

# MONITORAMENTO DE ÁREAS IMPACTADAS POR DERRAMAMENTO DE GASOLINA UTILIZANDO BIOLOGIA MOLECULAR

Marcio Luis Busi da Silva<sup>a</sup> e Henry Xavier Corseuil<sup>a</sup>

**Resumo** – O uso da biologia molecular como ferramenta no monitoramento de uma área experimental impactada por derramamento de gasolina contendo etanol (25% v/v) e bioestimulada com nitrato como aceptor de elétrons foi investigada. PCR quantitativo foi utilizado para quantificar a presença de bactérias totais; metanogênicas; nitrato-, ferro-, e sulfato-redutoras na água subterrânea. A presença do gene *bssA* (único gene conhecido e presente em todas as bactérias anaeróbicas responsáveis pela biodegradação do tolueno e xilenos) também foi investigada. A maior demanda de nitrato foi observada nos pontos com maiores concentrações de BTEX e etanol, sugerindo desnitrificação. As maiores concentrações de bactérias totais e redutoras de nitrato foram observadas nos pontos com as maiores concentrações do substrato BTEX e ethanol indicando intensa atividade de biodegradação nestes pontos. A presença do gene catabólico *Phe* (fenol monooxigenase) presente em bactérias aeróbicas capazes de metabolizar os BTEX demonstrou que a biodegradação dos BTEX ocorre em condições microaerofílicas. Bactérias metanogênicas também não foram detectadas corroborando com a ausência de gás metano. Análises de biologia molecular serviram para melhor caracterização dos processos de atenuação natural e biorremediação da área contaminada servindo como ferramenta indispensável no monitoramento ambiental.

**Abstract** – Groundwater samples from a contaminated aquifer were analyzed using quantitative PCR (qPCR) to evaluate the microbial community response to a release of gasoline amended with ethanol (25% v/v). Total bacteria growth coincided with BTEX and ethanol migration and availability. The concentrations of nitrate-reducers were also higher in areas of high demands of nitrate. Interestingly, bacteria harboring the gene *bssA* (present in all anaerobic bacteria capable of toluene and xylene biodegradation) were not observed. Moreover, the presence of high concentrations of bacteria harboring the catabolic phenol monooxygenase gene (*Phe*) responsible for BTEX metabolism confirmed that aerobic (microaerophilic) BTEX biodegradation was occurring. Thus, nitrate enhanced ethanol removal and alleviated the high demands of electron

---

<sup>a</sup> Afiliação: Universidade Federal de Santa Catarina / Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental Campus Universitário - Trindade Florianópolis/ SC- 88040-970. Tel.: (48) 3331-7569 / Fax: (48) 3234-64598. Email: silva@ens.ufsc.br

acceptors exacerbated by ethanol biodegradation and that could aid in the formation of strongly anaerobic zones not conducive of BTEX biodegradation. Methanogens were not detected corroborating with the absence of methane. Overall, molecular biology techniques appears to be a promising monitoring tool to aid conventional footprints analyses in assessing natural attenuation and bioremediation of contaminated groundwater.

**Palavras-Chave** – BTEX, Monitoramento, qPCR.

## INTRODUÇÃO

A atenuação natural monitorada e biorremediação estão entre as tecnologias de melhor custo benefício na remediação de solos e águas subterrâneas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo e derivados. Atualmente, a avaliação do potencial de biorremediação e atenuação natural monitorada é realizada através de evidências indiretas dos processos de biodegradação, utilizando indicadores geoquímicos, modelagem numérica ou fracionamento de isótopos. Entretanto, a legislação ambiental e a aprovação pública requerem uma caracterização detalhada da biorremediação ou atenuação natural monitorada demonstrando evidências diretas de da biodegradação do contaminante. Desta forma, técnicas convencionais de monitoramento podem ser complementadas com técnicas de biologia molecular emergente que detectam e quantificam as bactérias associadas com a biodegradação do contaminante de interesse.

Técnicas de biologia molecular como *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) poderiam oferecer evidências diretas dos tipos de processos microbiológicos atuantes na remoção dos contaminantes, complementando os relatórios de avaliação dos processos de atenuação natural ou biorremediação. Por exemplo, a quantificação do gene bacteriano responsável pela biodegradação de naftaleno demonstrou ser um ótimo indicador da biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (Fleming et al., 1993). Similarmente, a redução do Fe (III) foi correlacionada com a expressão gênica da bactéria redutora de ferro *Geobacter sulfurreducens* (Chin et al., 2004). Técnicas de biologia molecular também estão sendo utilizadas para caracterizar os processos de redução do cloro (Holmes et al., 2006). Similarmente a qPCR vêm sendo utilizada como ferramenta para investigação do potencial de biodegradação dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (Capiro et al., 2008; Da Silva e Alvarez 2008).

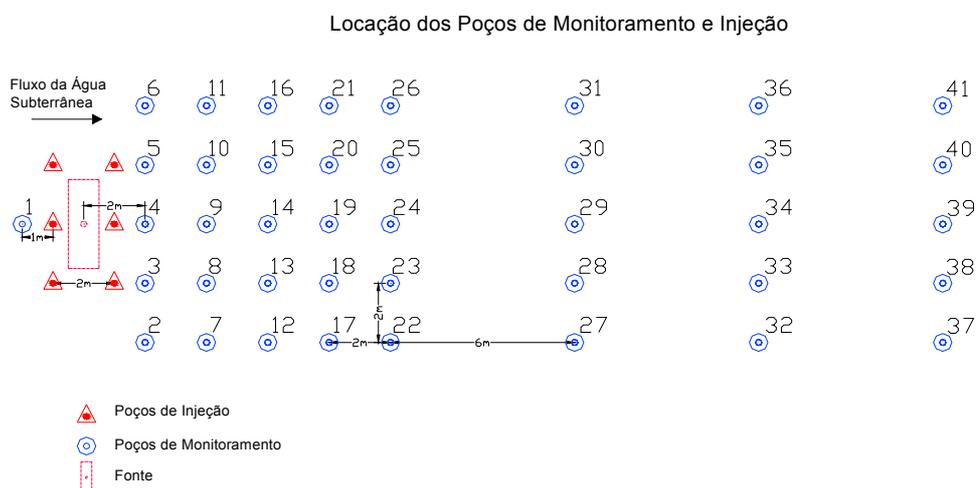
Neste trabalho foi investigado o potencial da técnica de biologia molecular, especificamente no uso do qPCR, como ferramenta no monitoramento de uma área experimental experimental impactada por derramamento de gasolina contendo etanol (25% v/v) e bioestimulada com nitrato como acceptor de elétrons.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Área experimental.

A área experimental utilizada encontra-se no sul do município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 100L de gasolina comercial brasileira contendo 25% (v/v) etanol foi derramado em uma área de 1 m<sup>2</sup> e 1 m abaixo da superfície do solo (fonte de contaminação). O derramamento ocorreu no dia 22 de dezembro de 2004. Após 2 meses do derramamento, nitrato foi injetado na área para acelerar a remoção biológica dos contaminantes, acelerando os processos de atenuação natural. Inicialmente foi utilizada uma concentração de 5g/ L de nitrato de sódio. Nesta concentração, o nitrato foi rapidamente consumido na região da fonte e, portanto, concentrações maiores (40g/ L) foram posteriormente utilizadas. As injeções eram realizadas 3 vezes por semana. Nos 3 primeiros meses, as injeções foram realizadas em todos os 6 poços de injeções (Figura 1). Entretanto, de acordo com os resultados obtidos nos monitoramentos foram necessárias modificações no esquema de injeção, que incluíram a diminuição no número de poços e a suspensão da injeção por período determinado (de 15 à 20 de julho de 2005). Desta forma se evitou o acúmulo de nitrato em regiões onde este não estava sendo utilizado. A injeção de nitrato foi encerrada no dia 2 de dezembro de 2005.

45 poços de monitoramento foram instalados no local para acompanhamento do movimento da água subterrânea e monitoramento da pluma de contaminação (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição e identificação da fonte, poços de monitoramento e pontos de injeção de nitrato.

## **Análises químicas.**

Água subterrânea foi coletada à 4,8 m de profundidade da região da fonte de contaminação e dos poços de monitoramento (PM) 1, 5, 10, 15, 20, 25, e 30 (Figura 1). Para coleta foi utilizada bomba peristáltica Millipore (Modelo Easy-Load) com mangueiras Masterflex® Tygon. A água coletada foi transferida diretamente para frascos de 40mL (para determinação de BTEX, etanol e metano), 200 mL para análises físico-químicas, e 1L para análises de biologia molecular. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em gelo e/ou conservadas a pH < 2.

Etanol, metano, Benzeno, tolueno, etil-benzeno e isômeros do xileno (BTEX) foram analisados em cromatógrafo gasoso (HP 6890) equipado com coluna capilar de sílica fundida HP 1 (19095z-123, HP, EUA), detector FID e headspace autosampler (HP 7694). Hélio foi utilizado como gás de arraste (7 mL/ min). As temperaturas de operação do CG foram (°C): injetor (260), detector BTEX (280) e etanol e metano (190), rampa (70- 120) 5°C/min com 30°C/min (220). Para o etanol a rampa utilizada foi de (40 – 120) 5°C/min com 30°C/min (220). Metano foi analisado em isoterma (40). Curvas de calibração foram feitas conforme EPA/8015<sup>A</sup> (EPA, 1996). Curva de calibração para o metano foi feita utilizando-se solução saturada com gás metano e utilizando a constante de Henry para determinação da concentração aquosa (Stumm e Morgan, 1981). Os limites de detecção (µg/L) foram: BTEX (5), etanol (1000), e metano (1).

Nitrato, sulfato, e acetato foram analisados por cromatografia líquida (IC -1000, DIONEX, EUA) equipado com detector de condutividade iônica e coluna AS14A-4mm de acordo com Standard Methods, 1992. Carbonato e bicarbonato de sódio foram utilizados na fase móvel. Os limites de detecção foram  $\geq 1$  µg/L.

Ferro II e sulfeto foram analisados espectrofotômetro (DR/2500, Hach) pelo método 1,10 fenantrolina (Ferro II) ou colorimétrico com azul de metileno (sulfeto) (Standard Method, 1992). Os limites de detecção foram (µg/ L): ferro II (8) e sulfeto (2).

pH, oxigênio dissolvido (OD) e potencial de oxido-redução foram analisados em campo utilizando o analisador de água Micropurge® Flow Cell (modelo MP 20).

Todos os químicos (Supelco ou Merk) utilizados na preparação das curvas de calibração foram de grau de pureza  $\geq 99,9\%$ .

## **Extração de DNA.**

1-L de água subterrânea de cada ponto de amostragem foi filtrada em Kitasato e bomba de vácuo usando filtro Millipore 0.22µm. Após filtragem os filtros eram transferidos para kit de extração de DNA MoBio Power Soil™ kit (Carlsbad, CA). O DNA foi extraído de acordo com as recomendações do kit. Após o processo de extração, 100 µL de DNA era obtido e armazenado em

frascos livre de DNA e RNA de 2 mL (Eppendorf) e estocados em freezer (-30°C, MidSci) para análises em PCR quantitativo (qPCR).

### **PCR quantitativo (qPCR).**

As análises de biologia molecular foram realizadas utilizando os métodos de reação em cadeia da polimerase (*real-time quantitative polimerase chain reaction*, qPCR). qPCR foi utilizado para quantificar bactéria total, redutoras de nitrato, redutoras de ferro (gêneros *Geobacter* e *Peloobacter*), redutoras de sulfato ( $\delta$ -*Proteobacteria* como *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfuromosa*, e *Desulfuromonas*), e metanogênicas. A quantificação das bactérias totais foi determinada utilizando os primers BACT1369F e PROK1492R (Beller et al., 2002). A quantificação de bactérias capazes de metabolizar aerobicamente os compostos BTEX foi estimada utilizando o gene catabólico *Phe* (fenol monooxigenase). A concentração de bactérias contendo o único gene conhecido pela biodegradação anaeróbica (nitrato-redução) do tolueno ou xilenos (benzil succinato sintase, *bssA*) foi estimada com os primers e sonda fluorogênica descritos por Beller et al. (2002). A concentração das bactérias redutoras de nitrato foi estimada utilizando os primers nirK1F/ nirK5R e nirS1F/ nirS6R. A quantificação das bactérias redutoras foi obtida utilizando-se os primers 361F e 685R com sonda fluorogênica GBC1. Bactérias redutoras de sulfato foram quantificadas utilizando os mesmos primers para determinação das bactérias redutoras de ferro adicionado a sonda fluorogênica EUB1. A concentração das bactérias metanogênicas foi estimada utilizando-se os primers ME1F e ME2R. As análises foram realizadas no equipamento Mastercycler ep realplex (Eppendorf). Os kits para reação de PCR foram o Taqman e Sybr-Green (Applied Biosystems, EUA). Todos os primers e sondas foram obtidos da empresa Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA). A concentração de bactérias por amostra foi determinada de acordo com Da Silva e Alvarez (2004).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Monitoramento da biorremediação.**

Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos 1260 dias após o derramamento. Os dados foram obtidos através do monitoramento da água subterrânea coletada a 4,8 m de profundidade onde as concentrações de BTEX foram comparativamente superiores às demais profundidades. A Figura 2A mostra que a pluma de BTEX e etanol se encontra a aproximadamente 16 m (Figura 1) da fonte de contaminação. As maiores concentrações de BTEX (1 – 13 mg/L) e

etanol (12 mg/L) foram observadas no centro da pluma, localizada a aproximadamente 6 – 8 m da fonte de contaminação (Figuras 1 e 2A).

### **Indicadores geoquímicos.**

Nitrato, ferro (II), sulfato, oxigênio, acetato e metano foram utilizados como parâmetros de geoquímicos do monitoramento da biodegradação.

O nitrato utilizado como acceptor de elétron neste trabalho (bioestimulação) para promover rápida remoção dos BTEX e etanol, foi consumido nos pontos de maior concentração dos compostos BTEX e etanol. Estes resultados sugerem a utilização do nitrato como acceptor de elétrons na biodegradação dos compostos BTEX e etanol.

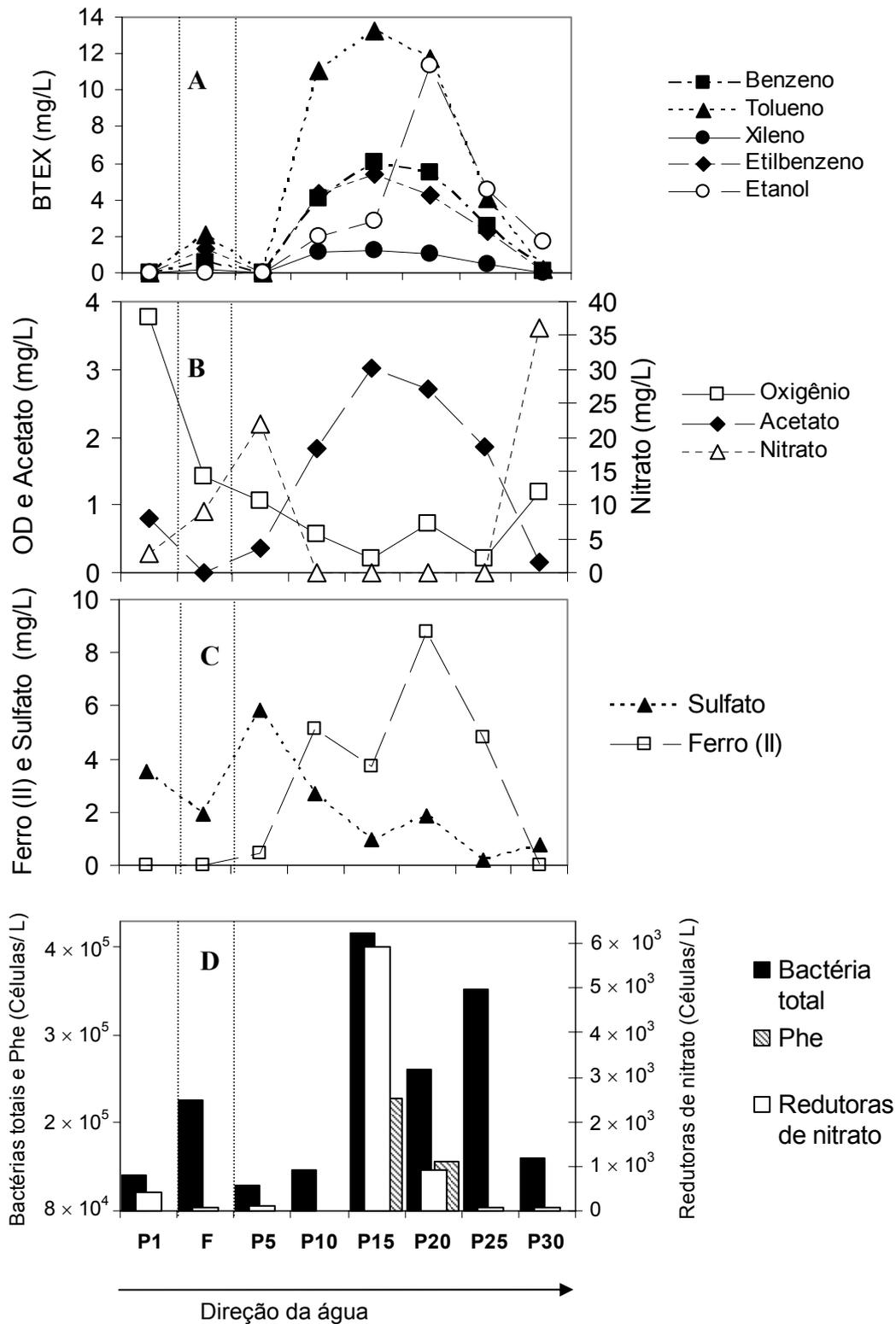
Similarmente as concentrações do nitrato ao longo da pluma de contaminação, as concentrações de oxigênio dissolvido reduziram de 3,8 mg/L (amostra *background*) para 0,2 mg/L nos pontos de maior concentração dos compostos BTEX e etanol (Figuras 2A e 2B), também sugerindo demanda biológica de oxigênio por processos de biodegradação.

A redução da concentração de sulfato ao longo da pluma aconteceu concomitantemente com o aumento da concentração de ferro (II) (Figura 2C). Percebe-se que as maiores concentrações de ferro (II) também foram observadas nos pontos de maior concentração dos compostos BTEX e etanol (Figuras 2A e 2C).

Acetato, que é um produto intermediário da fermentação do etanol, foi detectado imediatamente atrás da pluma do etanol (Figuras 2A e 2B). A fermentação do etanol ocorreu aparentemente na presença de baixas concentrações de oxigênio ( $\geq 0,2$  mg/L) (Figuras 2A e 2B). O acúmulo de acetato na área contribuiu para o aumento da acidez (mg CaCO<sub>3</sub>/L) de 6 mg/L (amostra *background*) para 19,9 mg/L no poço P25 (dados não mostrados). Portanto, não se descarta a hipótese de que o aumento da acidez no solo poderia estar atuando na dissolução do ferro e na precipitação com o sulfato (formando FeS). Esta hipótese poderia justificar a concomitante redução das concentrações de sulfato com o aumento das concentrações de ferro (II) (Figura 2C) justamente onde as concentrações de acetato (Figura 2B) e acidez foram maiores.

A presença do gás metano não foi observada em nenhuma amostra (dado não mostrado). Este resultado não foi surpreendente devido ao fato que bactérias metanogênicas são extremamente sensíveis a presença de oxigênio.

Os resultados obtidos com os indicadores geoquímicos utilizados neste trabalho serviram para demonstrar os principais mecanismos de atenuação natural na área contaminada.



**Figura 2.** Concentração dos compostos BTEX e etanol (A); oxigênio dissolvido, acetato e nitrato (B); sulfato e ferro (II) (C); e bactérias totais, degradadoras aeróbicas dos BTEX (*Phe*) e redutoras de nitrato ao longo da pluma de contaminação. Fonte de contaminação (F) representada entre as linhas paralelas. Para referência da localização dos poços ver Figura 1.

No entanto, estes dados não ofereceram informações suficientes que justifiquem a biodegradação dos contaminantes BTEX. Por exemplo, nenhuma evidência direta foi obtida para demonstrar: (a) que os processos de remoção biológica dos contaminantes BTEX estão ocorrendo, e (b) que o uso do nitrato, ferro (III) ou sulfato estão associados na remoção biológica dos compostos BTEX. Portanto, é evidente que análises de microbiologia, especificamente no uso da biologia molecular, tornam-se indispensáveis. Estas análises de biologia molecular poderão complementar as técnicas convencionais de monitoramento ambiental oferecendo superior detalhamento na caracterização dos processos de atenuação natural e biorremediação.

### **Biologia molecular.**

Análises de biologia molecular foram realizadas em amostras de água subterrânea utilizando qPCR. Os biomarcadores moleculares utilizados neste trabalho referem-se aos principais grupos de bactérias associadas com a biodegradação dos BTEX e etanol. Por exemplo, o benzeno, que é o composto mais tóxico e recalcitrante entre os BTEX pode ser biodegradado anaerobicamente em condições redutoras de nitrato (Burland & Edwards 1999; Coates et al. 2001), redutoras de ferro (Lovley et al. 1996), redutoras de sulfato (Anderson & Lovley 2000; Coates et al. 1996), e metanogênicas (Ficker et al. 1999). Portanto, análises de bactérias totais (16S rDNA), redutoras de nitrato, redutoras de ferro, redutoras de sulfato e metanogênicas foram utilizadas para monitoramento biológico da área contaminada. A quantificação do gene *bssA* (i.e. benzil succinato sintase) que é o único gene conhecido até o momento presente em bactérias anaeróbicas fototróficas (Zengler et al., 1999), desnitrificantes (Beller e Spormann, 1997a), redutoras de sulfato (Beller e Spormann, 1997b), e redutoras de ferro (Kane et al., 2002) responsáveis pela biodegradação do tolueno e xilenos, foi também analisada. A quantificação de bactérias capazes de metabolizar aerobicamente os compostos BTEX foi determinada através do gene catabólico *Phe* (fenol monooxigenase).

A Figura 2D mostra as concentrações de bactérias totais e redutoras de nitrato ao longo da pluma de contaminação. Os resultados revelam que a maior concentração de bactérias foram observadas nos pontos P15 e P25 (Figura 2D) coincidentemente onde as concentrações de BTEX e etanol foram maiores (Figura 2A).

As maiores concentrações de bactérias redutoras de nitrato foram também observada nos pontos P15 e P20 (Figura 2D) onde o nitrato não foi detectado (Figura 2B). Estes resultados sugerem que as atividades de desnitrificação nestes pontos foram também maiores. Interessantemente, não foi detectado em nenhuma amostra a presença do gene *bssA*. Isto indica que o nitrato esteja sendo consumido como aceptor de elétrons na biodegradação do etanol e não dos BTEX. Este fato foi confirmado pela maior concentração de bactérias contendo o gene *Phe*

coincidentalmente nos pontos de maior concentração dos BTEX (Figuras 2A e 2D). Assim, a bioestimulação com o nitrato aliviou a excessiva demanda de elétrons aceptores necessários para a biodegradação preferencial do etanol minimizando à formação de zonas anaeróbicas extremas (i.e., redução de sulfato ou metanogênicas) e que não são favoráveis à rápida biodegradação dos BTEX. A desnitrificação do etanol também possibilitou que o oxigênio residual disponível (regiões microaerofílicas) (Da Silva et al., 2005) fosse utilizado para biodegradação aeróbica dos BTEX (Figura 2B) como evidenciado pela presença de bactérias contendo o gene *Phe*.

Bactérias metanogênicas, que são extremamente sensíveis a presença do oxigênio, não foram detectadas nas amostras analisadas. Estes dados corroboram com a ausência de metano (dados não mostrados).

Embora os dados geoquímicos indiquem a presença de ferro-, e sulfato-redução (Figura 2C) entre os pontos P15 e P25 onde as concentrações de BTEX e etanol foram maiores, não foram detectadas bactérias ferro-, ou sulfato-redutoras (dados não mostrados). Os motivos pelos quais estes processos foram determinados pelos indicadores geoquímicos não foram estudados neste trabalho. No entanto, não se descarta a hipótese de que estes processos tenham sido mediados quimicamente (e não biologicamente) em consequência da alta acidez como discutido acima.

Considerando que a maior biomassa de bactérias se encontra aderida ao solo (biofilme) e não suspensa na água subterrânea é possível que o número total de bactérias analisadas neste trabalho tenha sido subestimada. Testes futuros utilizando maiores volumes de água subterrânea serão necessários para otimizar a concentração de DNA e células.

## CONCLUSÕES

Neste trabalho, uma área experimental contaminada com gasolina contendo etanol (25% v/v) e bioestimulada com o aceptor de elétrons nitrato foi monitorada por aproximadamente 4 anos. O uso dos indicadores geoquímicos e da biologia molecular como ferramentas de monitoramento ambiental foram investigados. Os resultados obtidos com os indicadores geoquímicos mostraram-se adequados na caracterização da pluma de contaminação e na determinação de zonas de transição entre aceptores de elétrons e que sugerem potencial biodegradação. Entretanto, os resultados obtidos não demonstraram evidências diretas que confirmassem a remoção dos contaminantes por processos de biodegradação. Somente através das análises de biologia molecular e que foi evidenciado, por exemplo, que os contaminantes BTEX não estão sendo removidos diretamente com a adição do nitrato. A ausência dos gene *bssA* (presente em todas as bactérias desnitrificantes capazes de biodegradar tolueno e xilenos), das bactérias ferro-, e sulfato-redutoras indicaram que os

contaminantes BTEX estão sendo degradados aerobicamente na presença do oxigênio ( $\geq 0.2$  mg/L). Estes resultados foram confirmados pela presença de maiores concentrações de bactérias contendo o gene (*Phe*) responsável pela biodegradação aeróbica dos BTEX nos pontos com maior concentração destes compostos. Deste modo, a bioestimulação com nitrato serviu para minimizar a demanda de elétrons aceptores causada pela biodegradação preferencial do etanol. A presença do nitrato também contribuiu inibindo o aparecimento de zonas anaeróbicas e desfavoráveis à rápida biodegradação dos contaminantes BTEX. As maiores concentrações de bactérias foram observadas nas amostras contendo as maiores concentrações dos compostos BTEX e etanol. A maior concentração de bactérias desnitrificantes foi observada nas amostras que apresentaram maior remoção do nitrato.

Em resumo, este trabalho demonstrou que as análises de biologia molecular foram indispensáveis para melhor caracterização dos processos de atenuação natural e biorremediação da área contaminada por gasolina e etanol. Portanto, estas análises mostram ser imprescindível como ferramenta no monitoramento ambiental complementando as informações obtidas com as técnicas convencionais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson RT & Lovley DR (2000) Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleumcontaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 34: 2261–2266.
- Beller, H. R., Kane, S. R., Legler, T. C., and Alvarez, P. J. J. (2002). “A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene.” *Environ. Sci. Technol.*, 36 (18), 3977 -3984.
- Beller, H. R., and A. M. Spormann. 1997a. Anaerobic activation of tolueneand *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* 179:670–676.
- Beller, H. R., and A. M. Spormann. 1997b. Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3729–3731.
- Burland SM & Edwards EA (1999) Anaerobic benzenebiodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 529–533
- Chin, K.-J., Esteve-Núñez, A., Leang, C., and Lovley, D. R. (2004). “Direct correlation between rates of anaerobic respiration and levels of mRNA for key respiratory genes in *Geobacter sulfurreducens*.” *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5183-5189.

- Coates JD, Chakraborty R, Lack JG, O'Connor SM, Cole KA, Bender KS & Achenbach LA (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* 411: 1039–1043.
- Coates JD, Anderson RT & Lovley DR (1996) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1099–1101.
- Da Silva, M.L.B. and Pedro J.J. Alvarez. (2007). “Assessment of anaerobic benzene degradation potential using 16S rRNA gene-targeted real-time PCR.” *Environmental Microbiology*: 9(1), 72–80.
- Da Silva, M.L.B.; and P.J.J. Alvarez. (2004). “Enhanced Anaerobic Biodegradation of Benzene-Toluene-Ethylbenzene-Xylene-Ethanol Mixtures in Bioaugmented Aquifer Columns.”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 4720-4726.
- Da silva, M.L.B.; Ruiz-Aguilar G.M.L. and Alvarez P.J.J. (2005). “Enhanced Anaerobic Biodegradation of BTEX-Ethanol Mixtures in Aquifer Columns Amended with Sulfate, Chelated Ferric Iron or Nitrate.” *Biodegradation*. 16: 105-114.
- Ficker M, Krastel K, Orlicky S & Edwards E (1999) Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5576–5585.
- Fleming, J. T., Sanseverino, J., and Saylor, G. S. (1993). “Quantitative relationship between naphthalene catabolic gene frequency and expression in predicting PAH degradation in soils at town gas manufacturing sites.” *Environ. Sci. Technol.* 27:1068-1074.
- Holmes, V. F., He, J, Lee, P. K. H., and L. Alvarez-Cohen. (2006). “Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a TCE enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(9):5877-5883.
- Kane, S. R., H. R. Beller, T. C. Legler, and R. T. Anderson. 2002. Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation* 13:149–154.
- Natalie L. Cápiro, Marcio L.B. Da Silva, Brent P. Stafford, William G. Rixey, and Pedro J.J. Alvarez. (2008). “Microbial community response to a release of neat ethanol onto residual hydrocarbons in a pilot-scale aquifer tank.” *Environmental Microbiology*. Aceito para publicação.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2002). 20th Edition. American Public Health Association. Washington, DC. USA.

Zengler, K., J. Heider, R. Rossello-Mora, and F. Widdel. 1999. Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfovirdis*. Arch. Microbiol. 172:204–212.