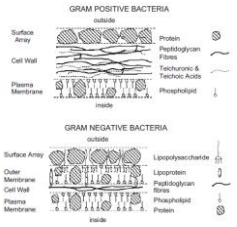
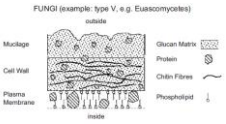
Biorremediação

Aplicação

Biorremediação não-catabólica

Biosorção: adsorção de íons de metais na superfície da célula



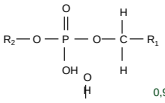
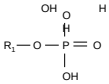


Composição da superfície da célula varia dependendo do estado fisiológico do organismo!

Fonte: Volesky, Wat. Res.41, 4017, 2007

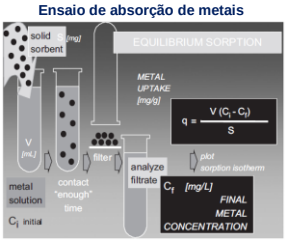
Biorremediação não-catabólica

Principais grupos funcionais envolvidos na absorção de metais

Grupo funcional	Fórmula	pKa	Grupo funcional	Fórmula	pKa
Carboxila		1,7-4,7	Imidazol		6,0
Sulfhidrila	R — SH	8,3-10,8			
Sulfonato		1,3	Fosfodiéster		1,5
Amida		-	Fosfonato		0,9-2,1 6,1-6,8

Biorremediação não-catabólica

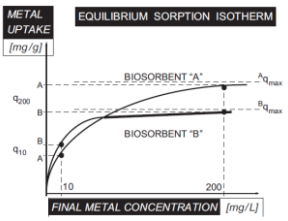
Ensaio de absorção de metais



Fonte: Volesky, Wat. Res.41, 4017, 2007

Biorremediação não-catabólica

Isoterma de absorção de equilíbrio



- **Solução do ensaio deve ser representativa para aquífero;**
- **Biosorção vs.precipitação química!**
- **Tempo de contato (mudança da superfície das células);**
- **Células devem estar nas condições nas quais serão usadas no tratamento.**

Fonte: Volesky, Wat. Res.41, 4017, 2007

Biorremediação não-catabólica

Bioprecipitação: precipitação de metais com sulfetos produzidos *in situ* com bactérias redutoras de sulfato.

Sulfeto metálico	Kps
Ag_2S	8×10^{-51}
CdS	1×10^{-27}
CoS (alfa)	5×10^{-22}
CoS (beta)	3×10^{-26}
CuS	8×10^{-37}
FeS	8×10^{-19}
HgS (preto)	2×10^{-53}
HgS (vermelho)	2×10^{-54}

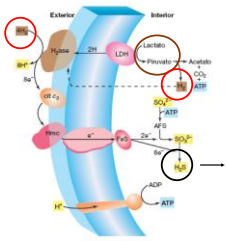
Sulfeto metálico	Kps
MnS (rosa)	3×10^{-11}
MnS (verde)	3×10^{-14}
NiS (alfa)	4×10^{-20}
NiS (beta)	1.3×10^{-25}
PbS	3×10^{-28}
ZnS (alfa)	2×10^{-25}
ZnS (beta)	3×10^{-23}

Composto	Kps
$CaCO_3$ (calcita)	3.36×10^{-9}
$CaSO_4$	4.93×10^{-5}

$Ag_2S \Leftrightarrow 2[Ag^+] + [S^{2-}]$

$Kps = [Ag^+]^2 \times [S^{2-}]$

Biorremediação não-catabólica



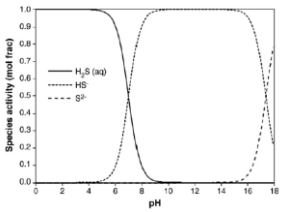
Produção de H_2S com bactérias sulfato-redutoras

Insumos para energia e biomassa

Produto final da redução de sulfato
⇒
agente precipitador de metais

Biorremediação não-catabólica

Precipitação de metais com sulfetos acidifica a solução!



$$HS^- \overset{Kp2}{\rightleftharpoons} S^{2-} + H^+ \quad K_{p2} = \frac{[S^{2-}][H^+]}{[HS^-]} \quad pK_2 = 17.4$$

$$M^{2+} + S^{2-} \rightleftharpoons MS(s)$$

$$M^{2+} + HS^- \rightleftharpoons MS(s) + H^+$$

Fonte: Lewis,Hydrometallurgy 104, 222, 2010

Biorremediação não-catabólica

Eficiência de precipitação de sulfetos de metais depende do pH

Atenção!
A equação abaixo representa uma simplificação do processo de dissolução ou precipitação de metais. Para desenvolver um processo eficaz de tratamento é indispensável conhecer todas as formas em que o metal se encontra dissolvido na solução

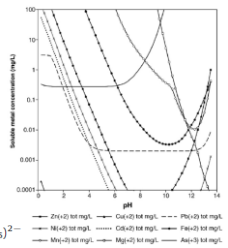
$$M^{2+} + HS^- \rightleftharpoons MS(s) + H^+$$

$$CuS(s) + nHS^- \rightleftharpoons CuS(HS)_n^{-n}$$

$$\text{where } n = 2 \text{ and } 3$$

$$CuS(HS)_2^{2-},\ CuS(HS)_3^{3-},\ CuS(S_5)_2^{3-},\ Cu(S_4)(S_5)^{3-}\ CuS(S_5)^{2-}$$

Fonte: Lewis,Hydrometallurgy 104, 222, 2010



Aplicação

Contaminantes tratados por biorremediação

Contaminante	Biodegradabilidade	Condições preferenciais
Hidrocarbonetos alifáticos		
cadeia curta	boa	aeróbia
cadeia longa	baixa	
ramificados	baixa	aeróbia
cíclicos	baixa	aeróbia
Hidrocarbonetos monoaromáticos		
Hidrocarbonetos monoaromáticos	boa	aeróbia
Fenóis	boa	aeróbia
Cresóis	baixa	aeróbia
Catecóis	boa	aeróbia
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos		
2-3 anéis	boa	aeróbia
3- 6anéis	baixa	aeróbia

Fonte: Manual for Bioremediation techniques, ICSS,2006, https://clu-in.org

Aplicação

Contaminantes tratados por biorremediação

Contaminante	Biodegradabilidade	Condições preferenciais
Hidrocarbonetos alifáticos clorados		
PCE, tricloroetano	boa	anaeróbia
TCE,	boa	anaeróbia
dicloroetano,DCE, VC	boa	anaeróbia/aeróbia
Hidrocarbonetos aromáticos clorados		
Clorofenóis altamente clorados	baixa	anaeróbio
Clorofenóis com baixa cloração	boa	anaeróbio/aeróbio
Clorobenzenos altamente clorados	baixa	anaeróbio
Clorobenzenos com baixa cloração	boa	anaeróbio/aeróbio
Cloronaftaleno	boa	anaeróbio/aeróbio
PCBs altamente corados	baixa	anaeróbio
PCBs com baixa cloração	boa	anaeróbio/aeróbio
Dioxinas		
PCDD/F (vários)	baixa	anaeróbio
2,3,7,8 PCDD/PCDF	nula	

Fonte: Manualfor Bioremediation techniques, ICSS,2006, https://clu-in.org

Aplicação

Contaminantes tratados por biorremediação

Contaminante	Biodegradabilidade	Condições preferenciais
Compostos nitroaromáticos		
Mono e dinitroaromáticos	boa	anaeróbio/aeróbio
TNT	boa	anaeróbio/aeróbio
Trinitrofenol	baixa	anaeróbio/aeróbio
Compostos nitroalifáticos		
Trinitrato de glicerol	boa	aeróbio
Pesticidas		
γ-HCH (lindano)	boa	anaeróbio/aeróbio
β-HCH (lindano)	baixa-nula	anaeróbio/aeróbio
Atrazinas	boa	aeróbio

Fonte: Manualfor Bioremediation techniques, ICSS,2006, https://clu-in.org

Aplicação

Contaminantes tratados por biorremediação

Contaminante	Biodegradabilidade	Condições preferenciais
Inorgânicos		
Cianetos livres	boa	aeróbio
Cianetos complexados	boa	aeróbio
Amonia	boa	aeróbio
Nitrato	boa	anaeróbio
Sulfato	boa	anaeróbio
Metais	baixa(ICSS)/nula(USEPA)	anaeróbio/aeróbio
Radionuclídeos	baixa(ICSS)/nula(USEPA)	anaeróbio/aeróbio

Fonte: Manualfor Bioremediation techniques, ICSS,2006, https://clu-in.org

Aplicação

Biorremediação: Objetivos de Tratamento

Tempo?
Custo?

Table 1. Examples of Variation in Cleanup Levels for DNAPL Constituents in Soil and Ground Water[1]

Contaminant	Maximum Contaminant Level (µg/L)	Range of Cleanup Levels at Selected Sites (Number of Sites)[2]	
		Soil (mg/kg)	Ground Water (µg/L)
Chlorinated Ethenes			
PCE	5	0.03 - 529 (12)	0.7 - 8.85 (16)
TCE	5	0.015 - 20,400 (11)	1 - 17,500 (25)
cis-1,2-DCE	70	71,000 (1)	0.38 - 50,000 (9)
1,1-DCE	7	0.08 (1)	7 (2)
Chlorinated Ethane			
1,1,1-TCA	200	6 - 25.6 (2)	30 - 8,850 (5)
Chlorinated Methanes			
Carbon Tetrachloride	5	2 – 6 (2)	5 (2)
Chloroform	None	0.3 – 6 (2)	10 (1)
Methylene Chloride	None	5.77 - 227,000 (2)	2,000 (1)

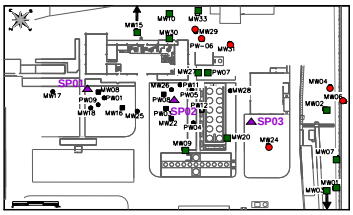
Aplicação

Biorremediação – Caracterização da Área

- **Áreas geralmente estão contaminadas com misturas de contaminantes;**
- **Natureza exata dos contaminantes desconhecida;**
- **Composição da contaminação varia na área;**
- **Presença de nutrientes?**
- **Disponibilidade de aceptores finais de elétrons?**
- **Temperatura?**
- **Outros compostos biodegradáveis?**
- **Indicadores de biodegradação?**

Aplicação

Heterogeneidade da distribuição de contaminantes



- Todos os BTEX dentro dos padrões de potabilidade
- Todos os BTEX fora dos padrões de potabilidade
- Poço com fase livre
- Alguns BTEX dentro e alguns fora dos padrões de potabilidade
- Perfis de solos

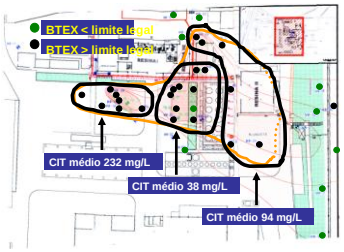
Aplicação

Identidade dos contaminantes?

Amostra	Carbono Orgânico Total (mgC/L)	Carbono Inorgânico Total (mgC/L)	BTEX (mgC/L)
PB 03	933	27	21
PB 04	431	55	48
PB 05	397	40	30
PB 07	3790	19	3
PB 08	625	53	25
PB 11	311	48	37
PM 16	473	220	40
PM 17	317	280	21
PM 18	517	394	5
PM 22	783	29	19
PM 25	1055	8	9
PM 26	416	47	47
PM 27	215	55	52
PB 06	56	105	0
PM 28	952	82	9
PM 29	121	170	2
PM 31	644	74	0
PM 15 ("limpo")	22	2	0

Aplicação

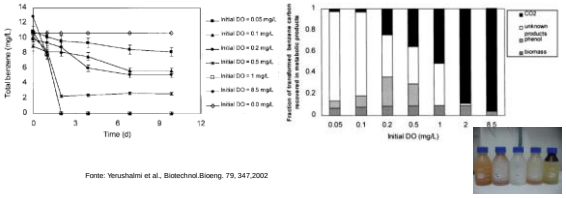
Indicadores de biodegradação: CO_2



Aplicação

Heterogeneidade da distribuição de contaminantes

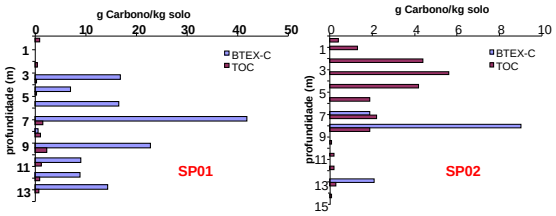
Produção de metabólitos na biodegradação de BTEX em condições de microaerofilia



Fonte: Yerushalmi et al., Biotechnol.Bioeng. 79, 347,2002

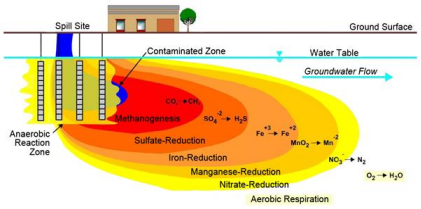
Aplicação

Heterogeneidade da distribuição de Hidrocarbonetos no Solo:



Aplicação

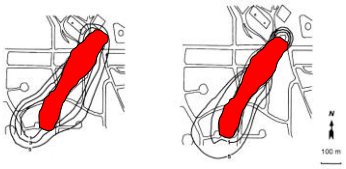
Indicadores de biodegradação: consumo de aceptores finais de elétrons



Aplicação

Indicadores de biodegradação: consumo de aceptores finais de elétrons

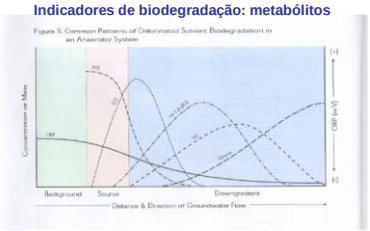
Oxigênio dissolvido **Nitrato**



Fonte: Wilson, J. T. In Proc. 1999 Contam. Site Rem. Conf. Perth, Johnston, C. D. (Ed.), 283-296 (1999)

Aplicação

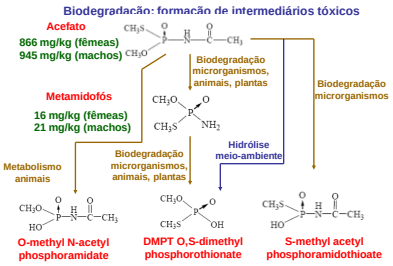
Indicadores de biodegradação: metabólitos



Fonte: https://clu-in.org

Aplicação

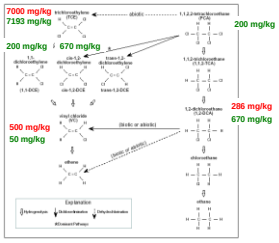
Biodegradação: formação de intermediários tóxicos



Aplicação

LD 50 ratos

Concentração mínima letal humanos



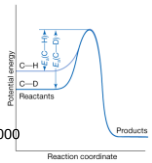
Biodegradação: formação de intermediários tóxicos

Biorremediação não-catabólica

Análise da composição isotópica de contaminantes e metabólitos

CSIC – compound specific isotope composition: substratos com<12C

Elemento	Abundância Relativa Isótopos	Differença de Massa Relativa
H/D	99,9844/0,0156	2,00
$^{12}C/^{13}C$	98,89/1,11	1,08
$^{14}N/^{15}N$	99,64/0,36	1,07
$^{16}O/^{18}O$	99,76/0,02	1,13
$^{32}S/^{34}S$	94,02/4,21	1,06
$^{15}Cl/^{17}Cl$	75,53/24,47	1,06



Fonte: MeckenstocK et al. J Contaminant Hydrol 75, 215– 255, 2004

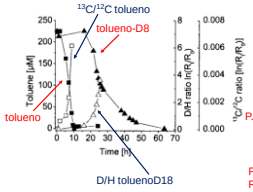
$\delta^{13}C = (^{13}C/^{12}C$ poluente - $^{13}C/^{12}C$ padrão$)/^{13}C/^{12}C$ padrão x 1000

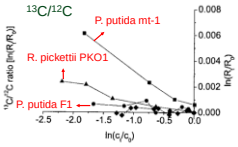
Teor maior de isótopos pesados em $\delta^{13}C$ de -13°/₀₀ do que em $\delta^{13}C$ de -26°/₀₀

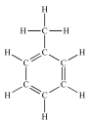
Biorremediação não-catabólica

Análise da composição isotópica de contaminantes e metabólitos

CSIC – compound specific isotope composition: substratos com<12C







P. putida mt-1: metilmonoxigenase
R. pickettii PKO1: monoxinase introduz O no anel
P. putida F1: dioxigenase

Fonte: MeckenstocK et al. J Contaminant Hydrol 75, 215– 255, 2004

Biorremediação não-catabólica

Análise da composição isotópica de contaminantes e metabólitos
CSIC – compound specific isotope composition: substratos com<12C

$\delta^{13}C$ >2°/₀₀ ⇒ PCE está sendo degradado!
$\delta^{13}C$ TCE pluma <<< fonte: TCE está sendo degradado!
$\delta^{37}Cl$ cDCE > $\delta^{37}Cl$ TCE: cDCE está sendo degradado!

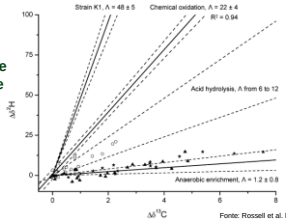
Description	Well	PCE (µg/L)	TCE (µg/L)	cDCE (µg/L)	PCE ^{13}C δ ‰	TCE ^{13}C δ ‰	cDCE ^{13}C δ ‰	PCE ^{37}Cl δ ‰	TCE ^{37}Cl δ ‰	cDCE ^{37}Cl δ ‰
Source	E&E 18	3,700	14	3.9J	-26.61	-31.89	-23.75	0.8	1.3	3
Source	E&E 19	2,800	20	34	-26.98	-34.55	-26.57	1.4	2.8	3.7
Source	MW-33S	530	31	14	-27.3	-31.27	-22.25	-0.3	3.3	4.9
Mid-gradient	MW-32S	74	230	19	-23.45	-24.74	-28.89	2.2	4.5	4.1
Mid Fringe	MW-7	4.4J	1.2J	<(5)	-26.05	-25.2	ND	-0.9	4.6	ND
Mid Fringe	MW-13	0.6J	5	10	ND	-1.52	-28.18	ND	11.0	6.2
Mid Fringe	MW-14	0.6J	6	6	-23.36	-9.88	-27.16	ND	8.6	6.3
Downgradient	MW-34S	6	37	6	-22.78	-25.15	-32.5	1.3	4.7	3.9

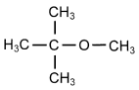
Fonte: Weller e Stewart, apresentação

Biorremediação não-catabólica

Análise da composição isotópica de contaminantes e metabólitos
CSIC – compound specific isotope composition: substratos com<12C

Mecanismos de degradação de MTBE

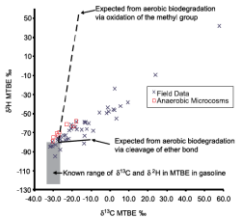


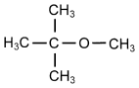


Fonte: Rossell et al. Environ. Sci. Technol., 46, 4757−4766, 2012

Aplicação

Indicadores de biodegradação: Compound Specific Stable Isotopes





Fonte: EPA 600/R-08/148 | December 2008

Aplicação

Indicadores de biodegradação: contagens microbianas

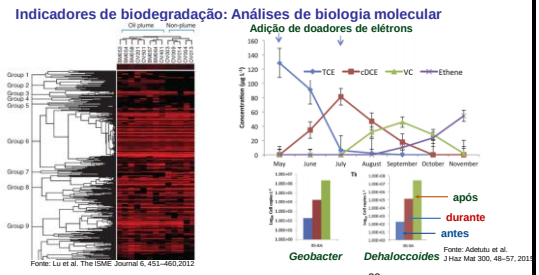
Amostra	BTEX baixo	BTEX médio-alto	Fase livre
CT	$4{,}8x10^5 \pm 7{,}7x10^5$	$3{,}6x10^6 \pm 8{,}9x10^6$	$2{,}6x10^5 \pm 2{,}0x10^5$
CH	$5{,}9x10^4 \pm 7{,}4x10^4$	$1{,}4x10^5 \pm 2{,}4x10^5$	$12{,}5 \pm 10{,}9$
CD	$7{,}8x10^4 \pm 1{,}1x10^4$	$2{,}2x10^5 \pm 2{,}9x10^5$	$3{,}3x10^2 \pm 3{,}3x10^2$

CT: contagem total (número/ml);
CH: contagem heterotrófica (ufc/ml)
CD: contagem de biodegradadoras (ufc/ml)

Isoladas 21 cepas de organismos degradadores de BTEX aeróbios

Aplicação

Indicadores de biodegradação: Análises de biologia molecular

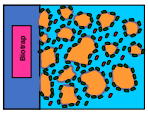


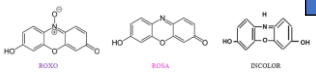
Fonte: Lu et al. The ISME Journal 6, 451–460,2012

Fonte: Adetutu et al. J Haz Mat 300, 48–57, 2015

Aplicação

Ensaios de Biodegradação em Laboratório: Microcosmos

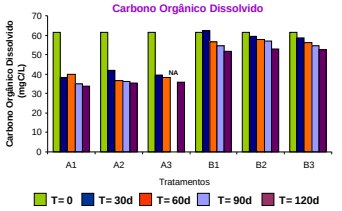




- OK para condições aeróbias e anaeróbias
- Condições microaerofílicas?

Aplicação

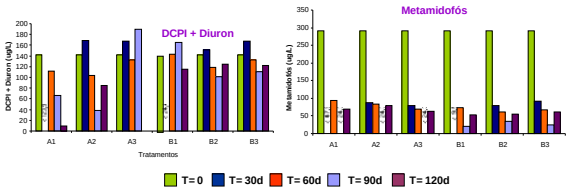
Microcosmos: Pesticidas em Aquífero de Rocha Fraturada



Metamidofós	280µg/L
Hetdio	820µg/L
dicofol	200µg/L
Propanil	450µg/L
xileno	8000µg/L
alaclor	1000µg/l
DCPI e Diuron	140µg/L
ametrim	620µg/L
3,4-DCA	1800µg/L
Endosulfana α e β:	58µg/L
captan	500µg/L
Total	**13,3mg/L**

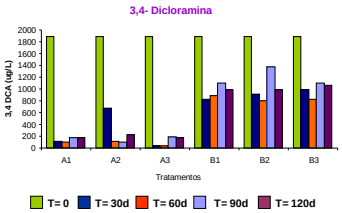
Pesticidas em Aquífero de Rocha Fraturada

Microcosmos: Pesticidas em Aquífero de Rocha Fraturada



Aplicação

Microcosmos: Pesticidas em Aquífero de Rocha Fraturada



Aplicação

Microcosmos: BTEX

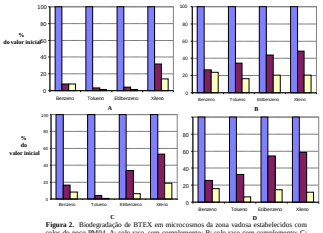
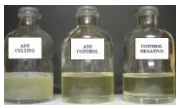


Figura 2. Biodegradação de BTEX em microcosmos da zona vadosa estabelecidos com solos do poço PM04. A: solo raso, sem complemento; B: solo raso com complemento; C: solo profundo, sem complemento; D: solo profundo, com complemento. Tempos de incubação: 1 dia; 14 dias; 28 dias.

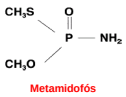
Aplicação

Microcosmos: Biorremediação de Pesticidas

sem fósforo e enxofre
Glicerol e citrato



sem nitrogênio e enxofre
Glicerol, glicose e citrato

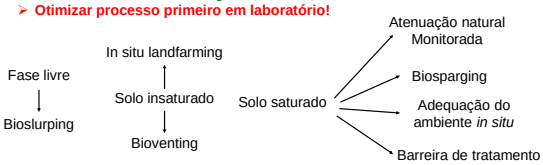


Metamidofós

Aplicação

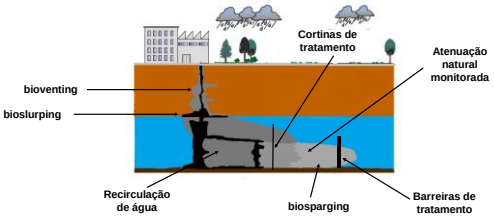
Biorremediação *in situ*: técnicas

- Adicionar aceptores de elétrons: oxigênio, nitrato, peróxido, etc.
- Adicionar co-substratos: lactato, metano, hidrogênio, melaço
- Adicionar nutrientes: nitrogênio, fósforo, etc.
- Otimizar processo primeiro em laboratório!



Aplicação

Biorremediação *in situ*: técnicas



Aplicação

Atenuação Natural Monitorada

- Degradação dos poluentes pelos microrganismos naturalmente presentes na área
- Ocorre em diferentes intensidades em todos os processos de remediação

Mecanismos.

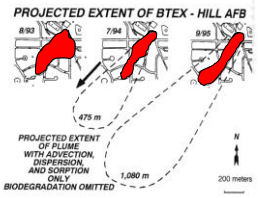
1. Diluição:
   - convencção
   - dispersão
   - volatilização
2. Adsorção.
3. Degradação abiótica.
4. Biodegradação

Atenuação natural em plumas de postos de gasolina

Localização	Califórnia	Califórnia	Texas
Postos avaliados	119	271	217
Pluma	85% < 60m	poucas > 80m	75% < 75m
Comprimento da pluma	91% estáveis ou diminuindo	92% estáveis ou diminuindo	97% estáveis ou diminuindo
Concentrações de poluentes	91% estáveis ou diminuindo	92% estáveis ou diminuindo	86% estáveis ou diminuindo

Aplicação

Biorremediação *in situ*: Atenuação Natural Monitorada



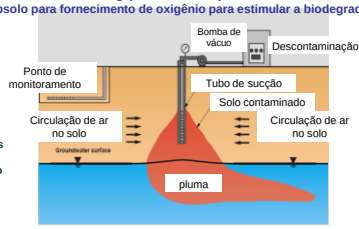
Fonte: Wilson, J. T. In Proc. 1999 Contam. Site Rem. Conf. Perth, Johnston, C. D. (Ed.), 283-296 (1999)

Aplicação

Bioventing (zona vadosa):

Injeção de ar no subsolo para fornecimento de oxigênio para estimular a biodegradação

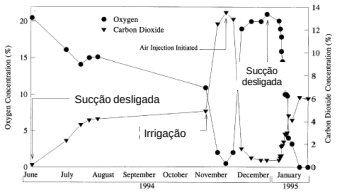
- **Combustíveis**
- **BTEX**
- **Fenóis**
- **Solventes voláteis**
- **Solventes semivoláteis**
  Organoclorados voláteis ou semivoláteis com baixo índice de cloração
- **PAHs mais leves**



Aplicação

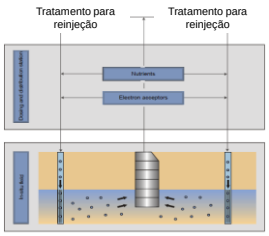
Bioventing (zona vadosa):

Injeção de ar no subsolo para fornecimento de oxigênio para estimular a biodegradação



Aplicação

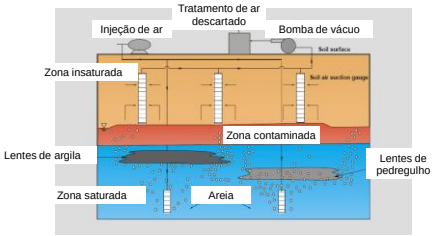
Biorremediação *in situ*: Recirculação de Água



- **Objetivo importante do tratamento: remoção de Fe ou Mn que poderiam entupir os poços de reinjeção!**

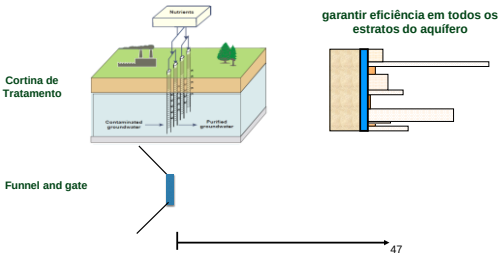
Aplicação

Biorremediação *in situ*: Biosparging



Aplicação

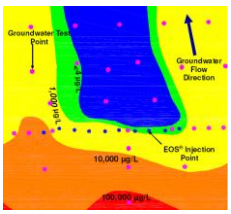
Biorremediação *in situ*: Cortinas de Tratamento e Funnel and gate



Aplicação

Biorremediação *in situ*: Cortinas de Tratamento

Concentração de TCE



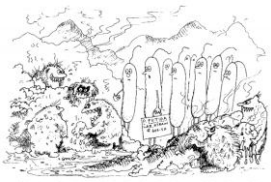
Condutividade hidráulica

Aplicação

Bioaumentação com Bactérias *in situ*

"and with these 'money-off' coupons, I can get two more mixed cultures, a nutrient amendment, and something that will unblock my drains!"

Caplan, Tibtech,11, 320,1993

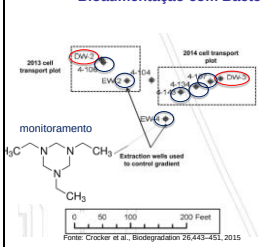


"Oh dear! I didn't realize 'in the field' would be like this! We should have stayed in the laboratory."

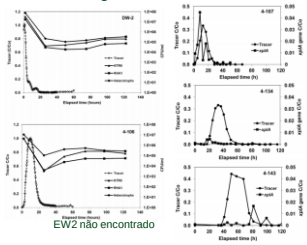
Liu & Suflita, Tibtech,11, 344,1993

Aplicação

Bioaumentação com Bactérias *in situ:* degradadores de RDX



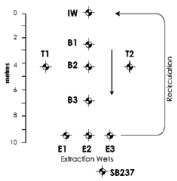
Fonte: Crocker et al., Biodegradation 26,443–451, 2015

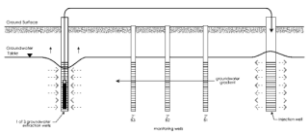


EW2 não encontrado

Aplicação

Bioaumentação com Bactérias *in situ:* degradadores de PCE

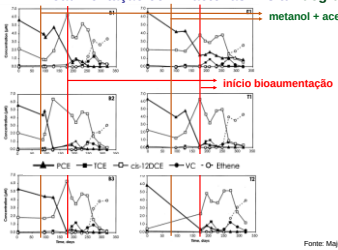


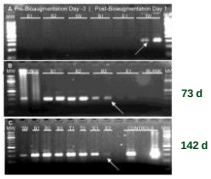


Fonte: Major et al., Environ. Sci. Technol. 36, 5106-5116, 2002

Aplicação

Bioaumentação com Bactérias *in situ:* degradadores de PCE

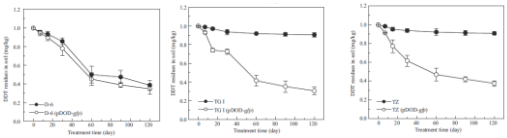




Fonte: Major et al., Environ. Sci. Technol. 36, 5106-5116, 2002

Aplicação

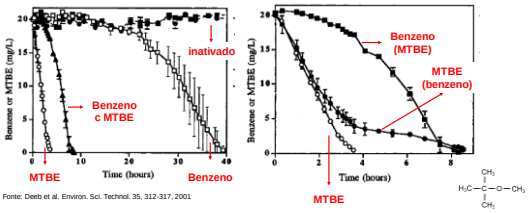
Bioaumentação com Plasmídeos com Genes de Vias Metabólicas de Degradação de DDT



D6: *Sphingobacterium* sp. (biodegradador original)
TG1: *E. coli* (não degradadora)
TZ: *Klebsiella* sp. (não degradadora)
pDOD-*gfp*: plasmídeo

Crescimento Microbiano

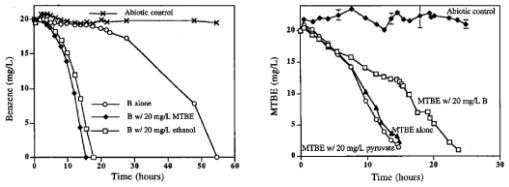
Degradação simultânea benzeno/MTBE por células de cultura pura



Fonte: Deeb et al. Environ. Sci. Technol. 35, 312-317, 2001

Crescimento Microbiano

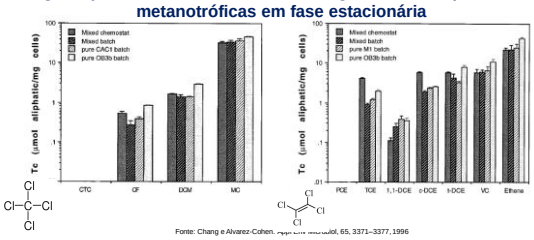
Degradação simultânea benzeno/MTBE por células de cultura pura



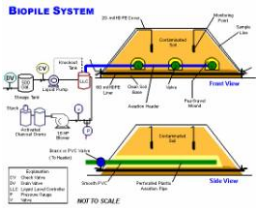
Fonte: Deeb et al. Environ. Sci. Technol. 35, 312-317, 2001

Crescimento Microbiano

Degradação simultânea de solventes organoclorados por células metanotróficas em fase estacionária



Fonte: Chang e Alvarez-Cohen, Appl. Environ. Microbiol, 65, 3371–3377, 1996

Aplicação

Biorremediação *ex situ*: Biopilha