degradação dos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno não foi evidenciada no material pesquisado.

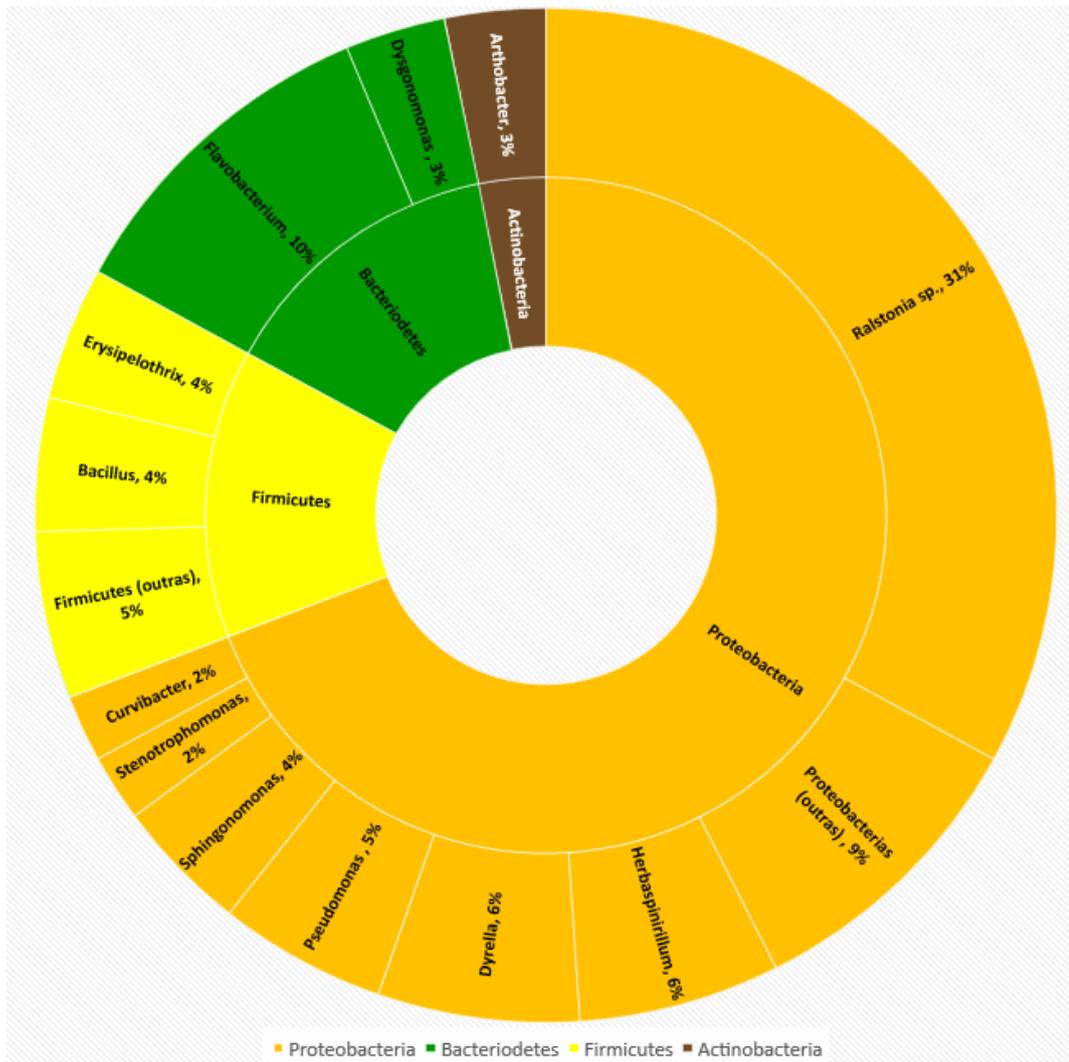
Como mencionado anteriormente, o processo de degradação dos nitrotoluenos por dioxigenase são semelhantes a dioxigenase do naftaleno, que já foi demonstrado (SHEMER et al., 2018), portanto, é plausível que estas bactérias também sejam capazes de degradar os 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno.

É curioso que algumas espécies que são enriquecidas durante o processo de degradação sob condição aeróbia muitas vezes não são detectadas no biorreator AN2 Branco (material de inicial), por exemplo: *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Pseudoxanthomonas*. Isso não significa, necessariamente, que essas espécies não estavam presentes no material de inicial. Pode ser que as concentrações estivessem muito baixas para serem detectadas pelo método NGS.

As diferentes condições aplicadas aos biorreatores para experimento sob condição aeróbia levaram a diferenças claras na composição das populações de bactérias.

A amostra dos biorreatores AE1 Esterilizado apresentou enriquecimento do filo *Proteobactérias*, com uma predominância de bactérias pertencentes a espécie *Ralstonia sp.* (31%), que também foi identificada nos biorreatores AN2 Branco com 11 % das leituras. A amostra composta dos biorreatores AE1 (A,B) tem uma assinatura microbiológica bastante semelhante com AN2 Branco, figura 41.

**Figura 41 – Biorreator AE1 (Esterilizado) - Condição Aeróbia**



Fonte: Laboratório Bioclear (2021)

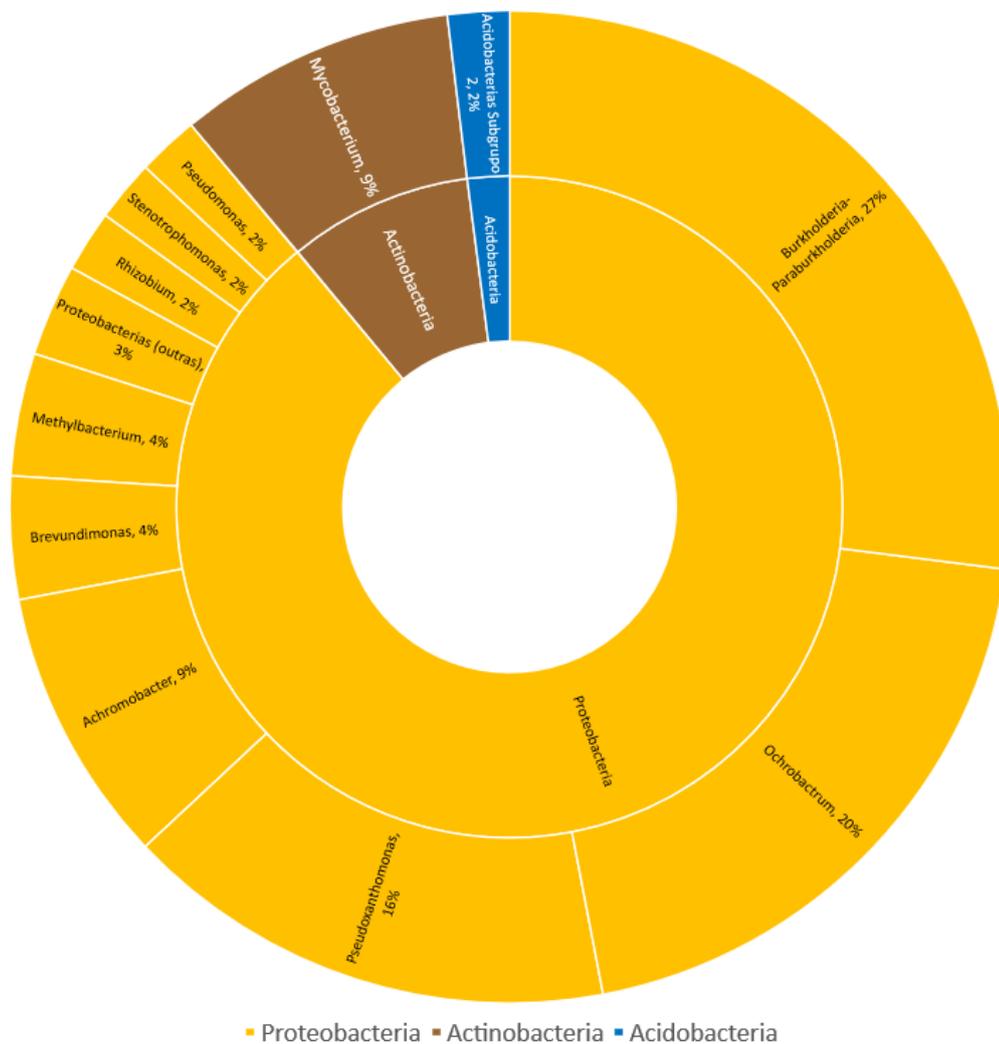
### 5.3.6 Biorreator AE2 (Branco)

A assinatura biológica dos biorreatores AE2 Branco é, claramente, diferente da composição dos biorreatores AE1 Esterilizado.

A proporção do filo *Proteobacteria* aumentou significativamente alcançando 89 %, entretanto, filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, bem como suas espécies, que estavam presentes na amostra dos biorreatores AN2 Branco e nos biorreatores AE1 Esterilizado desapareceram ou se tornaram muito menos presentes.

A maior mudança em relação ao biorreator AN2 Branco foi o forte enriquecimento de bactéria *Burkholderia* (Figura 42). Para várias espécies de *Burkholderia*, incluindo *Burkholderia cepacia* R34 e *Burkholderia* sp. cepa, a via de degradação oxidativa do 2,4 Di-Nitro-Tolueno foi demonstrado (NISHINO & SPAIN, 2004). A primeira etapa é realizada por uma dioxigenase 2,4 Di-Nitro-Tolueno, sendo este convertido a 4-metil-5-nitrocatecol e nitrito (HANG SUNGSOO, 2008; PANTOJA et al., 2013).

**Figura 42 – Biorreator AE2 (Branco)**



Fonte: Laboratório Deltares (2021)

Além da espécie *Burkholderia*, outras bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria* foram identificadas de forma predominante: *Ochrobactrum*, *Pseudoxanthomonas* e *Achromobacter*.

A *Ochrobacterium anthropi* foi citada como capaz de degradar o 2,4-Diaminotolueno, que é um dos sub-produtos na via de degradação redutora do 2,4 Di-Nitro-Tolueno (KIM et al., 2002). Esta mesma espécie também pode mineralizar completamente o Metil Paration, um outro composto nitroaromático (TALWAR, MULLA, & NINNEKAR, 2014). A espécie *Ochrobacterium anthropi* também é capaz de degradar hidrocarbonetos poliaromáticos (WANG et al., 2015).

A degradação do naftaleno também já foi demonstrada para a cepa *Ochrobacterium anthropi* (LI, WANG, & YANG, 2013). Devido a dominante presença de diferentes espécies de *Ochrobacterium* nas amostras é provável que estas também possam mineralizar o 2,4-diaminotolueno.

Não foi identificado, no material pesquisado, a ocorrência de degradação direta de 2,4 ou 2,6 Di-Nitro-Tolueno pela bactéria *Ochrobactrum*, mas com base na variedade de compostos que essas bactérias podem degradar, incluindo naftaleno, não se pode descartar que as espécies possam oxidar e converter 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno. Além do *Ochrobactrum*, outra bactéria encontrada nos biorreatores AE2 Branco foi a *Achromobacter*, que são conhecidas por sua capacidade de quebrar compostos orgânicos sintéticos, tais como o explosivo Tri Nitro Tolueno (KAO et al., 2016). O *Achromobacter* pode usar Tri Nitro Tolueno como única fonte de carbono e nitrogênio (KAO et al., 2016). A degradação de 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno foi demonstrada por algumas cepas de *Achromobacter xylosoxydans* (PARALES et al., 2005).

A espécie *Mycobacterium*, também presente no biorreator AE2 com 9% das leituras, demonstrou ser capaz de degradar o Tri Nitro Tolueno co-metabolicamente (VANDERBERG, PERRY & UNKEFER, 1995). Também se sabe que a espécie *Mycobacterium* pode degradar o Naftaleno e outros Hidrocarbonetos Poliaromáticos (KIM et al., 2002).

A presença de várias espécies de bactérias em AE2 Branco para as quais a degradação direta de 2,4 Di-Nitro-Tolueno ou subprodutos foi demonstrada está

consistente com os resultados obtidos em que a concentração do 2,4 Di-Nitro-Tolueno atingiu o limite de detecção em 25 semanas.

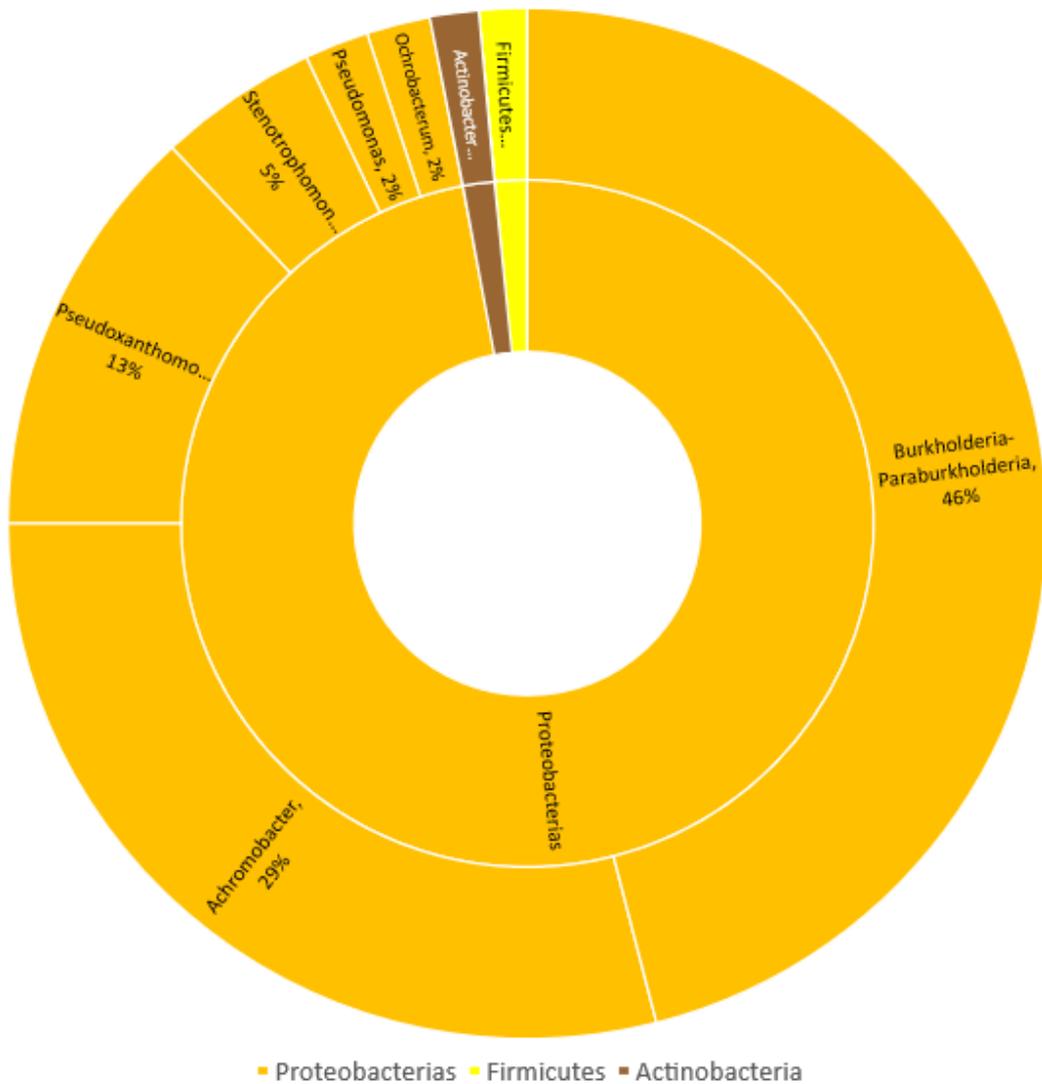
### **5.3.7 Biorreator AE3 (Fósforo) – Condição Aeróbia**

A amostra dos biorreatores AE3 (Fósforo), apresentou, quase exclusivamente, o enriquecimento do filo *Proteobacteria* (97%), principalmente, com as espécies *Burkholderia-Paraburkholderia* (46%), *Achromobacter* (29%) e *Pseudoxanthomonas* (13%).

Os filios *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, bem como suas espécies, também desapareceram ou se tornaram muito menos presentes nas amostras dos biorreatores AE3 Fósforo.

Foi interessante observar que, nessas condições, a espécie *Ochrobacterum*, que tinha presença dominante na amostra dos biorreatores AE2 Branco (20%), em AE3 Fósforo, constituiu, apenas, uma pequena parte da população (2%). Isso pode ser devido à dosagem de fosfato nesta condição (Figura 43).

**Figura 43 – Biorreator AE3 (Fósforo) - Condição Aeróbia**



Fonte: Laboratório Bioclear (2021)

Notavelmente, as espécies de *Stenotrophomonas* também são encontradas em todas as condições do experimento sob condições aeróbias. Em uma pesquisa sobre consórcios de bactérias que podem degradar totalmente 2,4-Di-Nitro-Tolueno e seus subprodutos a espécie *Stenotrophomonas maltophilia* foi identificada (SNELLINX et al., 2003).

O enriquecimento de várias espécies de bactérias do filo *Proteobactérias* na amostra dos biorreatores AE3 Fósforo associado aos resultados de análises, onde a

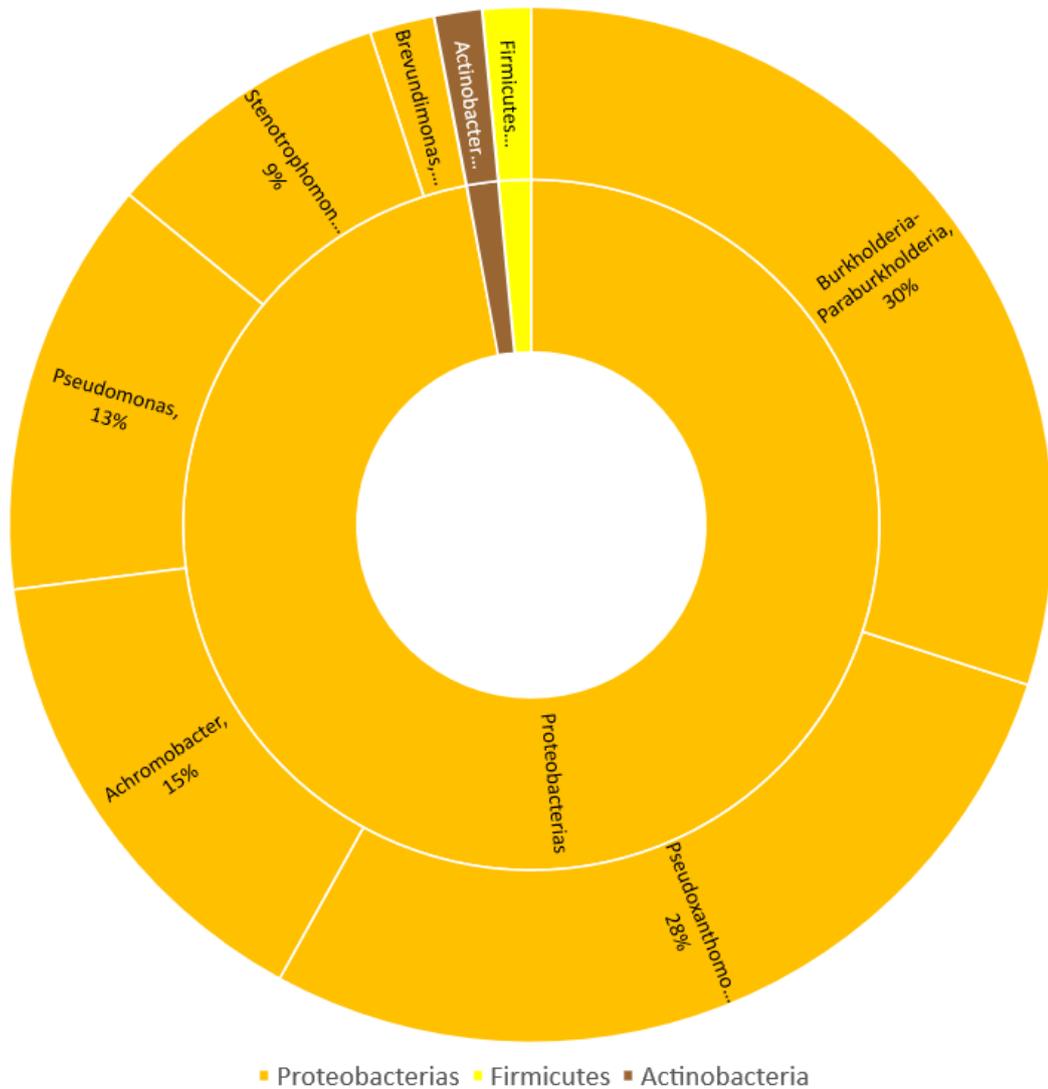
concentração atingiu o limite de detecção em torno de 17 semanas claramente demonstra que esta condição acelerou o processo de degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno e subprodutos.

Por outro lado, a concentração do 2,6 Di-Nitro-Tolueno não apresentou degradação relevante. Esta conclusão é consistente com a literatura pesquisada e existem algumas explicações possíveis para isso, por exemplo, não havia bactérias presentes que poderiam realizar a rota de degradação oxidativa 2,6 Di-Nitro-Tolueno ou a alta concentração de 2,4 Di-Nitro-Tolueno leva à inibição da degradação de 2,6 Di-Nitro-Tolueno (ABURTO MEDINA et al., 2017).

#### **5.3.8 Biorreator AE4 (Fósforo + Nitrogênio + pH Ajustado) – Condição Aeróbia.**

A amostra dos biorreatores AE4 Fósforo + Nitrogênio + pH ajustado, apresentou, de forma muito similar a AE3 Fósforo, um enriquecimento predominante do filo *Proteobacteria* (97%), principalmente, com as espécies *Burkholderia-Paraburkholderia* (30%), *Achromobacter* (15%), *Pseudoxanthomonas* (28%), *Pseudomonas* (13%), entre outras. Os filos *Firmicutes* e *Actinobacteria* representaram 3% das leituras, enquanto o filo *Bacteroidetes* não foi identificado para esta condição (Figura 44).

**Figura 44 – Biorreator AE4 (Fósforo + Nitrogênio + pH ajustado) - Condição Aeróbia**



Fonte: Laboratório Bioclear (2021)

Na amostra dos biorreatores AE4 (Fósforo+Nitrogênio+pH ajustado) o efeito do pH pode ser claramente observado. Nos biorreatores AE2 Branco e AE3 Fósforo, as *Pseudomonas* foram detectadas em contagens relativamente baixas, com cerca de 2% das leituras, entretanto, no biorreator AE4, a população aumentou para 13% das leituras. Espécies de *Pseudomonas* crescem de forma otimizada em torno de um pH neutro (HUDCOVA et al., 2011). O processo de degradação de 2,4-Di-Nitro-Tolueno por espécies de *Pseudomonas* já foi caracterizado (PACA et al., 2009;

SNELLIX et al., 2003; SPANGGORD et al., 1991), bem como as espécies *Burkholderia* (NISHINO & SPAIN, 2004).

As espécies *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* foram identificadas nos biorreatores AE2 Branco, AE3 Fósforo e AE4 Fósforo + Nitrogênio + pH ajustado. Comparando AE4 com as outras 2 condições, observa-se que o ajuste de pH trouxe um claro benefício às *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* e *Stenotrophomonas* que apresentaram enriquecimento de 2% para 13%, 19% para 28% e 5% para 9 %, respectivamente. Com relação a espécie *Burkholderia-Paraburkholderia*, houve redução de 46% para 30%.

A degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno por *Pseudoxanthomonas* sp. JA40 foi demonstrada (CHENG et al., 2007). Como era esperado, a condição AE4 Fósforo + Nitrogênio + pH ajustado demonstrou o maior potencial para degradação do 2,4 Di-Nitro-Tolueno, que ocorreu em torno de 12 semanas (5 semanas antes de AE3 Fósforo e 13 semanas antes de AE2 Branco). Esta conclusão pode ser estendida para o isômero 4 Nitro Tolueno.

Também não foi surpresa a inexistente degradação do 2,6 Di-Nitro-Tolueno. Esta conclusão é consistente com a literatura pesquisada (ABURTO MEDINA et al., 2017).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biodegradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno por microorganismos nativos contidos na água subterrânea da antiga fábrica de Tolueno Di Isocianato da Dow Brasil foi comprovada. Os subprodutos da degradação 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno, tais como os isômeros do Nitro Tolueno, Diamino Tolueno e Amino Tolueno também podem ser degradados biologicamente.

A interpretação dos parâmetros coletados ao longo do experimento indica que a melhor condição para degradação dos compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno e subprodutos de degradação é a condição anaeróbia, seguida de conversão para meio aeróbio, associada à adição de bioestimulador (Dehalo-GS e/ou Nutrientes: Fósforo e Nitrogênio) e ajuste do pH para 7,5.

Verificou-se que a biorremediação é, certamente, uma abordagem promissora e sustentável. A diversidade da biomassa e sua capacidade de degradar os compostos 2,4 e 2,6 Di-Nitro-Tolueno e seus subprodutos foi comprovada.

No processo de biodegradação dos 2,4 e 2,6 Dinitrotoluenos, não serão gerados sub-produtos mais tóxicos (exceção ao 2-Amino 4-nitrotolueno / CAS 99-55-8).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURTO MEDINA, A.; TAHA, M.; SHAHSAVARI, E.; BALL, A. S. Degradation of the dinitrotoluene isomers 2, 4-and 2, 6-DNT: Appraising the role of microorganisms. In: **Enhancing cleanup of environmental pollutants**, 2017.

ADRIAN, N.; ARNETT, C. Anaerobic biotransformation of explosives in aquifer slurries amended with ethanol and propylene glycol. **Chemosphere** v.66, p.1849–1856, 2007.

ANTIZAR–LADISLAO, B. Bioremediation: Working with Bacteria. **Elements**, v. 6, n.6, p. 389–394, 2010.

BRASIL. Poder Executivo. **Lei 13.123/2015** – Lei da Biodiversidade Brasileira, 2015.  
CCOHS – **Canadian Centre for Occupational Health and Safety** -  
<https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>

**CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Diretoria de Controle Ambiental.** Texto explicativo relação de área contaminada e reabilitada no Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2012. 14 p.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas.** São Paulo: CETESB, 2013.

CHENG, J. Z.; HARADA, R.; CAMPBELL, S.; LI, Q. X. Biodegradation of dinitrotoluene by *Pseudoxanthomonas* sp. JA40. **Journal Young Investigators**, v.16, n.3, 2007

CHENG, J.; KANJO, Y.; SUIDAN, M.T.; VENOSA, A. D. Anaerobic biotransformation of 2,4-dinitrotoluene with ethanol as primary substrate: Mutual effect of the substrates on their biotransformation. **Water Research**, v.30, n.2, p. 307–314, 1996.

DARKO-KAGYA, K.; KHODADOUST, A. P; REDDY, K. R. Reactivity of lactate-modified nanoscale iron particles with 2, 4-dinitrotoluene in soils. **Journal of hazardous materials**, v.182, p. 177-183, 2010.

DEBASREE, K.; CHINMAY, H.; AMBALAL, C. Isolation, screening and assessment of microbial isolates for biodegradation of 2, 4-and 2, 6-dinitrotoluene. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.4, n.1, p. 564-574, 2015.

FREEDMAN, D. L.; SHANLEY, R. S; SCHOLZE, R. J. Aerobic biodegradation of 2,4-dinitrotoluene, aminonitrotoluene isomers, and 2,4-diaminotoluene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 49, p. 1-14, 1996.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 8, n. 34, 2005.

HORST, J. C.; FLANDERS, M.; KLEMMER, D. S.; RANDHAWA, D.; ROSSO. Low-temperature thermal remediation: Gaining traction as a green remedial alternative. **Groundwater Monitoring & Remediation**, v.38, n.3, p.18–2, 2018.

HUANG, J.; NING, G.; LI, F.; SHENG, G. D. Biotransformation of 2,4-dinitrotoluene by obligate marine *Shewanella marisflavi* EP1 under anaerobic conditions. **Bioresource Technology**, v.180, p. 200–206, 2015.

HUDCOVA, T.; HALECKY, M.; KOZLIAK, E.; STIBOROVA, M.; PACA, J. Aerobic degradation of 2,4-dinitrotoluene by individual bacterial strains and defined mixed population in submerged cultures. **Journal of Hazardous Materials**, v.192, n.2, p. 605–613, 2011.

HUGHES, J. B.; WANG, C. Y., ZHANG C. Anaerobic biotransformation of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum*: a pathway through dihydroxylamino intermediates. **Environmental Science & Technology**, v.33, n.7, p. 1065–1070, 1999.

ITRC – Technical and Regulatory Requirements for Enhanced “**IN SITU BIOREMEDIATION OF CHLORINATED SOLVENTS IN GROUNDWATER**” - December 23, 1998.

IARC – **International Agency for Research on Cancer** - <https://www.iarc.who.int/>  
JOHNSON, G. R.; SPAIN, J. C. Evolution of catabolic pathways for synthetic compounds: bacterial pathways for degradation of 2,4-dinitrotoluene and nitrobenzene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.62, p. 110–123, 2003.

JURELEVICIUS, D.; ALVAREZ, V. M.; MARQUES, J. M.; SOUSA, L. L. R.; DIAS F. A.; SELDIN, L. Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.19, p. 5927-5935, 2013.

KAO, C. M.; LIN, B. H.; CHEN, S. C.; WEI, S. F.; CHEN, C. C.; YAO, C. L.; CHIEN, C. C. Biodegradation of trinitrotoluene (TNT) by indigenous microorganisms from TNT-contaminated soil, and their application in TNT bioremediation. **Bioremediation Journal**, v.20, n.3, p. 165-173, 2016.

KIM, M. N.; JANG, J. C.; LEE, I. M.; LEE, H. S.; YOON, J. S. Toxicity and biodegradation of diamines. **Journal of Environmental Science and Health**, v.37, n.1, p. 53-64, 2002.

KÜCE, P.; CORAL, G.; KANTAR, C. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene (DNT) by *Arthrobacter sp.* K1 isolated from a crude oil contaminated soil. **Annals of Microbiology**, v. 65, n.1, p. 467–476, 2015.

LIISA TUOMINEN; TIMO KAIREVALO; AND HELINA HARTIKAINEN - Comparison of Methods for Inhibiting Bacterial Activity in Sediment Department of Limnology and Environmental Protection,<sup>1</sup> and **Department of Applied Chemistry and Microbiology**,<sup>3</sup> FIN-00014 University of Helsinki, and The Environmental Unit, University of Helsinki FIN-15210 Lahti,<sup>2</sup> Finland Received 23 March 1994/Accepted 6 July 1994

LESSNER, D. J.; PARALES, R. E.; NARAYAN, S.; GIBSON, D. T. Expression of the nitroarene dioxygenase genes in *Comamonas sp.* strain JS765 and *Acidovorax sp.* strain JS42 is induced by multiple aromatic compounds. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.13, 2003.

LI, B.; WANG, B.; YANG, Q. Aerobic naphthalene degradation by *Ochrobactrum anthropi*: Kinetics and thermodynamics study. **Fresenius Environmental Bulletin**, v.22, p. 1195- 1202, 2013.

MORAES, S. L.; TEIXEIRA, C. E.; MAXIMIANO, A. M. S. **Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas**. IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo: BNDES, 2014.

NISHINO S. F.; SPAIN, J. C. Catabolism of nitroaromatic compounds. In: Ramos JL (ed) *Pseudomonas*. **Springer**, p. 575–608, 2004.

NISHINO S. F.; SPAIN, J. C. Technology status review: **Bioremediation of Dinitrotoluene (DNT)**: DTIC document, 2001.

NISHINO, S. F.; PAOLI, G. C.; SPAIN, J. C. Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p. 2139–2147, 2000.

NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C.; HE, Z. Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: process discovery to field application. **Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives**, v.7, p. 61-65, 2000.

NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C. Catabolismo de compostos nitroaromáticos. Em *Pseudomonas* (pp. 575-608). **Springer**, 2004.

NOGUERA D. R.; FREEDMAN, D. L. Reduction and acetylation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.7, p. 2257–2263, 1996.

NOGUERA, D. R.; FREEDMAN, D. L. Reduction and Acetylation of 2, 4-Dinitrotoluene by a *Pseudomonas aeruginosa* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.7, p. 2257-2263, 1996.

PACA, J.; HALECKY, M.; BARTA, J.; BAJPAI, R. Aerobic biodegradation of 2,4 Di-Nitro-Tolueno and 2,6-DNT: performance characteristics and biofilm composition changes in continuous packed-bed bioreactors. **Journal of Hazardous Materials**, v.163, p. 848–854, 2009.

PANTOJA, P. D.; NIKEL, P. I.; CHAVARRÍA, M.; LORENZO, V. Endogenous stress caused by faulty oxidation reactions fosters evolution of 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria. **PLoS Genet**, v.9, 2013.

PARALES, R. E.; SPAIN, J. C.; JOHNSON, G. R. **Bacterial Degradation of DNT and TNT Mixtures** CU1212, 2005.

PESCE, S. F.; WUNDERLIN, D. Biodegradation of 2,4- and 2,6-diaminotoluene by acclimated bacteria. **Water Research**, v.31, p. 1601-1608, 1997.

RIEGER, P. H.; MEIER, H. M.; GERLE, M.; VOGT, U.; GROTH, T.; KNACKMUSS, H. J. Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. **Journal of Biotechnology**, v.94, n.1, p. 101-123, 2002.

SHEMER, B.; YAGUR-KROLL, S.; HAZAN, C.; BELKIN, S. Aerobic transformation of 2, 4-dinitrotoluene by *Escherichia coli* and its implications for the detection of trace explosives. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n.4, 2018.

SHIN, K. H.; LIM, Y.; AHN, J. H.; KHIL, J.; CHA, C. J.; HUR, H. G. Anaerobic biotransformation of dinitrotoluene isomers by *Lactococcus lactis* subsp. lactis strain 27 isolated from earthworm intestine. **Chemosphere**, v.61, n.1, p. 30–39, 2005.

SMETS, B. F.; MUELLER, R. J. Metabolism of 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) by *Alcaligenes* sp. JS867 under oxygen limited conditions. **Biodegradation**, v.12, p. 209-217, 2001.

SNELLINX, Z.; TAGHAVI, S.; VANGRONSVELD, J.; Van Der LELIE, D. Microbial consortia that degrade 2,4 Di-Nitro-Tolueno by interspecies metabolism: isolation and characterisation. **Biodegradation**, v.14, n.1, p. 19–29, 2003.

SPANGGORD, R. J.; SPAIN, J. C.; NISHINO, S. F.; MORTELMANS, K. E. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.11, p. 3200–3205, 1991.

SPONZA, D. T.; ATALAY, H. Influence of Nitrate and COD on phosphorus, nitrogen and dinitrotoluene (DNT) removals under batch anaerobic and anoxic conditions. **Anaerobe**, v.10, p. 287 – 292, 2004.

SUEN, W. C.; HAIGLER, B. E.; SPAIN, J. C. 2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: similarity to naphthalene dioxygenase. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.16, p.4926–4934, 1996.

SUEN, W. C.; SPAIN, J. C. Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.6, p. 1831–1837, 1993.

**SV-513 METHODIEK VOOR HET VASTSTELLEN VAN DE DUURZAAMHEID VAN NATUURLIJKE AFBRAAK (D-NA) VAN GECHLOREERDE ETHENEN** - Stichting Kennisontwikkeling Kennisoverdracht Bodem – Januari – 2003

TALWAR, M. P.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Biodegradation of organophosphate pesticide quinalphos by *Ochrobactrum* sp. strain HZM. **Journal of Applied Microbiology**, v.117, n.5, p. 1283-92, 2014.

THIJS, S.; WEYENS, N.; SILLEN, W.; GKOREZIS, P.; CARLEER, R.; VANGRONSVELD, J. Potential for plant growth promotion by a consortium of stress-tolerant 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria: isolation and characterization of a military soil. **Microbial Biotechnology**, v.7, n.4, p. 294-306, 2014.

TRIGO, A.; VALENCIA, A.; CASES, I. Systemic approaches to biodegradation. **Microbiology Reviews**, v.33, p. 98-108, 2009.

TSUDA, T.; YORIFUJI, T.; TAKAO, S.; MIYAI, M.; BABAZONO A. Minamata disease: Catastrophic poisoning due to a failed public health response. **Journal of Public Health Policy**, v. 30, n. 1, p. 54–67, 2009.

USEPA- United States Environmental Protection Agency. **Introduction to In Situ Biorremediation of Groundwater, 2013.**

VANDERBERG L. A.; PERRY, J. J.; UNKEFER, P. J. Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, n.5, p. 937-945, 1995.

WANG, X.; JIN, D.; ZHOU, L.; ZHANG, Z. Draft Genome Sequence of *Ochrobactrum anthropi* Strain W13P3, a Halotolerant Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium. **Genome announcements**, v.3, n.4, 2015.

WANG, Z. Y.; YE, Z. F.; ZHANG, M. H. Bioremediation of 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) in immobilized micro-organism biological filter. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, n.6, p. 1476–1484, 2011.

XIU, Z. M.; JIN Z. H.; LI L. L.; MAHENDRA, S.; LOWRY, G. V.; ALVAREZ, P. Effects of nanoscale zero-valent iron particles on a mixed culture dechlorinating trichloroethylene. **Bioresource Technology**, v.101, n. 4, p. 1141–1146, 2010.

YANG, H.; ZHAO, J. S.; HAWARI, J. Effect of 2,4-dinitrotoluene on the anaerobic bacterial community in marine sediment. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.6, p.1799–1808, 2009.

ZHANG, C.; HUGHES, J. B.; NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C. Slurry-phase biological treatment of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene: role of bioaugmentation and effects of high dinitrotoluene concentrations. **Environmental Science & Technology**, v.34, n.13, p. 2810–2816, 2000.

## **ANEXOS**

ANEXO A - Certificado de Análises – Laboratório Synlab

ANEXO B - Certificado de Análises – Laboratório Bioclaer

ANEXO C - Certificado ISO 9001 – Laboratório Bioclear

## ANEXO D - Certificados de Análises – Laboratório Deltares

1. Nitrato – Aeróbio
2. Nitrito – Aeróbio
3. Nitrato – Anaeróbio
4. ORP – Aeróbio
5. ORP – Anaeróbio
6. Oxigênio Dissolvido – Aeróbio
7. Oxigênio Dissolvido – Anaeróbio ( Fase I e II)
8. pH – Aeróbio
9. pH – Anaeróbio

ANEXO E - Certificado ISO 9001 – Laboratório Deltares

ANEXO F - Certificado ISO 14001 – Laboratório Deltares

ANEXO G - Certificado OSHA– Laboratório Deltares

ANEXO H - Relatório Analítico – Laboratório Dow Terneuzen