



**Campus de São Carlos**

**Degradação anaeróbia de fenol sob  
diferentes condições nutricionais**

Sandra Imaculada Maintinguer

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Bernadete A. Varesche

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**



**ESCOLA DE ENGENHARIA  
DE SÃO CARLOS**

# DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE FENOL SOB DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço... 10 / 09 / 04

Ass.: *Sandra Imaculada Maintinguer*

**Sandra Imaculada Maintinguer**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Hidráulica e Saneamento.

DEDALUS - Acervo - EESC



31100047334

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva

São Carlos  
2004



Class.	TESE EESC
Cott.	13251
Tombo	T280/04
Sysno	1395568

Ficha catalográfica preparada pelo Serviço de Tratamento  
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

M226d

Maintinguer, Sandra Imaculada

Degradação anaeróbia de fenol sob diferentes condições  
nutricionais / Sandra Imaculada Maintinguer -- São  
Carlos, 2004.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São  
Carlos-Universidade de São Paulo, 2004.

Área: Hidráulica e Saneamento.

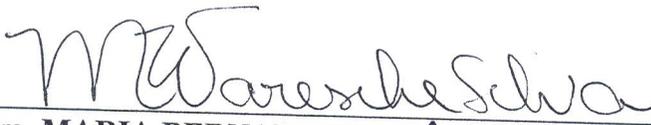
Orientador: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio  
Varesche Silva.

1. Fenol. 2. Redução de sulfato. 3. Microrganismos  
anaeróbios. 4. Extrato de levedura. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

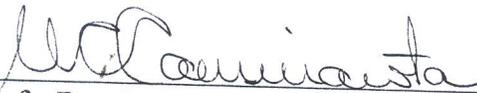
Candidata: Ecólogo SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

Dissertação defendida e julgada em 27-07-2004 perante a Comissão Julgadora:



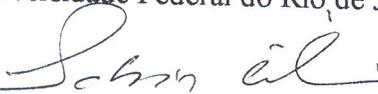
Profª. Dra. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA** (Orientadora)  
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada



Profª. Dra. **MAGALI CRISTE CAMMAROTA**  
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)

aprovada



Dra. **FÁBIO ALEXANDRE CHINAGLIA**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

aprovado



Profª. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

A JOSÉ EDUARDO, meu grande amor e  
GUILHERME HENRIQUE, razão de minha vida.

*“Cuando miro en los ojos de mi hijo yo creo en la eternidad.”*

**Pablo Neruda**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar ao meu lado em todos os momentos mostrando, mais uma vez, que a vida é recomeçar e aprender sempre.

À professora Dr<sup>a</sup> Odete Rocha por incentivar o retorno na carreira acadêmica, pela amizade, dedicação e ajuda incondicional.

Ao CNPq pela bolsa concedida, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup> Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva pela orientação, paciência, dedicação e, principalmente, por estar disponível em todos os momentos, pela grande amizade.

Aos professores Dr. Marcelo Zaiat e Dr. José Alberto Rodrigues pelas sugestões na participação das bancas de qualificação desse trabalho.

Ao Professor Dr Edson Silva e Gisele Sancinetti pelos ensinamentos nas análises de fenol.

À professora Elisabeth Mattos Moraes pelo auxílio nas análises de fenol, preparação e cálculos das demais soluções; pela amizade, carinho e paciência.

À técnica Maria Ângela Tallarico pelo auxílio nas análises de ácidos, metano e etanol. Pelo otimismo, amizade e carinho dedicados.

À técnica Heloisa Pozzi pelo apoio nas análises de microscopia, amizade e apoio em todos os momentos.

Ao amigo Sidney Silva pelos ensinamentos das rotinas de laboratório, pela paciência, apoio e carinho.

À amiga Valquiria Gusmão pela paciência, pelos conselhos no laboratório, pelos ensinamentos de biologia molecular, microbiologia e microscopia.

Ao Dr<sup>a</sup> Isabel Sakamoto pelas análises e ensinamentos em biologia molecular; por sua experiência, persistência, amizade e carinho.

À Iolanda Duarte (Tininha) pela ajuda na confecção das fotos de microscopia óptica, pelos ensinamentos de microbiologia, pela paciência e grande amizade.

Ao Dr. Fábio Chinalia pelos ensinamentos sobre microrganismos, pela didática, paciência e amizade.

À Julia pelo apoio na montagem desse trabalho no computador; pela paciência, apoio e amizade.

Ao Neyson pelos ensinamentos em informática na finalização do trabalho, companheirismo, apoio e amizade.

Ao Ariovaldo Silva pela ajuda na aplicação dos testes estatísticos, amizade e paciência.

À Dr<sup>a</sup> Dalva pela amizade e incentivo; pelos cafezinhos e companheirismo.

Aos amigos do LPB que tornaram meus momentos no laboratório mais leves e prazerosos: Betão, Arnaldo, Renato, Fernandão, Karina, Rogers, Samantha, Mercia, Dirlane, Larissa, Luana, Andréa, Márcia, Estela, Cattony, Tatiana, Cristina, Kelvin, Flavinha, Areta, Thiago, Monique, Ana Paula, Renata, Bruna.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação da EESC – Hidráulica e Saneamento: Luciana, Orlando, Denise, Ana Rosa, Hugo, Carlos, Gláucio, Alexandre Bottari, Edson, Leonardo, Daniele, Lara, pelo carinho e ensinamentos a cerca de engenharia e biologia.

Às secretárias Sá e Pavi, pela atenção e disponibilidade. À Rose pela atenção e carinho. À Dona Terezinha pela dedicação, amizade e carinho.

Ao meu primo Ronaldo pelos ensinamentos sobre microbiologia e demais técnicas de laboratório. Pelo empréstimo de livros que me ajudaram tanto.

À minha mãe e meus sogros pela ajuda nos cuidados com o Guilherme para que eu pudesse estar no laboratório e concluir esse trabalho.

Ao meu marido Eduardo que sempre me incentivou e acreditou no sucesso desse trabalho; pela paciência, amizade, amor, compreensão, cumplicidade e companheirismo.

Ao meu filho Guilherme que, com a opção pela convivência nas suas brincadeiras e compromissos escolares provocaram alguns atrasos nesse trabalho, mas certamente enriqueceram minha vida.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

**OBRIGADA!**

## Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Características químicas do fenol	4
3.2. Os fenóis e sua influência nos vegetais	5
3.3 Processos Anaeróbios de Degradação de Fenol	6
3.4. Microrganismos envolvidos na degradação de fenol	10
3.5. Degradação de fenol e as bactérias redutoras de sulfato	12
3.6. Degradação de fenol e adição de co-substratos	13
3.7. Degradação de fenol e adição de extrato de levedura	14
3.8. Degradação de fenol e análises de biologia molecular	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Fluxograma experimental	18
4.2. Ensaio de degradação de fenol	18
4.3. Enriquecimento do lodo	19
4.4. Ensaio em reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato	20
4.5. Ensaio em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e co-substratos	21
4.6. Ensaio em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura	23
4.7. Ensaio com reatores controles	25

4.8. Análises físico-químicas e cromatográficas	26
4.8.1. Determinação da Produção de Metano	26
4.8.2. Determinação de fenol	26
4.8.3. Determinação de ácidos voláteis	26
4.8.4. Determinação do Sulfato	27
4.8.5. Determinação de Sólidos	27
4.8.6. Determinação de etanol	27
4.8.7. Determinação de Lactato	27
4.9. Exame Microscópico	28
4.10. Meio de Cultura	28
4.10.1. Solução traço de metais	28
4.10.2. Solução de vitaminas	29
4.10.3. Solução estoque de sulfato	29
4.10.4. Solução estoque de fenol	30
4.10.5. Solução estoque de lactato de sódio	30
4.10.6. Solução estoque de extrato de levedura	30
4.10.7. Solução estoque de etanol	31
4.11. Caracterização microbiana através da técnica PCR DGGE	31
4.11.1. Extração dos Ácidos Nucléicos	31
4.11.2. Amplificação do gene através da reação de polimerização em cadeia - PCR	32
4.11.3. Eletroforese em gel de agarose	35
4.11.4. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante	36
4.12. Estatística dos dados experimentais	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Ensaio de enriquecimento	40

5.2. Ensaio de degradação em reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato	41
5.3. Ensaio de degradação em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e co-substratos	50
5.3.1. Ensaio com fenol	50
5.3.2. Ensaio com fenol e sulfato	52
5.3.3. Ensaio de degradação com fenol, sulfato e lactato	54
5.3.4. Ensaio de degradação com fenol, sulfato e etanol	59
5.4. Ensaio de degradação em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura	68
6. Análises de biologia molecular através de técnicas de extração de DNA (DGGE)	83
6.1. Ensaio alimentados com fenol, sulfato e co-substratos	83
6.2. Ensaio alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura	87
7. CONCLUSÕES	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

## Lista de Figuras

- Figura 3. 1 Fórmula estrutural do fenol. 4
- Figura 4. 1 Organograma das atividades experimentais. 18
- Figura 5. 1 Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência das amostras dos reatores do ensaio de enriquecimento: (a) filamentos semelhantes a *Methanosaeta* sp., (b) cocos com estrias, (c) bacilos fluorescentes e (d) cisto de sarcina. 40
- Figura 5. 2 Variação temporal da degradação de fenol e consumo de sulfato nos reatores em batelada. 41
- Figura 5. 3 Variação temporal da degradação de fenol e consumo de sulfato nos reatores em batelada. 43
- Figura 5. 4 Variação temporal da produção de metano do ensaio de degradação de fenol e sulfato. 45
- Figura 5. 5 Variação temporal da produção de metano do ensaio de degradação de fenol e sulfato. 45
- Figura 5. 6 Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência do ensaio com reatores alimentados com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l): (a) estafilococos e bacilos, (b) filamentos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e cocos, (c) filamentos (d) diplococos e bacilos. 48
- Figura 5. 7 Variação temporal da degradação de fenol nos reatores em batelada. 48
- Figura 5. 8 Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência do ensaio com reatores alimentados com fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l): (a) cocos e filamentos, (b) bacilos fluorescentes, (c) bacilos semelhantes a *Methanosaeta* sp., cocos e bacilos e (d) cocos com estrias e filamento. 49
- Figura 5. 9 Variação temporal do ensaio com reatores anaeróbios em batelada alimentados com fenol. 51
- Figura 5. 10 Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência do ensaio de degradação de fenol (329,3 mg/l): (a) bacilos de extremidades arredondadas e morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp.; (b) estafilococos, filamentos longos e filamentos septados. 51
- Figura 5. 11 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato. 52

- Figura 5. 12- Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência do ensaio de degradação com reatores alimentados com fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l): (a) diplococos, bacilos e filamentos; (b) cocos e (c) estafilococos. 54
- Figura 5. 13 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e lactato. 56
- Figura 5. 14 Variação temporal de ácidos orgânicos do ensaio de degradação com reatores alimentados com fenol, sulfato e lactato. 57
- Figura 5. 15 Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência do ensaio de degradação de fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l): (a) estafilococos, filamentos e nanobactérias; (b) cisto de sarcinas; (c) bacilos, filamentos, nanobactérias e (d) cocos (1500x). 58
- Figura 5. 16 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e etanol. 61
- Figura 5. 17 Variação temporal do consumo de etanol no ensaio com reatores alimentados com fenol, sulfato e etanol. 62
- Figura 5. 18 Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência do ensaio com reatores alimentados com fenol (332,1 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (230 mg/l): (a) estafilococos, filamentos septados e (b) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. 62
- Figura 5. 19 Variação da produção de gás metano dos ensaios com reatores alimentados com fenol sulfato e co-substratos. 64
- Figura 5. 20 Variação temporal do consumo de sulfato nos reatores alimentados com fenol e sulfato, fenol, sulfato e lactato; fenol, sulfato e etanol. 67
- Figura 5. 21 Variação temporal da degradação de fenol nos reatores alimentados com fenol, sulfato e co-substratos. 67
- Figura 5. 22 Variação temporal do consumo de fenol dos reatores em batelada alimentados com fenol e extrato de levedura. 68
- Figura 5. 23 Variação temporal do consumo de fenol e redução do sulfato dos reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura. 70
- Figura 5. 24 Variação temporal do consumo de fenol e sulfato dos reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura. 71
- Figura 5. 25 Variação temporal do consumo de fenol nos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura. 72
- Figura 5. 26 Variação temporal da redução de sulfato dos ensaios controles alimentados com sulfato e sulfato e extrato de levedura. 74

Figura 5. 27 Variação temporal da produção de metano dos reatores alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura. 77

Figura 5. 28 Variação temporal da produção de metano nos ensaios controle alimentados com sulfato e sulfato e extrato de levedura. 77

Figura 5. 29 Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência dos ensaios de degradação alimentados com Fenol (239,7 mg/l) e extrato de levedura (0,05%): (a) cocos e filamentos septados (b) morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp., bacilos com extremidades arredondados e cocos ovalados. Fenol (234,3 mg/l), sulfato (162,5 mg/l) e extrato de levedura (0,05%): (c) vibrios, morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp., cocos e bacilos com extremidades arredondadas; (d) morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp. e cocos. Fenol (256,0 mg/l), sulfato (500 mg/l) e extrato de levedura (0,05%): (e) morfologias semelhantes à *Methanosarcina* sp., (f) cocos estriados, estafilococos e bacilos retos. 81

Figura 5. 30 Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência dos ensaios controle com sulfato (170 mg/l): (a) cocos, bacilos com extremidades arredondadas e bacilos retos; (b) cocos, filamentos e morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp. Ensaios controle com sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura (0,05%): (c) estafilococos e filamentos; (d) diplococos em pares, cocos, bacilos retos e vibrios. 82

Figura 6. 1 Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e adição de co-sustratos com primers específicos para o Domínio *Archaea* (1100 FGS e 1400 R); (HS) controle positivo *Archaea* DSM668 – *Halobacterium salinarum*; (MS) controle positivo sarcinas ATCC 43241 – *Methanosarcina barkeri*; (1) fenol (329,3 mg/l); (2) fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l); (3) fenol (322,3 mg/l) sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l); (4) fenol (322,3 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,3 mg/l); (I) inóculo. % do gradiente em gel desnaturante: 35% - 55%. 84

Figura 6. 2 Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e adição de co-sustratos com primers específicos para o Domínio *Bacteria*: (DSM) controle positivo bactéria – *Allochromatium vinosan*; (P) controle positivo *Pseudomonas* sp.; (1) fenol (329,3 mg/l); (2) fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l); (3) fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l); (4) fenol (322,3 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,3 mg/l); (I) inóculo. % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 60%. 85

Figura 6. 3 Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e co-sustratos com primers específicos do grupo BRS (AGMSFGC e 907R); (DR) controle positivo *Desulfotomaculum ruminis* ATCC-23193; (1) fenol (329,3 mg/l); (2) fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l); (3) fenol (322,3 mg/l) sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l); (4) fenol (322,3 mg/l) sulfato (150 mg/l) e etanol (129,3 mg/l); (I) inóculo. % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 60%. 86

Figura 6. 4 Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e extrato de levedura com primers específicos para o Domínio *Archaea* (1100 FGS e 1400 R); (HS) controle positivo arquea DSM668 – *Halobacterium salinarum*; (MS) controle positivo sarcinas ATCC 43241 – *Methanosarcina barkeri*; (I) lodo inicial do ensaio; (1) Fenol (239,7 mg/l); (2) Fenol (234,3 mg/l) e Sulfato (162,5 mg/l); (3) Fenol (256,0 mg/l) e Sulfato (500 mg/l); (4) Sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura; (5) Sulfato (170 mg/l). % do gradiente em gel desnaturante: 35% - 55%. 89

Figura 6. 5 Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e extrato de levedura com primers específicos para o domínio Bactéria (DSM) controle positivo bactéria – *Allochromatium vinosan*; (P) controle positivo *Pseudomonas* sp.; (I) inóculo; (1) fenol (239,7 mg/l); (2) fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l); (3) fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l); (4) sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura; (5) sulfato (170 mg/l). % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 60%. 89

Figura 6. 6 Perfil das bandas de DGGE dos ensaios de degradação de fenol, sulfato e extrato de levedura e condições controles com sulfato e extrato de levedura com primers específicos do grupo BRS (AGMSFGC e 907R); (DR) controle positivo ATCC-23193 - *Desulfotomaculum ruminis*; (I) inóculo; (1) fenol (239,7 mg/l); (2) fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l); (3) fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l); (4) sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura; (5) sulfato (170 mg/l). % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 60%. 90

## Lista de Tabelas

Tabela 3. 1 Características físico-químicas do fenol.	5
Tabela 3. 2 Descrição da classe de fenóis, abrangência e efeitos em vegetais inferiores e superiores.	6
Tabela 3. 3- Composição química da célula de levedura	14
Tabela 3. 4 Composição do extrato de levedura	15
Tabela 4. 1 Composição do inóculo.	20
Tabela 4. 2 Enriquecimento do lodo.	20
Tabela 4. 3 Composição dos reatores alimentados com fenol e sulfato.	21
Tabela 4. 4 Composição do inóculo dos reatores alimentados com fenol, sulfato e co-substratos.	22
Tabela 4. 5 Composição do ensaio alimentado com fenol, sulfato e co-substratos.	23
Tabela 4. 6 Composição do inóculo dos reatores alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.	24
Tabela 4. 7 Composição do ensaio alimentado com fenol, sulfato e extrato de levedura.	24
Tabela 4. 8 Composição do inóculo dos reatores controle.	25
Tabela 4. 9 Composição dos ensaios controle.	25
Tabela 4. 10 Meio de cultura para BRS.	28
Tabela 4. 11 Solução traço de metais.	29
Tabela 4. 12 Solução de vitaminas.	30
Tabela 4. 13 Procedimento para o preparo da solução de PCR	33
Tabela 4. 14 Programação do aparelho termociclador para amplificação dos fragmentos de ácidos nucléicos para as análises de PCR.	33
Tabela 4. 15 Primers utilizados nas análises com PCR.	34
Tabela 4. 16 Descrição dos controles positivos utilizados nas análises com PCR.	34
Tabela 4. 17 Porcentagem do gel utilizada para os domínios <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> e grupo BRS.	36

Tabela 4. 18 Procedimentos para o preparo do gel em gradiente desnaturante para o volume de 100 ml.	36
Tabela 4. 19 Constituição das soluções de gel desnaturante para os domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> e o grupo das BRS.	38
Tabela 5. 1 Variação temporal do consumo de fenol e sulfato no ensaio de degradação de fenol e sulfato.	41
Tabela 5. 2 Sólidos totais voláteis determinados no início e no final dos ensaios com reatores alimentados com fenol e sulfato.	42
Tabela 5. 3 Variação temporal do consumo de fenol e sulfato no ensaio de degradação em reatores em batelada.	43
Tabela 5. 4 Variação temporal da produção de metano nos ensaios com fenol e sulfato.	44
Tabela 5. 5 Caracterização morfológica dos ensaios de enriquecimento; ensaios alimentados com fenol e sulfato.	47
Tabela 5. 6 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol.	50
Tabela 5. 7 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato.	53
Tabela 5. 8 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e lactato.	55
Tabela 5. 9 Variação temporal de lactato do ensaio de degradação com reatores alimentados com fenol, sulfato e lactato.	57
Tabela 5. 10 Sólidos totais voláteis determinados no início e no final dos ensaios com reatores alimentados com fenol e sulfato.	59
Tabela 5. 11 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e etanol.	60
Tabela 5. 12 Variação temporal do consumo de etanol no ensaio com reatores alimentados com fenol, sulfato e etanol.	61
Tabela 5. 13 Produção de gás metano nos ensaios de degradação de fenol, sulfato e co-substratos.	63
Tabela 5. 14 Caracterização morfológica dos ensaios de alimentados com fenol, sulfato e co-substratos.	65
Tabela 5. 15 Variação temporal do consumo de fenol dos reatores em batelada alimentados com fenol e extrato de levedura.	68

Tabela 5. 16	Varição temporal do consumo de fenol e redução do sulfato dos reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.	69
Tabela 5. 17	Varição temporal do consumo de fenol e sulfato dos reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.	71
Tabela 5. 18	Sólidos totais voláteis determinados no início e no final dos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.	73
Tabela 5. 19	Varição temporal da redução de sulfato dos ensaios controles alimentados com sulfato e sulfato e extrato de levedura.	74
Tabela 5. 20	Varição temporal da produção de metano nos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura e; ensaios controles com sulfato e sulfato e extrato de levedura.	76
Tabela 5. 21	Sólidos totais voláteis determinados no inicio e no final dos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.	78
Tabela 5. 22	Caracterização morfológica dos ensaios de degradação de fenol Sulfato e extrato de levedura	79

## RESUMO

MAINTINGUER, S. M. (2004). *Degradação anaeróbia de fenol sob diferentes condições nutricionais*. São Carlos – SP, 99p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A tecnologia anaeróbia tem sido utilizada com sucesso no tratamento de água residuária contendo compostos fenólicos. Recentes pesquisas incluem tais compostos entre aqueles que podem ser degradados através desse processo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a degradação do fenol em diferentes condições nutricionais, com ênfase na redução do sulfato. Os experimentos foram realizados com meio de cultura específico para esses microrganismos anaeróbios. Foram realizados ensaios de degradação em reatores em batelada alimentados nas seguintes condições: (1) fenol e sulfato, a diferentes concentrações, com inóculo previamente enriquecido; (2) fenol, sulfato e co-substratos e; (3) fenol, sulfato e extrato de levedura. Todos os ensaios foram realizados em temperatura de 30<sup>0</sup>C, sob agitação de 150 rpm. Foi avaliado o consumo de fenol e sulfato e, produção de metano, em função do tempo, para diferentes concentrações iniciais de fenol e sulfato. Nos ensaios com reatores alimentados com fenol (329,3 mg/l); fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l); fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,16 mg/l); fenol (332,1 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,76 mg/l), a remoção foi de, respectivamente, 99,8%, 98,2%, 98,8% e 98,8%. Os reatores alimentados com fenol (239,7 mg/l) obtiveram 100% de eficiência na degradação em apenas 11 dias e, os reatores alimentados com fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l) e fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l) tiveram eficiências de degradação de, respectivamente, 98,8% e 99,3% com 17 dias de operação. Tais eficiências foram obtidas pelo acréscimo de extrato de levedura nos reatores, no início dos ensaios. A caracterização morfológica foi realizada através de microscopia óptica. A diversidade microbiana referente aos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, além do grupo de bactérias redutoras de sulfato foi avaliada através da técnica de PCR DGGE, onde foram observadas alterações nas populações microbianas, em função das condições nutricionais. Para o Domínio *Archaea* não foram observadas diferenças nos ensaios realizados. Para o Domínio *Bacteria* e Grupo das BRS essas diferenças foram, mais facilmente, percebidas com relação ao inóculo e entre os diversos reatores. A alteração na diversidade microbiana pode ter sido decorrente da composição do meio que, nesse caso, foi específico para BRS e a composição do inóculo que continha parte previamente adaptada às BRS. Essas condições adequadas puderam propiciar surgimento e desenvolvimento de populações microbianas capazes de degradar fenol, utilizando sulfato.

Palavras-chave: fenol, redução de sulfato, extrato de levedura, microrganismos anaeróbios.

## ABSTRACT

MAINTINGUER, S.M. (2004). *Degradação anaeróbia de fenol sob diferentes condições nutricionais*. São Carlos – SP, 99p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The anaerobic technology has been successfully used to treat wastewater containing phenolic compounds. Recent research includes such compounds among those that can be degraded through this process. The goal of this project was to assess phenol degradation in different nutritional conditions, focusing on sulfate reduction. The essays were carried out in a specific culture mean for these kinds of anaerobic microorganisms. Degradation essays were carried out in a batch reactor fed in the following ways: (1) phenol and sulfate, in different concentrations, with previously enriched inoculum; (2) phenol, sulfate and co-substrates and; (3) phenol, sulfate and yeast extract. All the essays were carried out at 30<sup>0</sup>C, under 150 rpm agitation. The consumption of phenol and sulfate and, methane production, in function of time, for different initial concentrations of phenol and sulfate was assessed. In the essays the reactors were fed with phenol (329.3 mg/l); phenol (307.3 mg/l) and sulfate (160 mg/l); phenol (322.3 mg/l), sulfate (160 mg/l) and lactate (478.16 mg/l); phenol (332.1 mg/l), sulfate (150 mg/l) and ethanol (129.76 mg/l), the removal was of, respectively, 99.8%, 98.2%, 98.8% and 98.8%. The reactors fed with phenol (239.7 mg/l) obtained 100% degradation efficiency in only 11 days. The reactors fed with phenol (234.3 mg/l) and sulfate (162.5 mg/l) and phenol (256.0 mg/l) and sulfate (500 mg/l) obtained degradation efficiency of 98.8% and 99.3%, respectively, in only 17 days of operation. Such efficiencies were obtained by the increase of yeast extract in the reactors, in the beginning of the essays. The morphological characterization was carried out by optical microscopy. The microbial diversity regarding the *Bacteria* and *Archaea* Domain, besides the sulfate reducing bacteria group was assessed through the PCR DGGE technique, where alterations were seen in the microbial population, due to nutritional conditions. For the *Archaea* Domain, no differences were seen in all the essays. For the *Bacteria* Domain and the SRB Group these differences were easily seen, noticed by the inoculum and the diverse reactors. The alteration in the microbial diversity might have occurred due to culture mean composition that, in this case, was specific for SRB and also due to inoculum composition that contained a part previously adapted to SRB. These adequate conditions could promote appearance and development of microbial population capable of degrading phenol, using sulfate.

Keywords: phenol, sulfate reduction, yeast extract, anaerobic microorganisms.

## 1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos e seus derivados estão presentes em todo o ambiente. Raízes de plantas liberam variedade de compostos fenólicos que são denominados metabólitos secundários, incluindo 4-hidroxibenzoato e os ácidos ferúlico, comárico, vanílico, cinâmico e siríngico. Também ocorrem no ambiente como intermediários da biodegradação de polímeros naturais contendo anéis aromáticos, como lignina e taninos. Além disso, o fenol pode apresentar-se como intermediário durante a degradação de compostos xenobióticos. Neste caso, a poluição por fenol está associada à sua presença em águas residuárias provenientes de minas de carvão, refinarias de petróleo, preservação de madeira e indústrias químicas. Fenóis e seus derivados são usados na preparação de ampla variedade de compostos específicos, como antioxidantes, herbicidas, adesivos, solventes e resinas sintéticas (ZHOU & FANG, 1997).

Fenol, clorofenol e cresol, têm sido designados poluentes primários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Os fenóis são tóxicos ou letais a peixes, mesmo em concentrações muito baixas (5 mg/l a 25 mg/l). O limite permissível em efluentes industriais é de 0,5 mg/l. Níveis superiores afetam a vida aquática causando desequilíbrio ecológico no corpo receptor. É tóxico ao homem em concentrações de 13,0 mg/Kg corporal e 10,0 g no organismo é fatal (COSTA, 1994).

A Portaria nº. 36/GM de 19/01/1990, do Ministério da Saúde, classifica o fenol como substância que confere odor à água potável, principalmente após a cloração. O limite máximo permitido de fenol na água potável é de 0,1 µg/L (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1990).

O uso da tecnologia anaeróbia para tratamento de água residuária tem intensificado devido às vantagens sobre os processos aeróbios, principalmente, no consumo de energia e produção de lodo. Pesquisas recentes têm permitido incluir muitos compostos fenólicos dentre aqueles que podem ser tratados por processos anaeróbios (BOLAÑOS *et al.*, 2001).

A degradação de fenol é processo complexo envolvendo uma seqüência de passos, cada um deles executado por grupos específicos de microrganismos. De acordo com ZHOU & FANG (1997), os fenóis são primeiramente degradados por

bactérias acidogênicas em benzoato, posteriormente convertidos em acetato (bactérias acetogênicas) e, finalmente, em metano pelas arqueas metanogênicas.

A demonstração do sucesso da biorremediação para remoção de vários contaminantes orgânicos tem encorajado muitos pesquisadores a estudar o metabolismo do fenol e outros compostos aromáticos. Várias tentativas têm sido feitas para estudar ~~os~~ aspectos fisiológicos das bactérias anaeróbias presentes em resíduos de suinocultura em consórcios microbianos capazes de degradar fenol (Boopathy, 1997).

No entanto, existem questões a serem respondidas, como por exemplo, a importância do inóculo e o papel das bactérias redutoras de sulfato (BRS) na utilização desse composto. Sob tais considerações, nesse trabalho pretendeu-se avaliar a utilização de fenol por cultura enriquecida de BRS sob diferentes condições nutricionais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.OBJETIVO GERAL**

Avaliar a degradação de fenol em reatores anaeróbios em batelada sob diferentes condições nutricionais.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a degradação do fenol na presença de sulfato;
- Avaliar a degradação de fenol na presença de co-substratos;
- Avaliar a degradação do fenol na presença de extrato de levedura;
- Caracterizar morfologicamente os microrganismos presentes nos reatores anaeróbios em batelada; e
- Avaliar e comparar a diversidade da comunidade microbiana nos diferentes ensaios, utilizando técnicas de biologia molecular.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Características químicas do fenol

O fenol tem em sua molécula pelo menos um grupo OH ligado diretamente ao anel aromático (Figura 1) (HOLUM, 1994). É também conhecido como ácido carbólico, ácido fênico, ácido fenílico, hidróxido fenil, hidroxibenzeno, oxibenzeno (THE MERCK INDEX, 1996). Em geral são sólidos, pouco solúveis em água, de cheiro forte característico. São tóxicos e têm ação cáustica sobre a pele. É um ácido fraco, com constante de dissociação ( $K_a$ ) para ácidos igual a  $1,0 \times 10^{-10}$  ( $25^\circ \text{C}$ ); é mais fraco que o ácido acético, no entanto, capaz de neutralizar grupamentos  $\text{OH}^-$  (HOLUM, 1994). A Figura 3. 1 apresenta a fórmula estrutural do fenol. Algumas características físico-químicas do fenol estão apresentadas na Tabela 3. 1.

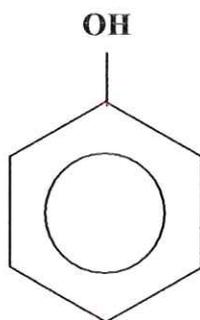


Figura 3. 1 Fórmula estrutural do fenol.

Tabela 3. 1 Características físico-químicas do fenol.

Características	Descrição
Fórmula Molecular	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O
Massa Molecular	94,11 g (C: 76,7%; H: 6,43%; O: 17%)
Densidade	1.071 g/cm <sup>3</sup>
pK <sub>a</sub> a 25 °C	10,0
Forma Física	Cristais incolores
pH solução aquosa	6,0
Solúvel	álcool, clorofórmio, éter, glicerol, dissulfeto de carbono, vaselina, ácidos voláteis e fixos, óleos voláteis e fixos e hidróxidos aquosos.
Quase insolúvel	éter de petróleo

Fonte: THE MERK INDEX (1998)

### 3.2. Os fenóis e sua influência nos vegetais

As plantas superiores como estão fixas no solo são incapazes de fugir dos predadores. Sendo assim, desenvolvem mecanismos de defesa que podem funcionar como toxinas provocando distúrbios no predador. Esses mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas são chamados metabólitos secundários. Os compostos fenólicos são classificados como metabólitos secundários (LARCHER, 2000).

Os fenóis podem apresentar-se na forma de taninos e flavonóides. Os taninos hidrolisáveis são compostos derivados do ácido gálico ou egálico. Têm propriedades antimicrobianas; são inibidores de crescimento por precipitarem proteínas existentes nos alimentos.

Os flavonóides são derivados da via metabólica do acetato e chiquimato.

A Tabela 3. 2 descreve a abrangência dos fenóis e seus efeitos em vegetais inferiores e superiores.

Tabela 3. 2 Descrição da classe de fenóis, abrangência e efeitos em vegetais inferiores e superiores.

CLASSE	ABRANGÊNCIA	EFEITO
<b>Fenóis Simples</b>	Nas folhas e no córtex, em líquens e microalgas	Antibiótico , alelopático e detergente
<b>Fenóis halogenados</b>	Algas marinhas	Amargo
<b>Flavonóides</b>	Distribuição universal	Coloração, pigmento de proteção contra raios UV, antioxidante
<b>Taninos</b>	Células do parênquima, idioplastos e líquens	Amargo, antibiótico
<b>Dibenzofurano</b>	Líquens	Antibiótico, tóxico

Fonte: Larcher, 2000.

### 3.3 Processos Anaeróbios de Degradação de Fenol

BOYD *et al.* (1983) utilizaram lodo de esgoto municipal (Jackson, Mich., EUA) de digestor anaeróbio primário para testes de degradação anaeróbia de fenol e isômeros (orto, meta e para) de clorofenol (50 mg/l), metoxifenol (50 mg/l), metilfenol (50 mg/l), cresol e nitrofenol (50 mg/l). Os reatores anaeróbios foram preparados em frascos de 2 litros, contendo no *headspace* a mistura de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90/10%), com 10% de inóculo. Dos 12 mono-fenóis substituídos examinados, somente *p*-clorofenol e *o*-cresol não foram significativamente degradados durante o período de 8 semanas de incubação. O *m*-cresol necessitou de 7 semanas para o completo desaparecimento, enquanto que os outros fenóis mono-substituídos e fenol desapareceram durante as primeiras 3 semanas de incubação. As concentrações de

todos os compostos testados não alteraram nos controles estéreis. A mineralização completa dos fenóis, com 10% de lodo foi monitorada pela produção de metano (CH<sub>4</sub>). A produção de CH<sub>4</sub> foi maior que 90% para os seguintes compostos: *o*-clorofenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-nitrofenol. Em relação a *o*-, *m*- e *p*-metoxifenóis, *p*-clorofenol e *o*-cresol, não ocorreu degradação e conseqüente produção de CH<sub>4</sub>. Outros compostos, tais como *m*-nitrofenol e *p*-nitrofenol desapareceram completamente, mas não produziram quantidade de CH<sub>4</sub> esperada. Na presença de *m*-clorofenol a produção de CH<sub>4</sub> foi observado somente após 5 a 8 semanas. Resultados similares foram observados para *m* e *p*-nitrofenol.

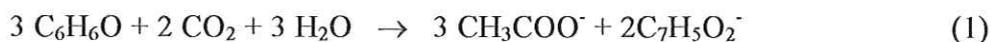
FANG *et al.* (1995) verificaram a degradação de 97% de fenol em reator UASB, com 12 horas de tempo de detenção hidráulica, à 37°C, para concentração inicial de 1260mg/l, correspondendo a 3000mg/l de DQO e taxa de carregamento orgânico de 6g DQO/l/d. Os grânulos no reator tiveram período de aclimação prolongado para desenvolver a capacidade de degradar fenol. Essa capacidade diminuiu quando os grânulos foram expostos a mudanças repentinas de carga orgânica. No entanto, o prejuízo não foi permanente e a recuperação foi gradual e prolongada. Os autores evidenciaram no grânulo, as presenças de *Syntrophus buswellii*, *Methanosaeta*, *Methanospirillum hungatei* e *Methanobrevibacter*. *Syntrophus buswellii* foi o microrganismo anaeróbio mais abundante, evidenciando que, na degradação anaeróbia, fenol foi primeiramente convertido a benzoato.

ZHOU & FANG (1997) realizaram experimentos em reator UASB, a 37°C e tempo de detenção de 24 h, por 444 dias. A água residuária continha fenol e *m*-cresol. Sacarose foi adicionada como co-substrato durante a partida do reator. Os experimentos foram conduzidos nas seguintes fases: (1) concentração de sacarose (2000 mg/l) foi diminuída com o aumento da concentração de fenol, (2) água residuária foi preparada com fenol e *m*-cresol, sem sacarose; (3) alimentação do reator com 600 mg/l de fenol e concentrações de *m*-cresol na faixa de 200 mg/l a 800 mg/l.

Na fase 2, a biomassa foi capaz de degradar 98% de fenol e 20% de *m*-cresol, para concentrações iniciais de 900 mg/l e 320mg/l, respectivamente. Para

concentrações maiores desses compostos, a atividade da biomassa foi drasticamente prejudicada. Posteriormente, os autores, diminuíram as concentrações dos compostos e, mesmo assim a biomassa não foi capaz de recuperar a degradação. Os autores verificaram que o reator UASB apresentou eficiência de remoção de fenol de 97%, com tempo de detenção de 12 horas, para concentrações de fenol de 1260 mg/l. No entanto, foi verificado que a diminuição da atividade dos grânulos foi relacionada com o aumento da concentração de *m*-cresol. Nesse caso, a água residuária continha 400 mg/l de *m*-cresol e 1100 mg/l de fenol. No experimento contínuo, as concentrações de intermediários, incluindo benzoato e ácidos graxos voláteis, estiveram presentes abaixo dos limites detectáveis (<1 mg/l). Isso pareceu sugerir que o passo limitante das degradações de fenol e de *m*-cresol foi relacionado com a acidogênese, em vez de acetogênese e subsequente metanogênese.

KARLSOON *et al.* (1999) estudaram a degradação de fenol em reatores em batelada sob condições anaeróbias estritas, em temperatura mesofílica e termofílica. O modelo de degradação de fenol foi baseado em resultados preliminares da transformação de fenol a benzoato e acetato, em reatores alimentados com ácido bromoetanossulfônico (BES). O BES foi utilizado para inibir a atividade metanogênica. O fenol foi inicialmente reduzido, formando benzoyl-CoA. A equação 1 descreve a relação estequiométrica dessa degradação.



KARLSSON *et al.* (2000) estudaram a degradação fermentativa do fenol usando cultura não metanogênica enriquecida. Essa cultura continha duas morfologias distintas de bactérias. O experimento foi montado em condições anaeróbias estritas. As culturas foram mantidas em meio contendo 470 mg/l de fenol e 200 mg/l de extrato de levedura. O fenol foi fermentado a benzoato, acetato e butirato.

BOLANOS *et al.* (2001) verificaram que reator anaeróbio horizontal de leito fixo com espuma de poliuretano pode ser usado potencialmente para o tratamento de

águas residuárias contendo fenol. Segundo os autores, a alta eficiência na remoção de fenol, cerca de 99%, o curto período de partida observado de 15 dias, com 12 horas de tempo de detenção hidráulica estiveram relacionados com a utilização de biomassa imobilizada. Ao final de cada operação, com diferentes concentrações de fenol, as biopartículas presentes nas espumas de poliuretano foram observadas para caracterização microbiana. Em todas as condições de operação ocorreram predomínio de bacilos irregulares, víbrios, bacilos e filamentos septados. Além disso, arqueas metanogênicas, semelhantes a *Methanosarcina* e bacilos fluorescentes foram observados em toda extensão do reator. Os bacilos irregulares foram, provavelmente, os microrganismos que oxidaram fenol. Esses bacilos apresentaram comportamento pleomórfico quando a concentração de fenol foi progressivamente aumentada. O víbrio não fluorescente foi relacionado com a bactéria fermentativa utilizadora de ácidos orgânicos.

A rápida aclimatação da biomassa aderida às partículas de espuma de poliuretano permitiu a estabilidade e o sucesso da operação com concentração de fenol afluente aumentando de 50 mg/l até 1200 mg/l. Os resultados indicaram a aplicação desse reator para propostas de biorremediação no tratamento de águas residuárias contendo fenol. A eficiência máxima de remoção de fenol foi concluída para a carga orgânica de 2,4g/l a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , com pH entre 7,5 a 8,0, e tempo de detenção hidráulica de 12 horas. A taxa de conversão máxima total, de 7,92 mg de fenol/g STV/h, foi observada para concentração afluente de 900 mg/l.

SARFARAZ *et al.* (2004) trabalharam com reator em batelada sequencial alimentado com água residuária contendo fenol em concentrações que variaram de 550 a 1150 mg/l. Utilizaram como inóculo lodo do tratamento de água residuária de forno de coque que foi adaptado previamente ao fenol e nitrato. Posteriormente esse lodo foi colocado no reator, já em forma de grânulos, ocupando 30% do volume total. O reator foi operado por mais de um ano. Os parâmetros estudados foram os tempos de abastecimento diferentes (ciclos) a taxas de reação e a influência das concentrações de fenol. Foram determinados DQO efluente, fenol, nitrato e nitrito durante ciclos consecutivos. Os resultados obtidos para concentrações iniciais de 1150 mg/l de fenol apresentaram remoções que ultrapassaram 80%. Foram feitas

microscopias dos grânulos formados. Observou-se presença de cocos gram-positivos e alguns bacilos gram-negativos.

#### 3.4. Microrganismos envolvidos na degradação de fenol

BISAILLON *et al* (1991) observaram consórcio anaeróbio na presença de fenol e proteose peptona, constituído por sete morfologias diferentes, tais como bacilos, cocos, coco-bacilos e filamentos. Quando a proteose peptona foi substituída por triptofano e lisina, as morfologias foram reduzidas a seis, não sendo mais observada a bactéria predominante. Após o ácido 2-bromoetanossulfônico (BES) ser adicionado ao consórcio, as cadeias longas de bacilos deixaram de ser observadas, sendo identificadas, de acordo com suas características morfológicas, como arqueas semelhantes à *Mehtanosaeeta*. A atividade carboxilante do consórcio foi afetada quando proteose peptona foi substituída por glicose, glicerol, piruvato, ácidos graxos voláteis ou bicarbonato de sódio.

LÉTOURNEAU *et al.*(1995) realizaram diferentes tratamentos para caracterizar os microrganismos e, eventualmente, facilitar o isolamento das células degradadoras de fenol. Em todos os testes, os autores usaram como inóculo, células provenientes de consórcio metanogênico. Tais organismos degradaram fenol em ácido benzóico. Sob condições aeróbias, após 20 dias de incubação, fenol não foi utilizado pelo consórcio, conseqüentemente, o crescimento não foi observado no meio sólido. As células submetidas ao tratamento com calor (80°C), ou, posteriormente, calor (80°C) e etanol, mantiveram a capacidade de degradar o fenol em condições estritamente anaeróbias. Contudo, essa degradação foi mais rápida em culturas não submetidas a esses tratamentos. Observações em microscopia óptica de células submetidas ao aquecimento durante 15 minutos, a 80°C, revelaram a presença de bacilos Gram-positivos. Nessa cultura, a produção de metano não foi detectada e ácido benzóico foi acumulado.

LÉTOURNEAU *et al.*(1995) isolaram cinco culturas com morfologias distintas, sob condições anaeróbias, utilizando inóculo aquecido a 80°C. Quatro linhagens foram identificadas dentro do gênero *Clostridium*: *C. ghonii* (linhagem1),

*C. hastiforme* (linhagens 2 e 3) e *C. glycolicum* (linhagem 5). Somente uma linhagem não foi identificada. Em todos os sub-cultivos, bactérias gram-negativas e arqueas metanogênicas não foram observadas.

Esses resultados sugeriram que as bactérias formadoras de esporos estiveram envolvidas na carboxilação do fenol e as bactérias sensíveis ao calor foram responsáveis pela degradação do ácido benzóico. A bactéria que sobreviveu a 80°C, também resistiu ao tratamento com etanol e etanol-calor (90°C). No entanto, algumas linhagens foram eliminadas por esse tratamento mais intensivo como revelado por observações macroscópicas e microscópicas.

LÉTOURNEAU *et al.* (1995), relataram que a função do *Clostridium* sp. no consórcio microbiano não pôde ser demonstrado diretamente na degradação do fenol. É possível que os microrganismos carboxilantes não cresceram no meio sólido ou cresceram mais lentamente que as cinco linhagens isoladas. Isso explicou porque as cinco linhagens não utilizaram fenol em cultura pura ou em co-cultura. Provavelmente, os microrganismos carboxilantes transformaram fenol por cometabolismo. Nesse caso, o carbono e fonte de energia foram peptona proteose ou metabólito secundário produzido por outra linhagem. No meio sólido, esse produto não pôde ser avaliado e a linhagem carboxilante não pôde crescer para formar colônia isolada. Provavelmente, os microrganismos carboxilantes sejam uma das cinco linhagens isoladas, mas, as condições próprias não foram reconstituídas para apresentar essa atividade.

CHANG *et al.* (1995) avaliaram a degradação de fenol (500mg/l), em reator UASB alimentado com meio sintético. Os grânulos eram de tamanho pequeno, variando entre 0,61 mm a 0,77mm. Análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou a predominância de *Methanosaeta* na superfície e no interior dos grânulos. A atividade metabólica específica dos grupos tróficos microbianos foi maior para hidrogênio, seguido por acetato, benzoato, fenol e propionato.

SANCINETTI *et al.* (2004) testaram reatores anaeróbios em batelada alimentados com fenol a diferentes concentrações e sulfato (2,5 mg/l) inoculados

com lodo proveniente de reator UASB do tratamento de resíduos de suinocultura. Foram obtidas degradações de fenol para concentrações de 137 mg/l em 17 dias; 185 mg/l em 24 dias; 267 mg/l em 30 dias; 355 mg/l em 36 dias e 438 mg/l em 57 dias. Quando as concentrações testadas foram de 620 mg/l o experimento foi interrompido porque, após três meses de operação, não foi observado consumo de fenol. Foram observados morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp* e predomínio de bacilos fluorescentes.

### 3.5. Degradação de fenol e as bactérias redutoras de sulfato

BOOPATHY (1995) isolou e caracterizou bactéria redutora de sulfato (BRS) de resíduos de suínos. Essa bactéria usou fenol como única fonte de carbono e energia, convertendo-o em ácido acético, na presença de sulfato (960 mg/l). Para cada mol de fenol metabolizado ocorreu produção de dois moles de ácido acético. O ácido acético não foi utilizado e a bactéria, portanto, considerada no grupo das oxidadoras incompletas. As células isoladas eram bacilos curvos, anaeróbios estritos e desulfoviridina positiva. O crescimento máximo com 47mg/l de fenol ocorreu em 48 horas, com absorvância máxima de 0,29 (densidade óptica) em 600nm. A cultura necessitou de sulfato como acceptor final de elétrons para crescimento e metabolismo do substrato. A BRS isolada cresceu com fenol e *p*-clorofenol. No entanto, não cresceu com 2,4-diclorofenol e pentaclorofenol.

BOOPATHY (1997) estudou diversos grupos de bactérias anaeróbias presentes em resíduos de suinocultura. Os experimentos foram montados para 2 consórcios distintos: bactérias redutoras de sulfato (BRS) e arqueas metanogênicas. Foram adicionados 500 mg/l de fenol como fonte de carbono nos reatores. A inibição das BRS foi feita com a adição de 799,7 mg/l de molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ). A degradação de fenol ocorreu nas culturas que receberam molibdato e decaiu até 0,94 mg/l. Nos reatores sem adição de molibdato a degradação foi insignificante comparada com o controle. Nos reatores metanogênicos a inibição foi induzida com a adição do ácido bromoetanossulfônico (BESA).

As BRS foram responsáveis pela metabolização do fenol a ácido acético e as metanogênicas pela conversão do acetato a metano e  $\text{CO}_2$ . Neste estudo ficou

demonstrado, claramente, que as BRS e as metanogênicas são as participantes mais importantes na degradação do fenol em condições anaeróbias. Também ficou evidenciado que o inóculo de suinocultura foi o passo inicial para processo de tratamento de efluentes fenólicos. //

### 3.6. Degradação de fenol e adição de co-substratos

KAR *et al.* (1996) estudaram a degradação de fenol em culturas de *Arthrobacter sp* aclimatadas a esse composto, com adição de glicose como co-substrato. Inicialmente a cultura foi inoculada para crescer em diferentes reatores com as mesmas concentrações de fenol (500 mg/l) e glicose (500 mg/l). Foram montados 3 ensaios: (1) fenol; (2) fenol e glicose; (3) glicose. A degradação no ensaio (1) ocorreu em 16 dias; no ensaio(2) em 8 dias e no ensaio (3) em 6 dias. Em ensaios novos a glicose (200 mg/l a 5000 mg/l) foi adicionada em cada reator, com a mesma concentração de fenol (500 mg/l), a diferentes intervalos de tempo, para determinar se sua adição afetaria a degradação do fenol. Os resultados indicaram que a população microbiana aclimatada apresentou preferência inicial ao fenol. A taxa de degradação de fenol foi reduzida na presença de glicose e inibida na concentração de 2000mg/l. Esses resultados indicaram que substratos não tóxicos podem afetar a biodegradação de compostos tóxicos. A aclimatação da cultura pode ser necessária para a biodegradação do substrato constituído de fenol e glicose.

TARIGHIAN *et al.* (2003) estudaram a biodegradação do 4 – clorofenol (300 mg/l usando glicose e fenol como co-substratos com cultura pura de *Pseudomonas putida*. A concentração inicial dos substratos orgânicos foi de 300 mg/l. O crescimento da biomassa e o desaparecimento dos substratos orgânicos ocorreram num período de 4 horas (3 horas com o fenol e 1 hora com a glicose). Concluiu-se que o fenol e a glicose puderam ser usados como co-substratos auxiliando assim, a biodegradação do 4-clorofenol. Foi observado também, que a glicose foi o co-substrato mais eficiente, quando comparado com o fenol, na biodegradação do 4-clorofenol.

### 3.7. Degradação de fenol e adição de extrato de levedura

A levedura começou a ser recuperada e comercializada em alimento protéico e vitamínico como extrato de levedura, extrato de levedura para consumo humano e farinha de levedura para ração.

O extrato de levedura é um produto solúvel em água que provem de células de leveduras autolisadas. Pode ser empregado no enriquecimento de grande número de meios de cultura, em trabalhos gerais de bacteriologia e em processos fermentativos, como os de produção de álcool. O processo de produção do etanol é realizado pela fermentação do açúcar pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A composição química principal da levedura é seu teor protéico que varia de 35-56% e sua excelente fonte de nitrogênio. A proteína de levedura é composta de aminoácidos essenciais. A Tabela 3. 3 descreve a composição química da célula de levedura e a Tabela 3. 4 a composição química da célula e do extrato de levedura.

Tabela 3. 3- Composição química da célula de levedura

COMPONENTES	LEVEDURAS EM GERAL	LEVEDURA CERVEJARIA
	(%)	(%)
Nitrogênio	7,5 – 9,0	-
Proteína Bruta	47,0 – 56,0	48,4
Ácido Nucléico	12,0	7,52 (ribonucléico)
Cinzas	5,0 – 9,5	8,33
Lipídios	2,0 – 6,0	3,44
Fibra solúvel	-	9,59

Fonte: [www.biobras.com.br](http://www.biobras.com.br)

BARKOVSKII *et al.* (1995) estudaram a degradação de fenol (94 mg/l) e benzoato (121 mg/l), em condições aeróbias, por *Azospirillum brasiliense* e *Azospirillum lipoferum* isolados de rizosfera de plantas. Ambas as linhagens necessitaram de extrato de levedura (0,05%) para degradar fenol e benzoato. No início do experimento a presença de fenol foi inibitória para as espécies degradadoras. O fenol não foi degradado na ausência do extrato de levedura por nenhuma das linhagens. Para a linhagem *Azospirillum ssp* a presença do extrato de

levedura mostrou ser necessária para a degradação dos compostos aromáticos. Toda linhagem *Azospirillum brasiliense* testada era fototrófica, enquanto que a linhagem *Azospirillum lipoferum* requereu somente biotina para seu crescimento. O extrato de levedura não foi utilizado pela linhagem *Azospirillum brasiliense* como fonte de aminoácidos e biotina, mas como fonte de carbono e energia.

Tabela 3. 4 Composição do extrato de levedura

CONSTITUINTE	% p/p
Umidade	29,5
Nitrogênio total	7,0
Nitrogênio amino	3,6
Cinzas	19,0
Lipídios	Traços
Carboidratos (por diferença)	7,7
Cloreto (NaCl)	11,5
Fósforo (como P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	4,1
Sódio (Na <sub>2</sub> O)	7,5
Potássio (K <sub>2</sub> O)	3,8
PH de solução 5%	5,5
Aminoácidos:	
Lisina	3,5
Triptofano	0,6
Fenilalanina	2,1
Metionina	0,9
Teonina	2,5
Leucina	3,5
Isoleucina	2,8
Valina	2,6

Fonte: Solomons G.L.

Foi verificado que a presença de fontes alternativas de carbono e energia não foram requeridas para meio de crescimento de bactérias degradadoras de fenóis simples. Mas a presença do extrato de levedura pareceu ser necessária para a degradação de compostos aromáticos pela linhagem *Azospirillum ssp.* Na presença de extrato de levedura tanto benzoato como fenol foram degradados por essa linhagem.

Os fenóis não foram usados como única fonte de carbono e energia e não tiveram efeito significativo no crescimento na presença de extrato de levedura. A fraca estimulação do crescimento por fenóis na presença de extrato de levedura, provavelmente, foi um resultado da incapacidade de *Azospirillum ssp.* em usar fenóis como substrato de crescimento, na ausência de outros compostos mais facilmente utilizáveis. Como para o benzoato foi observada estimulação no crescimento, a degradação de fenóis na presença de extrato de levedura pareceu representar um co-metabolismo.

O tempo necessário da remoção total de fenol ou benzoato variou de linhagem para linhagem no intervalo de 2 a 7 dias.

### **3.8. Degradação de fenol e análises de biologia molecular**

van SCHIE & YOUNG (1998), isolaram três microrganismos redutores de nitrato capazes de usar fenol como fonte de carbono. Os autores utilizaram inóculo proveniente de três ambientes, em função, principalmente, das diferenças entre eles, baseados nas propriedades fisiológicas e metabólicas. A cultura pura desnitrificante foi proveniente do enriquecimento de sedimento anaeróbico do Rio Leste (NY), bosque de laranjas (Flórida) e floresta alagada (Costa Rica). A análise da seqüência de DNAr 16S indicou similaridade com *Azoarcus sp.*

KINIGHT *et al.* (1999) trabalharam com consórcio microbiano enriquecido sob condições sulfetogênicas. Foi utilizado sedimento estuarino como inóculo. Fenol (17,1 mg/l) ou 2-bromo-fenol (20 mg/l) foi adicionado, inicialmente, como fontes de carbono. O 2-bromo-fenol foi degradado, inicialmente, para fenol na ausência de sulfato. Com a adição de sulfato a de-halogenação do 2-bromo-fenol não ocorreu. A degradação do fenol (17,1 mg/l) ocorreu em 5 dias na presença de sulfato 480 mg/l) e

inibida pela adição de molibdato ( 479,8 mg/l); inibidor específico da redução do sulfato. O consórcio foi mantido, durante o período de três anos, com diluições em série, em meio fresco. Foram aplicadas técnicas de PCR/DGGE para caracterizar os microrganismos presentes. Na degradação do 2-bromo-fenol foram identificados por análises filogenéticas e microscópicas *Desulfitobacterium* e *Desulfomonile*. Na degradação do fenol foram identificados *Thiomicrospira denitrificans* e *Anaeroflexus maritimus*.

SHONODA *et al.* (2000) estudaram duas bactérias denitrificantes que degradaram fenol (94 mg/l): *Azoarcus sp* linhagem CC-11 e espiroqueta linhagem CC-26, onde foram isoladas da mesma cultura enriquecida após o período de 1 a 3 anos de incubação. Ambas as linhagens necessitaram do íon ferro para crescer, mas a linhagem CC-26 cresceu melhor sob essa condição limitante. A linhagem CC-26 cresceu em fenol, benzoato e outros compostos sob condições denitrificantes.

Foram feitas análises filogenéticas da seqüência do DNA 16S da linhagem CC-26 e revelou ser mais parecida com *Magnetospirillum sp*, um membro da sub-classe alfa da classe Proteobactéria. Essa é a primeira linhagem de bactéria desse grupo que degrada compostos aromáticos. Seu crescimento ocorreu na presença de fenol somente em condições denitrificantes.

KLEIKEMPER *et al.* (2002) quantificaram os microrganismos redutores de sulfato em aquífero contaminado por hidrocarbonetos de petróleo através das técnicas de FISH e PCR/DGGE. Relatarem o consumo de sulfato e fontes de carbono adicionadas na presença de BRS. Foram adicionadas soluções anóxicas contendo brometo como solução traço, sulfato e propionato. No monitoramento foram utilizados butirato, lactato ou acetato como fontes de carbono. Os resultados do FISH revelaram que a atividade microbiana aumentou com a adição de sulfato e fontes de carbono. No entanto, o perfil do DGGE indicou que não houve alteração na estrutura das espécies microbianas dominantes. A combinação dos métodos de análises físico-químicas e Biologia Molecular complementou e demonstrou as atividades das BRS no aquífero contaminado. As BRS vindas desse ambiente foram capazes de usar uma variedade de fontes de carbono.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Fluxograma experimental

Os experimentos foram divididos em três fases: (1) enriquecimento do lodo e montagem de ensaios em reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato ; (2) ensaios em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e co-substratos; (3) ensaios em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura. A Figura 4. 1 ilustra as atividades experimentais.

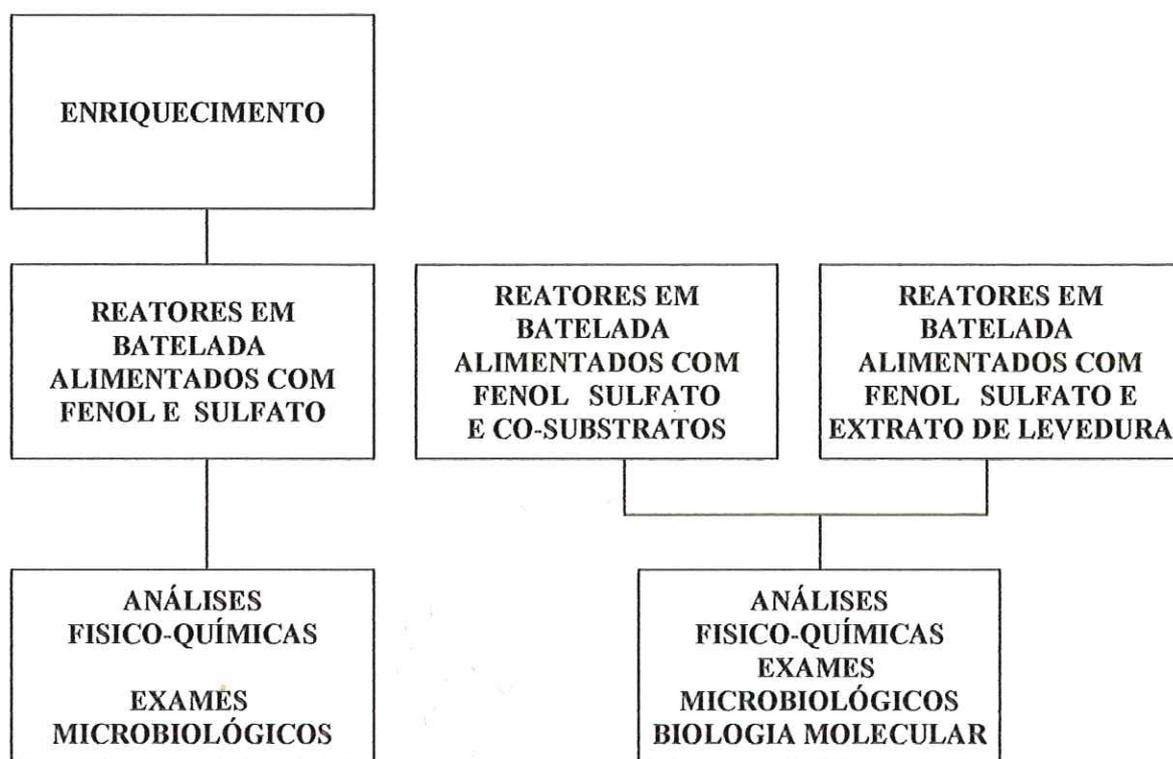


Figura 4. 1 Organograma das atividades experimentais.

### 4.2. Ensaios de degradação de fenol

Sob condições de assepsia, frasco de Duran de 2000 ml, em triplicata, contendo meio de cultura estéril foi submetido à atmosfera de nitrogênio (100%), durante 20 minutos. Posteriormente, ainda sob atmosfera de nitrogênio, soluções que compuseram os ensaios foram adicionadas ao meio, com auxílio de pipetas

automáticas, com ponteiras esterilizadas.. No enriquecimento do lodo, os reatores anaeróbios foram mantidos com volume final de reação de 1000 ml e *headspace* de 1000 ml. Na montagem dos reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato, os volumes finais de reação foram de 1300 ml e *headspace* de 700ml. Na montagem dos reatores com fenol, sulfato e co-substratos e; reatores com fenol, sulfato e extrato de levedura foram utilizados 1200mL de volume final de reação e *headspace* de 800mL em cada reator. Essa alteração foi necessária para que houvesse possibilidade de maior número de amostragens sem afetar a estabilidade dos reatores. Após a distribuição das soluções, os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica. Nesta fase, os reatores foram mantidos em agitação de 150 rpm (DOMINGUES, 2001) e temperatura de 30°C.

Foi utilizado 30% (v/v) de inóculo proveniente do lodo granulado de reator UASB no enriquecimento e nos ensaios de degradação de fenol e sulfato; enquanto nos ensaios de degradação de fenol, sulfato e co-substratos e fenol sulfato e extrato de levedura foram utilizados 20% (v/v). O lodo granulado foi homogeneizado em liquidificador caseiro e posteriormente adicionado no reator anaeróbio. Foi determinada a concentração inicial e final de sólidos totais voláteis (STV) (Standards Methods, 1998) em cada reator anaeróbio.

Foram utilizados fenol e sulfato como fontes de carbono e enxofre, respectivamente. Em todos os ensaios realizados foram avaliadas as concentrações desses compostos, mantendo aproximadamente a relação de 1,5:1 (fenol:sulfato).

#### 4.3. Enriquecimento do lodo

Na realização dos ensaios de degradação de fenol com consumo de sulfato foi usado, como inóculo, lodo granulado de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de suinocultura e de abatedouro de aves. As proporções estão descritas na Tabela 4. 1.

Primeiramente, o lodo foi enriquecido e mantido em reatores em batelada, em triplicata, com 2000 ml de volume total de reação sendo; 1000 ml de volume líquido e 1000 ml de *headspace* preenchido com N<sub>2</sub> (100%), mantidos sob agitação de 150 rpm e 30 °C, conforme descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4. 1 Composição do inoculo.

Composição	Quantidade (%)
Lodo de reator UASB de Suinocultura	70
Lodo de reator UASB de abatedouro de aves	30
Total	100

Tabela 4. 2 Enriquecimento do lodo.

Composição	Quantidade (ml)
Atmosfera Gasosa	N <sub>2</sub> (100%)
Meio de cultura para BRS	73
Acetato de zinco (20 mM)	10
Lactato de sódio (10 mM)	5
Glicose (10 mM)	10
Etanol (10mM)	5
Metanol (10 mM)	10
Sulfato de Sódio (195 mg/l)	2,0
Extrato de levedura (0,01%)	10
Inóculo (30%)	300
Volume Total	1000

#### 4.4. Ensaios em reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato

Foram realizados dois ensaios de degradação. Todos os ensaios foram realizados em reatores anaeróbios em batelada, em duplicata, mantidos sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30° C.

Foi utilizado como inóculo 30% do volume do ensaio de enriquecimento. O ensaio com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l) foi encerrado quando a concentração de fenol não foi mais detectada. A partir daí 50% do volume desses reatores foi utilizado como inóculo para ensaio de fenol a 300 mg/l. Quando a concentração de fenol foi zerada 50% do volume desse reator foi utilizado como inóculo para o ensaio de fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283 mg/l).

Esse procedimento teve o objetivo de aclimatar os microrganismos ao fenol e, com isso, obter maior eficiência na remoção desse composto.

Os ensaios foram montados com as seguintes concentrações de fenol e sulfato, em mg/l: (1) 64,2 e 46,3 e; (2) 469,9 e 283,0, respectivamente, como apresentados na Tabela 4. 3. No ensaio (2) foi adicionado extrato de levedura na concentração 0,03%, com 101 dias de operação.

**Tabela 4. 3 Composição dos reatores alimentados com fenol e sulfato.**

<b>Composição</b>	<b>Fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l) ml</b>	<b>Fenol(469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l) ml</b>
Atmosfera Gasosa	N <sub>2</sub> (100%)	N <sub>2</sub> (100%)
Meio de Cultura (BRS)	60	60
Solução de Vitaminas	13	13
Sulfato de Sódio	0,9	4,5
Fenol	9	55,8
Solução Traço de Metais	13	13
Água Milli Q	814,1	503,94
Inóculo (30%)	390	650
Volume Total	1300	1300

#### **4.5. Ensaios em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e co-substratos**

Foram realizados quatro ensaios de degradação. Todos os ensaios foram realizados em reatores anaeróbios em batelada, em duplicata, mantidos sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30° C.

Nesta fase foi utilizado como inóculo o lodo granulado proveniente de reatores UASB utilizado no tratamento de água residuária de suinocultura, de abatedouro de aves e lodo enriquecido com BRS (Bactérias Redutoras do íon Sulfato), proveniente de abatedouro de aves (Tabela 4. 4).

**Tabela 4. 4 Composição do inóculo dos reatores alimentados com fenol, sulfato e co-substratos.**

<b>Composição</b>	<b>Quantidade ( %)</b>
Suinocultura	50
Avicultura	15
Lodo enriquecido com BRS	35
<b>Total</b>	<b>100</b>

Foram montados quatro ensaios em condições distintas; porém com a mesma composição do inóculo (20% do volume total do reator). Em todos os ensaios manteve-se a concentração de fenol em; aproximadamente 300 mg/l, conforme descrito a seguir:

- (1) 329,3 mg/l de fenol
- (2) 307,3 mg/l de fenol e 160 mg/l de sulfato.
- (3) 322,3 mg/l de fenol, 160 mg/l de sulfato e 478,2 mg/l de lactato
- (4) 332,1 mg/l de fenol, 150 mg/l de sulfato e 129,8 mg/l de etanol.

Esses ensaios estiveram em operação durante o período de 51 dias.

Nos ensaios que continham sulfato novas injeções foram feitas, sempre nas concentrações próximas de 195 mg/l, quando sua concentração era zerada, no decorrer do tempo. Esse procedimento objetivou manter sulfato disponível como fonte de enxofre.

Em todos os ensaios, decorridos 30 dias, foi adicionado extrato de levedura na concentração final de 0,03%. No reator alimentado com fenol, sulfato e lactato foi efetuada nova injeção de lactato nesse mesmo período.

A Tabela 4. 5 descreve, respectivamente, a composição dos ensaios com: (1) fenol; (2) fenol e sulfato; (3) fenol sulfato e lactato e; (4) fenol , sulfato e etanol.

Tabela 4. 5 Composição do ensaio alimentado com fenol, sulfato e co-substratos.

Composição	Fenol ( 329,3 mg/l)  ml	Fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l).  ml	Fenol (322,3mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l) ml	Fenol (322,1mg/l) Sulfato (150 mg/l) e etanol (129,8 mg/l) ml
Atmosfera Gasosa	N <sub>2</sub> (100%)	N <sub>2</sub> (100%)	N <sub>2</sub> (100%)	N <sub>2</sub> (100%)
Meio de Cultura (BRS)	55,4	55,4	55,4	55,4
Solução de Vitaminas	12	12	12	12
Fenol	31	31	31	31
Solução traço de metais	12	12	12	12
Etanol	-	-	-	3
Lactato	-	-	3	-
Sulfato	-	1,85	1,85	1,85
Água Milli Q	849,6	849,6	849,6	849,6
Inóculo (20%)	240	240	240	240
Volume total	1200	1200	1200	1200

#### 4.6. Ensaio em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura

Foram realizados três ensaios de degradação. Todos os ensaios foram realizados em reatores anaeróbios em batelada, em duplicata, mantidos sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30° C.

Nesta fase foi utilizado como inóculo o lodo proveniente de reatores UASB provenientes de água residuária de suinocultura, de abatedouro de aves e lodo enriquecido com BRS (Bactérias Redutoras do íon Sulfato) proveniente de reator UASB de água residuária de abatedouro de aves (Tabela 4. 6).

**Tabela 4. 6 Composição do inóculo dos reatores alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.**

<b>Composição</b>	<b>Quantidade ( %)</b>
Suinocultura	50
Avicultura	25
Lodo enriquecido com BRS (avicultura)	25
<b>Total</b>	<b>100</b>

A concentração de fenol utilizada foi de, aproximadamente, 250 mg/l.. Dois ensaios foram montados com sulfato em concentrações de 162,5 mg/l e 500 mg/l., respectivamente. A Tabela 4. 7 descreve, respectivamente, a composição dos ensaios com: (1) fenol (239,7 mg/l); (2) fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l); (3) fenol (256 mg/l) e sulfato (500 mg/l) e; (4) Sulfato(200 mg/l). Todos os ensaios foram montados com adição de extrato de levedura 0,05%.

**Tabela 4. 7 Composição do ensaio alimentado com fenol, sulfato e extrato de levedura.**

<b>Composição</b>	<b>Fenol (239,7mg/l) ml</b>	<b>Fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l) ml</b>	<b>Fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l) ml</b>
Atmosfera Gasosa	N <sub>2</sub> (100%)	N <sub>2</sub> (100%)	N <sub>2</sub> (100%)
Meio de Cultura (BRS)	60	60	60
Solução de Vitaminas	13	13	13
Solução Traço de Metais	13	13	13
Fenol	39	39	39
Sulfato	-	2,7	8,1
Extrato de Levedura (0,05%)	6,5	6,5	6,5
Água Milli Q	908,50	905,8	900,40
Inóculo (20%)	260	260	260
Volume total	1300	1300	1300

#### 4.7. Ensaios com reatores controles

Foram realizados dois ensaios controles. Os reatores anaeróbios em batelada, em duplicata, foram mantidos sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C.

Nesta fase foi utilizado como inóculo o lodo proveniente de reatores UASB de suinocultura, avicultura e lodo enriquecido com BRS (Bactérias Redutoras do íon Sulfato) (Tabela 4. 8).

**Tabela 4. 8 Composição do inóculo dos reatores controle.**

<b>Composição</b>	<b>Quantidade ( %)</b>
Suinocultura	50
Avicultura	25
Lodo enriquecido com BRS (avicultura)	25
<b>Total</b>	<b>100</b>

A Tabela 4. 9 descreve a composição dos ensaios controle alimentados com Sulfato (170 mg/l) e; Sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura (0,05%).

**Tabela 4. 9 Composição dos ensaios controle.**

<b>Composição</b>	<b>Sulfato ( 170 mg/l)</b>	<b>Sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura (0,05%)</b>
	<b>ml</b>	<b>ml</b>
Atmosfera Gasosa	N <sub>2</sub> (100%)	N <sub>2</sub> (100%)
Meio de Cultura (BRS)	60	60
Solução de Vitaminas	13	13
Solução Traço de Metais	13	13
Sulfato	2,7	2,7
Extrato de levedura (0,05%)	-	6,5
Água Milli Q	950	944,8
Inóculo (20%)	260	260
<b>Volume total</b>	<b>1300</b>	<b>1300</b>

Todos ensaios de degradação foram montados em reatores em batelada em duplicata. Os resultados apresentados das análises efetuadas foram as médias aritméticas das duplicatas dos ensaios.

#### **4.8. Análises físico-químicas e cromatográficas**

##### **4.8.1. Determinação da produção de metano**

Foram feitas determinações da produção de metano por cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo a gás, Gow-Mac série 150. A coluna utilizada foi Porapak-Q (comprimento de 2 metros e diâmetro interno de ¼" – 80 a 100 mesh), detector de condutividade térmica. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio super seco (White Martins), e o integrador HP 3396 série II. As condições de operação dos aparelhos foram: vazão do gás de arraste de 60 ml/min; temperatura do detector, coluna e injetor, 55°C; corrente 150 mA; volume de injeção de 500 µl. Os reatores foram despressurizados antes das análises. Os valores foram expressos em mg/l. Essa conversão foi efetuada para que fosse possível comparar com as concentrações de fenol adicionadas, que também foram expressas em mg/l.

##### **4.8.2. Determinação de fenol**

A determinação de fenol foi avaliada através do Método Colorimétrico da 4-Amino-Antipirina de acordo com a metodologia descrita pela CETESB (1990).

##### **4.8.3. Determinação de ácidos voláteis**

A produção de ácidos voláteis foi determinada através de cromatografia líquida, no cromatógrafo HP 6890/FID de ionização de chama, com coluna HP INNOWAX, 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm de espessura do filme, com fluxo de hidrogênio como gás de arraste de 20 ml/min, com temperatura de 250°C, com volume de injeção de 10 µl, temperatura do forno de 100 °C (3 minutos) a 180 °C (5 minutos), 5 °C/min, temperatura do detector de 300 °C, com fluxo de ar sintético de 300 ml/min, com fluxo de nitrogênio como gás auxiliar a 33 ml/min e fluxo de hidrogênio a 30 ml/min.

#### 4.8.4. Determinação do Sulfato

A determinação do consumo de sulfato foi realizada através de método espectrofotométrico, em amostras diluídas utilizando *kit* Hach SULFAVER ACCUBVAC de acordo com Standard Methods (1998). O cloreto de bário, presente nos frascos do *kit*, faz com que o íon sulfato se precipite em meio ácido. A leitura da absorbância foi feita a 450 nm. Foram utilizadas amostras de branco com amostra filtrada, sem precipitação do cloreto de bário, para zerar o equipamento.

#### 4.8.5. Determinação de Sólidos

As determinações de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) foram realizadas segundo métodos descritos pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

#### 4.8.6. Determinação de etanol

A análise de etanol foi feita através de metodologia desenvolvida no LPB – SHS – EESC – USP, por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama, utilizando a técnica de “headspace” estático (frascos lacrados, com volumes idênticos, 2 ml de amostra junto com n-propanol como padrão interno e aquecidos em água fervente por 10 minutos), em coluna INNOWAX, de 30m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme, em cromatógrafo HP6790. A temperatura do injetor foi de 250°C, pressão a 70°C de 10,0 psi, detector a 300°C, fluxo de hidrogênio no detector de 30ml/min., fluxo de ar sintético de 300ml/min. A temperatura do forno foi de 70°C por 3 minutos e, a seguir, a 5°C/min. até 90°C, com “post run” de 200°C, em 3 minutos.

#### 4.8.7. Determinação de Lactato

A determinação de lactato foi efetuada através de análise de ácidos voláteis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Utilizou-se a metodologia desenvolvida no LPB, com coluna Aminex HPX-87H, de 300 x 7,8mm e solução de ácido sulfúrico 0,005M como eluente, fluxo de 0,5 mL/min. e forno a 45°C, em sistema Shimadzu, com detector de Ultra Violeta,  $\lambda = 205\text{nm}$ .

#### 4.9. Exame Microscópico

Foram feitos exames microscópicos das amostras dos reatores, através de luz comum, contraste de fase e fluorescência em microscópio Olympus BX60-FLA. As imagens foram captadas através da câmera Optronics e software *Image Pro-Plus* versão 3.0.1, sendo possível observar e registrar o microrganismo presente na amostra (DOMINGUES, 2001).

#### 4.10. Meio de Cultura

Foi utilizado o meio descrito por BALCH & WOLFE (1976) para favorecer o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) proveniente do lodo granulado.

A Tabela 4. 10 descreve os componentes utilizados na preparação do meio de cultura.

Tabela 4. 10 Meio de cultura para BRS.

Componentes	Quantidades
KCl	2,1mM
NH <sub>4</sub> Cl	3,8 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,61 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,45 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,85 mM
NaCl	0,60 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,1 mM
Solução traço	10mL
Água Milli-Q	990,0mL
pH	6,8

Fonte: BALCH & WOLFE (1976)

##### 4.10.1. Solução traço de metais

A Tabela 4. 11 descreve os componentes da solução traço de metais que foi utilizada na preparação do meio de cultura descrito anteriormente.

#### 4.10.2. Solução de vitaminas

Na Tabela 4. 12, encontra-se descrita a solução de vitaminas para BRS (WIDDEL & PFENNIG, 1984). Foi preparada através da dissolução dos componentes e esterilizada através do processo de filtração pelo sistema Millipore, com membrana de 0,22 $\mu$ m de porosidade, sob condições assépticas. A solução foi distribuída em frascos de Duran, envolvidos em papel alumínio, fechados com tampa de butila e rosca plástica, armazenada sob refrigeração a 4° C no escuro.

Tabela 4. 11 Solução traço de metais.

Componentes	Quantidades
HCl (25%; 7.7M)	10,0 ml
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,50 g
— ZnCl <sub>2</sub>	70,0 mg
— MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	100,0 mg
— H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,0 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	190,0 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0 mg
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	24,0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	36,0 mg
Água Milli-Q	990 ml

Fonte: WIDDEL & PFENNIG (1984).

#### 4.10.3. Solução estoque de sulfato

O sulfato de sódio foi utilizado como fonte de enxofre para o crescimento das bactérias redutoras do íon sulfato. A preparação foi feita através da dissolução do sulfato de sódio em água Milli-Q. A esterilização foi feita em autoclave a temperatura de 120°C, 1atm, durante 20 minutos. A armazenagem foi feita em frascos de antibiótico, fechados com tampa de butila e lacrados com selos de alumínio. A solução estoque foi mantida sob temperatura ambiente e ausência de luz.

Tabela 4. 12 Solução de vitaminas.

Componentes	Quantidades
Biotina	2,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Piridoxina-HCl	10,0 mg
Tiamina-HCl.2H <sub>2</sub> O	5,0 mg
Riboflavina	5,0 mg
Ácido nicotínico	5,0 mg
D-pantotenato de cálcio	5,0 mg
Vitamina B <sub>12</sub>	0,1 mg
Ácido p-aminobenzóico	5,0 mg
Ácido lipóico	5,0 mg
Água Milli-Q	1000 ml

Fonte: WIDDEL & PFENNIG (1984).

#### 4.10.4. Solução estoque de fenol

A solução de fenol foi preparada de acordo com a metodologia descrita por SILVA (1995). Essa solução foi utilizada como fonte de carbono e doador de elétrons para as bactérias anaeróbias.

#### 4.10.5. Solução estoque de lactato de sódio

A solução de lactato de sódio foi preparada através da reação de neutralização das soluções de ácido láctico 4M e hidróxido de sódio 4M. O pH foi ajustado em 9,8 utilizando solução de hidróxido de sódio 4M. A solução foi armazenada em frascos de antibiótico, sob atmosfera de nitrogênio (100%), autoclavada a 120°C, a 1 atm, por 20 minutos, e armazenada em temperatura ambiente e ausência de luz.

#### 4.10.6. Solução estoque de extrato de levedura

A solução foi preparada através da dissolução de extrato de levedura (10% p/v) em água Milli-Q, sob fluxo de nitrogênio (100%) durante 20 minutos. As soluções foram distribuídas em frascos de antibióticos, sob fluxo de gás, fechados com tampa de butila e lacrados com selo de alumínio. Os frascos foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C e 1 atm, armazenados em temperatura ambiente, na ausência de luz.

#### 4.10.7. Solução estoque de etanol

A água Milli-Q e álcool foram armazenados separadamente em frascos de antibiótico, fechados com tampa de butila e lacrados com selos de alumínio, autoclavados a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. A solução de etanol foi adicionada à água, após o resfriamento, com auxílio de seringa estéril lavada com nitrogênio (100%), até atingir a concentração desejada. Os frascos foram armazenados em temperatura ambiente e ausência de luz.

#### 4.11. Caracterização microbiana através da técnica PCR DGGE

Foram feitas análises de Biologia Molecular nos ensaios alimentados com: fenol, sulfato e co-substratos e; fenol, sulfato e extrato de levedura.

A avaliação da diversidade da comunidade microbiana foi realizada através da técnica do PCR/DGGE. O DNA foi extraído segundo o protocolo de Griffiths et al. (2000), Na amplificação dos fragmentos do DNA foram utilizados “primers” específicos do Domínio *Bacteria* (Nielsen *et al.*, 1999), Domínio *Archaea* (Kudo *et al.*, 1997) e e do grupo das BRS (Nakagawa *et al.*, 2001). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE.

##### 4.11.1. Extração dos Ácidos Nucleicos

A extração de DNA das amostras foi feita segundo o protocolo Griffiths *et al.* (2000), conforme descrito:

- Adicionar 0,5 g de amostra em tubos de 15 ml contendo 0,5 g de “glass beads”:
- Adicionar 1 ml de mistura tampão de fenol equilibrado com Tris, clorofórmio, álcool isoamílico (25:24:1) e 1 ml de tampão PBS 1 X;
- Agitar as amostras no vortex por 1 minuto e manter em gelo;
- Centrifugar a 6000 rpm a temperatura de 4°C;
- Transferir 1 ml do sobrenadante (DNA ) para um tubo de 2ml (se a amostra estiver suja deve-se adicionar 500 µl de mistura tampão de fenol) ;
- Homogeneizar em vortex e manteve-se em gelo;
- Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos a temperatura de 4°C;

- Transferir 400 µl do sobrenadante para outro frasco;
- Adicionar 400 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
- Homogeneizar em vortex para formar emulsão e centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos;
- Transferir 200 µl do sobrenadante para outro frasco e adicionar o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
- Homogeneizar em vortex para formar emulsão e centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos;
- Transferir 100 µl do sobrenadante para um outro eppendorf e adicionar 2,5 volumes de etanol 100% para precipitar o DNA;
- Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos;
- Descartar a solução de etanol 100% gelada, com muito cuidado, para não descolar o pellet de DNA;
- Adicionar 1 ml da solução de etanol 70% (v/v) gelada e inverter gentilmente;
- Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos;
- Deixar secar em temperatura ambiente;
- O pellet do DNA será dissolvido com 50 µl-100 µl de água milli-Q estéril ou tampão TE. Guardar o produto na geladeira a 4,0°C.

As soluções PBS, TAE foram preparadas segundo SAMBROOK *et al.* (1989).

#### 4.11.2. Amplificação do gene através da reação de polimerização em cadeia - PCR

A partir do DNA extraído da amostra foram obtidos fragmentos DNAr 16S, utilizando a técnica da amplificação através da reação de polimerização em cadeia (PCR) com *primers* homólogos às regiões conservadas do gene RNAr 16S.

A amplificação foi feita com *primers* específicos para os domínios: *Archaea*, *Bacteria* e para o grupo das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).

O procedimento para a amplificação dos ácidos nucléicos será apresentado a seguir.

A Tabela 4. 13 descreve o procedimento para o preparo da solução para PCR de uma amostra a ser analisada.

Tabela 4. 13 Procedimento para o preparo da solução de PCR

n° de Amostras	H <sub>2</sub> O Milli Q	10 x Tampão PCR	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	dNTP (2 mM)	Primer forward (100 pmol/l)	Primer reverse (100 pmol/l)	Ampli Taq Gold Kit (5U/μl)	Template
1	36 μl	5 μl	1,5 μl	5μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	1μ

A Tabela 4. 14 descreve as condições de amplificação para os domínios *Archaea*, *Bacteria* e grupo das BRS.

Tabela 4. 14 Programação do aparelho termociclador para amplificação dos fragmentos de ácidos nucléicos para as análises de PCR.

Microrganismos	n° de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da Extensão	Resfriamento
Domínio <i>Archaea</i>	35	94°C 1,30 minutos	94°C 0,30 minutos	55°C 0,30 minutos	72°C 1,30 minutos	94°C 3,0 minutos	4°C
Domínio <i>Bacteria</i>	35	94°C 5 minutos	94°C 45 segundos	38°C 45 segundos	72°C 1 minuto	72°C 5 minutos	4°C
Grupo BRS	10	94 °C	94°C 1,30 minutos	62°C 1 minuto	72°C 1,30 minutos	-	-
	25	94 °C	94°C 1,30 minutos	57°C 1 minuto	72°C 1,30 minutos	72°C 5 minutos	4°C

A Tabela 4. 15 descreve os *primers* dos domínios *Archaea* e *Bacteria* e do grupo das BRS utilizados nas análises de PCR.

A Tabela 4. 16 descreve os controles positivos utilizados nas análises com PCR para *Archaea*, *Bacteria* e grupo das BRS.

Tabela 4. 15 *Primers* utilizados nas análises com PCR.

<b>Microrganismos</b>	<b>Primers e seqüência (5' → 3')</b>	<b>Fonte</b>
<b>Domínio Archaea</b>	<b>1100 FGC</b> (5'- AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG-3')-	Kudo <i>et al</i> (1997)
	<b>1400 R</b> (5'- CGC CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC-3')	
	<b>GC clamp</b> (5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG-3')	
<b>Domínio Bacteria</b>	<b>968 FGC</b> (5'- AACGCGAAGA ACCTTAC – 3')	Nielsen <i>et al</i> (1999)
	<b>1392 R</b> (5'- AACG GGC GGT GTG TAC – 3')	
	<b>GC clamp</b> (5'- CGC CCG CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG – 3')	
<b>Grupo BRS</b>	<b>GMSFGC</b> (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')	Nakagawa <i>et al</i> (2001)
	<b>907R</b> (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3')	
	<b>CG clamp</b> (5'-CCG CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC -3')	

Tabela 4. 16 Descrição dos controles positivos utilizados nas análises com PCR.

<b>Microrganismos</b>	<b>Controle Positivo</b>
Domínio <i>Archaea</i>	DSM 668 – HS – <i>Halobacterium salinarum</i> ATCC 43241 – <i>Methanosarcina barkeri</i>
Domínio <i>Bacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp DSM 183 - <i>Allochromatium vinosum</i>
Grupo BRS	ATCC 23193 – <i>Desulfotomaculum ruminis</i>

#### 4.11.3. Eletroforese em gel de agarose

A agarose em gel eletroforético é utilizada para avaliar o produto resultante da extração dos ácidos nucleicos e da amplificação dos genes por PCR.

O procedimento para a avaliação da extração dos ácidos nucleicos e da amplificação do PCR é o mesmo; a única diferença está na concentração de agarose e no marcador.

Para a extração dos ácidos nucleicos utilizou-se a concentração de agarose de 1% e o marcador foi o High DNA Mass Ladder. Para verificar o produto da amplificação por PCR utilizou-se 1,5% de concentração de agarose e o marcador foi Low DNA Mass Ladder.

O protocolo para a preparação dessa etapa está descrito a seguir:

- Preparar soluções 1% ou 1,5% de agarose e adicionar solução TAE 1 X;
- Preparar “bandeja” colocando-se fita crepe dos lados;
- Despejar o gel na “bandeja” e, em seguida, colocar os pentes para formar as cavidades (poços);
- Aguardar o gel solidificar por, aproximadamente, 30 minutos;
- Retirar os pentes e a fita crepe que protege os lados;
- Recortar um pedaço de para-filme e adicionar (fazer pontos) 2 µl de corante “loading dye”;
- Adicionar 5,0 µl de extrato de ácido nucleico ou produto do PCR sob o corante (ponto) e homogeneizar bem com o auxílio da micro-pipeta automática;
- Transferir as amostras para as “cavidades” formadas pela retirada dos pentes;
- Colocar a “bandeja” no aparelho Pharmacia Biotech GNA 100 (programação de 75V constante, por 40 minutos) e completar com tampão TAE 1X;
- Transferir o gel para vasilha contendo brometo de etídio\* por 15 minutos;
- Lavar o gel em vasilha contendo água Milli-Q por 5 minutos;
- Colocar em câmara de trans-iluminador UV (Stratagene – Eagle Eye II);
- Imprimir ou copiar em disquete o resultado.

\* Brometo de etídio: substância cancerígena. Manipular sempre com luva.

O tampão TAE foi preparado segundo metodologia descrita por SAMBROOK *et al* (1989).

#### 4.11.4. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante

A técnica de DGGE (*Denaturing gradient Gel Electrophoresis*) é uma metodologia que permite a separação de fragmentos de DNA com os mesmos tamanhos, porém com seqüências de nucleotídeos diferentes. A separação desses fragmentos ocorre de acordo com grau de desnaturação da dupla hélice de DNA, sob a ação de géis de poliacrilamida com gradiente crescente dos agentes desnaturantes (formamida e uréia).

O procedimento dessa análise consiste na preparação da solução do gel na concentração desejada. A Tabela 4. 17 descreve as concentrações utilizadas neste trabalho.

Tabela 4. 17 Porcentagem do gel utilizada para os domínios *Bacteria*, *Archaea* e grupo BRS.

Microrganismos	Concentração do gel (%)		
	Domínio <i>Archaea</i>	0	35
Domínio <i>Bacteria</i> e Grupo BRS	0	30	60

- Os géis foram preparados de acordo com a Tabela 4. 18 para um volume de 100 ml.

Tabela 4. 18 Procedimentos para o preparo do gel em gradiente desnaturante para o volume de 100 ml.

Concentração do gel DGGE (%)	0%	30%	35%	55%	60%
40% de gel acrilamida/Bis (ml)	20	20	20	20	20
Solução de 50 x TAE (ml)	2	2	2	2	2
Formamida (ml)	0	12	14	22	24
Uréia (ml)	0	12,6	14,7	23,1	25,4

- Dissolver a uréia nos reagentes líquidos e completar o volume para 100 ml com água Milli-Q. Preparar o “sanduíche” com o kit de placas de vidro e suporte.
- Em tubos de centrifuga de 15 ml adicionar, conforme Tabela 4.18 para os domínios *Archaea* e *Bacteria* e o grupo das BRS.
- Os tubos com as soluções devem ser mantidos em gelo, enquanto, se realiza a preparação dos géis.
- O temed deve ser adicionado por último. Este reagente provoca a solidificação do gel.
- Transferir os géis \* (30% e 60%), simultaneamente, para o “sanduíche” de placas de vidro, com auxílio de 2 seringas presas ao aparelho injetor;
- Aguardar 10 minutos. Colocar os pentes para formar as cavidades (poços). Adicionar a solução do gel 0%;
- Aguardar 1 hora, no mínimo, ou uma noite para a solidificação adequada dos géis;
- Preparar a câmara “eletroforética” adicionando-se 140 ml de 50 X TAE e completar o volume de 7 litros com água Milli-Q;
- Colocar para aquecer a temperatura de 65°C. Na “corrida do gel” utilizar a temperatura de 60°C;
- Transferir os “sanduíches” de vidro para essa câmara à 65°C;
- Retirar os “pentes”. Lavar as cavidades dentro da câmara com a solução tampão com o auxílio de micro-pipetas;
- Preparar as amostras:
  - 20 µl de amostra (“template”);
  - 4 µl de 6 X loading dye (corante)
- Colocar o corante sob superfície de para-filme. Adicionar o template sobre o corante. Homogeneizar bem com o auxílio de micro-pipeta;
- Transferir a mistura (corante + template) para as cavidades do gel;
- Ligar a bomba de agitação e conectar nos eletrodos à 130V;
- O tempo de corrida depende de cada pesquisa. Neste trabalho foram utilizados 6,5 horas;

- Decorrido o tempo de “corrida” do gel, retirar o “sanduíche” de vidro e transferir o gel para uma bandeja de acrílico;
- Submergir a bandeja com o gel em solução Vista Green \*\* (diluída 10.000 vezes). Aguardar 15 minutos;
- Colocar o gel na câmara de transiluminador UV (Stratagene – Eagle Eye II);
- Efetuar a leitura do resultado (software; Eagle Eye II).

Observações:

- O processo de preparação dos géis a diferentes gradientes desnaturantes foi descrito para o domínio *Bactéria* e grupo das BRS (30% e 60%). O mesmo processo também foi efetuado para o domínio *Archaea* (35% e 55%), conforme especificado na Tabela 4. 19.
- Vista green – substância cancerígena – manipular com luvas e muito cuidado.

Tabela 4. 19 Constituição das soluções de gel desnaturante para os domínios *Archaea* e *Bactéria* e o grupo das BRS.

Constituição das soluções	Domínio <i>Archaea</i>	Domínio <i>Bactéria</i> e Grupo BRS
0%	3 ml solução 0% 20 µl APS 10% 2 µl temed	3 ml solução 0% 20 µl APS 10% 2 µl temed
30%	-	14 ml solução 30% 100 µl APS 10% 10 µl temed
35%	14 ml solução 35% 100 µl APS 10% 10 µl temed	-
55%	14 ml solução 55% 100 µl APS 10% 10 µl temed	-
60%	-	14 ml solução 60% 100 µl APS 10% 10 µl temed

#### **4.12. Estatística dos dados experimentais**

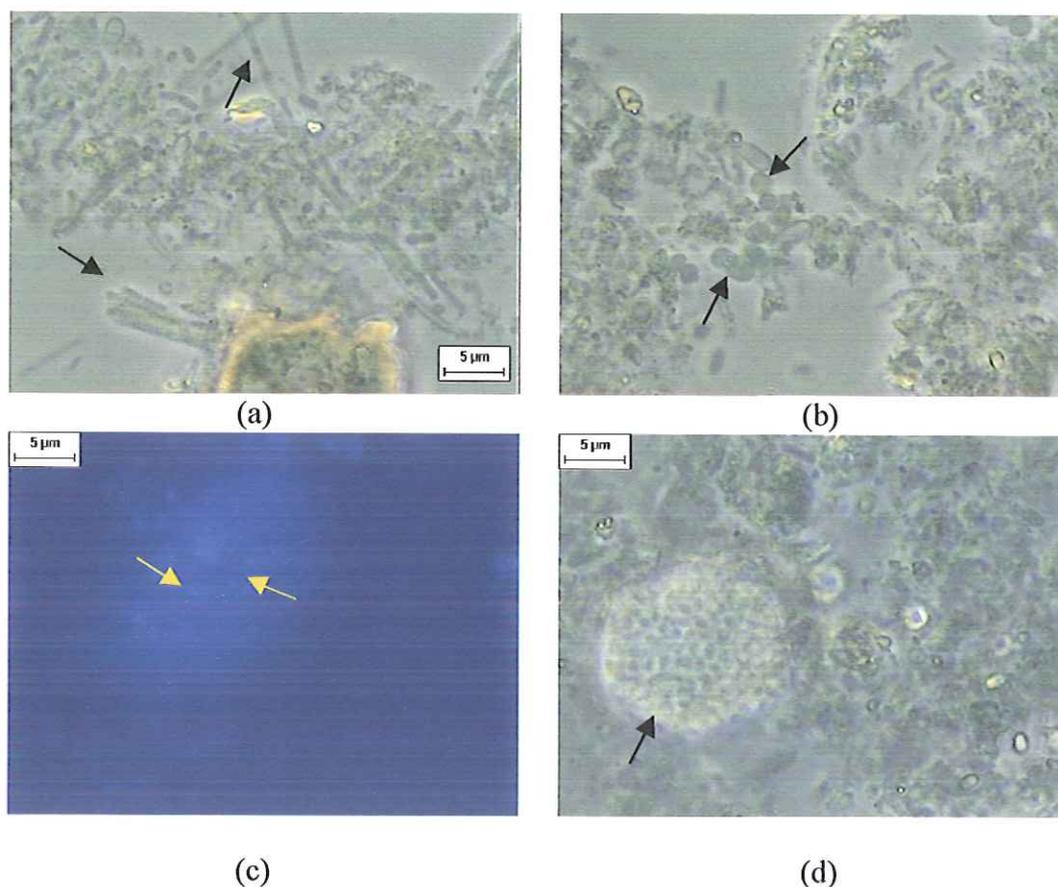
Foi aplicado o programa BioEstat 3.0, com objetivo de comparar os resultados obtidos nos diferentes ensaios. Os cálculos realizados e o tratamento estatístico foram feitos por meio do Microsoft Excel 2000. Os testes de hipótese utilizados foram: Kruskal-Wallis, Anova – um critério e *t*-Student.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio de enriquecimento

O enriquecimento ocorreu no período de, aproximadamente, 30 dias. Decorrido esse tempo, 20% desse volume foi utilizado como inóculo para a preparação dos reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato.

Nesta fase não foram feitas análises físico-químicas. O objetivo do enriquecimento foi aumentar a biomassa e a diversidade microbiana, para que o inóculo fosse capaz de efetuar a degradação de fenol e redução de sulfato. Microscopia óptica foi efetuada. Através da Figura 5. 1 são observadas diversidades morfológicas dos microrganismos encontrados.



**Figura 5. 1** Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência das amostras dos reatores do ensaio de enriquecimento: (a) filamentos semelhantes a *Methanosaeta* sp., (b) cocos com estrias, (c) bacilos fluorescentes e (d) cisto de sarcina.

## 5.2. Ensaio de degradação em reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato

O primeiro ensaio foi montado nas proporções de, aproximadamente, 64,2 mg/l de fenol e 46,3 mg/l de sulfato, conforme descrito na Tabela 5. 1. Esse ensaio teve a duração de 21 dias. Na Figura 5. 2, que ilustra o comportamento das concentrações de fenol e sulfato em função do tempo, pode-se observar que o consumo de fenol foi total, porém, as concentrações de sulfato mantiveram-se em, aproximadamente, 70,2% de seu valor inicial. Ou seja, apenas aproximadamente, 29,8% de sulfato foram utilizados para o consumo total do fenol .

Tabela 5. 1 Variação temporal do consumo de fenol e sulfato no ensaio de degradação de fenol e sulfato.

Tempo (dias)	Fenol (mg/l)	Sulfato (mg/l)
1	64,2	46,3
4	50,4	45,6
10	15,8	42,5
13	6,9	41,2
17	1,3	34,7
21	0	32,5

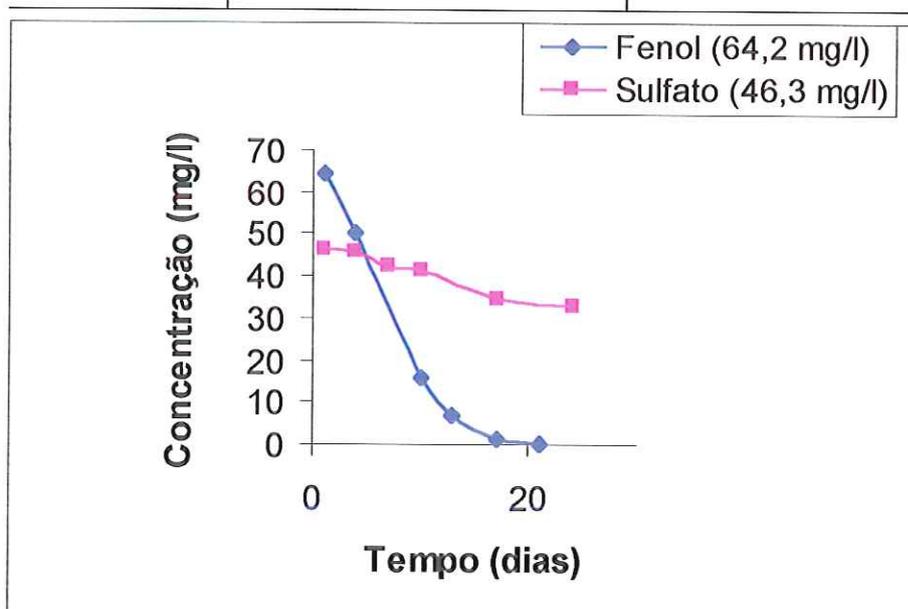


Figura 5. 2 Variação temporal da degradação de fenol e consumo de sulfato nos reatores em batelada.

A Tabela 5. 2 descreve o comportamento dos sólidos totais voláteis dos ensaio de degradação dos reatores anaeróbios em batelada alimentados com fenol e sulfato.

**Tabela 5. 2 Sólidos totais voláteis determinados no início e no final dos ensaios com reatores alimentados com fenol e sulfato.**

<b>Ensaio alimentado com fenol e sulfato</b>		
	<b>*Inicial (g/l)</b>	<b>Final (g/l)</b>
Fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l)	1,82	2,49
Fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l)	1,61	1,09

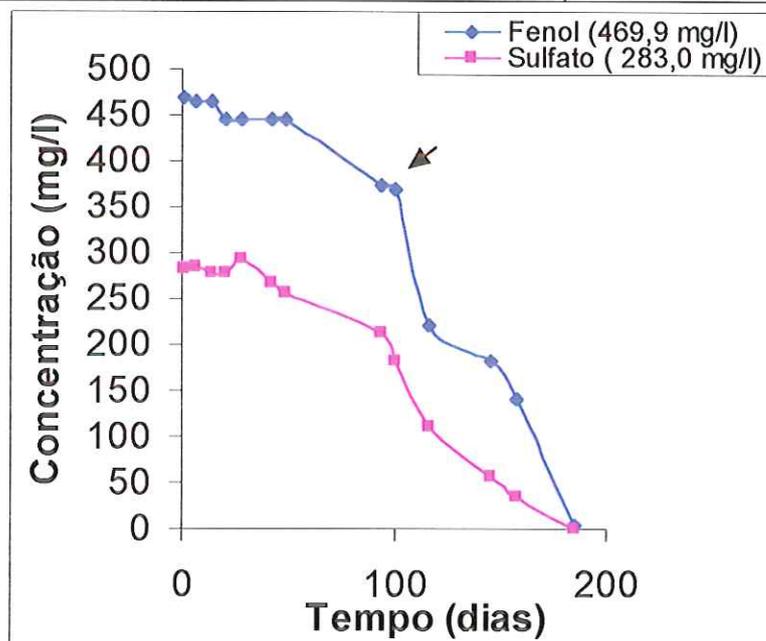
\* Inicial- inóculo

Nos reatores alimentados com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l) as concentrações de sólidos totais voláteis aumentaram de 1,82 g/l no início para 2,49 g/l no final do ensaio, o que significou aumento de 36,8%. Essa variação pode estar relacionada com o aumento da biomassa microbiana. Isso se justifica pois, esse ensaio adveio de uma fase de enriquecimento onde foram adicionadas fontes de carbono diversas, de fácil assimilação pelos microrganismos facilitando seu crescimento. Nesse ensaio as concentrações de fenol eram baixas e, portanto, não tóxicas nesse momento.

O próximo ensaio foi montado nas proporções de 469,9 mg/l de fenol e 283,0 mg/l de sulfato, conforme descrito na Tabela 5. 3 e Figura 5. 3. Esse ensaio teve a duração de 203 dias. Quando o ensaio estava com 100 dias de operação foi adicionado 0,03% de extrato de levedura. Na Figura 5. 3, a seta indica o ponto onde foi efetuada a injeção de extrato de levedura. Com essa adição esperava-se eficiência maior na degradação de fenol e, com isso, finalizar o ensaio. Aos 100 dias do ensaio (369,3 mg/l) houve declínio da degradação na faixa de 21,4% das concentrações iniciais (469,9 mg/l), quando comparado, por exemplo, aos 7 dias (465,2 mg/l) de amostragem que variaram 1,0% das concentrações iniciais (469,9 mg/l). Os consumos de fenol e sulfato, estão descritos, respectivamente, na Tabela 5. 3 e Figura 5. 3. A degradação foi muito lenta. Com 116 dias de ensaio obteve-se 221,7 mg/l de fenol e 110,0 mg/l de sulfato; o que equivaleu ao consumo de, respectivamente, 52,8% e 61,1% das concentrações iniciais.

**Tabela 5.3** Variação temporal do consumo de fenol e sulfato no ensaio de degradação em reatores em batelada.

Tempo (dias)	Fenol (mg/l)	Sulfato (mg/l)
1	469,9	283,0
7	465,2	285,0
14	464,8	285,0
21	446,5	279,0
28	439,2	293,6
42	445,7	267,0
49	445,1	255,7
94	372,9	213,3
100	369,3	183,3
116	221,7	110,0
146	181,7	57,5
158	140,4	34,5
185	4,33	0



**Figura 5.3** Variação temporal da degradação de fenol e consumo de sulfato nos reatores em batelada.

Nos dois ensaios foram feitas análises diárias da produção de gás metano. A Tabela 5. 4 descreve esse comportamento.

**Tabela 5. 4 Variação temporal da produção de metano nos ensaios com fenol e sulfato.**

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Fenol (64,2 mg/l) e Sulfato (46,3 mg/l) (mg/l)</b>	<b>Fenol (469,9 mg/l) e Sulfato (283,0 mg/l) (mg/l)</b>
1	0	-
2	21,2	-
3	20,59	-
4	23,3	-
7	23,6	-
8	24,7	-
16	44,0	-
17	44,4	-
18	49,7	-
19	47,7	-
20	59,0	-
23	39,1	-
146		-
151		155,7
185		120,4
192		122,7
199		115,9
201		99,3
203		97,2

(-) não detectado

No ensaio com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l) houve produção de metano. No final do ensaio, quando a remoção de fenol foi total, a estabilização do gás ocorreu aos 23 dias com concentrações de 39,1 mg/l. (Figura 5. 4).

No ensaio com fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l) a produção de metano também manteve-se muito baixa. A partir do 151º dia sua produção foi de 155,7 mg/l e houve estabilização da produção desse gás aos 203 dias do início do ensaio com concentrações médias de 97,2 mg/l (Figura 5. 5).

Nos reatores alimentados com fenol (469,3 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l) houve decréscimo nas concentrações de sólidos totais voláteis de 1,61 g/l para 1,09 g/l; o que significou 32,1% de declínio. Pode ter havido declínio na biomassa microbiana. Esse fato pode estar relacionado com as altas concentrações de fenol que se tornaram tóxicas para os microrganismos diminuindo assim o crescimento.

Com o procedimento de utilizar o inóculo adaptado ao fenol, pode ter diminuído, também, a quantidade de microrganismos capazes de degradar o composto. O inóculo do ensaio com fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l), bastante diluído e pobre em biomassa, agregado ao aumento na concentração de fenol e sulfato podem ter sido os fatores limitantes para a lenta degradação do fenol nessas condições.

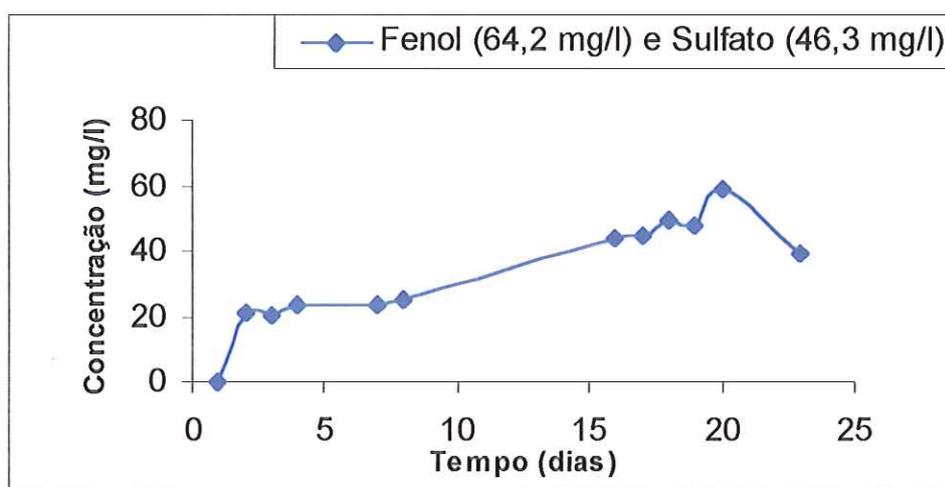


Figura 5. 4 Variação temporal da produção de metano do ensaio de degradação de fenol e sulfato.

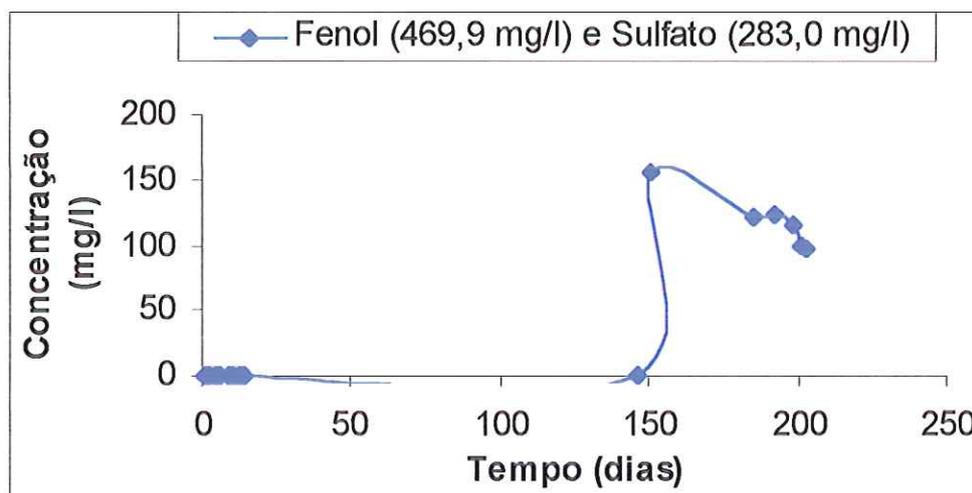


Figura 5. 5 Variação temporal da produção de metano do ensaio de degradação de fenol e sulfato.

Outro fato que contribuiu para a maior eficiência na degradação no ensaio com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l), quando comparado com o ensaio com

fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l), foram as baixas concentrações iniciais de fenol.

No ensaio com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l) foram identificados, em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência, bacilos fluorescentes, presença de *Methanosaeta*, e *Methanosarcina*. Nessa fase foi verificado o predomínio de cocos com estrias e bacilos .

No ensaio com fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l) verificou-se, também através de microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência, presença de cistos de sarcina, bacilos longos, bacilos curvos, cocos, cocos com estrias, nanobactérias e filamentos.

As diversidades morfológicas desses dois ensaios estão demonstradas, respectivamente, na Tabela 5. 5, Figura 5. 6 e Figura 5. 8. No enriquecimento houve maior diversidade microbiana com o predomínio de bacilos retos, cocos, cocos com estrias, diplococos, estafilococos, bacilos fluorescentes e bacilos retos fluorescentes. Nos dois ensaios com fenol e sulfato houve predomínio de bacilos retos, cocos, cocos com estrias e presença de morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp.*

Tanto no enriquecimento quanto nos reatores alimentados com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l) houve predomínio de bacilos retos fluorescentes e não foram observadas nanobactérias móveis.

Nos reatores alimentados com fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l) houve presença de morfologias semelhantes a *Methanosarcina sp.*

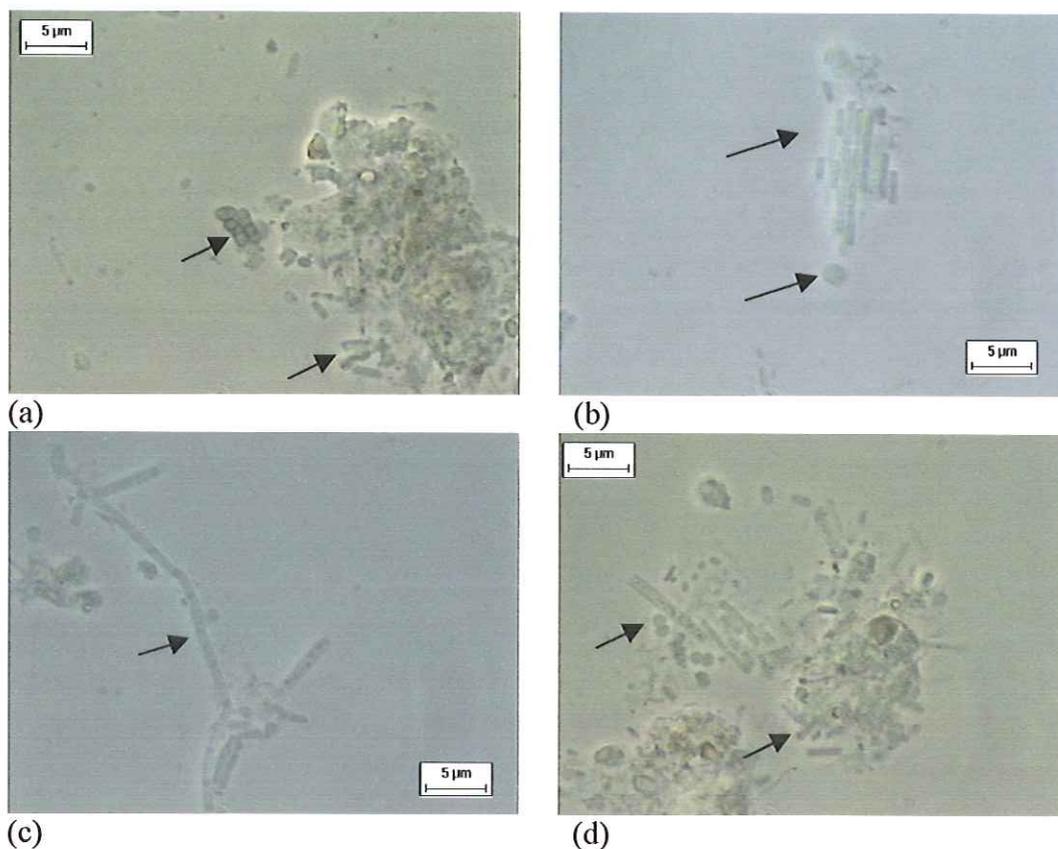
A Figura 5. 7 ilustra a comparação do comportamento da remoção de fenol dos dois ensaios realizados com fenol e sulfato. Observa-se, claramente, a eficiência do ensaio de fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l) na degradação. Em apenas 21 dias a remoção de fenol foi de 100% das concentrações iniciais. O ensaio de fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l) obteve, com 185 dias de operação, aproximadamente, 99,1% de remoção das concentrações iniciais. Quando as concentrações de fenol foram aumentadas a degradação tornou-se mais lenta e, possivelmente, a capacidade do inóculo em degradar o composto tóxico se tornou limitante nesta situação. Em concentrações de fenol próximas a 500 mg/l a ineficácia na degradação foi observada em reatores em batelada, sem sulfato ( SANCINETTI, 2004).

Reatores anaeróbios horizontais de leito fixo com a biomassa imobilizada em espuma de poliuretano têm sido usados potencialmente para o tratamento de águas residuárias contendo fenol, com alta eficiência na remoção desse composto. Esse tipo de reator, provavelmente, poderá ser usado para altas concentrações de fenol e obter satisfatoriamente essa degradação com redução de sulfato (BOLANOS, 2001).

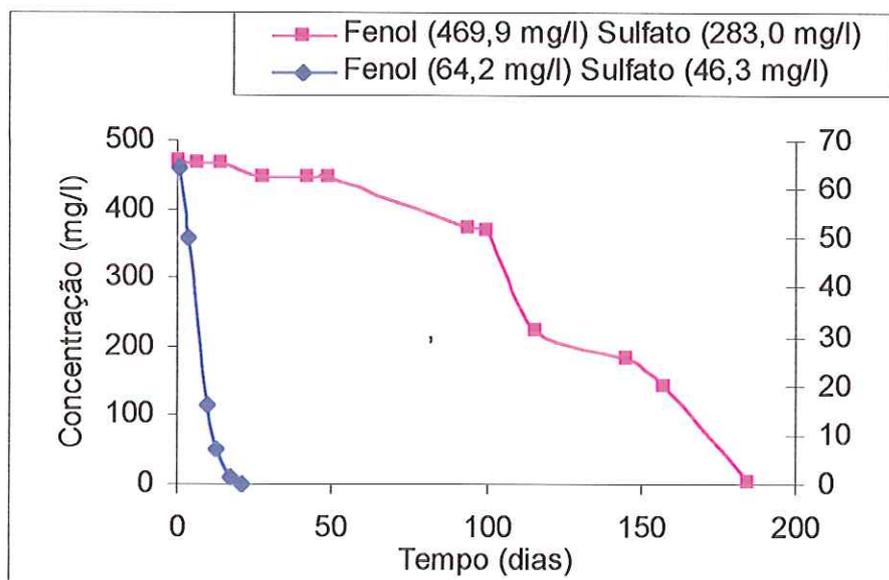
**Tabela 5. 5 Caracterização morfológica dos ensaios de enriquecimento; ensaios alimentados com fenol e sulfato.**

Morfologias	Frequência nos ensaios		
	Enriquecimento	Fenol (64,2 mg/l) e Sulfato (43,6 mg/l)	Fenol (469,9 mg/l) e Sulfato (283 mg/l)
<b>BACTÉRIAS</b>			
Bacilos retos	++++	++++	++++
Bacilos com extremidade arredondada	++	-	+++
Bacilos ovalados	++	+	+
Bacilos curvos	+	-	++
Cocos	++++	++++	++++
Cocos com estrias	++++	++++	++++
Diplococos	++++	+	+
Estafilococos	++++	++	++
Filamento	++	+	+
Filamento septado	+	-	+
Nanobactérias móveis	-	-	+
<b>ARQUEAS METANOGÊNICAS</b>			
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	+++	++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	+++	+++
Cocos fluorescentes	-	-	-
Bacilos fluorescentes	++++	-	++
Bacilos retos fluorescentes	++++	++++	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não foram observados



**Figura 5. 6** Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência do ensaio com reatores alimentados com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l): (a) estafilococos e bacilos , (b) filamentos semelhantes a *Methanosaeta sp.* e cocos, (c) filamentos (d) diplococos e bacilos.



**Figura 5. 7** Variação temporal da degradação de fenol nos reatores em batelada.

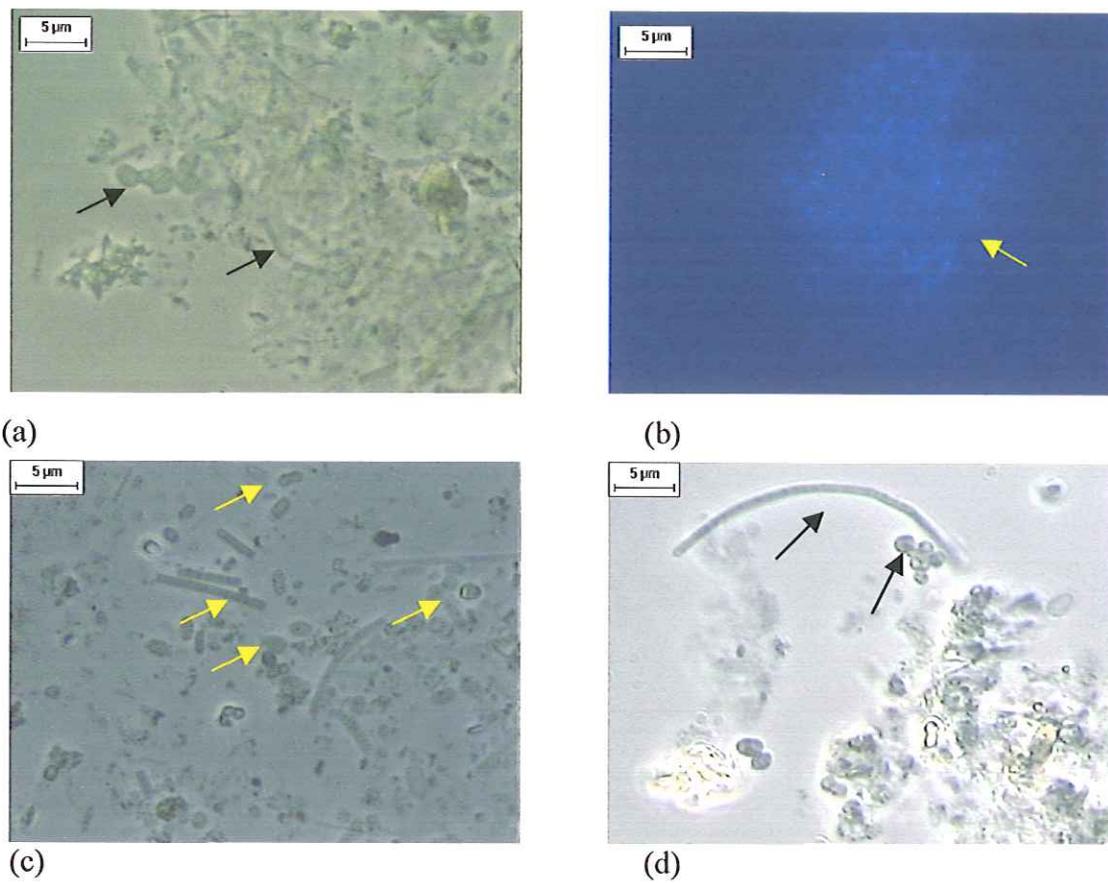


Figura 5. 8 Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência do ensaio com reatores alimentados com fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0 mg/l): (a) cocos e filamentos , (b) bacilos fluorescentes, (c) bacilos semelhantes a *Methanosaeta sp.*, cocos e bacilos e (d) cocos com estrias e filamento.

### 5.3. Ensaio de degradação em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e co-substratos

#### 5.3.1. Ensaio com fenol

Aos 9 dias do início do ensaio obteve-se 18,2% de remoção de fenol das concentrações iniciais. Aos 38 dias do início do ensaio percebeu-se aumento na eficiência da degradação do fenol; foram consumidos cerca de 87,8% desse composto; as concentrações iniciais de 329,3 mg/l passaram para 40,2 mg/l. Esse fato pode estar relacionado, diretamente, com a adição do extrato de levedura no trigésimo dia. A partir desse ponto ficou evidente a eficiência na remoção do fenol.

A Tabela 5. 6 descreve o comportamento do fenol no ensaio de fenol (329,3 mg/l). A eficiência da remoção de fenol foi de 99,2% ao final dos 51 dias de ensaio, com concentrações finais de 2,7 mg/l.

Na Figura 5. 9 está ilustrado o comportamento da degradação do fenol e a seta indica o ponto onde foi efetuada a adição de extrato de levedura.

**Tabela 5. 6 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol.**

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Fenol (mg/l)</b>
1	329,3
9	267,4
13	259,7
21	262,4
28	228,9
38	40,2
44	10,1
51	2,7



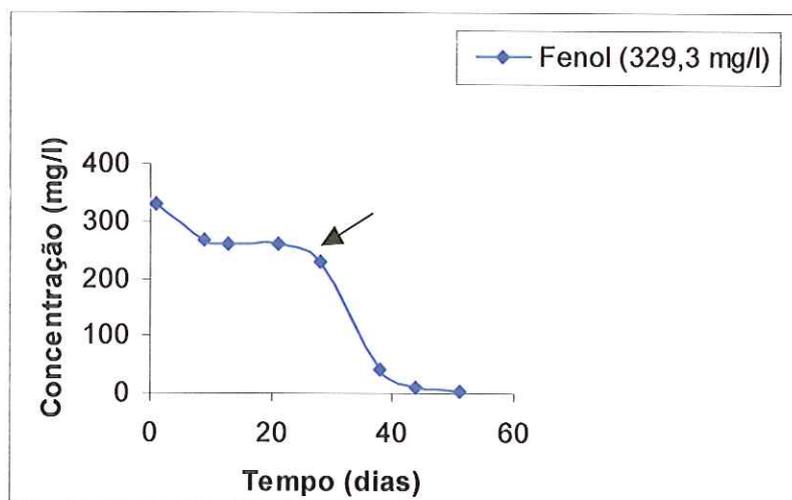
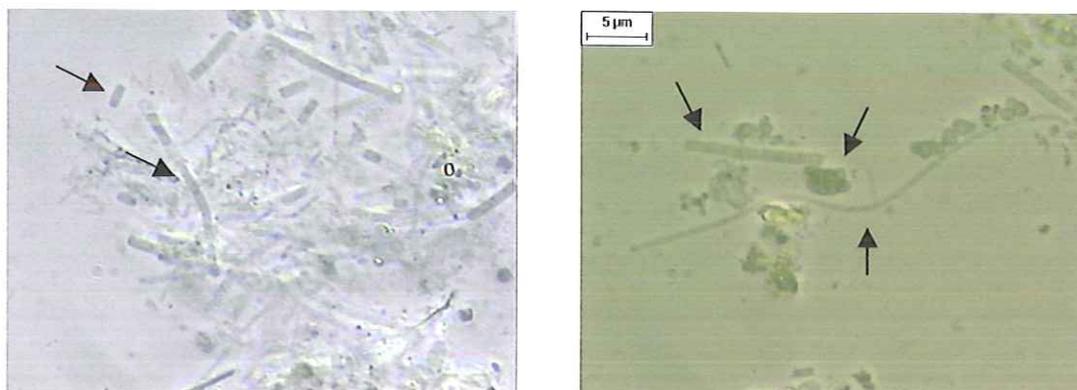


Figura 5.9 Variação temporal do ensaio com reatores anaeróbios em batelada alimentados com fenol.

No início do ensaio foram observados cocos, cocos com estrias e filamentos. No final observou-se presença de sarcinas fluorescentes, bacilos fluorescentes, estafilococos e predomínio de morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.* As microscopias de contraste de fase e fluorescência estão ilustradas na Figura 5.10.



(a)

(b)

Figura 5.10 Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência do ensaio de degradação de fenol (329,3 mg/l): (a) bacilos de extremidades arredondadas e morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.*; (b) estafilococos, filamentos longos e filamentos septados.

### 5.3.2. Ensaio com fenol e sulfato

A eficiência de degradação do fenol foi de, aproximadamente 3,3% aos sete dias do início do ensaio. Observou-se, portanto, degradação lenta nas primeiras amostragens, quando comparado com os ensaios alimentados com: fenol; fenol, sulfato e lactato; fenol, sulfato e etanol. Também, neste experimento, o extrato de levedura foi primordial para acelerar o processo de degradação do fenol. Isso está demonstrado na Tabela 5. 7, quando a injeção foi feita no trigésimo dia. A partir desse ponto a eficiência na degradação foi de, aproximadamente, 43,4 % dos valores das concentrações iniciais de fenol. Duas injeções de sulfato também foram feitas, assim que sua concentração decaia para que a fonte de enxofre não se esgotasse, possibilitando, assim, a manutenção das condições necessárias para o crescimento das bactérias redutoras de sulfato. A Figura 5. 11 ilustra o comportamento da degradação de fenol e o consumo de sulfato. As setas, nesta figura, indicam, respectivamente, os pontos onde foram feitas injeções de extrato de levedura (curva da degradação do fenol) e sulfato (curva do consumo do sulfato) nos reatores.

A eficiência da remoção de fenol foi de, aproximadamente, 98,2% no final do ensaio; as concentrações iniciais que eram de 307,3 mg/l passaram para 5,6 mg/l aos 51 dias.

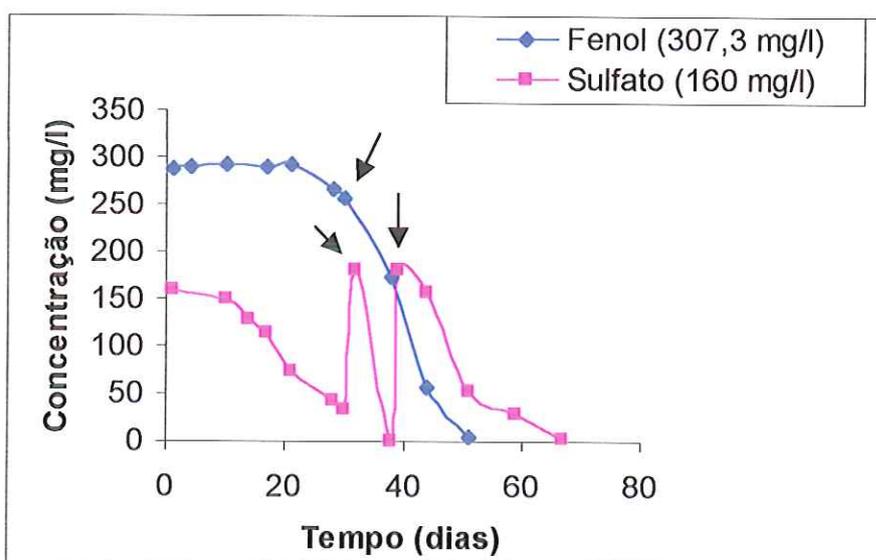


Figura 5. 11 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol. e sulfato.

**Tabela 5. 7** Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>fenol (mg/l)</b>	<b>sulfato (mg/l)</b>
1	307,3	160,0
4	306,4	-
7	297,3	-
10	290,0	150,0
14	287,1	127,5
17	285,6	115,0
21	285,4	75,0
28	266,2	42,5
30	256,2	32,5
32	-	180,0
38	174,0	0
39	-	180,0
44	56,0	157,5
51	5,6	52,5
59	-	28,0
67	-	2

No início do ensaio foi observado, predominantemente, cocos, cocos com estrias, bacilos, morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp* e filamentos. No final, observou-se baixa diversidade morfológica como filamentos, morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp*, presenças de cocos, bacilos ovalados e fluorescentes (Tabela 5. 14). As microscopias de contraste de fase e fluorescência estão ilustradas na Figura 5. 12.

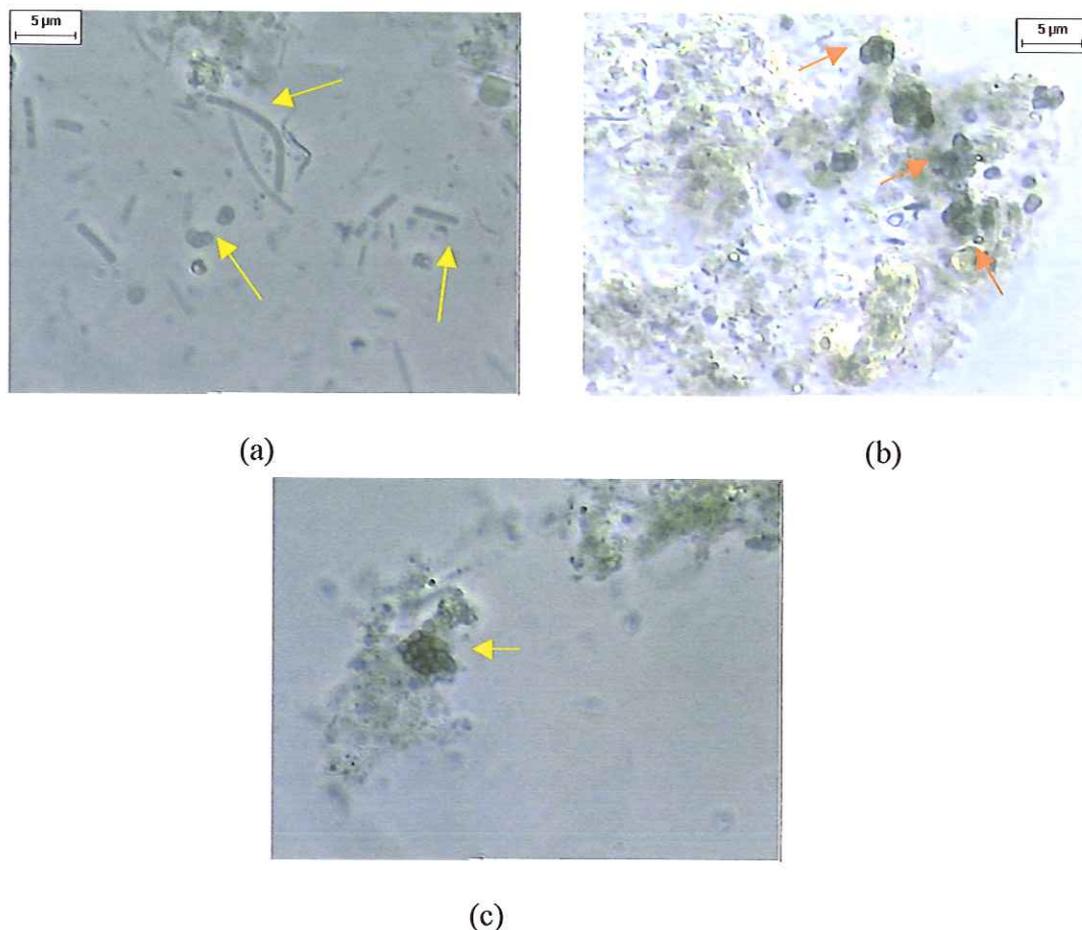


Figura 5. 12- Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência do ensaio de degradação com reatores alimentados com fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l): (a) diplococos, bacilos e filamentos; (b) cocos e (c) estafilococos.

### 5.3.3. Ensaio de degradação com fenol, sulfato e lactato

Aos 7 dias do início do ensaio a eficiência de degradação do fenol foi de 8,9% (Tabela 5. 8). Com a presença do lactato, como co-substrato, observou-se consumo mais rápido do sulfato, em função do tempo.

Nessa fase também foi necessária a injeção do extrato de levedura, no trigésimo dia, para acelerar o processo. Esse fato foi verificado com a amostragem aos 38 dias onde a eficiência de degradação de fenol foi de 75,8%, ou seja, concentrações iniciais de 322,3 mg/l passaram para 78,0 mg/l. Essa ocorrência pode estar relacionada diretamente com a injeção de extrato de levedura.

A Figura 5. 13 ilustra o comportamento da degradação de fenol e consumo de sulfato em função do tempo. A seta na curva de degradação do fenol indica a

injeção de extrato de levedura. As setas, na curva do sulfato, indicam as três injeções efetuadas ao longo do tempo.

A eficiência da remoção de fenol foi de, aproximadamente, 98,8% ao final dos 51 dias de ensaio. As concentrações iniciais que eram de 322,3 mg/l passaram para 3,9 mg/l em 51 dias.

**Tabela 5. 8 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e lactato.**

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Fenol (mg/l)</b>	<b>Sulfato (mg/l)</b>
1	322,3	160
4	311,4	10
7	293,6	0
10	282,2	185
14	262,4	150
17	-	135
21	269,5	82,5
24	-	52,5
28	217,5	7,5
30	-	182,5
38	78,0	7,5
39	-	182,5
44	11,0	147,5
51	3,9	75
59	-	34
67	-	22

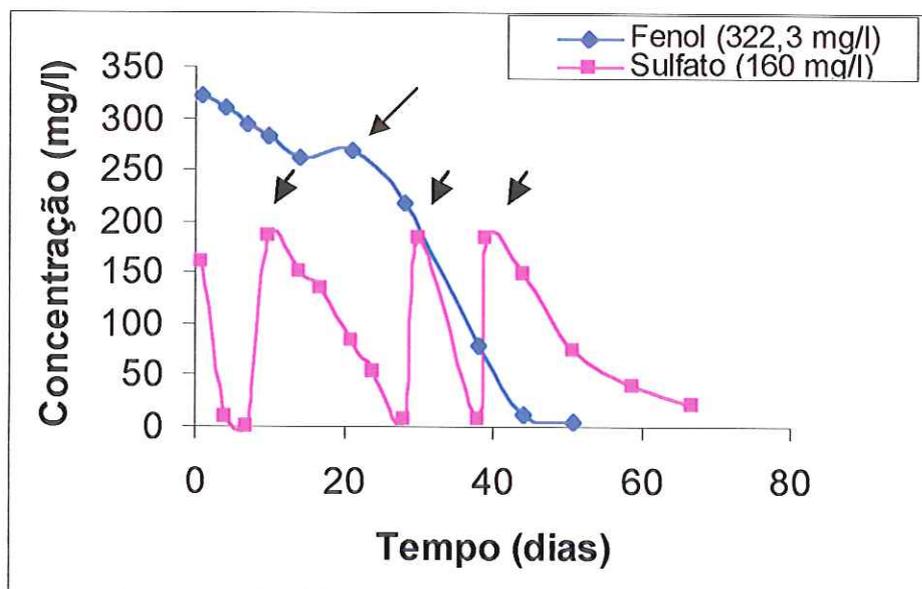


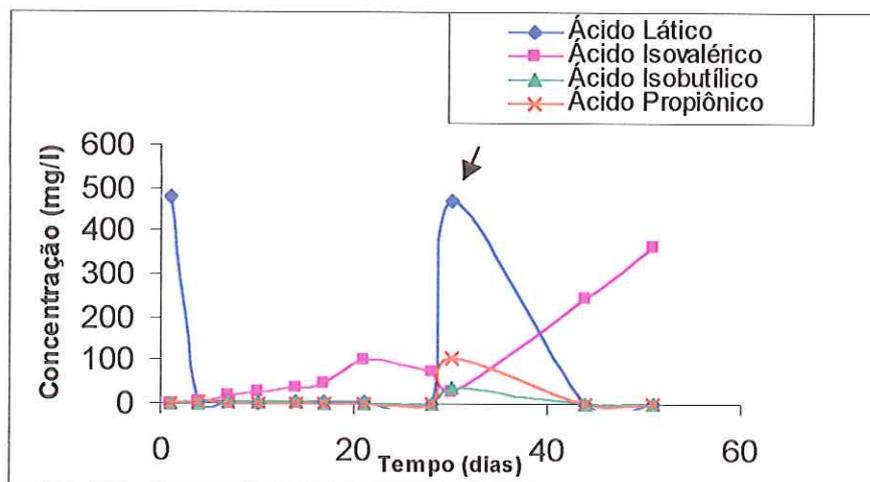
Figura 5. 13 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e lactato.

A Tabela 5. 9 e Figura 5. 14 demonstram o consumo de lactato em função do tempo. Aos 28 dias do início do ensaio a concentração foi de 1,72 mg/l; o que representou 99,64% do consumo da concentração inicial. Nova injeção de lactato foi efetuada, aos 30 dias do início do ensaio. O ensaio se encerrou com 51 dias e a concentração final de lactato foi de 1,72 mg/l; representando assim consumo de 99,63% desse composto. Houve produção de ácidos isobutírico, isovalérico e propiônico. A análise dos dados levou à formulação da seguinte hipótese: Com a utilização das fontes alternativas de carbono (lactato e extrato de levedura) pode ter havido aumento da biomassa bacteriana. Esse fato foi evidenciado no aumento da decomposição do fenol. Com o esgotamento das fontes de carbono a conseqüente lise celular dessa biomassa bacteriana pode ter acarretado na produção de subprodutos como os ácidos isobutírico, isovalérico e propiônico. Uma outra hipótese é que microrganismos que degradam compostos cáusticos como fenol possuam mecanismos de defesa como produção de uma matriz polissacarídica. Essa camada de proteção pode também conter lipídios que, quando oxidados, produzem ácidos como isobutírico, isovalérico e propiônico.

**Tabela 5. 9 Variação temporal de lactato do ensaio de degradação com reatores alimentados com fenol, sulfato e lactato.**

Tempo (dias)	Ácido Láctico (Mg/l)	Ácido Isobutírico (Mg/l)	Ácido Isovalérico (Mg/l)	Ácido Propiônico (Mg/l)
1	478,16	-	-	-
4	5,5	-	4,89	4,42
7	3,35	3,5	17,09	-
10	1,88	4,49	26,11	-
14	4	3,62	36,64	-
17	2,35	-	44,21	-
21	2,83	-	99,68	-
28	1,72	-	74,36	-
30	472,16	36,51	27,46	105,51
44	2,07	-	242,43	-
51	1,84	-	365,04	-

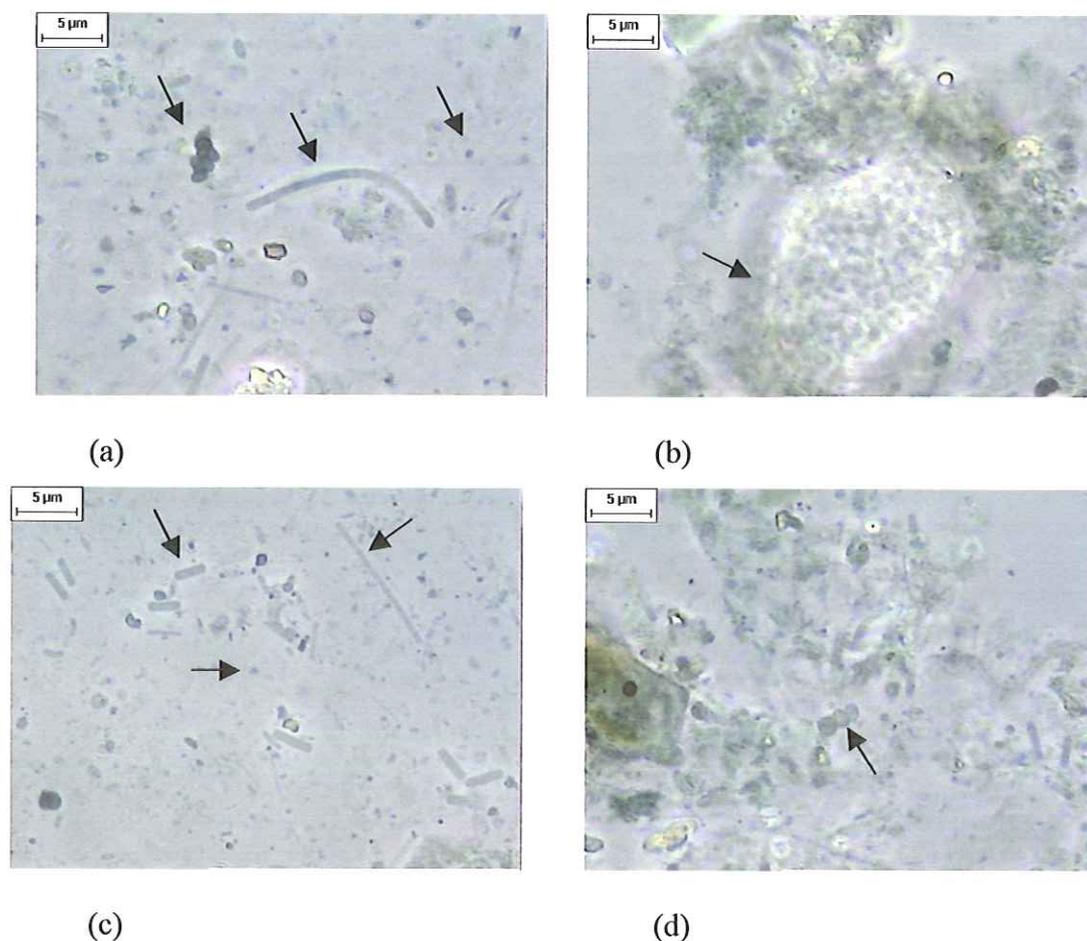
(-) não detectado



**Figura 5. 14 Variação temporal de ácidos orgânicos do ensaio de degradação com reatores alimentados com fenol, sulfato e lactato.**

No início do ensaio foram observados cocos, cocos com estrias, bacilos curvos, morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp*, bacilos curvos, nanobactérias móveis, cistos de sarcina e filamentos. No final observou-se o predomínio de bacilos

fluorescentes e estafilococos. As microscopias de contraste de fase e fluorescência estão ilustradas na Figura 5. 15.



**Figura 5. 15** Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência do ensaio de degradação de fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l): (a) estafilococos, filamentos e nanobactérias; (b) cisto de sarcinas; (c) bacilos, filamentos, nanobactérias e (d) cocos (1500x).

A Tabela 5. 10 descreve o comportamento dos sólidos totais voláteis dos ensaios dos reatores anaeróbios alimentados com fenol, sulfato e co-substratos.

Nos ensaios de degradação alimentados com fenol, sulfato e co-substratos a variação foi pequena quando comparado com os ensaios alimentados com fenol e sulfato. Somente nos reatores com fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l) a variação foi ligeiramente mais expressiva onde ocorreu decréscimo nas concentrações de sólidos totais voláteis de 2,67 g/l para 2,05 g/l, representando 23,2%.

**Tabela 5. 10 Sólidos totais voláteis determinados no início e no final dos ensaios com reatores alimentados com fenol e sulfato.**

<b>Reatores alimentados com fenol, sulfato e adição de co-substratos</b>	<b>*Inicial (g/l)</b>	<b>Final (g/l)</b>
Fenol (329,3 mg/l)	2,67	2,36
Fenol (307,3 mg/l) e Sulfato (160 mg/l)	2,67	2,05
Fenol (322,3 mg/l), Sulfato (160 mg/l) e Lactato (478,16 mg/l)	2,67	2,73
Fenol (322,3 mg/l) Sulfato (150 mg/l) e Etanol (129,76 mg/l)	2,67	2,58

\* Inicial - inóculo

#### **5.3.4. Ensaio de degradação com fenol , sulfato e etanol**

A eficiência de degradação de fenol foi de, aproximadamente, 3,7% nos primeiros 7 dias do ensaio; bem menos eficiente que nos ensaios com fenol (307,3 mg/l); fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l), quando comparados.

A injeção de extrato de levedura, também, foi importante como fator acelerador na eficiência da degradação de fenol. Na Tabela 5. 11 está descrito o comportamento da degradação do fenol e o consumo do sulfato.

Aos 28 dias obteve-se 22,1% de eficiência de remoção de fenol; concentrações iniciais de 332,1 mg/l passaram para 258,7 mg/l. Aos 38 dias do início do ensaio e, portanto, após a adição do extrato de levedura, obteve-se 58,6% de remoção de fenol, com concentrações de 137,5 mg/l. Observa-se que, com a injeção do extrato de levedura, a eficiência da remoção do fenol saltou de, aproximadamente, 3,7% aos 4 dias para 58,6% aos 38 dias.

Injeções de sulfato também foram necessárias para que se mantivessem as fontes de enxofre disponíveis para as bactérias redutoras de sulfato e, assim, haver a remoção do fenol. A Figura 5. 16 ilustra o comportamento da degradação do fenol e o consumo do sulfato ao longo do tempo. A seta indica a injeção de extrato de levedura. As setas, na curva do sulfato, indicam as injeções efetuadas ao longo do tempo. A eficiência na remoção de fenol foi de, aproximadamente, 98,8% no final do ensaio. As concentrações iniciais de 332,1 mg/l passaram para 4,0 mg/l aos 51 dias.

**Tabela 5. 11** Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e etanol.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Fenol (mg/l)</b>	<b>Sulfato (mg/l)</b>
1	332,1	150
4	319,8	100
7	319,7	57,5
10	296,8	47,5
14	-	0
17	-	182,5
21	282,5	142,5
28	258,7	125
30	-	122,5
38	137,5	0
39	-	182,5
44	95,1	172,5
51	4,0	57,5
59	-	27,0
67	-	14

A Tabela 5. 12 e Figura 5. 17 demonstram o comportamento do consumo de etanol nesse ensaio. Há sete dias do início do ensaio as concentrações de etanol foram de 40,31 mg/l, o que representou 68,93% de seu consumo. A partir de 14 dias não se detectou etanol nas amostragens evidenciando que o composto foi consumido totalmente.

O rápido consumo do etanol pode ser admitido pelo fato de tratar-se de uma molécula simples, com apenas 2 carbonos em sua constituição e sem duplas ligações. Essas características facilitaram seu consumo pelos microrganismos presentes no reator.

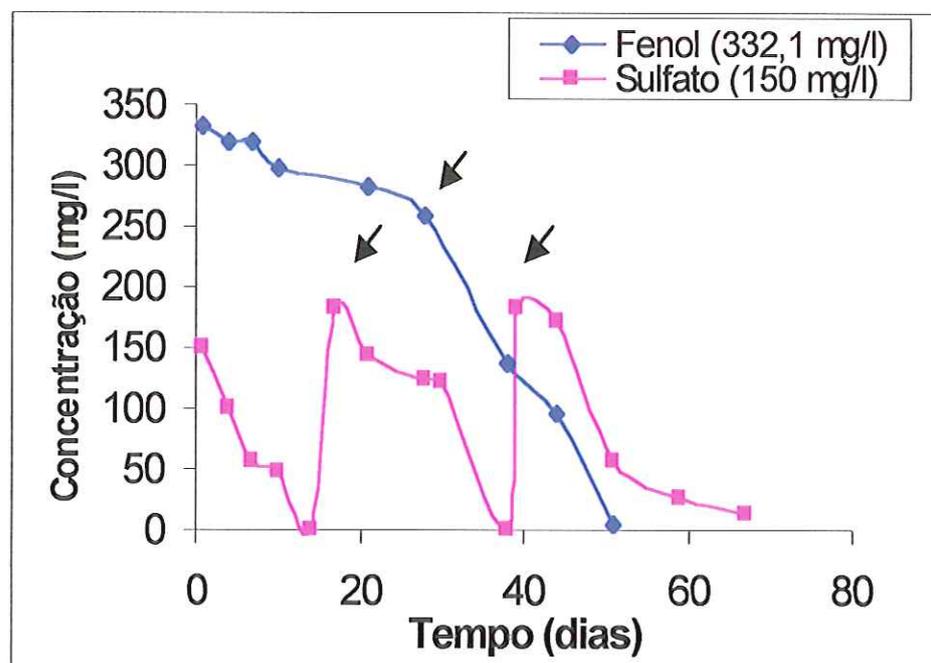


Figura 5. 16 Variação temporal do ensaio com reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e etanol.

Tabela 5. 12 Variação temporal do consumo de etanol no ensaio com reatores alimentados com fenol, sulfato e etanol.

Tempo (dias)	Etanol (mg/l)
1	129,8
7	40,3
14	-
29	-
39	-
46	-
53	-

(-) não detectado

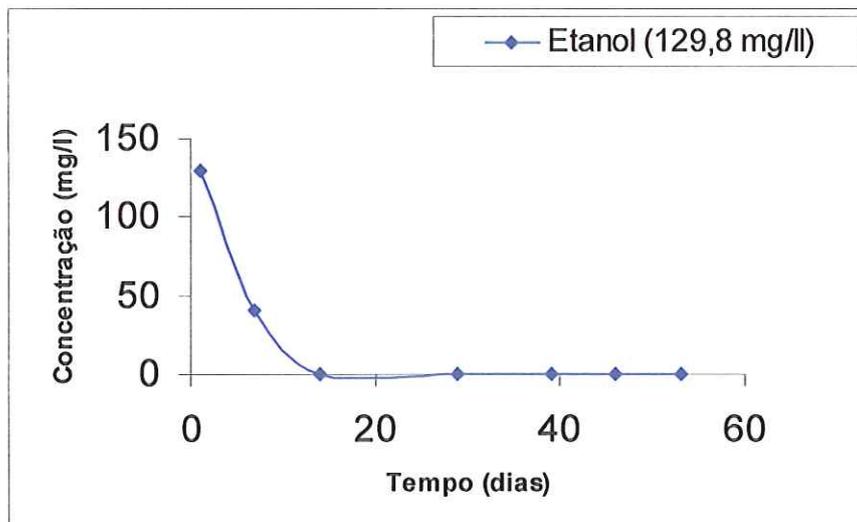


Figura 5. 17 Variação temporal do consumo de etanol no ensaio com reatores alimentados com fenol , sulfato e etanol.

No início do ensaio foram observadas as presenças de cocos, cocos com estrias, bacilos, morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp*, bacilos curvos, nanobactérias móveis, cistos de sarcina e filamentos. No final, observou-se baixa diversidade morfológica como raros filamentos, presenças de cocos, bacilos e o predomínio de bacilos fluorescentes (Tabela 5. 14). As microscopias de contraste de fase e fluorescência estão ilustradas na Figura 5. 18.

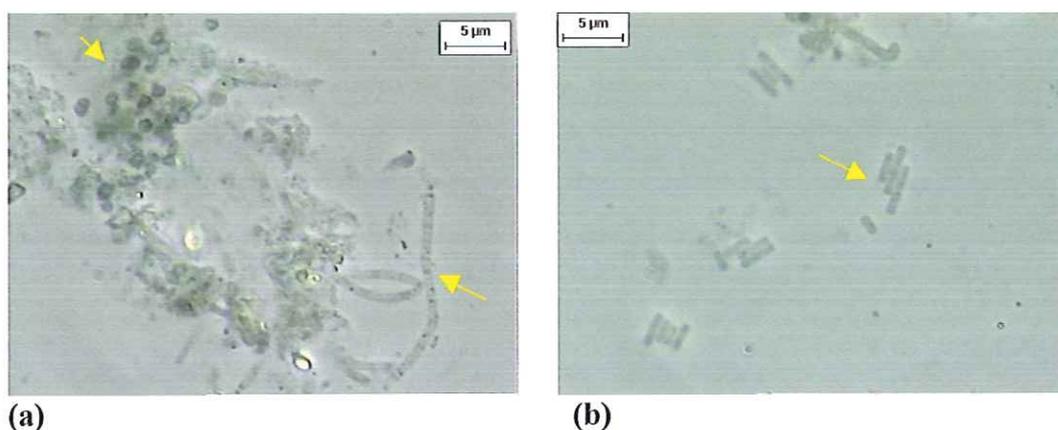


Figura 5. 18 Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência do ensaio com reatores alimentados com fenol (332,1 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (230 mg/l): (a) estafilococos, filamentos septados e (b) morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp*.

A Tabela 5. 13 e Figura 5. 19 demonstram o comportamento da produção de gás metano nos ensaios.

No ensaio com fenol a produção de gás metano variou de 17,9 mg/l a 253,2 mg/l e houve estabilização do processo aos 43 dias com 177,2 mg/l. No ensaio com fenol e sulfato houve variação da produção de gás metano de 27,6 mg/l a 295,0 mg/l e estabilização com 59 dias a 188,9 mg/l. No ensaio com fenol, sulfato e lactato houve variação de 18,5 mg/l a 143,5 mg/l e estabilização do processo de produção com 59 dias a 133,8 mg/l. No ensaio com fenol, sulfato e etanol a variação da produção de gás foi de 24,7 mg/l a 149,8 mg/l e a estabilização do processo de produção ocorreu com 143,5 mg/l aos 66 dias.

Nos quatro ensaios a produção máxima de gás metano ocorreu após as injeções de extrato de levedura. Isso pode estar relacionado com o aumento da atividade microbiana e aceleração no processo de degradação do fenol, com conseqüente produção de hidrogênio e acetato para utilização pelas arqueas metanogênicas, com a produção do biogás.

**Tabela 5. 13** Produção de gás metano nos ensaios de degradação de fenol, sulfato e co-substratos.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Fenol (329,3 mg/l) mg/l</b>	<b>Fenol (307,3 mg/l) e Sulfato (160 mg/l) mg/l</b>	<b>Fenol (322,3 mg/l), Sulfato (160 mg/l) e Lactato (478,2 mg/l) mg/l</b>	<b>Fenol (322,3 mg/l) Sulfato (150 mg/l) e Etanol (129,8 mg/l) mg/l</b>
1	17,9	27,6	18,5	24,7
3	19,6	55,6	21,0	65,5
6	27,7	79,2	26,5	88,5
9	31,0	47,1	28,5	75,3
13	25,1	49,4	30,5	
16	42,2	90,4	36,8	93,9
20	29,0	71,8	33,9	75,0
23	48,4		29,4	
27	95,7	145,9	46,7	136,6
34	106,2		94,4	149,8
37	253,2	295,0	143,5	
43	177,2	257,5	127,9	102,9
51			169,1	
59		188,9	133,8	163,4
66				143,5

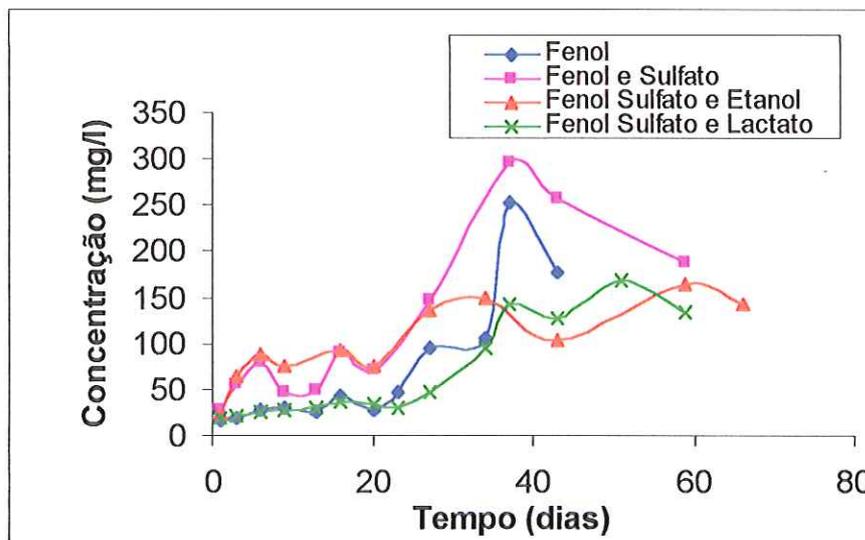


Figura 5. 19 Variação da produção de gás metano dos ensaios com reatores alimentados com fenol sulfato e co-substratos.

A Tabela 5. 14 descreve a caracterização morfológica do ensaio alimentado com fenol, sulfato e co-substratos. No ensaio com fenol (329,3 mg/l) observou-se o predomínio de bacilos retos, ovalados e cocos. Notou-se, também, a frequência de cocos com estrias, diplococos, estafilocos, filamentos septados e morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp*. Filamentos, bacilos curvos, bacilos com pontuações nas extremidades, bacilos fluorescentes e morfologias semelhantes a *Methanosarcina* foram pouco frequentes.

No ensaio com fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l) observou-se o predomínio de bacilos retos, cocos e estafilococos. Notou-se a frequência de cocos com estrias. Bacilos ovalados, filamentos, morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp* foram poucos frequentes. Não foram observados morfologias semelhantes a *Methanosarcina sp* e cocos fluorescentes.

No ensaio com fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,16 mg/l) foram observados predomínio de bacilos ovalados, diplococos em pares e cocos fluorescentes. Os bacilos curvos e filamentos longos foram frequentes. Os cocos com estrias, estafilococos, filamentos curtos e morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp* foram pouco frequentes. Não foram observados bacilos retos e cocos fluorescentes.

No ensaio com fenol (322,3 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,8 mg/l) observou-se o predomínio de bacilos retos, cocos e filamentos. Estafilococos foram freqüentes. Bacilos ovalados, diplococos e morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp* foram pouco freqüentes.

Evidenciou-se presença de nanobactérias móveis nos ensaios com fenol e sulfato; fenol sulfato e lactato e; fenol sulfato e etanol. Nos quatro ensaios não foram evidenciados bacilos com extremidade arredondada e cocos fluorescentes.

Tabela 5. 14 Caracterização morfológica dos ensaios de alimentados com fenol , sulfato e co-substratos.

Morfologias	Freqüência			
	Fenol (329,3 mg/l)	Fenol (307,3 mg/l) e Sulfato (160 mg/l)	Fenol (322,3mg/l), Sulfato (160 mg/l) e Lactato (478,16 mg/l)	Fenol (322,3 mg/l) Sulfato (150 mg/l) e Etanol (129,76 mg/l)
<b>BACTÉRIAS</b>				
Bacilos com pontuações nas extremidades	++	+	+	+
Bacilos retos	++++	++++	-	++++
Bacilos ovalados	++++	++	++++	++
Bacilos curvos	++	+	+++	-
Cocos	++++	++++	+++	++++
Cocos com estrias	+++	+++	++	+
Diplococos	+++	+	++++	++
Estafilococos	+++	++++	++	+++
Filamento	++	++	+++	++++
Filamento septado	+++	+	+	-
Nanobactérias móveis	-	+	+	+
<b>ARQUEAS METANOGENICAS</b>				
<i>Methanosarcina sp.</i>	++	-	+	-
<i>Methanosaeta sp.</i>	+++	++	++	++
Cocos fluorescentes	-	-	-	-
Bacilos fluorescentes	++	++	++++	-
Bacilos retos fluorescentes	+	+	+	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não observados.

Na Figura 5. 20 está demonstrada a variação do consumo de sulfato nos ensaios com fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l), fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l), fenol (332,1 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,8 mg/l). As setas indicam os pontos onde foram efetuadas novas injeções de sulfato, no momento em que houve declínio de seu consumo. O ensaio com fenol e sulfato necessitou de duas injeções de sulfato: aos 32 dias e 39 dias do início. O ensaio com fenol, sulfato e lactato necessitou de três injeções de sulfato: aos 10 dias, aos 30 dias e aos 39 dias do início. O ensaio com fenol, sulfato e etanol necessitou de 2 injeções de sulfato: aos 17 dias e aos 39 dias do início. Nesses ensaios as concentrações totais de sulfato adicionadas durante o período experimental foram iguais a, respectivamente, 520 mg/l, 710 mg/l e 515 mg/l. As reduções de sulfato do ensaio com fenol e sulfato foram de 79,7% da concentração inicial aos 30 dias. O ensaio com fenol, sulfato e lactato consumiu todo sulfato nos sete primeiros dias. O ensaio com fenol, sulfato e etanol consumiu todo sulfato nos primeiros quatorze dias. O consumo de sulfato foi maior nos ensaios que continham outras fontes de carbono; ou seja, nos ensaios com lactato e etanol. Com esses resultados esperava-se maior eficiência na degradação de fenol nos ensaios onde o consumo de sulfato foi maior. Tal fato se justificaria considerando, provavelmente, aumento das BRS, devido à presença de substratos orgânicos preferenciais para seu crescimento. No entanto, quando se observa a Figura 5. 21 verifica-se o comportamento semelhante da degradação do fenol nos quatro ensaios. A seta indica o ponto onde foi efetuada a injeção de extrato de levedura.

Embora se tratassem de quatro ensaios distintos, as eficiências de degradação foram semelhantes. Esse fato foi confirmado com a aplicação do teste de hipótese Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, obtendo-se  $p = 0,5317$ . Os quatro ensaios foram, portanto, considerados estatisticamente iguais.

A remoção de fenol, ao final dos 51 dias, nos ensaios com fenol (329,3 mg/l); fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l); fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,16 mg/l); fenol (332,1 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,76 mg/l), foi de, respectivamente, 99,8%, 98,2%, 98,8% e 98,8% das concentrações iniciais. Ressalta-se, também, a importância da injeção do extrato de levedura aos 30 dias do início dos ensaios.

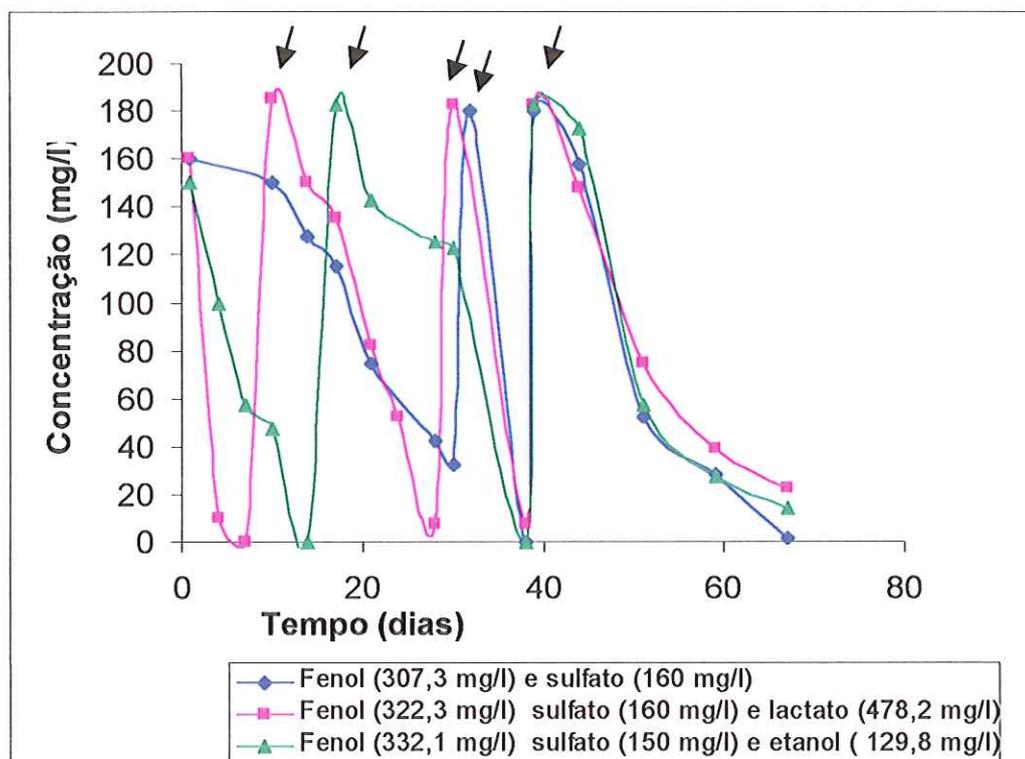


Figura 5. 20 Variação temporal do consumo de sulfato nos reatores alimentados com fenol e sulfato; fenol, sulfato e lactato e; fenol, sulfato e etanol .

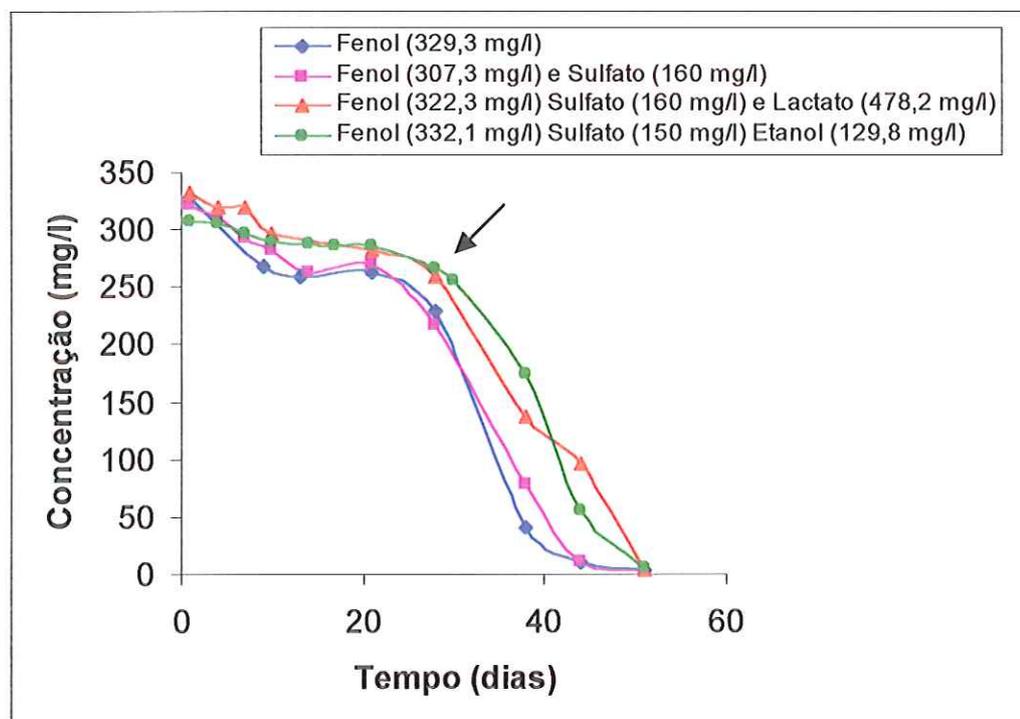


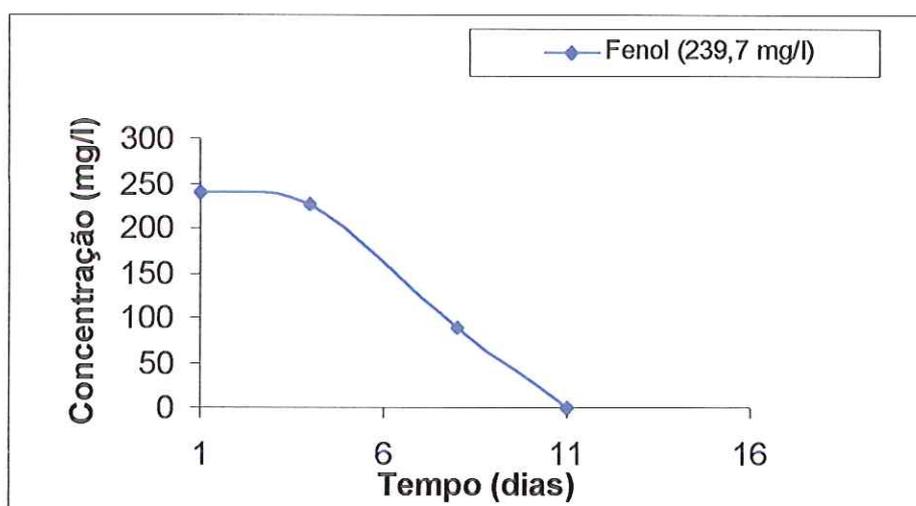
Figura 5. 21 Variação temporal da degradação de fenol nos reatores alimentados com fenol, sulfato e co-substratos.

#### 5.4. Ensaio de degradação em reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura

O primeiro ensaio foi realizado com 239,7 mg/l de fenol e 0,05% de extrato de levedura. Nesse ensaio obteve-se remoção total de fenol com 11 dias de operação. Aos 3 dias do início do ensaio a remoção do fenol foi de, aproximadamente, 5,14%. Aos 7 dias as concentrações foram de 89,9 mg/l, o que representou 62,47% de eficiência de degradação das concentrações iniciais. A rapidez dessa remoção pode estar relacionada, diretamente, com a presença do extrato de levedura. A Tabela 5. 15 e a Figura 5. 22 descrevem o comportamento do fenol no ensaio com concentrações de 239,7 mg/l. A eficiência da remoção de fenol foi de 100% ao final dos 11 dias de ensaio.

**Tabela 5. 15 Variação temporal do consumo de fenol dos reatores em batelada alimentados com fenol e extrato de levedura.**

Tempo (dias)	Fenol (mg/l)
1	239,7
4	227,3
8	89,9
11	0



**Figura 5. 22 Variação temporal do consumo de fenol dos reatores em batelada alimentados com fenol e extrato de levedura.**

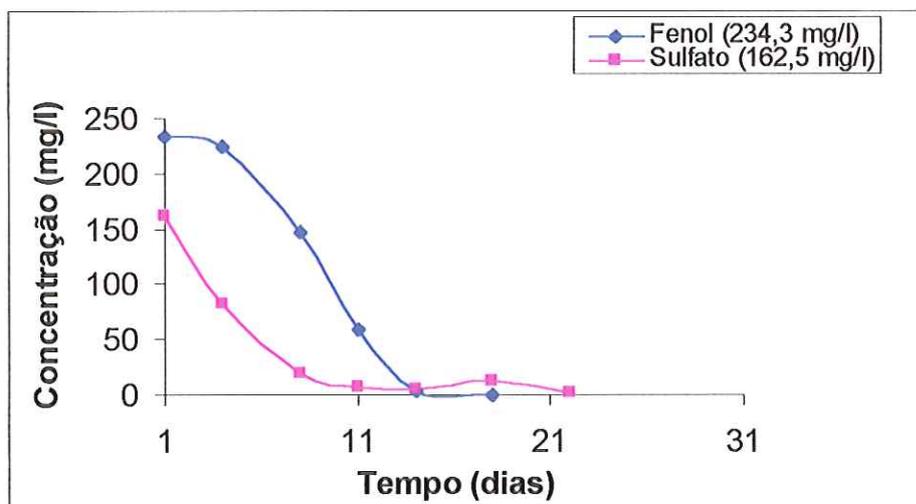
O próximo ensaio foi realizado com 234,3 mg/l de fenol, 162,5 mg/l de sulfato e 0,05 % de extrato de levedura.

Nesse ensaio todo fenol foi consumido em 17 dias. Com 3 dias a eficiência de degradação do fenol foi de 4,2% ou seja; concentrações iniciais de 234,3 mg/l passaram para 224,4 mg/l. Com 10 dias do início do ensaio a eficiência de degradação foi de 74,6%, com concentrações de 59,4 mg/l. Com 3 dias de ensaio o consumo de sulfato foi de 50,8% ou seja; as concentrações que estavam em 162,5 mg/l passaram para 82,5 mg/l. Com 10 dias de operação as concentrações de sulfato foram de 7,5 mg/l, representando consumo de 95,4% das concentrações iniciais. O consumo de sulfato foi de 98,8% ao final de 24 dias de operação.

A Tabela 5. 16 e Figura 5. 1Figura 5. 23 demonstram o comportamento da degradação de fenol e sulfato no ensaio de fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l).

**Tabela 5. 16 Variação temporal do consumo de fenol e redução do sulfato dos reatores em batelada alimentados com fenol , sulfato e extrato de levedura.**

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Fenol (mg/l)</b>	<b>Sulfato (mg/l)</b>
1	234,3	162,5
3	224,4	82,5
7	146,6	20
10	59,4	7,5
13	2,89	
17	0	5
19		6
24		2



**Figura 5. 23 Variação temporal do consumo de fenol e redução do sulfato dos reatores em batelada alimentados com fenol , sulfato e extrato de levedura.**

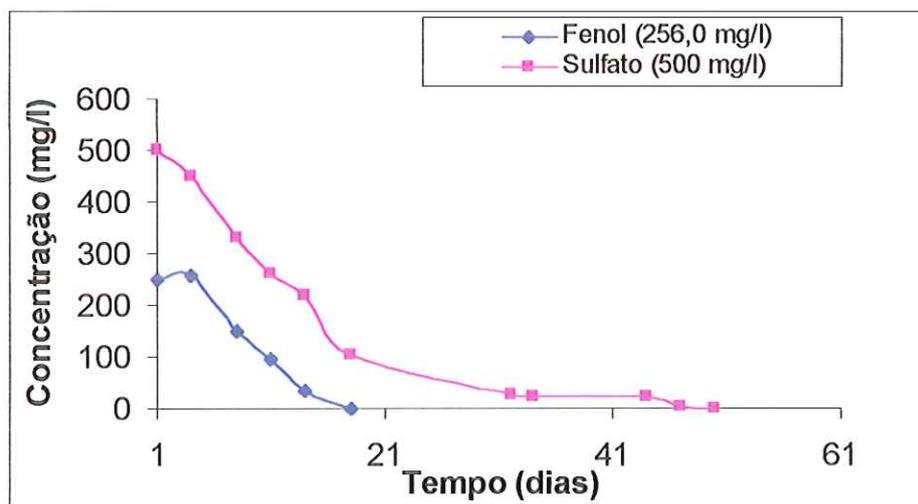
O próximo ensaio foi realizado com 256,0 mg/l de fenol, 500 mg/l de sulfato e 0,05% de extrato de levedura. Com 17 dias o ensaio teve 99,3% de eficiência na degradação de fenol com concentrações finais de 1,7 mg/l. Aos 7 dias do início do ensaio a eficiência de remoção do fenol foi de 62,2%; as concentrações iniciais de 256,0 mg/l passaram para 96,8 mg/l e, aos 10 dias as concentrações foram de 36,1 mg/l; o que equivaleu a 85,9% de degradação.

Aos 4 dias do início as concentrações de sulfato foram de 450 mg/l, equivalendo a 10% da concentração total consumida, que era de 500 mg/l. Com 17 dias as concentrações de sulfato eram de 105 mg/l, representando, com isso, 79% de remoção das concentrações iniciais. Aos 50 dias do ensaio as concentrações de sulfato foram zeradas.

A Tabela 5. 17 e Figura 5. 24 demonstram a degradação de fenol e consumo do sulfato em função do tempo.

**Tabela 5. 17** Variação temporal do consumo de fenol e sulfato dos reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.

Tempo (dias)	Fenol (mg/l)	Sulfato (mg/l)
1	256	500
3	251,2	-
4	-	450
7	151,3	331,3
10	96,8	260
13	36,1	220
17	1,7	105
32	-	26
34	-	25
44	-	25
47	-	4
50	-	0



**Figura 5. 24** Variação temporal do consumo de fenol e sulfato dos reatores em batelada alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.

A Figura 5. 25 demonstra a degradação de fenol dos ensaios com: fenol (239,7 mg/l); fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l) e; fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l).

O ensaio alimentado com fenol (239,7 mg/l) obteve 100% de eficiência na degradação de fenol em apenas 11 dias.

Os ensaios alimentados com fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l) e fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l) tiveram eficiência de degradação de, respectivamente, 98,8% e 99,3% com 17 dias de operação. O fato desses dois ensaios serem operados com concentrações diferentes de sulfato não influenciou no tempo em que o fenol foi degradado. Apesar dos reatores terem sido operados em condições distintas não houve diferenças significativas na eficiência de degradação do fenol. Esse fato foi confirmado com a aplicação do teste de hipótese A Nova, com nível de significância de 5%, obtendo-se  $p = 0,9096$ . Os três reatores foram, portanto, considerados estatisticamente iguais.

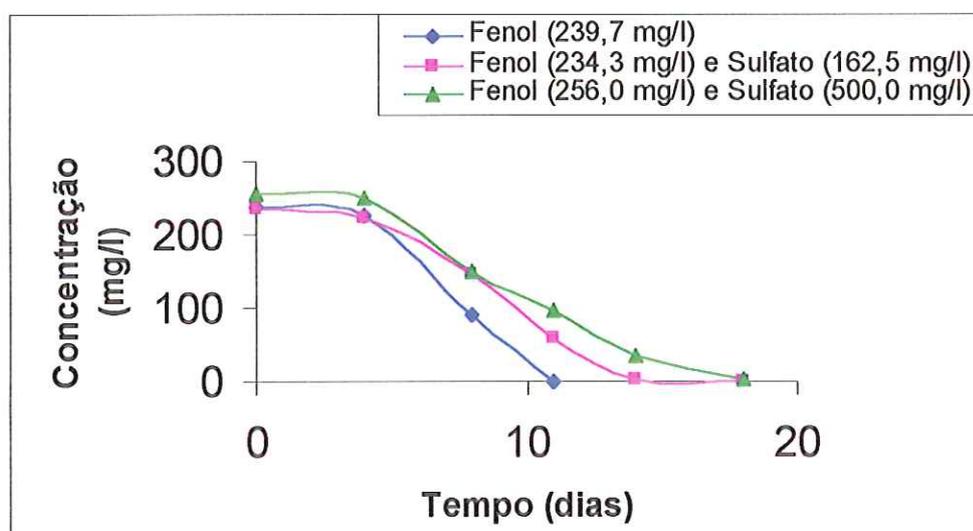


Figura 5. 25 Variação temporal do consumo de fenol nos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.

A Tabela 5. 18 descreve o comportamento dos sólidos totais voláteis dos ensaios de degradação dos reatores anaeróbios alimentados com fenol e sulfato e extrato de levedura. As variações das concentrações iniciais e finais de sólidos totais

voláteis foram próximas de 10% e, portanto muito pequenas não sendo possível inferir sobre variação de biomassa microbiana.

**Tabela 5. 18 Sólidos totais voláteis determinados no início e no final dos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.**

<b>Ensaio alimentado com fenol, sulfato e extrato de levedura</b>		
<b>Ensaio</b>	<b>*Inicial (g/l)</b>	<b>Final (g/l)</b>
Fenol (239,7 mg/l);	7,5	6,67
Fenol (234,3 mg/l) e Sulfato (162,5 mg/l)	7,5	6,80
Fenol (256,0 mg/l), Sulfato (500 mg/l)	7,5	6,60

\*Inicial - inóculo

Dois ensaios controles foram realizados com reatores alimentados com sulfato (170 mg/l) e; sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura (0,05%).

O ensaio de degradação alimentado com sulfato (170 mg/l) teve duração de 14 dias com consumo total nesse período. O ensaio alimentado com sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura (0,05%) teve redução total da fonte de enxofre em 13 dias.

Aos 3 dias do início os ensaios alimentados com sulfato (170 mg/l) e sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura tiveram, respectivamente, remoção de sulfato de 22,1% e 30%. Aos 9 dias as porcentagens de redução de sulfato foram de, respectivamente, 94,1% e 96,25%.

A Tabela 5. 19 e Figura 5. 26 demonstram o consumo de sulfato em função do tempo dos ensaios alimentados com sulfato (170 mg/l) e; sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura.

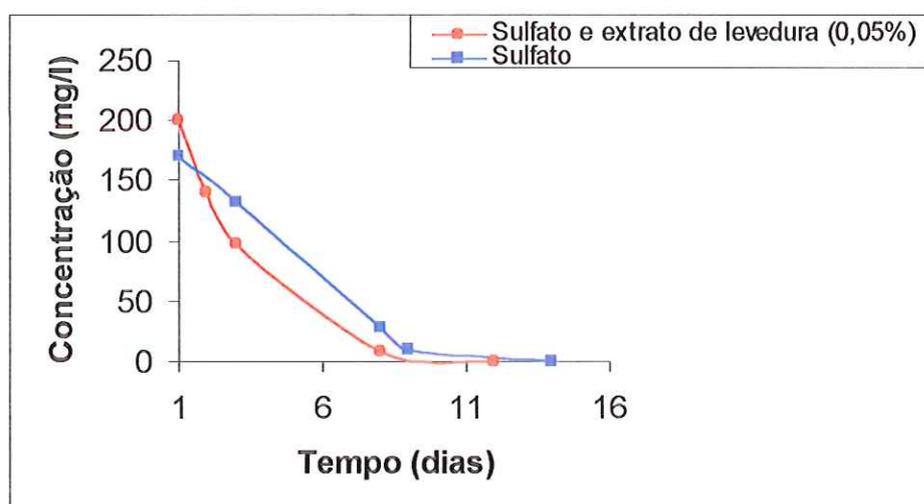
Pela análise comparativa dos ensaios observou-se que ambos tiveram comportamento semelhante. A presença do extrato de levedura no ensaio com sulfato não demonstrou diferenças significativas quando comparado com o ensaio alimentado somente com sulfato. Esse fato foi confirmado com a aplicação do teste de hipótese *t*-Student, com nível de significância de 5%, obtendo-se  $p = 0,6975$ . Os ensaios controle foram, portanto, considerados estatisticamente iguais.

Esses ensaios foram montados como controle. Como não foram adicionadas fontes de carbono, não se esperava o consumo de sulfato. Desse modo, duas hipóteses podem ser aceitas pelo consumo de sulfato nos reatores: (1) presença de

ácidos orgânicos no inóculo ; (2) decomposição celular com liberação de ácidos orgânicos e; (3) redução de sulfato por metabolismo microbiano endógeno possibilitando o consumo do sulfato.

**Tabela 5. 19** Variação temporal da redução de sulfato dos ensaios controles alimentados com sulfato e sulfato e extrato de levedura.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Sulfato (mg/l)</b>	<b>Sulfato e extrato de levedura (mg/l)</b>
1	170,0	200
3	132,5	140
4	-	97,5
8	27,5	-
9	10,0	7,5
13	-	0
14	0	-



**Figura 5. 26** Variação temporal da redução de sulfato dos ensaios controles alimentados com sulfato e sulfato e extrato de levedura.

A Tabela 5. 20, Figura 5. 27 e Figura 5. 28 descrevem o comportamento da produção de gás metano nos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura e nos ensaios controle alimentados com sulfato e extrato de levedura. A primeira amostragem foi efetuada após 24 horas da montagem dos ensaios.

No ensaio alimentado com fenol (239,7 mg/l) ocorreu produção 146,1 mg/l de gás metano no primeiro dia. A estabilização do processo se deu aos 59 dias do início do ensaio com 300,3 mg/l de produção de gás metano. Observou-se aumento de 205,5% da produção desse gás no período de operação desse ensaio.

No ensaio alimentado com fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l) obteve-se 127,7 mg/l de produção de gás metano no primeiro dia. A estabilização ocorreu aos 59 dias com produção de 290,5 mg/l de gás metano. Observou-se aumento de 227,5% na produção de gás metano no final desse ensaio.

No ensaio alimentado com fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l) ocorreu produção de 157,7 mg/l de gás metano no primeiro dia e aos 59 dias, 289,6 mg/l. Observou-se, então, aumento de 183,6% na produção desse gás.

Nos ensaio controle alimentado com sulfato (170 mg/l) ocorreu produção de 160,2 g/l de gás metano no primeiro dia e, no final do ensaio, aos 57 dias, 273,9 mg/l. Observou-se aumento de 171,0% na produção de gás metano.

No ensaio controle alimentado com sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura ocorreu 43,6 mg/l e, aos 31 dias 205,8 mg/l de produção de gás metano. Observou-se produção 472,0% de gás metano.

Em todos os ensaios houve produção crescente de gás metano. Isso pode ser devido à presença de ácidos orgânicos e hidrogênio advindos da degradação do fenol. Esses ácidos e hidrogênio foram utilizados pelas arqueas metanogênicas transformando-os em metano.

As morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp* também foram observadas mas, seu domínio ocorreu, principalmente, no final dos ensaios evidenciando ainda mais as razões do aumento nas concentrações de gás metano.

A Tabela 5. 21 descreve o comportamento dos sólidos totais voláteis dos ensaios controle alimentados com sulfato e extrato de levedura. As variações das concentrações iniciais e finais de sólidos totais voláteis foram próximas de 12% para o ensaio com sulfato e; 2% para o ensaio com sulfato e extrato de levedura. Essas variações foram muito pequenas e, portanto, não sendo possível inferir sobre variação de biomassa microbiana.

Vários exames microscópicos foram feitos durante a realização dos ensaios. Observou-se mudança na morfologia dos microrganismos. A Figura 5. 29 e Figura

5. 30 ilustram a diversidade morfológica dos microrganismos observada nos ensaios tais como cocos, bacilos, vibrios, filamentos, morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp* e cistos de sarcinas.

No início dos ensaios a diversidade morfológica foi maior. Foram evidenciados cocos, bacilos, vibrios, nanobactérias móveis, filamentos (Figura 5. 29 (a) e (c)) e principalmente cocos estriados (Figura 5. 29(f)).

**Tabela 5. 20** Variação temporal da produção de metano nos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura e; ensaios controles com sulfato e sulfato e extrato de levedura.

Tempo (dias)	Fenol (239,7 mg/l) (mg/l)	Fenol (234,3 mg/l) e Sulfato (162,5 mg/l) (mg/l)	Fenol (256,0 mg/l) e Sulfato (500 mg/l) (mg/l)	Sulfato (170 mg/l) (mg/l)	Sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura (mg/l)
1	146,1	127,7	157,7	160,2	43,6
2	-	-	-	132,7	-
3	-	-	-	-	73,4
4	-	-	149,9	141,9	-
6	-	-	-	-	103,9
7	189,1	154,4	171,2	-	-
8	-	-	-	191,1	178,4
10	279,1	273,2	210,5	-	-
12	-	-	-	202,0	-
13	254,6	263,3	-	-	201,5
15	-	-	-	-	178,7
16	258,8	249,8	-	-	-
18	175,4	322,7	315,7	-	-
19	320,0	162,4	242,1	-	-
20	-	-	-	-	191,8
22	-	-	-	-	214,7
23	292,6	270,0	147,6	-	-
24	-	-	-	-	226,2
25	-	-	-	267,8	-
27	-	-	-	-	261,9
30	-	-	-	-	203,3
31	-	-	-	-	205,8
32	-	-	-	327,8	-
36	317,9	294,4	-	-	-
38	319,2	307,7	238,2	-	-
39	-	-	-	389,7	-
40	310,7	313,0	163,1	-	-
41	-	-	-	-	-
43	311,6	317,3	-	-	-
45	361,8	342,9	-	-	-
46	-	-	-	-	-
48	-	-	-	285,5	-
50	337,8	335,9	304,8	-	-
52	400,1	377,4	294,1	-	-
53	-	-	-	271,1	-
55	-	-	-	295,9	-
57	364,8	333,7684	316,1	273,9	-
59	300,3	290,5	289,6	-	-

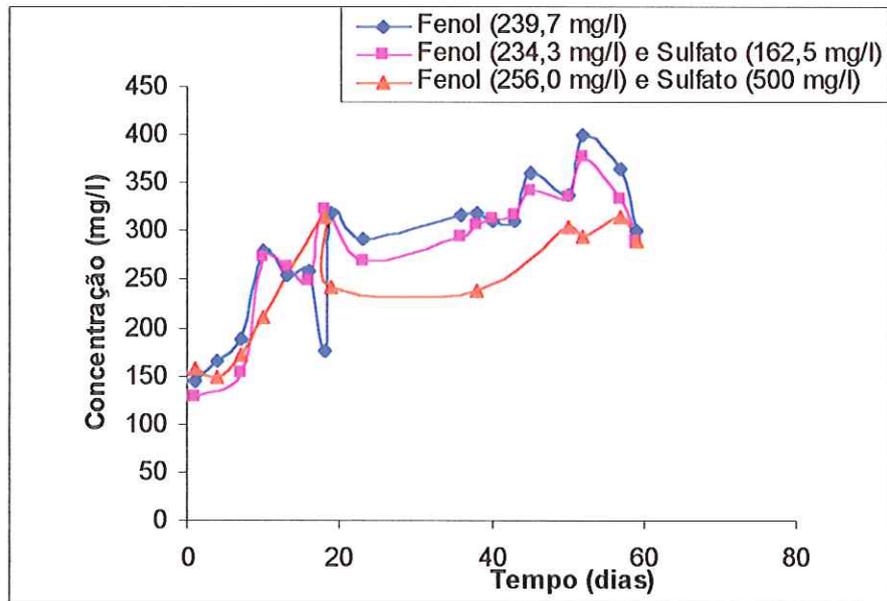


Figura 5. 27 Variação temporal da produção de metano dos reatores alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.

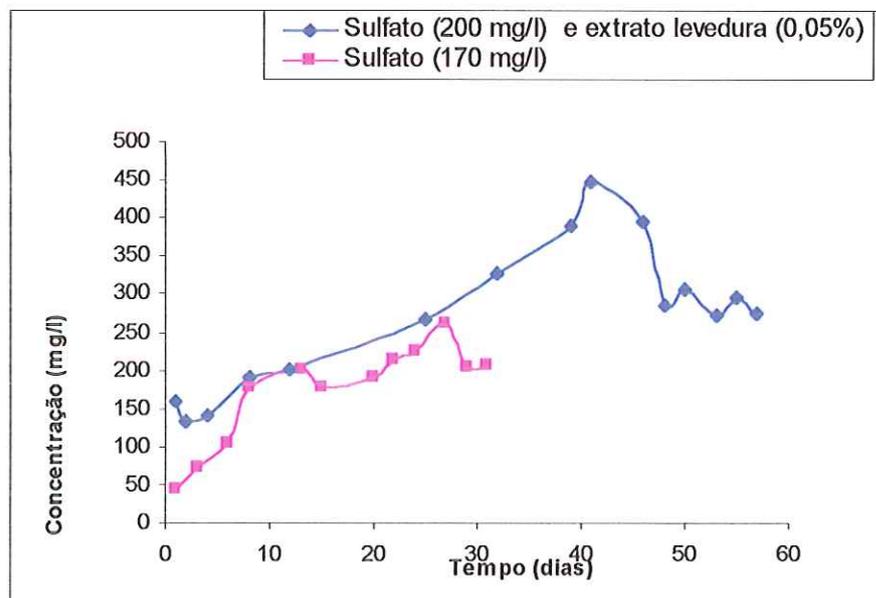


Figura 5. 28 Variação temporal da produção de metano nos ensaios controle alimentados com sulfato e sulfato e extrato de levedura.

**Tabela 5. 21 Sólidos totais voláteis determinados no início e no final dos ensaios alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.**

<b>Ensaio controle alimentos com sulfato</b>		
<b>Ensaio</b>	<b>*Inicial (g/l)</b>	<b>Final (g/l)</b>
Sulfato (170 mg/l)	9,8	8,58
Sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura	9,3	9,14

\*Inicial - inóculo

No final dos ensaios, quando o fenol já fora degradado, observou-se mudança na morfologia microbiana. Morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp* tornaram-se abundantes neste momento, tomando o lugar dos cocos estriados agora menos freqüentes ( Figura 5. 29 (d)). Através da Figura 5. 30 (b) de amostra final do ensaio observou-se a presença de filamentos, morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp* e alguns cocos com rompimento da parede celular. Essa mudança pode explicar, também, a produção de gás metano ao longo dos ensaios, evidenciando, mais uma vez, a presença de microrganismos metanogênicos na etapa final da degradação do fenol (ZHOU & FANG, 1997).

A Tabela 5. 22 descreve a caracterização morfológica dos ensaios com fenol, sulfato e extrato de levedura e nos ensaios controles com sulfato e sulfato e extrato de levedura.

No ensaio com fenol (239,7 mg/l) foram predominantes as presenças de bacilos retos, bacilos com extremidade arredondada, cocos com estrias, nanobactérias móveis e morfologias semelhantes *Methanosaeta sp*. Foram observadas as freqüências de: bacilos curvos, cocos, diplococos, estafilococos e filamentos.

No ensaio com fenol e sulfato (162,5 mg/l) foram predominantes as presenças de cocos, filamentos curtos e morfologias semelhantes á *Methanosaeta sp*. Foram observadas as freqüências de bacilos ovalados, cocos com estrias, estafilococos e filamentos longos. Registrou-se, também, pouca freqüência de bacilos com extremidade arredondada, bacilos retos, cocos em pares e filamentos septados.

No ensaio com fenol e sulfato (500 mg/l) foram predominantes as presenças de: filamentos longos e filamentos septados. Foram observadas as freqüências de

bacilos com extremidades arredondadas, cocos, cocos com estrias e morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.* Foram registradas presenças de morfologias semelhantes à *Methanosarcina sp.* As presenças de bacilos retos, bacilos ovalados e bacilos curvos não foram observados.

Tabela 5. 22 Caracterização morfológica dos ensaios de degradação de fenol, sulfato e extrato de levedura.

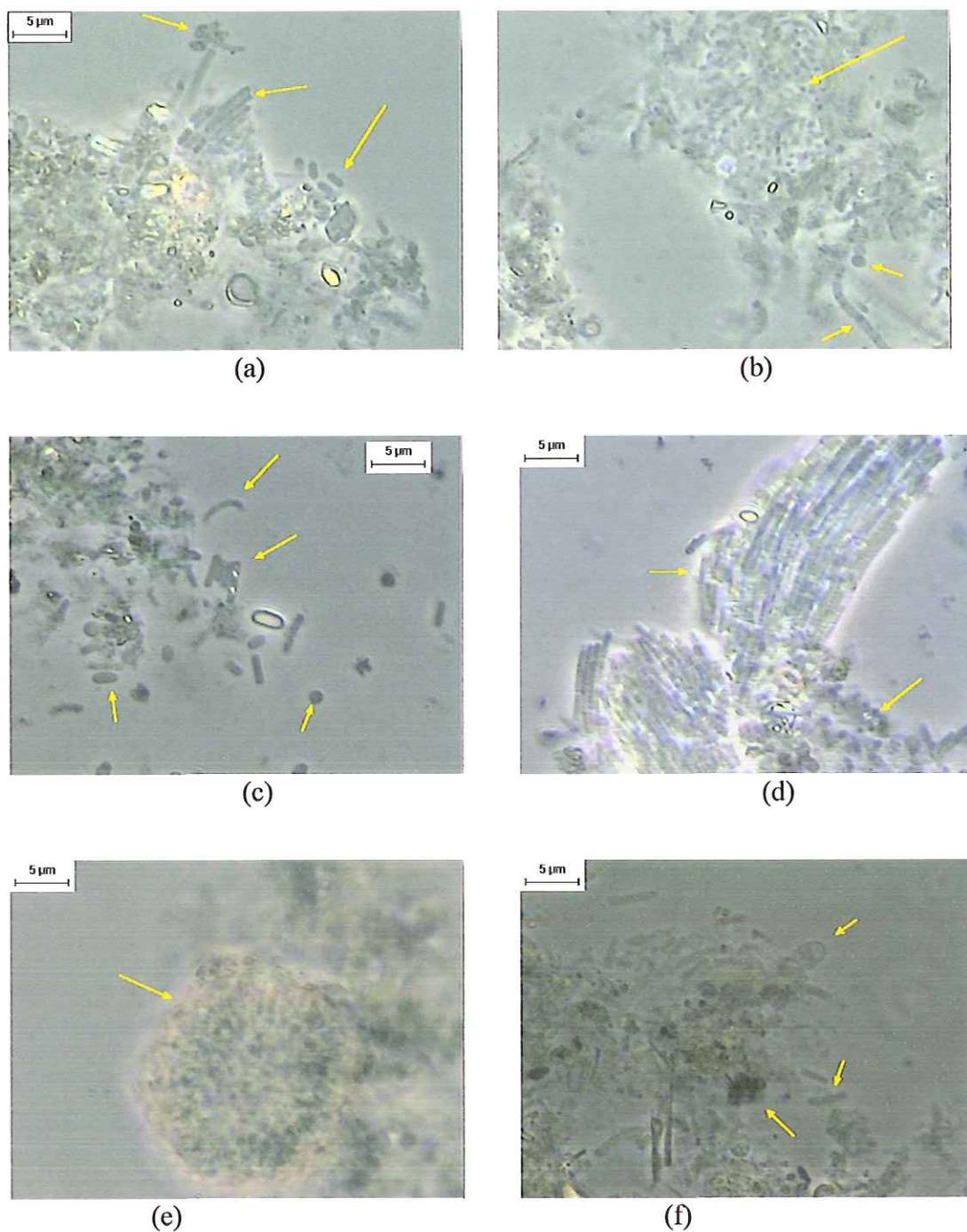
Morfologias	Frequência				
	Fenol (239,7 mg/l)	Fenol (234,3 mg/l) e Sulfato (162,5 mg/l)	Fenol (256,0 mg/l) e Sulfato (500 mg/l)	Sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura	Sulfato (170 mg/l)
<b>BACTÉRIAS</b>					
Bacilos com pontuações nas extremidades	-	-	-	-	-
Bacilos retos	++++	++	+	+++	++++
Bacilos com extremidade arredondada	++++	++	+++	+	-
Bacilos ovalados	+	+++	-	+++	++
Bacilos curvos	+++	+	-	-	++
Cocos	+++	++++	+++	++++	+++
Cocos com estrias	++++	+++	+++	+	++
Cocos em pares	++	++	++	+	+++
Estafilococos	++	+++	+	-	++++
Filamento curto	++	++++	++	+++	+++
Filamento longo	++	+++	++++	++++	++
Filamento septado	++	++	++++	+++	++
Nanobactérias móveis	++++	+	+	++++	++
<b>ARQUEAS METANOGENICAS</b>					
<i>Methanosarcina sp.</i>	-	-	+	-	-
<i>Methanosaeta sp.</i>	++++	++++	+++	++++	++++
Cocos fluorescentes					
Bacilos fluorescentes					
Bacilos retos fluorescentes					

(++++) predominantes; (++++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não observados.

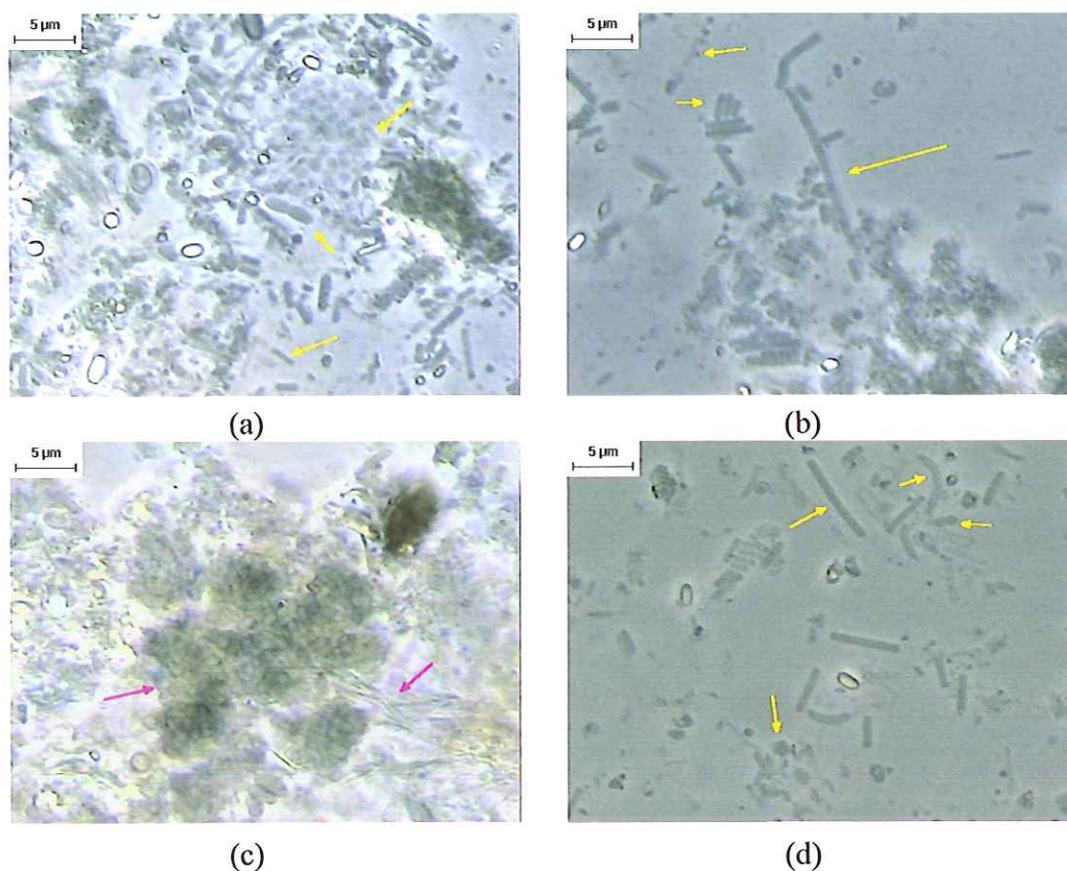
No ensaio controle com sulfato (170 mg/l) foram predominantes as presenças de cocos, filamentos longos, nanobactérias móveis e morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.* Foram observadas as presenças de bacilos retos, bacilos ovalados, filamentos longos e septados.

Em todos os ensaios de degradação realizados e nos reatores controles não foram detectados ácidos orgânicos pelas análises de cromatografia gasosa. Provavelmente, nas diversas fases da degradação, onde o composto foi degradado vários ácidos foram produzidos e, instantaneamente, consumidos pelos microrganismos presentes.

A adição de extrato de levedura, em ambos ensaios, pareceu ser o fator acelerador na degradação do fenol. No ensaio alimentado com fenol sulfato e co-substratos observou-se, com a injeção de extrato de levedura no trigésimo dia, a aceleração na degradação com o decréscimo das concentrações de fenol. No ensaio alimentado com fenol sulfato e extrato de levedura observou-se a degradação do fenol em menor intervalo de tempo. Nesse caso pode- admitir-se que a adição de extrato de levedura no início do ensaio acelerou o processo degradação de fenol fazendo com que o composto fosse removido mais rapidamente, quando comparado com o ensaio com fenol e sulfato e co-substratos.



**Figura 5. 29** Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência dos ensaios de degradação alimentados com Fenol (239,7 mg/l) e extrato de levedura (0,05%): (a) cocos e filamentos septados (b) morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp., bacilos com extremidades arredondadas e cocos ovalados. Fenol (234,3 mg/l), sulfato (162,5 mg/l) e extrato de levedura (0,05%): (c) vibrios, morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp., cocos e bacilos com extremidades arredondadas; (d) morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp. e cocos. Fenol (256,0 mg/l), sulfato (500 mg/l) e extrato de levedura (0,05%): (e) morfologias semelhantes à *Methanosarcina* sp., (f) cocos estriados, estafilococos e bacilos retos.



**Figura 5. 30** Morfologias observadas sob microscopia de contraste de fase e fluorescência dos ensaios controle com sulfato (170 mg/l) : (a) cocos, bacilos com extremidades arredondadas e bacilos retos; (b) cocos, filamentos e morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp. Ensaios controle com sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura (0,05%): (c) estafilococos e filamentos; (d) diplococos em pares, cocos, bacilos retos e vibrios.

## 6. Análises de biologia molecular através de técnicas de extração de DNA (DGGE)

Foram aplicadas técnicas de PCR/DGGE com a finalidade de comparar e avaliar populações do Domínio *Archaea*, Domínio *Bacteria* e do Grupo das BRS presentes nos reatores com as seguintes condições nutricionais: (1) fenol, sulfato e co-substratos; (2) fenol, sulfato e extrato de levedura e; (3) condições controles.

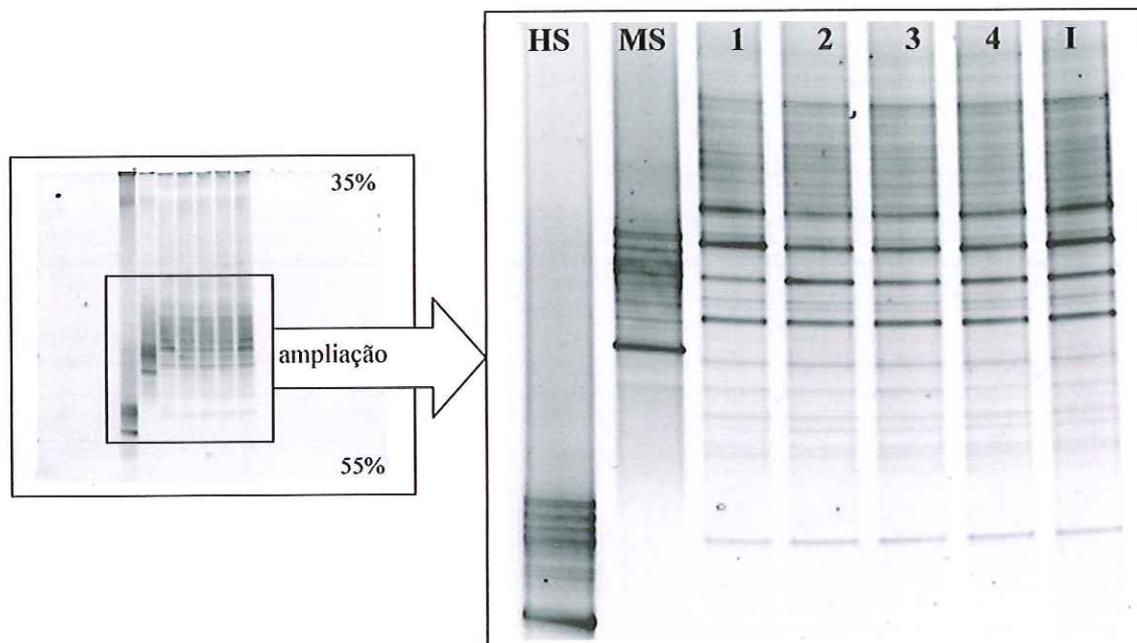
### 6.1. Ensaio alimentados com fenol, sulfato e co-substratos

A Figura 6. 1 ilustra o perfil das bandas de DGGE para o Domínio *Archaea*. Através desta análise observou-se homogeneidade na estrutura das populações das comunidades microbianas nas bandas nos diferentes ensaios. Foi observado, portanto que não houve variações relevantes na estrutura das comunidades microbianas.

As populações microbianas advindas do inóculo (I) permaneceram nos reatores alimentados com fenol; fenol e sulfato; fenol, sulfato e lactato; e fenol, sulfato e etanol. Essa comprovação pode ser evidenciada nas análises de microscopia óptica onde foi constatado presença de morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp* e *Methaosarcina sp* em todos os ensaios, além de bacilos fluorescentes em algumas condições.

A Figura 6. 2 ilustra o comportamento do Domínio *Bacteria* nos reatores alimentados com fenol, sulfato e co-substratos.

Diferenças foram observadas com relação à composição das bandas nos diferentes ensaios. Na seta A observa-se a presença da banda no inóculo (canaleta I) e nos reatores alimentados com fenol; fenol, sulfato e lactato e; fenol, sulfato e etanol (canaletas 1,3 e 4). Essa banda não apareceu no ensaio com fenol e sulfato (canaleta 2). Ou seja, a população microbiana que estava presente no inóculo permaneceu nos reatores alimentados com fenol e co-substratos e desapareceu no reator que continha somente fenol e sulfato. Essa ocorrência pode sugerir que houve seleção da população microbiana não ocorrendo para essa última condição.



**Figura 6. 1** Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e adição de co-sustratos com primers específicos para o Domínio *Archaea* (1100 FGS e 1400 R); (HS) controle positivo *Archaea* DSM668 – *Halobacterium salinarum*; (MS) controle positivo sarcinas ATCC 43241 – *Methanosarcina barkeri*; (1) fenol (329,3 mg/l); (2) fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l); (3) fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l); (4) fenol (322,3 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,3 mg/l); (I) inóculo. % do gradiente em gel desnaturante: 35% - 55%.

A seta B indica a banda que só apareceu no inóculo (canaleta I). Pode ter havido alteração da comunidade microbiana nos reatores que, com a presença do fenol (canaletas 1,2,3,4), tornaram o ambiente tóxico para essa população microbiana.

A seta C evidencia a banda, somente, no ensaio com fenol e sulfato; nas demais canaletas ela não apareceu. Isso evidenciou, mais uma vez, alteração na diversidade microbiana nos reatores que também tiveram composição diferente.

A alteração na diversidade do Domínio *Bacteria* pode ter sido decorrente da composição nutricional dos reatores, possibilitando, assim, o surgimento de novas populações microbianas adaptadas a esse meio (seta C), ao seu desaparecimento (seta A), ou à manutenção, por exemplo, de outras populações (setas D, E e F).

A Figura 6. 3 demonstra o perfil das bandas de DGGE para o grupo das BRS no ensaio com fenol, sulfato e co-sustratos.

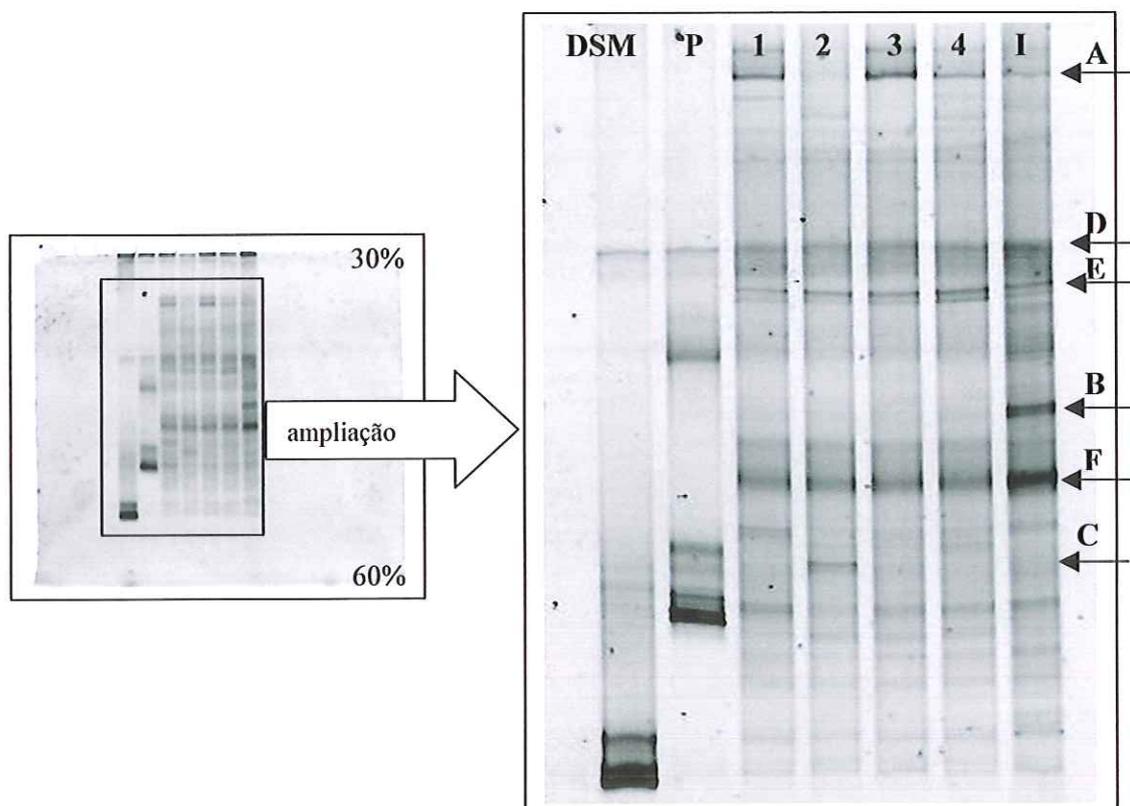
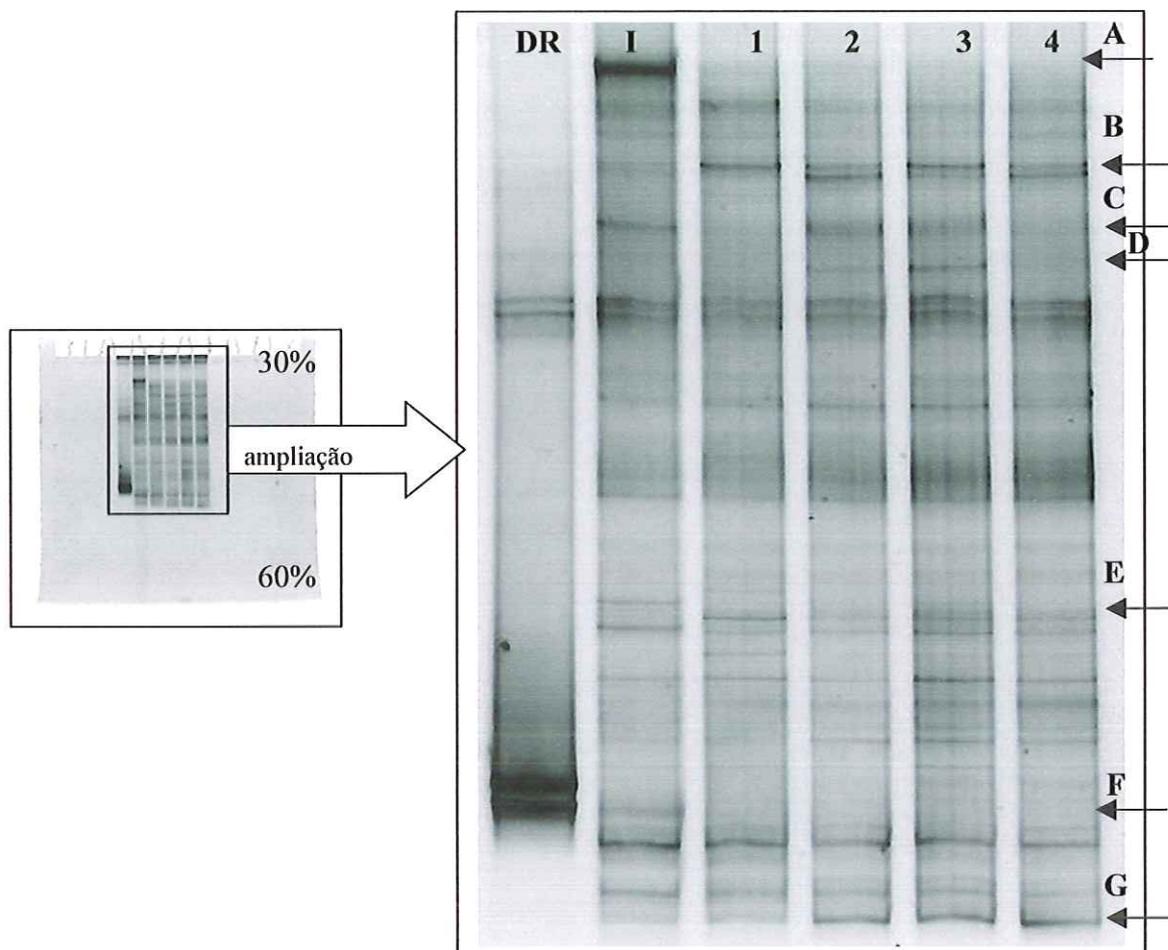


Figura 6. 2 Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e adição de co-substratos com primers específicos para o Domínio *Bacteria*: (DSM) controle positivo bactéria – *Allochromatium vinosan* ; (P) controle positivo *Pseudomonas sp*; (1) fenol (329,3 mg/l); (2) fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l); (3) fenol (322,3 mg/l), sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l); (4) fenol (322,3 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,3 mg/l); (I) inóculo. % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 60%.

As populações microbianas se apresentaram de maneira heterogênea nos reatores e no inóculo. Na seta C fica evidenciada a presença de populações microbianas nas canaletas I, 2 e 3. Essa ocorrência pode sugerir tratar-se de populações microbianas específicas presentes no inóculo, que degradaram fenol na presença de sulfato e lactato. Na seta D observam-se bandas formadas nas canaletas 2 e 3. Nesse caso, evidenciaram-se populações microbianas que, provavelmente, surgiram pela presença do fenol, sulfato e lactato. Na seta G observa-se presença de banda em todos reatores (canaletas I, 1, 2, 3 e 4); porém em menor intensidade no inóculo e reator alimentado com fenol (canaletas I e 1). Essa ocorrência pode indicar que a população microbiana existente no inóculo permaneceu no reator com fenol e aumentou nos ensaios com fenol, sulfato e co-substratos. Essa evidencia pode, provavelmente, sugerir que sejam microrganismos

que degradam fenol na presença de sulfato e favorecidas pelos co-substratos, como lactato e etanol.



**Figura 6. 3** Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e co-substratos com primers específicos do grupo BRS (AGMSFGC, e 907R); (DR) controle positivo *Desulfotomaculum ruminis* ATCC-23193; (1) fenol (329,3 mg/l); (2) fenol (307,3 mg/l) e sulfato (160 mg/l); (3) fenol (322,3 mg/l) sulfato (160 mg/l) e lactato (478,2 mg/l); (4) fenol (322,3 mg/l), sulfato (150 mg/l) e etanol (129,3 mg/l); (I) inóculo. % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 60%.

A seta B destacou a presença de bandas nos ensaios com fenol e sulfato e co-substratos (canaletas 2,3 e 4). Essa evidência pode sugerir que essas populações sejam formadas por BRS pois, nesses ensaios, tinha presença de sulfato. Além disso, na canaleta 1, que é o ensaio alimentado somente com fenol, essa banda não apareceu, podendo sugerir que tal população seja formada por microrganismos redutores de sulfato.

As setas A e F indicam alteração da população microbiana que apareceu somente no inóculo (canaleta I) e desapareceu nos demais reatores (canaletas 1, 2, 3 e 4). Contrariamente observou-se o surgimento de banda nos reatores e sua ausência no inóculo (Seta E). Com a presença de fenol e sulfato, provavelmente, podem ter surgido populações específicas que consumiram esses compostos.

Deve-se destacar, ainda, a presença de outras populações indicadas por seis bandas no inóculo e em todas as condições nutricionais. Tal fato é justificado pela caracterização do inóculo, que foi enriquecido para favorecer a presença de BRS.

## 6.2. Ensaio alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura

A Figura 6. 4 ilustra o perfil das bandas de DGGE para o Domínio *Archaea*. Através desta análise, observou-se homogeneidade na estrutura das populações das comunidades microbianas nas bandas dos diferentes ensaios, como também já salientado para os ensaios com fenol, sulfato e co-substratos. Foi observado, portanto que não houve variações relevantes na estrutura das comunidades microbianas de arqueas metanogênicas.

As populações microbianas advindas do inóculo (I) permaneceram nos ensaios alimentados com fenol; sulfato e extrato de levedura e nos ensaios controles com sulfato e sulfato e extrato de levedura. Essa comprovação foi evidenciada nas análises de microscopia óptica onde ocorreram presenças de morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. e *Methaosarcina* , em todos os ensaios.

A Figura 6. 5 ilustra o perfil das bandas de DGGE para o Domínio *Bacteria*. Alterações foram observadas nas populações microbianas com relação ao inóculo e diferentes ensaios. As setas A e B indicam presença de população microbiana no inóculo e seu desaparecimento nos diferentes ensaios. Esse comportamento pode ser devido à presença de fenol e sulfato que, provavelmente inibiram o desenvolvimento dessas populações. A seta C indica a presença da população microbiana no inóculo e nos ensaios com fenol, sulfato e ensaios controle (canaletas I, 2, 3, 4, e 5). Evidenciou-se, também sua ausência no ensaio que continha somente fenol (canaleta 1). Essa ocorrência pode evidenciar tratar-se de uma população que utilizou sulfato como aceptor final de elétrons na degradação do

fenol. A seta D evidenciou a presença de populações microbianas no inóculo e no ensaio com fenol, sulfato e extrato de levedura. Essa população não ocorreu no ensaio controle que, portanto, não continha fenol. Pode-se inferir, provavelmente, que essa população seja consumidora de fenol e, na ausência desse composto, não ocorreu seu crescimento.

A Figura 6. 6 ilustra o perfil das bandas de DGGE para o grupo das BRS nos ensaios com fenol, sulfato e extrato de levedura e nas condições controles. Alterações foram observadas nas populações microbianas com relação ao inóculo e diferentes ensaios. As setas A, C e E indicam a ausência da população microbiana no inóculo e seu surgimento nos ensaios (canaletas 1, 2, 3, 4 e 5). Essa ocorrência pode evidenciar a seletividade microbiana que ocorreu nos ensaios, ou seja; reatores alimentados com fenol e sulfato auxiliaram no surgimento de populações microbianas específicas que consumiram esses compostos. A seta B indica a presença de população microbiana no inóculo (canaleta I) e nos reatores indicados pelas canaletas 1, 2, 3 e 5. No reator controle com sulfato e extrato de levedura (canaleta 4) a população microbiana apareceu em menor intensidade. Essa evidência sugere que microrganismos presentes no inóculo foram selecionados e, provavelmente, nessas condições (sulfato e extrato de levedura), não se desenvolveram. A seta D indica o surgimento de banda nas canaletas I e 1. Essa população microbiana, provavelmente advinda do inóculo permaneceu, somente, no ensaio que continha fenol. Essa evidência pode sugerir que sejam microrganismos fermentativos.

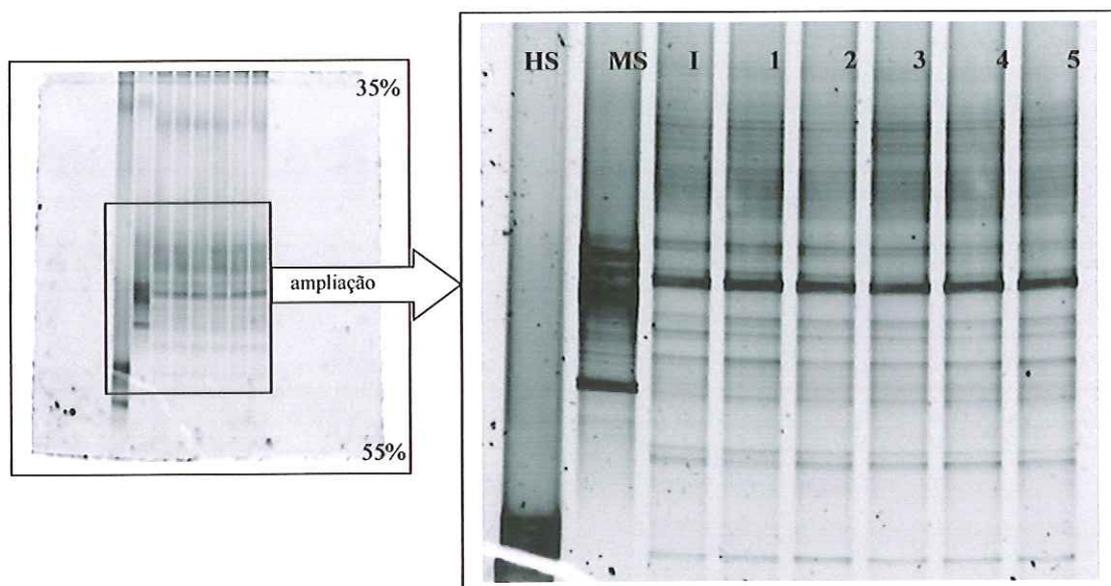


Figura 6. 4 Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e extrato de levedura com primers específicos para o Domínio *Archaea* (1100 FGS e 1400 R); (HS) controle positivo *Archaea* DSM668 – *Halobacterium salinarum*; (MS) controle positivo sarcinas ATCC 43241 – *Methanosarcina barkeri*; (I) lodo inicial do ensaio; (1) Fenol (239,7 mg/l); (2) Fenol (234,3 mg/l) e Sulfato (162,5 mg/l); (3) Fenol (256,0 mg/l) e Sulfato (500 mg/l); (4) Sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura; (5) Sulfato (170 mg/l). % do gradiente em gel desnaturante: 35% - 55%.

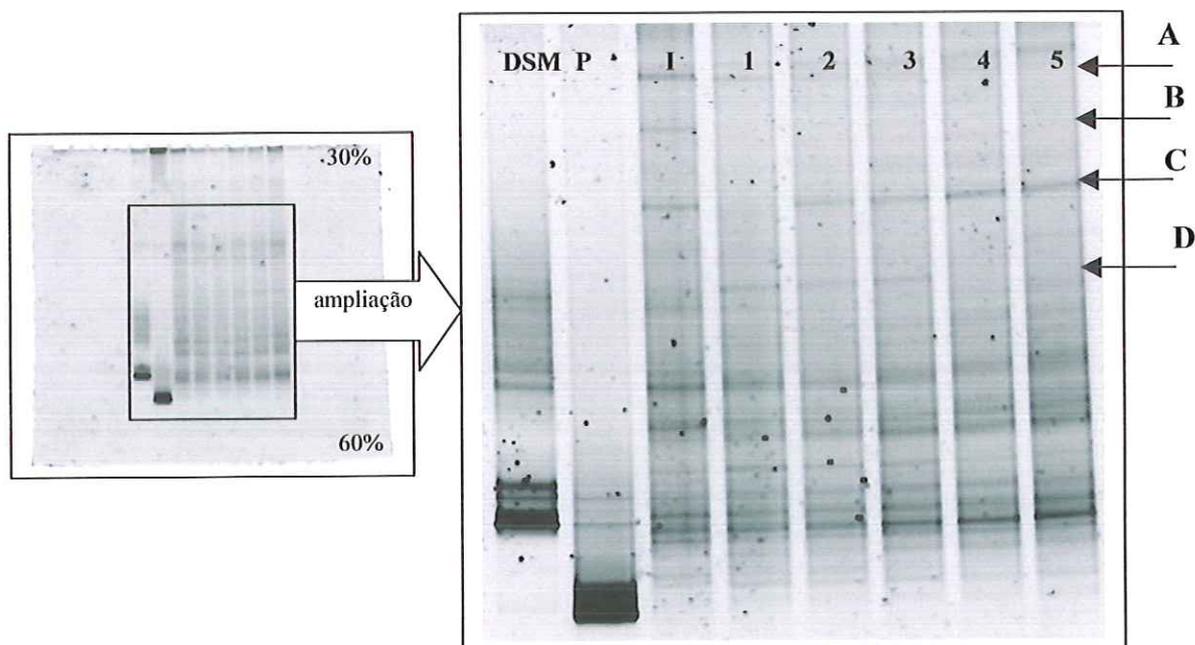


Figura 6. 5 Perfil das bandas de DGGE do ensaio de degradação de fenol, sulfato e extrato de levedura com primers específicos para o domínio *Bacteria* (DSM) controle positivo bactéria – *Allochromatium vinosan* ; (P) controle positivo *Pseudomonas sp*; (I) inóculo; (1) fenol (239,7 mg/l); (2) fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l); (3) fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l); (4) sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura; (5) sulfato (170 mg/l). % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 60%.

Neste caso, evidenciou-se, também, a manutenção de populações advindas do inóculo, que foram observadas em todos os ensaios e confirmadas pela presença de, aproximadamente, oito bandas.

Através das análises de PCR/DGGE observou-se alteração na diversidade microbiana principalmente para o Domínio *Bacteria* e Grupo das BRS. Essas diferenças foram, mais facilmente, percebidas em relação ao inóculo e entre os diversos reatores. A alteração na diversidade microbiana pode ter sido decorrente da composição do meio que, nesse caso, foi específico para BRS e a composição do inóculo que continha biomassa previamente adaptada à redução do sulfato. Essas condições propiciaram surgimento e desenvolvimento de populações microbianas capazes de degradar fenol e utilizar sulfato como aceptor final de elétrons.

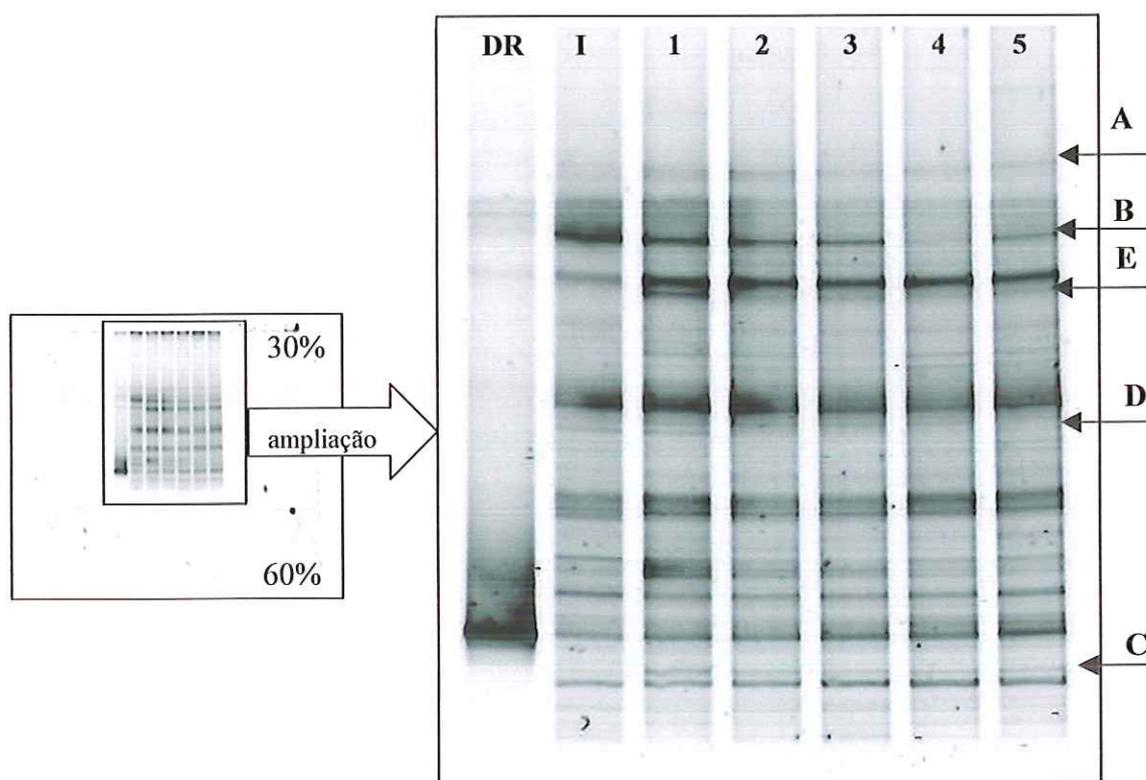


Figura 6. 6 Perfil das bandas de DGGE dos ensaios de degradação de fenol, sulfato e extrato de levedura e condições controles com sulfato e extrato de levedura com primers específicos do grupo BRS (AGMSFGC e 907R); (DR) controle positivo ATCC-23193 - *Desulfotomaculum ruminis*; (I) inóculo; (1) fenol (239,7 mg/l); (2) fenol (234,3 mg/l) e sulfato (162,5 mg/l); (3) fenol (256,0 mg/l) e sulfato (500 mg/l); (4) sulfato (200 mg/l) e extrato de levedura; (5) sulfato (170 mg/l). % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 60%.

Através das análises de PCR-DGGE, para o Domínios *Archaea* e Domínio *Bacteria* e grupo das BRS observou-se, em todas as amostras, presença de bandas

existentes no inóculo e que permaneceram em todos os ensaios. Essa ocorrência pode sugerir que as populações microbianas advindas do inóculo que permaneceram em todos os reatores e se repetiram sejam os microrganismos responsáveis pela degradação do fenol na presença de sulfato. Ou seja, essas evidências puderam sugerir que os microrganismos presentes no inóculo pertencentes ao domínio *Bacteria* e do grupo das BRS sejam, provavelmente, os responsáveis pela degradação do fenol, nessas condições. No entanto, para o Domínio *Archaea* não foram observadas diferenças significativas nas amostras do inóculo e dos reatores anaeróbios. Ou seja, a análise sugeriu a manutenção das populações que foram confirmadas através de microscopia de contraste de fase e fluorescência que destacaram, principalmente a presença de sarcinas (*Methanosarcina* sp.), bacilos retos (*Methanosaeta* sp.) e bacilos fluorescentes. Para confirmar tais suposições seria necessário identificar os microrganismos presentes nas populações. Existem técnicas que permitem identificação dos membros da população microbiana como a clonagem e o DGGE de marcadores moleculares; ambos seguidos por sequenciamento dos fragmentos amplificados e isolados. No entanto, a aplicação de tais técnicas, não foi o objetivo deste trabalho.

## 7. CONCLUSÕES

### Ensaio de enriquecimento :

- O enriquecimento do lodo foi importante para elevar a biomassa e a diversidade microbiana e, com isso, possibilitar a remoção de fenol nas fases seguintes.

### Ensaio em reatores em batelada alimentados com fenol e sulfato

- No ensaio com fenol (64,2 mg/l) e sulfato (46,3 mg/l), nas condições experimentais, não ocorreu sulfetogênese; apenas degradação de fenol.
- No ensaio com fenol (469,9 mg/l) e sulfato (283,0) ocorreu degradação de fenol com redução de sulfato, no período de 185 dias. Foi um ensaio bastante lento e, portanto, pouco eficiente.

### Ensaio de degradação de fenol, sulfato e co-substratos

- Em todos os ensaios ocorreu remoção de fenol.
- A presença de co-substratos (lactato e etanol) não favoreceu a degradação do fenol. Ou seja, todos reatores tiveram o mesmo desempenho.
- A adição de extrato de levedura, após trinta dias de operação, em todos ensaios, foi essencial para a degradação anaeróbia, pois, através dela, se conseguiu utilização de fenol e redução de sulfato.

### Ensaio de degradação de fenol, sulfato e extrato de levedura

- Em todos os ensaios ocorreu remoção de fenol.
- A adição inicial do extrato de levedura em todos os ensaios auxiliou a degradação anaeróbia e, com isso, se conseguiu utilização de fenol em menor intervalo de tempo.

#### Ensaio controle alimentados com sulfato e; sulfato e extrato de levedura

- Em todos os ensaios ocorreu consumo de sulfato.
- O ensaio com sulfato e extrato de levedura teve comportamento semelhante ao ensaio alimentado com sulfato. A adição inicial do extrato de levedura não ocasionou diferença significativa no consumo de sulfato.

#### Análises de Biologia Molecular

- As populações microbianas do Domínio *Archaea*, advindas do inóculo, permaneceram nos reatores alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura.
- As populações microbianas do Domínio *Bacteria* e grupo das BRS, advindas do inóculo, sofreram alteração. Algumas populações desapareceram na presença de fenol, sulfato e extrato de levedura; outras surgiram com a presença desses compostos e; várias foram mantidas em todos ensaios, favorecidas pela composição nutricional do inóculo.
- A evidência na alteração das populações do Domínio *Bacteria* e Grupo das BRS pode indicar que, provavelmente, sejam esses os microrganismos responsáveis pela degradação do fenol, nas condições estudadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA, AWWA and WEF (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20<sup>th</sup> edition, American Public Health Association, Washington, D.C.
- ARAÚJO, J. C. de (2001). *Biofilmes Anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação in situ com sondas fluorescentes*. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- BALCH, W.E.; WOLFE, R.S. (1976). *New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2 – mercaptoethane sulfonic acid (HS – CoM) – dependent growth of Metha bacterium ruminantium in a pressurized atmosphere*. Applied Environmental Microbiology. 32: 781-791.
- BARKOVSKII A. L.; KOSHUNOVA V.E.; POZDNYACOVA L.I. (1995). *Catabolism of phenol and benzoate by Azospirillum strains*. Applied Soil Ecology. Vol. 2 p. 17-24.
- BISAILLON J.; LÉPINE F.; BEAUDET R. (1991). *Study of the methanogenic of phenol via carboxylation to benzoate*. Can.J.Microbiol. 37: 573-576.
- BOLAÑOS, M.L. (2001) . *Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas*. Tese de Doutorado. SHS - -EESC – USP. São Carlos.
- BOLAÑOS, R.M.L.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2001). *Phenol degradation in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor under mesophilic conditions*. Water Science and Technology, vol. 44, no. 4, pp. 167-174.
- BOOPATHY, R. (1995). *Isolation and characterization of a phenol-degrading, sulfate-reducing bacterium from swine manure*. Environmental Research Division. Building 203. Argonne National Laboratory, Argonne, IL. 60439, USA.

- BOOPATHY, R. (1997). *Anaerobic Phenol Degradation by Microorganisms of Swine Manure*. Environmental Research Division. Building 203. Argonne National Laboratory, Argonne, IL. 60439, USA. *Current Microbiology* vol. 35: 64-67.
- BOYD, S.A.; SHELTON, D.R.; BERRY, D.; TIEDJE, J.M. (1983). *Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 46, no. 1, p. 50-54.
- CETESB (1990). *Determinação de fenóis em águas – Método Colorimétrico da 4-Amino Antipirina* L 5. 125. Set. 1990. p. 1-15.
- CHANG, Y.J.; NISHIO, N.; NAGAI, S. (1995). *Characteristics of granular methanogenic sludge grown on phenol synthetic medium and methanogenic fermentation of phenolic wastewater in a UASB reactor*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 79, nº 4, 348-353.
- COSTA, S.R.A. (1994). *Remoção de fenol em reator anaeróbico de leito fluidificado de carvão ativado*. Tese de doutorado. SHS - EESC – USP. São Carlos.
- DANIELS, L.; BELAY N.; RAJAGOPAL B.S. (1986). *Assimilatory Reduction of Sulfite Methanogenic Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 1986, p. 703-709.
- DOMINGUES, M.R. (2001) *Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e leito fixo, sob condições termofílicas*. Tese de mestrado. SHS – EESC – USP. São Carlos.
- FANG, H.P.; CHEN, T.; LI, Y.Y.; CHUI, H.K. (1995). *Degradation of phenol in wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket reactor*. *Water Research*. Vol. 30, no. 6, pp. 1353-1360.

- GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G. (2000). *Rapid Method for coextration od DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbil community composition*. Applied and Environmental microbiology. Vol. 66, no. 12, pp. 5488-5491.
- HOLUM, J.R. (1994). *Fundamentals of general organic and biological chemistry*. Jhon Willey & Soons, ins.
- KAR S.; SWAMINATHAN T.; BARADARAJAN A. (1996). *Studies on biodegradation of a mixture of toxic and nontoxic pollutant using Arthrobacter species*. Bioprocess Engineering 45: 195-199.
- KARLSSON, A.; EJLERTSSON, J.; NEZIREVIC D.; SVENSSON B.H. (1999). *Degradation of phenol under meso and thermophilic, anaerobic conditions*. Anaerobe 5, no. 1998.0187, pp. 25-35.
- KARLSSON A.; EJLERTSSON J.; SVENSSON B.H. (2000). *CO<sub>2</sub>-dependent fermentation of phenol to acetate, butyrate and benzoate by an anaerobic, pasteurized culture*. Arch Microbiol 173: 398-402.
- KLEIKEMPER, J.; SCHROTH, M.H.; SIGLER, W.V.; SCHMUCKI, M.; BERNASCONI, S.M.; ZEYER, J. (2002). *Activity and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer*. Applied and Environmental Microbiology. Apr. 2002 .p.1516-1523.
- KNIGHT V.K.; KERKHOF L.J.; HAGGBLOM M.M. (1999). *Community analyses of sulfifogenic 2-bromophenol-dehalogenating and phenol-degradaing microbial consortia*. FEMS Microbiology Ecology 29. 137-147.
- KUDO Y.; NAKAJIMA T.; MIYAKI T.; OYAIZU H. (1997). *Ethanogen Flora Of Paddy Soils In Japan*. Tókió. Japan. FEMS Microbiology Ecology 22: 39-48.

LARCHER W. (2000). *Ecofisiologia Vegetal*. 531 pgs. RIMA Editora. São Carlos – SP.

LÉTOURNEAU, L.; BISAILLON, J.G.; LÉPINE, F.; BEAUDET, R. (1995). *Spore-forming bacteria that carboxylate phenol to benzoic acid under anaerobic conditions*. Canadian Journal Microbiology. Vol. 41: 266-272.

MINISTÉRIO DA SAUDE. (1990). *Normas e padrão de potabilidade das águas destinadas ao consumo humano*. PORTARIA 36/GM. Brasília.

MORAES, E. M., ADORNO, M. A. T., ZAIAT, M., FORESTI, E. *Determinação de Ácidos Voláteis por Cromatografia Gasosa em Efluentes de Reatores Anaeróbios Tratando Resíduos Líquidos e Sólidos* In: VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, 2000, Recife - PE. Anais da VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia. Recife - PE: Editora Universitária - UFPE, 2000. v.2. p.235 – 238

NAKAGAWA, T.; SATO, S.; YAMAMOTO Y.; FUKUI, F. *Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium*. Water Research 36 (2002), p. 2813-2823.

NIELSEN A.T.; LIU W-T; FILIPE C.; GRADY L.; MOLIN S.; STAHL D.A. (1999). *Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor*. Applied an environmental microbiology. 1251-1258.

PLAS, C.; HARANT, H.; DANNER, H.; JELINEK, E.; WIMMER, K.; HOLUBAR, P. & BRAUN, R. (1992). *Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colorless sulphur bacteria*. Applied Microbiology and Biotechnology, 36: 817-82.

RUSSEL, J.B (1994). Química Geral, 2a. edição, vol. 2 – Makron Books.

- SAKAMOTO, I.K. (2001). *Comparação da estrutura de comunidades microbianas complexas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica de fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)*. Tese de Doutorado. SHS - EESC – USP. São Carlos.
- SAMBROOK, J., E., F FRITSCH, T. MANIATS. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANCINETTI, G.P.; VARESCHE, B.B.<sup>a</sup>; SILVA, E.L. (2004). *Kinetic of phenol degradation using anaerobic batch reactor*. 10<sup>th</sup> World Congress -Anaerobic Digestion. Canadá.
- SARFARAZ,S.;THOMAS, S.; TEWARI,U.K.; IYENGAR, L. (2004). *Anoxic treatment of phenolic wastewater in sequencing batch reactor*. Water research. Vol 38: 965-961.
- SCHIE, P.M.; YOUNG, L.Y. (1998). *Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria*. Applied and Environmental. Microbiology, Vol. 64: 2432-2438, no.7.
- SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UE M.; HIRAIISHI A.; KATO N. (2000). *Isolation and characterization of a new denitrifying Spirillum capable of anaerobic degradation of phenol*. Applied and Environmental. Microbiology. Vol. 66 no. 4 p. 1286-1291.
- SILVA, E.L. (1995). *Tratamento aeróbio de fenol em reator de leito fluidificado trifásico*. Tese de Doutorado. SHS – EESC – USP. São Carlos.
- SPEECE, R.E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewater*. Published by Archae Press.

SOLOMONS G.L. *Materials and Methods in Fermentation*. Academic Press. 1969.  
London and New York. Library of Congress Catalog Card number: 76-107933.  
Standard Book Number: 12-654450-6.

TARIGHIAN A.; HEADLEY J.; PEDRAS S. (2003). *Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose*. *Clean Techn Environ Policy*. 61-65. DOI 10.1007/s10098-002-176-5.

THE MERCK INDEX (1996). *An encyclopédia of chemicals, drugs and biologicals*.  
Published by Merck Research Laboratories. Twelfth edition.

WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1984). *Dissimilatory sulfate or sulphur reducing bacteria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Eds) KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. 1: 663-679.

ZHOU, G.M.; FANG, H. (1997). *Co-degradation of phenol and m-cresol in a UASB reactor*. *Bioresource Technology* 61, p. 47-52.

[www.biobras.com.br](http://www.biobras.com.br)

[www.unesp.br/propp/dir\\_proj/Industria/Industr 13a.htm](http://www.unesp.br/propp/dir_proj/Industria/Industr 13a.htm)