

**REGIANE CRISTINA CORRÊA**

**Degradação de Bifenila Policlorada e Caracterização da  
Comunidade Microbiana de Reator Anaeróbio com Biofilme**

**Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutora em Engenharia**

**Orientadora: Profa. Dra.  
Maria Bernadete A. Varesche**

**Versão corrigida**

São Carlos  
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

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

Corrêa, Regiane Cristina.

**C824d Degradação de bifenila policlorada e caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbio com biofilme. / Regiane Cristina Corrêa ; orientador Maria Bernadete Amâncio Varesche. São Carlos, 2011.**

**Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento)-- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.**

**1. Microbiologia ambiental. 2. Ascarel. 3. PCB. 3. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo. I. Título.**

**FOLHA DE JULGAMENTO**

Candidato: Bacharel **REGIANE CRISTINA CORRÊA**

Título da tese: **Degradação de bifenila policlorada e caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbio com biofilme.**

Data da defesa: 14/10/2011

**Comissão Julgadora:**

**Resultado:**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva (Orientadora)**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Dr<sup>ª</sup>. **Isabel Kimiko Sakamoto**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Iolanda Cristina Silveira Duarte**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

aprovada

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Cristina Rossi Nakayama**  
(Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP)

aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:  
Prof. Titular **Edson Cezar Wendland**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Associado **Paulo Cesar Lima Segantine**

*Dedico esta Tese à minha linda Família  
Paulinho, Lucão, Caru e Paulinha  
Meus amores, minha base, estrutura e motivação, meu caminho...  
Minha vida...*

*E aos meus pais, por me ensinarem os bons caminhos da vida...*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Bernadete Varesche, minha orientadora, por acreditar em mim e estar sempre presente. Muito obrigada!

Aos meninos Henrique Altero, Tais Hamamoto e Mara Rúbia pela constante troca, empenho e colaboração, dedico este trabalho, também, a vocês! Muito obrigada!

Aos Professores Marcelo Zaiat, Eugenio Foresti, Wiclef e Márcia Damianovick, exemplo de integridade, pela amizade e conversas agradáveis durante o cafezinho.

Às amigas e apoio técnico, Eloisa Pozzi, Isabel Sakamoto e Maria Angela Adorno, muito obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar, com muita seriedade e competência.

A Julia Hirasawa pela amizade e grande ajuda e colaboração no início deste trabalho.

Aos amigos engenheiros Dago Okada e Gustavo Mockaits pelos ensinamentos e ajuda com a montagem do RAHLF.

A todos os amigos do LPB, que dividiram comigo o espaço nas bancadas e fizeram os meus dias no labô ficarem mais agradáveis, em todas as fases deste trabalho: Adriana, Adis, Ana Flavia, Eduardo Penteado, Eduardo Blanco, Andressa, Lorena, Sandra, Gustavo Mockaits, Guilherme, Theo Syrto, Renata, Dani Vich, Tiagão, Mari Carósia, Andressa, Guto, Tiago Palladino, Juliana Kawanishi, Fabricio, Bruna, Priscila, Pilar, Débora, Ariane, Dago Okada, Djalma, Flavia, Filipe, Livia, Regiane Ratti, Carol Zampol, Daniel Lima, Raphael Moura, Mariana, Marcelinho, Jorge Pantoja, Betão, Julia Hirasawa, Janja, Elô, Bel, Henrique Altero, Tais Hamamoto e Mara Rubia.

Aos funcionários do SHS por estarem sempre prontos a ajudar, Pavi, Sá, Rose, Flávia, Fernanda e André.

Aos funcionários e técnicos do Campus 2, Silvana, Fernando, Juliana, Camilo e Edson, muito gentis e dispostos a ajudar.

Ao Professor Edson Rodrigues (Edinho) e Thais (aluna de mestrado) do Depto de Química (UFSCar) pelas análises de PCB e discussões imprescindíveis.

À Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) pela oportunidade de realização do doutorado.

A Capes e CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro.

À EDP Bandeirante Energia S.A. pelo fornecimento do ascarel utilizado nesta pesquisa.

A toda minha família, meus irmãos, cunhados, cunhadas, sobrinhos, sobrinhas, a madrastra Itália e meu enteadinho Daniel Campana, que estiveram sempre torcendo por mim e me apoiando; e as sobrinhas-netas Ana Clara e Ana Luisa, que vieram florir, ainda mais, o meu jardim.

Ao meu amor/amigo e companheiro, que esteve sempre me apoiando e incentivando, segurou minha mão nas minhas quedas... OBRIGADA, Paulinho!

Aos meus filhos (razões da minha vida), que vieram iluminar os meus dias, com muito amor, venho eternizar o meu agradecimento pelas suas existências, que me fizeram ser uma pessoa melhor, desejar um futuro melhor para a humanidade e perpetuar a minha essência... OBRIGADA por existirem! AMO MUITO VOCÊS!

Num meio dia de fim de primavera  
Tive um sonho como uma fotografia  
Vi Jesus Cristo descer à terra,  
Veio pela encosta de um monte  
Tornado outra vez menino,  
A correr e a rolar-se pela erva  
E a arrancar flores para as deitar fora  
E a rir de modo a ouvir-se de longe.

...

Um dia que Deus estava a dormir  
E o Espírito Santo andava a voar,  
Ele foi à caixa dos milagres e roubou três,  
Com o primeiro fez que ninguém soubesse que ele tinha fugido.  
Com o segundo criou-se eternamente humano e menino.  
Com o terceiro criou um Cristo eternamente na cruz

E deixou-o pregado na cruz que há no céu  
E serve de modelo às outras.  
Depois fugiu para o sol  
E desceu pelo primeiro raio que apanhou.  
Hoje vive na minha aldeia comigo.  
É uma criança bonita de riso e natural.  
Limpa o nariz no braço direito,  
Chapinha nas poças de água,  
Colhe as flores e gosta delas e esquece-as.  
Atira pedras nos burros,  
Rouba as frutas dos pomares  
E foge a chorar e a gritar dos cães.  
E, porque sabe que elas não gostam  
E que toda a gente acha graça,  
Corre atrás das raparigas  
Que vão em ranchos pelas estradas  
Com as bilhas às cabeças  
E levanta-lhes as saias.

A mim ensinou-me tudo.  
Ensinou-me a olhar para as cousas,  
Aponta-me todas as cousas que há nas flores.  
Mostra-me como as pedras são engraçadas  
Quando a gente as tem na mão  
E olha devagar para elas.

....

Ele mora comigo na minha casa a meio do outeiro.  
Ele é a Eterna Criança, o deus que faltava.  
Ele é o humano que é natural,  
Ele é o divino que sorri e que brinca.  
E por isso é que eu sei com toda a certeza  
Que ele é o Menino Jesus verdadeiro.

E a criança tão humana que é divina  
É esta minha quotidiana vida de poeta,  
E é porque ele anda sempre comigo que eu sou poeta sempre,  
E que o meu mínimo olhar  
Me enche de sensação,  
E o mais pequeno som, seja do que for,  
Parece falar comigo.

A Criança Eterna acompanha-me sempre.  
A direção do meu olhar é o seu dedo apontando.  
O meu ouvido atento alegremente a todos os sons  
São as cócegas que ele me faz, brincando, nas orelhas.  
Damo-nos tão bem um com o outro  
Na companhia de tudo  
Que nunca pensamos um no outro,  
Mas vivemos juntos a dois  
Com um acordo íntimo  
Como a mão direita e a esquerda.

Ao anoitecer brincamos as cinco pedrinhas  
No degrau da porta de casa,  
Graves como convém a um deus e a um poeta,  
E como se cada pedra  
Fosse todo o universo  
E fosse por isso um grande perigo para ela  
Deixá-la cair no chão.

Depois eu conto-lhe histórias das cousas só dos homens  
E ele sorri, porque tudo é incrível.  
Ri dos reis e dos que não são reis,  
E tem pena de ouvir falar das guerras,  
E dos comércios, e dos navios  
Que ficam fumo no ar dos altos-mares.  
Porque ele sabe que tudo isso falta àquela verdade

...

Ele dorme dentro da minha alma  
E às vezes acorda de noite  
E brinca com os meus sonhos,  
Vira uns de pernas para o ar,  
Põe uns em cima dos outros  
E bate as palmas sozinho  
Sorrindo para o meu sono.

...

O guardador de rebanhos

**Fernando Pessoa**  
(*Alberto Caeiro*)



## RESUMO

CORRÊA, R. C. **Degradação de bifenila policlorada e caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbico com biofilme.** 2011. 150f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

Métodos de Microbiologia de anaeróbios estritos e de Biologia Molecular foram empregados para se conhecer a diversidade de microrganismos relacionados à degradação de ascarel em reatores anaeróbios metanogênicos. A avaliação de potencial metanogênico foi realizada para a escolha da melhor condição nutricional, bem como, para a seleção de material suporte e solvente adequado a solubilização do ascarel. Nos ensaios em batelada, a produção de metano foi maior nos reatores contendo etanol (média de 0,22 - 0,46  $\mu\text{molCH}_4/\text{gSTV}$ , 46h). Remoção de 85,6% (86,7 mg/L de PCB em Aroclor 1016 e 1260) foi obtida na condição com espuma de poliuretano, etanol (46g/L) e formiato (680 mg/L). Diferentes solventes e surfactantes, tais como, DMSO, dioxano, ácido acético, ácido fórmico, *n*-hexano, acetona, etano, metanol, Tween 80, SDS (10%) e Triton X-100 foram avaliados para a solubilização de ascarel. Dentre esses, metanol, Triton X-100 e ácido fórmico foram eleitos para a realização de ensaio em reatores em batelada contendo espuma de poliuretano, com o propósito de avaliar o potencial metanogênico na degradação de PCB. Os valores de produção de metano foram muito semelhantes (0,21 – 0,38  $\mu\text{molCH}_4/\text{mLgSTV}$ , 45h) nas diferentes condições, no entanto, a remoção de PCB foi maior nos reatores com metanol 790 mg/L (86,6%), ácido Fórmico 600 mg/L (84,5%) e Triton X-100 1% (72,1%). Portanto, a melhor condição foi contemplada para a operação do reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) no tratamento do ascarel, ou seja, células imobilizadas em espuma de poliuretano, etanol e formiato (como fonte de carbono), Triton X-100 (0,1%) e metanol (como solvente). No RAHLF, a remoção média de matéria orgânica (DQO) foi de 91% para concentração afluenta média de 1270 mg/L. A presença de morfologias semelhantes à *Methanosarcina* e bacilos fluorescentes foi confirmada em exames microscópicos. Na análise filogenética, por meio de PCR/DGGE e seqüenciamento das bandas recortadas, os grupos encontrados foram relacionados aos Filos Proteobacteria, Firmicutes, Spirochaetes, Chlorobi e Chloroflexi, sendo que neste último estão incluídos representantes relacionados a degradação de PCBs. Dentre as arqueias metanogênicas verificou-se similaridade de 99% e 97% com *Methanosaeta* sp. e *Methanolinea* sp., relacionadas com a metanogenese acetoclástica e hidrogenotrófica, respectivamente.

**Palavras-chave:** Ascarel, PCB, co-substrato, , espuma de poliuretano, Triton X-100, Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo.

## ABSTRACT

CORRÊA, R. C. **Studies on the biodegradation and degradation of polychlorinated biphenyl in anaerobious conditions.** 2011. 150f. Thesis (Doctoral) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

Molecular biology and microbiology methods were used to study the microbial communities related to degradation of ascarel at methanogenic conditions in an anaerobic reactor. The methanogenic potential was evaluated to choose the better nutritional condition as well as to select the better support material and the most suitable solvent to favor the solubilization of ascarel. The methane production was higher ( $0.22 - 0.46 \mu\text{molCH}_4/\text{mLgSTV}$ , 46h) in batch reactors containing ethanol (46 g/L) and formate (680 mg/L), the PCB elimination attaining 85.6% (86.7 mg/L de PCB as Aroclor 1016 and 1260) when Polyuretane foam was used as support material. Different solvents, namely DMSO, dioxane, n-hexane, acetic acid, formic acid, acetone, ethane, methanol, and surfactants, such as 10% SDS, Triton X-100, were evaluated aiming to determine the better condition to solubilize ascarel. According to the results of such experiments, methanol, formic acid and Triton X-100 were selected for carrying out the batch experiments in reactors containing polyurethane foam to evaluate the methane production during the PCB's degradation. Regardless of the operation conditions the methane production rates were similar ( $0.21 - 0.38 \mu\text{molCH}_4/\text{gSTV}$ , 45h), however the elimination of PCB was higher in the reactors containing methanol (790 mg/L), formic acid (600 mg/L) and Triton X-100 (1%). Therefore, the better condition for treating ascarel-containing residues in a bench-scale horizontal-flow immobilized biomass (HAIB) was attained with cells immobilized in polyurethane foam when ethanol and formate were used as carbon sources, and in presence of Triton X-100 and methanol, the average elimination of organic material attaining 91% for affluent concentration of 1270 mg/L. The presence of *Methanosarcina* and fluorescent rods was confirmed by microscopy analysis. According to the filogenetics analysis, which was carried out by PCR/DGGE and band-sequencing, the Bacteria domain are related to the Filos Proteobacteria, Firmicutes, Spirochaetes, Chlorobi and Chloroflexi, this latter being directly related to the degradation of PCB. Among the methanogenic Archea, a similiraty of 99% and 97% was observed to *Methanosaeta* sp. and *Methanolinea* sp. related to acetoclastic and hydrogentrophic methanogenesis, respectively.

**Key words:** PCB, Aroclor, co-substrate, polyurethane foam, Triton X-100, bench-scale horizontal-flow anaerobic immobilized biomass bioreactor.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. (a) Estruturas da bifenila (orto 2,6; meta 3,5; para 4); (b) PCB (2,3,4,2',4',5'-CB).....	5
Figura 4.1. Fluxograma das principais etapas realizadas.....	16
Figura 4.2. Método de extração de PCB do ascarel.....	19
Figura 4.3. Coluna de purificação do extrato de PCB em hexano (a) vista geral da coluna e (b) detalhe das camadas de sílica e Florisil/Cu após a extração de PCB do ascarel.....	20
Figura 4.4. Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada.....	32
Figura 4.5 Fluxograma experimental da análise filogenética da comunidade microbiana.....	34
Figura 5.1. Áreas de PCB dos cromatogramas obtidos no Método de Hexano/Florisil/Silica.....	39
Figura 5.2. Áreas dos cromatogramas de PCB obtidas no Método de Quensen.....	39
Figura 5.3. Áreas dos cromatogramas de PCB obtidas no Método de Hexano/Florisil.....	40
Figura 5.4. Áreas dos cromatogramas de PCB obtidas no Método de Hexano/H2SO4/Florisil/Silica.....	40
Figura 5.5. Áreas cromatográficas dos padrões Aroclor (2,0 mg/L) 1016 (a) e 1260 (b).....	42
Figura 5.6. Áreas cromatográficas dos padrões Aroclor (2,0 mg/L) 1232 (a), 1242 (b), 1248 (c) e 1254 (d).....	43
Figura 5.7. Áreas cromatográficas do padrão Aroclor 1221 (2,0 mg/L).....	44
Figura 5.8. Áreas cromatográficas da mistura dos padrões 1016 e 1260 (2mg/L).....	44
Figura 5.9. Curva de calibração da mistura dos Padrões 1016 e 1260.....	45
Figura 5.10. Produção de metano em função do tempo nos reatores em batelada do ensaio 1, sem esgotamento da matéria orgânica. Reatores em suspensão:- R1 (controle), R2 (etanol), R3 (ascarel, etanol), R4 (ascarel), R11 (etanol, formiato), R12 (ascarel, formiato); Espuma de poliuretano:- R5 (ascarel, etanol, formiato), R6 (ascarel, formiato), R9 (formate); Carvão vegetal:- R7 (ascarel, etanol, formiato), R8 (ascarel, formiato), R10 (formiato).....	48

Figura 5.11. Produção de metano em função do tempo nos reatores em batelada do ensaio 1, com esgotamento da matéria orgânica. Reatores em suspensão:- R1 (controle), R2 (etanol), R3 (ascarel, etanol), R4 (ascarel), R11 (etanol, formiato), R12 (ascarel, formiato); Espuma de poliuretano:- R5 (ascarel, etanol, formiato), R6 (ascarel, formiato), R9 (formate); Carvão vegetal:- R7 (ascarel, etanol, formiato), R8 (ascarel, formiato), R10 (formiato).....	48
Figura 5.12. Cromatograma das áreas de PCB em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em suspensão controle (sem ascarel e fontes de carbono) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	50
Figura 5.13. Cromatograma das áreas de PCB em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em suspensão (com etanol e sem ascarel) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	51
Figura 5.14. Cromatograma das áreas de PCB em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em suspensão (com etanol e ascarel) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	51
Figura 5.15. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em suspensão (com ascarel) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	52
Figura 5.16. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em espuma de poliuretano (com etanol, ascarel e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	52
Figura 5.17. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em espuma de poliuretano (ascarel e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	53
Figura 5.18. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em carvão vegetal (com etanol, ascarel e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	53

Figura 5.19. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em carvão vegetal (com ascarel e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	54
Figura 5.20. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em espuma de poliuretano (com formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	54
Figura 5.21. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em carvão vegetal (com formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	55
Figura 5.22. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em suspensão (com etanol e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	55
Figura 5.23. Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com biomassa em suspensão (com ascarel e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	56
Figura 5.24 Cromatograma das áreas de PCB em função do tempo de retenção da amostra inicial dos ensaios em batelada (biomassa planctônica, com ascarel, etanol e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).....	56
Figura 5.25. Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X): (a) cocobacilos, (b) bacilos e cocos; (c) Methanosaeta (d) bacilos; e (e), Methanosarcina em contraste de fase, (f) Methanosarcina em fluorescência.....	59
Figura 5.26. Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X): (a) cocobacilos, (b) bacilos e filamentos (c) Methanosarcina em fluorescência; (d) Methanosarcina em contraste de fase; (e) cocos e bacilos.....	60
Figura 5.27. Dendograma do DGGE para Domínio Bacteria (341F e 518R Muyzer et al., 1993) do ensaio 1 – calculado pelo índice de similaridade de Pearson no programa Bionumerics. Concentração do gel: 45 – 65%. Reatores em suspensão:- R1 (controle), R2 (etanol), R3 (ascarel, etanol), R4 (ascarel), R11 (etanol, formiato), R12 (ascarel, formiato); espuma de poliuretano:- R5 (ascarel, etanol, formiato), R6 (ascarel, formiato), R9 (formiato); Carvão vegetal:- R7 (ascarel, etanol, formiato), R8 (ascarel, formiato), R10 (formiato).....	64

Figura 5.28. Dendograma do DGGE para Domínio Archaea (1100FGC e 1400R Kudo et al., 1997) do ensaio 1 – calculado pelo índice de similaridade de Pearson no programa Bionumerics. Concentração do gel: 40 – 70%. Reatores em suspensão:- R1 (controle), R2 (etanol), R3 (ascarel, etanol), R4 (ascarel), R11(etanol, formiato), R12 (ascarel, formiato); espuma de poliuretano:- R5 (ascarel, etanol, formiato), R6 (ascarel, formiato), R9 (formiato); Carvão vegetal:- R7 (ascarel, etanol, formiato), R8(ascarel, formiato), R10 (formiato).....	67
Figura 5.29. DGGE do biofilme dos reatores do ensaio 1 para o Domínio <i>Archaea</i> ; as flechas indicam as bandas que foram recortadas para posterior seqüenciamento para identificação de arqueias metanogênicas, denominadas a partir da combinação das letras ao lado e os números (em branco) acima (como exemplo a banda 4a).....	69
Figura 5.30. Árvore Filogenética dos reatores do Ensaio 1 (Potencial Metanogênico em diferentes suportes) dos membros do Domínio Archaea baseado na análise comparativa da sequencia do gene 16S rRNA - calculado de acordo com o método Neighbor-joining, Bootstrap (500 reamostragens) com Spirochaetes bacterium como outgroup.....	70
Figura 5.31 Solubilização do ascarel (a) 1 – solventes orgânicos, completa solubilização – 2 – alcoóis e ácidos, separação das fases; (b) separação das fases após a adição do meio Angelidaki. ....	72
Figura 5.32 Solubilização do ascarel (a) antes e (b) após adição de espuma de poliuretano.....	73
Figura 5.33 Produção de metano na presença de diferentes solventes em função do tempo.....	75
Figura 5.34 Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator sem solvente (com ascarel, etanol e formiato) .....	77
Figura 5.35 Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com metanol (1,6 g/L), ascarel, etanol e formiato.....	78
Figura 5.36 Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com metanol (790 mg/L), ascarel, etanol e formiato.....	78

Figura 5.37 Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com metanol (395 mg/L), ascarel, etanol e formiato. ....	79
Figura 5.38 Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com Triton X 100 10% (1:1), ascarel, etanol e formiato. ....	79
Figura 5.39 Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com Triton X 100 10% (1:10), ascarel, etanol e formiato. ....	80
Figura 5.40 Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com Ácido fórmico (1,2 g/L), ascarel, etanol e acetato.....	80
Figura 5.41 Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de Potencial Metanogênico com diferentes materiais suportes: Reator com Ácido fórmico (600 mg/L), ascarel, etanol e acetato. ....	81
Figura 5.42 Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X) após uma semana: (a) e (b) bacilos, cocos e Methanosaeta (em contraste de fase); (c) e (d), bacilos fluorescentes (em fluorescência).....	82
Figura 5.43 Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X) após uma semana (em contraste de fase): (f), (h) Methanosaeta; (e) e (h) bacilos e cocos. ....	83
Figura 5.44 Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X) em contraste de fase: (a), (b) e (c) cocos, bacilos e filamentos (d) cocobacilos; (e) Methanosarcina em contraste de fase; (f) Methanosarcina em fluorescência. ....	84
Figura 5.45 DGGE do biofilme dos reatores do ensaio de Potencial Metanogênico com diferentes solventes. (a) D. Bacteria com os primers 341 FGC e 518 R de Muyzer (1993) e (b) D. Archaea; as flechas indicam as bandas que foram recortadas para posterior seqüenciamento e identificação dos grupos. ....	87
Figura 5.46 Dendograma do DGGE para Domínio Bacteria (Muyzer, 1993) Reatores com espuma de poliuretano:- 1(controle), 2(controle com ascarel), 3(ascarel, metanol – 1,6 g/L), 4(ascarel, metanol - 790 mg/L), 5(ascarel, metanol – 395 mg/L), 6 (ascarel, Triton X-100 10% 1:1), 7(ascarel, Triton X-100 10% 1:10), 8(ascarel, ácido fórmico – 1,2 g/L), 9 (ascarel, ácido fórmico 600 mg/L). ....	88
Figura 5.47 Dendograma do DGGE para Domínio Archaea (Nielsen et al., 1999) – utilizou-se o índice de similaridade de Pearson no programa Bionumerics. Reatores com espuma de	

poliuretano:- 1(controle), 2(controle com ascarel), 3(ascarel, metanol – 1,6 g/L), 4(ascarel, metanol - 790 mg/L), 5(ascarel, metanol – 395 mg/L), 6 (ascarel, Triton X-100 10% 1:1), 6(ascarel, Triton X-100 10% 1:10), 7(ascarel, ácido fórmico – 1,2 g/L), 9 (ascarel, ácido fórmico 600 mg/L).....	90
Figura 5.48 Árvore Filogenética dos reatores do Ensaio de Potencial Metanogênico em diferentes solventes dos membros do Domínio Archaea baseado na análise comparativa da sequencia do gene 16S rRNA - calculado de acordo com o método Neighbor-joining (Bootstrap = 500 reamostragens). Grupo externo utilizado foi o Thermotogales bacterium.....	92
Figura 5.49 Variação temporal de pH no RAHLF. A linha verde representa o início da adição de ascarel.....	95
Figura 5.50 Variação espacial de pH do RAHLF.....	95
Figura 5.51 Variação temporal da alcalinidade no RAHLF. A linha verde representa o início da adição de ascarel.....	97
Figura 5.52 Variação temporal da demanda Química de Oxigênio no RAHLF.....	99
Figura 5.53 Variação espacial da DQO no RAHLF.....	100
Figura 5.54 Reator com coloração escura. (a) fase inicial de operação com ascarel; (b) início do acúmulo de ascarel na parede superior do RAHLF. ....	101
Figura 5.55 Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X). (a) e (f) semelhantes a Methanosaetas sp.; (b) e (e) bacilos e coco bacilos; (c) morfologia semelhante a formação inicial de sarcinas; (d) bacilos e filamentos. ....	102
Figura 5.56 Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF antes do acréscimo de ascarel, morfologias semelhantes a (a) Methanosaeta, (b) e (c)Methanosarcina, (d) cocos e bacilos diversos, início da formação do biofilme na superfície da espuma de poliuretano(5000X). ....	103
Figura 5.57 Formação de biofilme ao longo do RAHLF. (a) inicio da adesão do óleo a parede do reator; (b) e (c) biofilme amarelado formado na porção L/D 14 e L/D 19 do reator, respectivamente; (d) e (e) polímero de coloração esbranquiçada; (f) biofilme colorido na parte central (L/D 10) do reator. ....	104
Figura 5.58 Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após o acréscimo de ascarel, no primeiro perfil: morfologias semelhantes a (a) Methanosaeta,(L/D 1); (b) e (c) bacilos e presença de polímero extracelular, (L/D 1 e L/D5); (d)Methanosarcina, (L/D 10). ....	105



Figura 5.59 Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após acréscimo de ascarel: (a) e (b) gotículas de óleo aderidas a espuma de poliuretano na saída do reator (L/D 19); (c) e (d) Methanosarcina e exopolímero L/D 19.....	106
Figura 5.60 Formação de biofilme ao longo do RAHLF: (a) e (e) biofilme verde e laranja na região mediana do reator (L/D 10); (b) e (d) biofilmes alaranjado e verde na porção final do reator (L/D 19); (c) coleta de material para microscopia e análise de Biologia Molecular; (f) polímero de coloração esbranquiçada no início do reator (L/D 1).....	107
Figura 5.61 RAHLF na fase final de operação.....	108
Figura 5.62 Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após acréscimo de ascarel: (a) morfologias semelhantes a Methanosaeta sp.; (b) cocobacilos e bacilos envoltos por exopolímeros; (c) e (d) colonização da espuma de poliuretano por Methanosaeta sp. e bacilos.....	109
Figura 5.63 Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após do acréscimo de ascarel: (a) e (b) morfologias semelhantes a Methanosaeta sp. na formação de biofilmes; (c) e (d) bacilos envoltos por exopolímeros. ....	110
Figura 5.64 Fotomicrografia eletrônica de varredura do RAHLF do biofilme do RAHLF após acréscimo de ascarel no segundo perfil: (a) e (b) biofilme formado ao redor das gotículas do óleo; (c) e (d) bacilos , filamentos, espiroquetas e exopolímero.....	111
Figura 5.65 Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após acréscimo de ascarel no segundo perfil: (a), (b) e (c); bacilos envoltos por exopolímero, filamentos, espiroquetas e cocos; (d) biofilme formado ao redor das gotículas do óleo e morfologia semelhante a espiroqueta.....	112
Figura 5.66 Fotomicrografia do biofilme crescido ao redor do ascarel e a análise por EDS da amostra, na parte indicada.....	113
Figura 5.67 Dendograma do DGGE para Domínio Archaea do biofilme do RAHLF – (gradiente do gel 40 – 70%): i (inóculo); antes de acrescentar ascarel:- 1 (L/D1), 2 (L/D10) e 3 (L/D19); após acréscimo de ascarel - 1°. Perfil:- 4 (L/D1), 5 (L/D10) e 6 (L/D19); 2°. Perfil:- 7 (L/D1), 8 (L/D10) e 9 (L/D19); 10 (biomassa composta aderida ao suporte) e 11 (biomassa do biofilme de coloração amarelada aderida ao óleo acumulado na parede do reator).....	115
Figura 5.68 DGGE das diferentes fases e trechos (L/D) do RAHLF – Domínio Archaea (40% - 70%). As flechas indicam as bandas que foram recortadas, denominadas a partir da combinação das letras ao lado e os números acima: i (inóculo); antes de acrescentar ascarel:- 1	

(L/D 1), 2 (L/D 10) e 3 (L/D 19); após acréscimo de ascarel - 1º. Perfil:- 4 (L/D 1), 5 (L/D 10) e 6 (L/D 19); 2º. Perfil:- 7 (L/D 1), 8 (L/D 10) e 9 (L/D 19); 10 (biomassa composta aderida ao suporte) e 11 (biomassa do biofilme de coloração amarelada aderida ao óleo acumulado na parede do reator). .....	118
Figura 5.69 Árvore Filogenética das amostras do RAHLF para o Domínio Archaea baseado na análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA - calculado de acordo com o método Neighbor-joining (Bootstrap = 500 reamostragens). .....	119
Figura 5.70 DGGE para o Domínio Bacteria 45-65% (341FGC e 518R).....	121
Figura 5.71 DGGE para o Domínio Bacteria 40-70% (341FGC e 518R).....	123
Figura 5.72 Árvore Filogenética do RAHLF dos membros do Domínio Bacteria baseado na análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA - calculado de acordo com o método Neighbor-joining.....	129

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Fórmulas moleculares e massas moleculares de PCBs.....	6
Tabela 4.1: Composição do Meio Angelidaki.....	23
Tabela 4.2 Componentes dos reatores do ensaio 1.....	26
Tabela 4.3: Área superficial dos suportes (CCDM – UFSCar).....	27
Tabela 4.4: Solventes utilizados no ensaio 2.....	28
Tabela 4.5. Composição dos reatores do ensaio 3.....	30
Tabela 4.6: Frequência das análises.....	32
Tabela 4.7: Primers utilizados no PCR/DGGE.....	36
Tabela 4.8: Programação da reação de PCR para amplificação do RNAr 16S.....	36
Tabela 5.1: Concentração total de PCB no Aroclor para os diferentes testes de extração.....	39
Tabela 5.2: Velocidade máxima da produção de metano do ensaio 1 com esgotamento da matéria orgânica.....	48
Tabela 5.3: Concentração total de PCB em Aroclor 1016/1260.....	58
Tabela 5.4: Frequência das morfologias nos reatores em batelada do ensaio 1.....	62
Tabela 5.5: Relação das sequencias das bandas recortadas obtidas no Genbank nos reatores 1-12 (Material Suporte).....	72
Tabela 5.6: Solubilidade de Ascarel nos diferentes solventes.....	74
Tabela 5.7: Velocidade máxima de metano do ensaio com solventes.....	76
Tabela 5.8: Concentração total de PCB nos reatores em batelada.....	77
Tabela 5.9: Frequência das morfologias observadas nos reatores em batelada após uma semana de operação.....	86
Tabela 5.10: Frequência das morfologias observadas nos reatores em batelada após duas semanas de operação.....	86
Tabela 5.11: Relação das sequências das bandas recortadas obtidas no Genbank nos reatores 1-9 (diferentes solventes).....	94
Tabela 5.12: Valor médio de eficiência da remoção de matéria orgânica no RAHLF.....	99
Tabela 5.13: Relação das sequências das bandas recortadas obtidas no Genbank do DGGE do RAHLF para o Domínio Archaea.....	121
Tabela 5.14: Relação das sequências das bandas recortadas obtidas no Genbank do DGGE do RAHLF (Domínio Bacteria) .....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BLAST	Ferramenta de busca de homologia por alinhamento local
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno.
CCDM	Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa
CLAE/UV	Cromatografia Líquida com Detector de Ultravioleta
CNTP	Condições normais de temperatura e pressão.
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxirribonucleotideo Fosfatados
DQO	Demanda química de oxigênio
ECD	Detector de captura de elétrons
EDS	Espectômetro de dispersão de energia
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
GTA	Glutaraldeído
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LCE	Laboratório de Caracterização Estrutural
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NBR	Norma brasileira
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OCN	Octacloronaftaleno
OTU	Unidade taxonômica operacional
PAH	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCB	Bifenilas policloradas
PCP	Pentaclorofenol
PCR	Reação em cadeia da polimerase

POP	Poluentes orgânicos persistentes
RAHLF	Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
RNAr	Ácido Ribonucléico ribossômico
SDS	Dodecilsulfato de sódio
ST	Sólidos totais
STF	Sólidos totais fixos
STV	Sólidos totais voláteis
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TCB	Triclorobenzeno
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de manta de lodo ascendente

# SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
3.1. Efeitos na saúde humana e ambiente .....	7
3.2 Biodegradação de PCB .....	7
3.3 Métodos de extração e análises de PCB .....	12
3.3 Caracterização microbiana .....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
4.1. Estudo exploratório de métodos de extração e análises de PCB .....	16
4.1.1 Extração de PCB do ascarel .....	16
4.1.1.1 Método Hexano/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /Florisil/Sílica .....	18
4.2 Curva de calibração .....	20
4.2.1 Repetitividade do método .....	21
4.3 Descrição do ascarel e padrões .....	21
4.4 Método de análise e extração de PCB .....	22
4.5 Composição do meio de cultura .....	22
4.6 Inóculo .....	24
4.7 Potencial Metanogênico .....	24
4.7.1 1º. Ensaio - Material suporte e doador de elétrons .....	25
4.7.2 - 2º. Ensaio –solventes para solubilização do PCB .....	27
4.7.3 Potencial metanogênico com ascarel e diferentes solventes .....	28
4.8 Avaliação do potencial metanogênico .....	29
4.9 Operação do RAHLF .....	31
4.9.1 Análises físico-químicas de monitoramento .....	31
4.10 Caracterização da diversidade microbiana .....	33
4.10. 1 Exames microscópicos .....	33
4.10.2 Análises filogenéticas .....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
5.1 Avaliação dos protocolos de extração de PCB .....	38
5.1.1 Padrão de PCB .....	41
5.2 Potencial Metanogênico em reator de batelada com material suporte .....	45
5.2.2 Análise da comunidade microbiana .....	58
5.2.2.1 Exames microscópicos .....	58
5.2.2.2 Análise filogenética .....	61
5.3 Solubilidade do Ascarel .....	72
5.5. Operação e monitoramento do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo .....	94
5.5.4 Análise da comunidade microbiana .....	101
5.5.4.1 Fase de adaptação do RAHLF e após adição de ascarel .....	101
5.5.4.4 Análise Filogenética no RAHLF .....	113
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	129
<b>7. SUGESTÕES</b> .....	134
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	135
<b>ANEXO</b> .....	144

# 1. INTRODUÇÃO

---

As bifenilas policloradas (PCB), principal constituinte do ascarel, óleo que foi muito utilizado em transformadores, são compostos de origem antropogênica e foram sintetizados inicialmente na Alemanha, antes da virada do século 20 e produzidos em escala industrial a partir de 1929, pela Monsanto, EUA (Penteado & Vaz, 2001). Esses compostos são pouco biodegradáveis e acumulam em tecidos vegetais e animais. São tóxicos e causam riscos à saúde, considerados carcinogênicos, afetam, sobretudo, fígado, baço e rins. Além disso, podem causar danos irreversíveis ao sistema nervoso central.

Os efeitos do PCB na saúde humana foram primeiramente documentados, em 1968, em Yusho, Japão. Nesse ano, 1.600 indivíduos foram contaminados com PCB ao consumirem óleo de arroz. Os indivíduos contaminados apresentaram sintomas relacionados com dermatites, hiperpigmentação da pele, fortes dores de cabeça, danos no sistema nervoso periférico, no fígado e tireóide. Uma criança, cuja mãe foi afetada, nasceu com baixo peso e desenvolvimento intelectual prejudicado. Mais tarde, em Yu-Cheng, Taiwan, em 1979, mais de 2.000 pessoas ingeriu peixes contaminados com PCB (ATSDR, 2000).

No ambiente também se tem observado seus efeitos em animais, tais como peixes, pássaros e mamíferos, com ocorrência de falha na reprodução, no desenvolvimento e no sistema imune, danos no fígado, câncer e morte. A ocorrência do PCB no ambiente pode resultar na bioacumulação, causando efeitos crônicos e toxicidade, aumento da concentração nos tecidos, passando pela cadeia alimentar em dois ou mais níveis tróficos. Organismos aquáticos são expostos ao PCB dissolvido na água, adsorvido no sedimento e presente nos alimentos. No ecossistema terrestre, os organismos são contaminados, nos mais baixos níveis tróficos, pela ingestão de solo e presas, além da absorção na pele ou inalação, as quais também podem ocorrer em algumas espécies. Geralmente, os organismos que se encontram no topo da cadeia alimentar sofrem mais riscos à exposição do PCB (NRC, 2001).

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) são compostos, como o próprio nome diz, que representam ameaça ao ambiente e para a saúde humana, pois além de tóxicos, são de difícil degradação e continuam no ambiente causando problemas. Os PCBs encontram-se entre os doze POPs listados pela Convenção de Estocolmo/2004.

Estima-se que a produção mundial acumulada de PCB foi de aproximadamente 1.200.000 toneladas, sendo que 60% utilizados em transformadores e capacitores, 15% em fluidos de transferência de calor e 25% como aditivos na formulação de plastificantes, tintas, adesivos e pesticidas (Penteado & Vaz, 2001).

A fabricação e comercialização dos PCBs foram proibidas no Brasil em 1981, mesmo assim, o ascarel presente nos antigos transformadores ainda continua sendo usado. Estimativas indicam que, no Brasil, há cerca de 200 mil toneladas de resíduos de ascarel e apenas 1.500 a 2.000 toneladas, ou cerca de 1% são tratadas por ano. Muitos transformadores foram abandonados, todavia, contendo ascarel, com risco de vazamento, contaminação no armazenamento e na desmontagem desses equipamentos. Os impactos ambientais que pode causar são muitos, como a contaminação, tanto do solo como da água (Penteado & Vaz, 2001).

Embora, a produção de PCB tenha sido banida em muitos países desde 1977, sua contaminação é ubíqua. A entrada do PCB no ambiente pode ocorrer por meio de acidentes ou perdas no manuseio, evaporação de componentes contaminados, vazamentos de transformadores, capacitores ou trocadores de calor, armazenamento irregular de resíduo e vazamento de fluidos hidráulicos, fumaça decorrente da incineração de produtos contendo PCB

A descloração anaeróbia remove os átomos de cloro do PCB altamente clorados, contrariamente à degradação aeróbia, que transforma somente alguns congêneres com baixo número de cloros (Abramowicz, 1993). Estudos sobre a desalogenação reductiva têm contribuído significativamente para o estudo da ecologia, fisiologia e filogenética de comunidades microbianas. Todavia, há a necessidade de estudos detalhados sobre a microbiologia da descloração anaeróbia de PCB. Estudos recentes têm identificado os microrganismos envolvidos na descloração do PCB pelas seqüências do gene 16S RNAr (Yan *et al.*, 2006b). Os poucos estudos sobre a biodegradação da bifenila em sedimentos



e solos no Brasil foram realizados por Pellizari *et al.* (1996); Bicego *et al.* (2006) e Leigh *et al.* (2007).

O reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) foi usado nesse trabalho com a finalidade de avaliar a remoção de bifenila policlorada, especificamente contidas no ascarel. Esse reator foi utilizado no tratamento de diferentes águas residuárias, por Foresti *et al.* (1995), Zaiat *et al.* (1997), Damianovic (1997), Sarti (1998), Lima (2001), Bolaños (2001), Telh (2001), De Nardi (2002), Oliveira (2004) e Gusmão (2005). Nestes estudos ocorreu boa remoção de matéria orgânica, rápida adaptação e crescimento da biomassa, para adequado tempo de detenção hidráulica e não houve arraste severo da biomassa. Por essas características, o RHALF foi escolhido para ser utilizado no presente trabalho.

As técnicas de Biologia Molecular como o PCR/DGGE possibilitam a comparação de amostras ambientais simultaneamente, podendo-se realizar análise espacial e temporal das comunidades microbianas.

Neste trabalho, estas técnicas de biologia molecular foram utilizadas para entender a estrutura da comunidade microbiana presente em reatores anaeróbios utilizados para avaliar a degradação de PCB presentes no ascarel.

## 2. OBJETIVOS

---

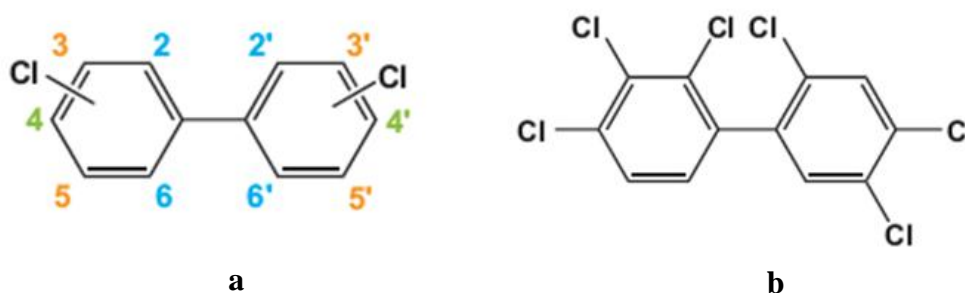
- ◆ Determinar método adequado para a extração de PCB do ascarel;
- ◆ Eleger solvente adequado para a solubilização de ascarel;
- ◆ Adaptar método cromatográfico para a quantificação de PCB presentes no ascarel;
- ◆ Avaliar co-substratos e meio suportes para determinação do potencial metanogênico em reator de batelada com ascarel;
- ◆ Aplicar a melhor condição nutricional e solvente adequado para avaliar a remoção de matéria orgânica contendo ascarel em reator de leito fixo;
- ◆ Avaliar a remoção de PCB nos reatores anaeróbios;
- ◆ Caracterizar a diversidade microbiana nos reatores anaeróbios em batelada e leito fixo;
- ◆ Realizar a aproximação da identidade filogenética, através de recorte de bandas de DGGE, de microrganismos presentes nos reatores anaeróbios.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

As bifenilas policloradas, comumente chamadas de PCB, são compostos produzidos a partir da cloração catalítica de bifenilas. São constituídos por dois anéis benzênicos unidos por uma ligação simples carbono-carbono, com até 10 átomos de cloro. Os vários números e posições do cloro, em substituição ao hidrogênio nos anéis aromáticos da bifenila, resultam nas 209 possíveis estruturas químicas da bifenila, que são denominados congêneres (Figura 3.1).

Estes compostos possuem baixo grau de reatividade, alta resistência elétrica, boas propriedades isolantes, não são inflamáveis e são estáveis ao calor e à pressão. Devido a estas características foram amplamente aplicados como fluidos dielétricos e isolantes em transformadores e capacitores. Dentre os possíveis congêneres de PCBs, 130 estão presentes nas misturas comerciais (Abramowicz, 1990; Tiedje *et al.* 1993; Borja *et al.* 2005).



**Figura 3.1.**(a) Estruturas da bifenila policlorada (orto 2,6; meta 3,5; para 4); (b) PCB (2, 2',3,4, 4',5'-CB)

Fonte: adaptado de Bedard (2008).

O ascarel é uma mistura de 50 a 70% de PCB e de 30 a 50% de triclorobenzenos (TCB), Kinner *et al.* (1993). Existem muitos transformadores originalmente a óleo

mineral ou a ascarel, que apresentam níveis de contaminação por PCB superiores a 50 ppm, o que os classifica como resíduos perigosos, obrigando legalmente os seus proprietários a darem correta destinação final, para não incorrerem em crime ambiental.

Aroclor é constituído de misturas de PCB produzidas pela Monsanto. A sua denominação se refere à percentagem de cloro presente no composto, como por exemplo, Aroclor 1242 possui 42% de cloro na sua composição (Penteado & Vaz, 2001).

Dependendo da quantidade e da posição de átomos de cloro, os PCBs recebem uma numeração. Observa-se que há três congêneres com apenas um átomo de cloro na sua composição. As fórmulas e massas moleculares dos PCBs, o número IUPAC e percentagem de cloro estão listados na Tabela 3.1

**Tabela 3.1:** Fórmulas moleculares e massas moleculares de PCBs

<b>Fórmula Estrutural</b>	<b>Nº de Congêneres</b>	<b>Nº IUPAC dos Congêneres</b>	<b>Massa Molecular (g/mol)</b>	<b>% Cloro</b>
$C_{12}H_9Cl$	3	1 - 3	188,65	18,79
$C_{12}H_8Cl_2$	12	4 - 15	233,1	31,77
$C_{12}H_7Cl_3$	24	16 - 39	257,54	41,30
$C_{12}H_6Cl_4$	42	40 – 81	291,99	48,56
$C_{12}H_5Cl_5$	46	82 – 127	326,43	54,30
$C_{12}H_4Cl_6$	42	128 – 169	360,88	58,93
$C_{12}H_3Cl_7$	24	170 – 193	395,32	62,77
$C_{12}H_2Cl_8$	12	194 – 205	429,77	65,98
$C_{12}HCl_9$	3	206 – 208	464,21	68,73
$C_{12}Cl_{10}$	1	209	498,66	71,10

Adaptado de Fiedler (1997)

A Lei Estadual 12.288 de 22 de fevereiro de 2006 dispõe sobre a eliminação controlada dos PCBs e dos seus resíduos, a descontaminação e supressão de transformadores, capacitores e demais equipamentos elétricos que contenham PCBs. A

Resolução CONAMA número 19 de 19 de setembro de 1994 autoriza, excepcionalmente, a exportação de resíduos perigosos, contendo bifenilas policloradas. A Instrução Normativa SEMA/STC/CRS N. 1 de 10 de junho de 1983 - disciplina as condições a serem observadas no manuseio, armazenamento e transporte de bifenilas policloradas e ou resíduos contaminados com tais compostos.

A incineração de materiais contaminados com PCB é uma técnica que apresenta vários inconvenientes, como riscos no processo de preparação dos equipamentos a serem incinerados; desperdício de material e energia, inutilizando os resíduos que poderiam ser reciclados; necessidade de um aterro Classe I para dispor as cinzas geradas, geração de efluentes líquidos e gasosos, como dioxinas e furanos, que necessitam ser tratados antes do descarte final, com risco da geração de um passivo ambiental. A descontaminação pode ser um processo mais adequado para destinação final deste resíduo, pois os materiais são reciclados, eliminando o potencial de geração de passivos ambientais futuros. No entanto, resíduos ainda são gerados e enviados à incineração. Os PCBs são combustíveis a alta temperatura e os produtos de sua combustão são mais tóxicos ainda (ATSDR, 2000).

### **3.1. Biodegradação de PCB**

Alguns microrganismos podem produzir enzimas capazes de converter compostos orgânicos como o PCB em compostos mais simples, minimizando os seus efeitos tóxicos. A biodegradação pode ocorrer de duas formas: mineralização e co-metabolismo. Na mineralização os microrganismos utilizam o poluente como fonte de carbono e energia, enquanto, no co-metabolismo, requerem uma segunda substância como co-substrato. Na degradação incompleta desses compostos pode ocorrer a formação e acumulação de produtos intermediários mais tóxicos que o composto original.

A biodegradação depende das características estruturais do poluente, de sua solubilidade em água e concentração no meio e, também de alguns fatores ambientais como temperatura, pH, presença de substâncias inibidoras ou tóxicas, disponibilidade de

acceptores de elétrons e interações entre os microrganismos. Geralmente, os acceptores de elétrons são fatores limitantes no metabolismo anaeróbio (Borja et al., 2005).

A contaminação ambiental por bifenilas policloradas ocorre por congêneres com diferentes graus de cloração. A completa degradação de misturas de PCB é raramente obtida, uma vez que os compostos altamente clorados não são metabolizados sob condição aeróbia. Embora, ocorram muitos relatos de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), muitos sedimentos contaminados encontram-se sob condições anaeróbias (Penteado & Vaz, 2001).

Pouco se conhece sobre a descloração anaeróbia do PCB, embora, se saiba que alguns microrganismos descloram PCB com ganho de energia para o seu crescimento. Rysavy *et al.* (2005) verificaram a presença de doadores de elétrons apropriados em sedimento contaminado com a finalidade de estimular a descloração de PCB. Os autores verificaram o efeito da adição de ferro ( $Fe^0$ ) como doador de elétrons na descloração microbiana de alguns congêneres de PCBs, 3,4,5-triclorobifenila (3,4,5-CB) e 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenila (2,2',3,4,4',5,5'-CB). Possivelmente, o sedimento já continha população microbiana endógena capaz de desclorar o PCB. A adição de 0,1 g  $Fe^0$ /g de sedimento reduziu a fase *lag* e favoreceu a remoção de cloro nas posições *di-para* em 100 dias. Como o  $Fe^0$  é uma fonte de  $H_2$ , o efeito da adição direta de  $H_2$  ao sedimento também foi testada. A adição de  $H_2$  (0,001 atm) no *headspace* resultou na mesma atividade de descloração e na redução da fase *lag*.

Ambrosoli *et al.* (2005) documentaram a degradação de bifenilas, fluoreno, fenantreno e pireno em solo de arrozais em local não contaminado, sob condição fermentativa e desnitrificante. Consórcio microbiano obtido de solo contaminado foi incubado, sob condição anóxica, por 20 dias, com nitrato e 10 g/L de bifenila, fenantreno e fluoreno e 5g/L de pireno e em algumas amostras, glicose ou acetato. Em intervalos de tempo regulares foram avaliados o potencial redox, a concentração de PAHs, ATP microbiano e concentração de nitrato. A degradação foi similar para cada PAHs e foi inexpressiva quando PAHs foram a única fonte orgânica disponível para o inóculo, confirmando a recalcitrância destes compostos. A biodegradação foi influenciada por outras fontes de carbono, sendo o melhor resultado obtido quando foi adicionado acetato (50 mg) ou glicose (50 mg). A biodegradação anaeróbia dos compostos estudados parece

ser possível por ambos os metabolismos, fermentativo e anóxico, fornecendo co-metabólitos como o nitrato, com baixa massa molecular e apropriado acceptor de elétrons.

Winchell & Novak (2008) analisaram duas tecnologias de biorremediação, a bioestimulação e bioadição em diferentes sedimentos, para observar a degradação do PCB. Os estudos de Bedard *et al.* (1997), Wu & Wiegel (1997) sugerem que a bioadição pode melhorar a descloração do PCB, mas é necessária adição concomitante de um bioestimulante. Rysavy *et al.* (2005) observaram descloração do PCB, após adição de um doador de elétron, ferro elementar ( $\text{Fe}^0$ ) como bioestimulante. Bioadição e bioestimulação podem ser mais efetivas na descloração de PCB do que somente um ou outro processo isoladamente.

Chen *et al.* (1988) utilizaram sedimentos coletados do rio Hudson (EUA) para a observação de biodegradação anaeróbia de Aroclor 1221 (mistura de bifenilas policloradas). Bactérias degradadoras de PCB foram isoladas do sedimento do rio Hudson e enriquecidas em meio contendo 20 mg/L de Aroclor 1221. Após 40 dias, 1 ml da cultura foi transferido para meio de enriquecimento. Mais três transferências foram realizadas antes das populações serem utilizadas no experimento. Três frascos de cultura, contendo 30 ppm de PCBs, receberam os seguintes tratamentos: (1) um deles recebeu 1 ml de meio mineral reduzido para determinar a atividade da microflora indígena; (2) outro, recebeu mistura da cultura isolada, para estudar a sua atividade no sedimento e (3) o terceiro foi utilizado como controle e recebeu 2 ml de formalina (30%). Estas preparações de sedimento foram vigorosamente agitadas (200 rpm) por 5 meses à temperatura ambiente. Os autores determinaram o PCB e metano por cromatografia gasosa. Os autores verificaram a completa degradação anaeróbia das bifenilas cloradas, todavia, metano não foi detectado em nenhuma condição. Após 105 dias de incubação, a quantidade de congêneres de PCBs foi de 15,19  $\mu\text{g/ml}$  no experimento controle, 2,87  $\mu\text{g/ml}$  com a microflora indígena e 2,57  $\mu\text{g/ml}$  na cultura isolada. Os congêneres de PCBs podem ser degradados anaerobiamente. Esses compostos podem ser utilizados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos responsáveis pela degradação.

Consórcio microbiano anaeróbio (ATCC 55616) proveniente de sedimentos foi crescido e mantido em grânulos de reator UASB à temperatura ambiente (Natarajan et al., 1999). Bifenila policlorada foi fornecida como única fonte de carbono e energia foi degradada, culminando com a produção de metano. Após 50 dias de operação ocorreu a

degradação de cerca de 75% da bifenila inicial (42,2  $\mu\text{mol}$ ). A velocidade de degradação da bifenila foi de 0,61  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ . Um produto intermediário originado do rompimento do anel de bifenila, *op*-cresol, foi detectado, e mineralizado a produtos finais e gás. A produção de *p*-cresol foi analisada por cromatografia líquida e confirmada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM). *p*-cresol não foi acumulado, pois a velocidade de degradação foi alta, ou seja, de 1,55  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ . A produção de metano aumentou com a correspondente diminuição da concentração de *p*-cresol. Assim, por exemplo, em 40 dias, 62  $\mu\text{mol}$  de *p*-cresol foram completamente degradados, com formação de 192  $\mu\text{mol}$  de metano.

Cutter *et al.* (2001) estudaram a descloração redutiva de PCBs por bactérias anaeróbias em sedimentos aquáticos. Sequências do gene 16S RNAr, obtidas de cultura enriquecida com bactérias degradadoras de *orto*-PCB, foram monitoradas pela técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Os autores correlacionaram a oxidação de acetato ou hidrogênio à redução de 2,3,5,6-CB (clorobifenila) a 2,3,5-CB e a 3,5-CB. Portanto, estes foram os primeiros pesquisadores a identificar bactérias anaeróbias degradadoras de PCB, que utilizaram acetato e 2,3,5,6-tetraclorobifenila. Os microrganismos identificados como bactériao-17 apresentaram seqüência de RNAr16S muito semelhante às bactérias verdes não-sulfurosa que inclui *Dehalococcoides ethenogenes*. A bactériao-17 utilizou acetato para a descloração e o crescimento. A conclusão de que o-17 foi capaz de desclorar o PCB foi baseada em três evidências. Uma delas é que o RNAr 16S dao-17 foi detectado durante a descloração do PCB e, somente, quando havia PCB no meio. Outra evidência é que não ocorreu a descloração quando o o-17 foi eliminado sistematicamente da cultura. A terceira evidência foi que RNAr 16S dao-17 foi muito similar a *Dehalococcoides* spp., microrganismos que reduzem compostos organoclorados.

A disponibilidade de informação filogenética sobre bactérias degradadoras de PCB permite a análise detalhada das comunidades microbianas e seu monitoramento durante processo de biorremediação com esses compostos tóxicos. Desse modo, pode-se acelerar o processo pela introdução de uma população previamente enriquecida de bactérias descloradoras de PCB. Esta biorremediação estratégica é denominada de bioadição e sua aplicação é muito importante no tratamento de compostos orgânicos recalcitrantes, tais como derivados de petróleo, solventes organoclorados e herbicidas.



Yan *et al.* (2006) investigaram o efeito da adição de culturas descloradoras de PCB em três diferentes sedimentos, em termos de atividade de descloração e estrutura da comunidade microbiana. Culturas descloradoras de PCB derivadas de sedimentos estuarinos e com boa atividade de degradação foram misturadas e inoculadas em sedimentos estéreis oriundos da mesma fonte, do Porto Baltimore, sedimento marinho de Palos Verdes e do Rio Hudson. Os autores observaram que a origem do sedimento e sua composição química podem afetar significativamente a atividade e a estrutura da comunidade microbiana. Os efeitos mais prováveis foram a sobrevivência e enriquecimento de população microbiana particular, resultante da disponibilidade de macro e micro-nutrientes. O impacto que os diferentes sedimentos tiveram sobre o crescimento dos microrganismos, sugeriu a caracterização preliminar do local contaminado para que a bioadição ocorra com sucesso.

Yang *et al.* (2007), investigaram a degradação anaeróbia de bifenila em quatro solos de arrozais não contaminados e em amostras contaminadas de sedimentos de rio, no Japão. Os autores verificaram que nos solos não contaminados ocorreu degradação anaeróbia de bifenila. Esta capacidade de degradação foi observada em solos submersos em água e sedimento do rio, em meio neutro, com baixas quantidades de nitrato e óxido de ferro. A adição de nitrato (10mM), além de lactato, piruvato e acetato inibiram completamente a degradação de bifenilas. A adição de sulfato (10 mM) e Fe (III) (20 mM) não aumentou a biodegradação anaeróbia de bifenilas. A maior degradação de bifenilas (44%) foi observada quando somente água e nenhum outro aceptor ou doador de elétrons foram adicionados.

Em 2001, Rockne e Strand estudaram a biodegradação e mineralização de PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, 20 mM) em reator de leito fluidificado. Os autores verificaram a dependência de nitrato na biodegradação de PAHs (naftalenos, fenantrenos e bifenilas). O reator foi enriquecido com nitrato, realimentados continuamente por período de dois anos, com os PAHs, como única fonte de carbono e energia, dissolvidos em água do mar sintética. Os PAHs e nitrato/nitrito foram determinados por cromatografia líquida com detector de ultravioleta (CLAE/UV). A biodegradação cessou quando nitrato foi esgotado, porém, foi reassumida quando nitrato foi novamente adicionado. Tal fato evidenciou que a biodegradação de PAHs foi dependente da redução de nitrato. Os autores verificaram que ocorreu degradação parcial

de naftaleno (17% do carbono inicial), entretanto, a degradação de fenantreno foi quase completa (96%). Na presença de naftaleno, foi observada menor assimilação de bifenilas ou fenantreno, porém o carbono do naftaleno foi assimilado em 57%. A degradação de PAHs foi estequiometricamente aproximada à quantidade de nitrato consumido. A degradação dos hidrocarbonetos aromáticos bicíclicos e policíclicos foi dependente da concentração de nitrato, portanto, concluiu-se que esses compostos não são recalcitrantes à biodegradação sob condições anóxicas.

### 3.2 Métodos de extração e análises de PCB

Diferentes métodos de extração podem ser utilizados para a extração de PCB dos diferentes materiais a serem estudados, como solo, sedimento ou diretamente do óleo de transformadores. O método mais utilizado por vários autores foi baseado no método de extração de Quensen *et al.* (1988) entre eles, Mousa *et al.* (1998), Rysavy *et al.* (2005), Yan *et al.* (2006) e Winchel & Novak (2008). Este método consiste em duas fases, uma de extrações sequenciais com hexano e acetona na proporção de (9:1), lavagem com NaCl (2%) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30%) e a outra de purificação em coluna cromatográfica contendo Florisil e cobre (4:1), o extrato é analisado em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5980, equipado com detector de captura de elétrons.

Outros diferentes métodos também foram utilizados por diferentes autores. Wu *et al.* (1996, 1997 e 1998) e Fava *et al.* (2003) utilizaram dietil éter anidro para a extração. Bedard *et al.* (1996), utilizaram éter anidro e mercúrio elementar. Bicego *et al.* (2006) e Cho *et al.* (2003) utilizaram extração em Soxhlet com *n*-hexano, Chang *et al.* (2001) utilizaram *n*-hexano e agitação em “shaker” por 2 horas a 160 rpm. Cutter *et al.* (1998) extraíram PCB com etil-acetato e coluna de Florisil/cobre. Drenzek *et al.* (2001) utilizaram éter metil terc butílico com ultrassom por 15 minutos. Fagervold *et al.* (2005) extraíram com hexano em “shaker” por 12 horas e coluna de Florisil/cobre (4:1). Berkaw *et al.* (1996) utilizaram etil-acetato em “shaker” por 10 horas e coluna de Florisil/cobre.

### 3.3 Caracterização microbiana

Técnicas de biologia molecular usadas para caracterização microbiana tais como, DGGE, permitem avaliação da riqueza dos microrganismos envolvidos na degradação de PCBs em biorreatores. Podendo-se conhecer a alteração da diversidade espacial e temporal no sistema em estudo. Outras técnicas de isolamento e seqüenciamento foram utilizadas para a identificação de microrganismos capazes de degradar os PCBs.

Grishchenkov *et al.*, (2002) isolaram *Citrobacter freundii* BS2211 de cultura enriquecida, contendo solo e resíduo industrial contaminados, em meio sintético suplementado com bifenila. A linhagem foi capaz de degradar a bifenila policlorada sob condição anaeróbia com redução de nitrato. Quando a concentração inicial de bifenila foi igual a 150 mg/mL para concentração celular de  $10^9$  células/mL ocorreu a degradação de 26 a 28% de bifenila em 3 dias a 28°C. Quando a concentração foi 250 mg/mL de bifenila, com  $10^7$  células/mL, observou-se 17% de degradação em 21 dias.

Wu *et al.* (2002) identificaram microrganismos cujo crescimento foi associado à descloração de bifenilas policloradas com cloros nas posições *orto* ou *meta*, dos dois lados em um anel benzeno (“doubly flanked chlorines”). As seqüências do 16S RNAr, obtidas da cultura enriquecida, levaram à identificação de três unidades taxonômicas operacionais (OTUs 1, 2 e 3). A OTU 1 foi sempre detectada quando 2,3,4,5-CB ou outros congêneres com dois cloros estavam presentes, os quais foram desclorados. As OTUs 2 e 3 foram detectadas na ausência de PCBs. As seqüências parciais de OTUs 2 e 3 apresentaram 98,2% de similaridade a *Desulfovibrio caledoniensis* (DCU53465). Cultura de bactérias redutoras de sulfato foi isolada da OTUs 2 e 3 e não foi capaz desclorar 2,3,4,5-CB, quando incubada em meio E-CI contendo 10 mM de formiato ou 10 mM de lactato. Desse modo, os autores concluíram que OTU 1 representou um grupo de bactérias descloradoras em co-cultura com *Desulfovibrio* sp. A seqüência de OTU 1 foi similar (89%) à bactéria *o-17*, a qual foi capaz de desclorar *orto*-PCB. Os autores verificaram também que arqueias metanogênicas e não participaram da descloração de PCBs com dois cloros na mesma posição em um dos anéis do benzeno.

Fagervold *et al.* (2005) mostraram que espécies do grupo *Chloroflexi* são reconhecidamente capazes de degradar anaerobiamente as bifenilas policloradas por descloração redutiva. PCB 101 (2,2',4,5,5'-CB) foi desclorado redutivamente a PCB 49 (2,2',4,5'-CB), nas posições *di-para* e *meta* pelo filotipo DEH10, pertencente a *Dehalococcoides*. Este mesmo grupo foi eficiente para desclorar PCB 132 a PCB 91 (2,2',3',4,6'-CB), nas posições *para-*, *di-orto* e *meta-*. No entanto, outro grupo designado SF1, mais estreitamente relacionado ao grupo do *o-17/DF-1* foi responsável pela subsequente descloração do PCB 91 a PCB 51 (2,2',4,6'-CB).

Com as considerações salientadas anteriormente pretendeu-se, neste trabalho, avaliar material suporte de imobilização para biomassa anaeróbia a ser aplicado, tanto, em reator de leito fixo, como de batelada, com ascarel como substrato orgânico. Além disso, testes foram realizados visando avaliar diferentes solventes orgânicos para solubilizar o ascarel, bem como, a aplicação de técnicas de Biologia molecular para caracterização de bactérias e arqueias metanogênicas presentes no biofilme dos reatores anaeróbios. Trata-se de contribuição inédita nesta área de pesquisa, uma vez que se refere à aplicação desse tóxico em reator contínuo de leito fixo. A maioria dos trabalhos da literatura (Bedard et al. 2005, Baba et al. 2007, Chang et al. 2001, Cutter et al. 2001, Fagervold et al. 2007, Rysavy et al. 2005) avalia a remoção desse composto e caracteriza a diversidade microbiana em microcosmos com sedimento proveniente de ambiente de água doce e marinho.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

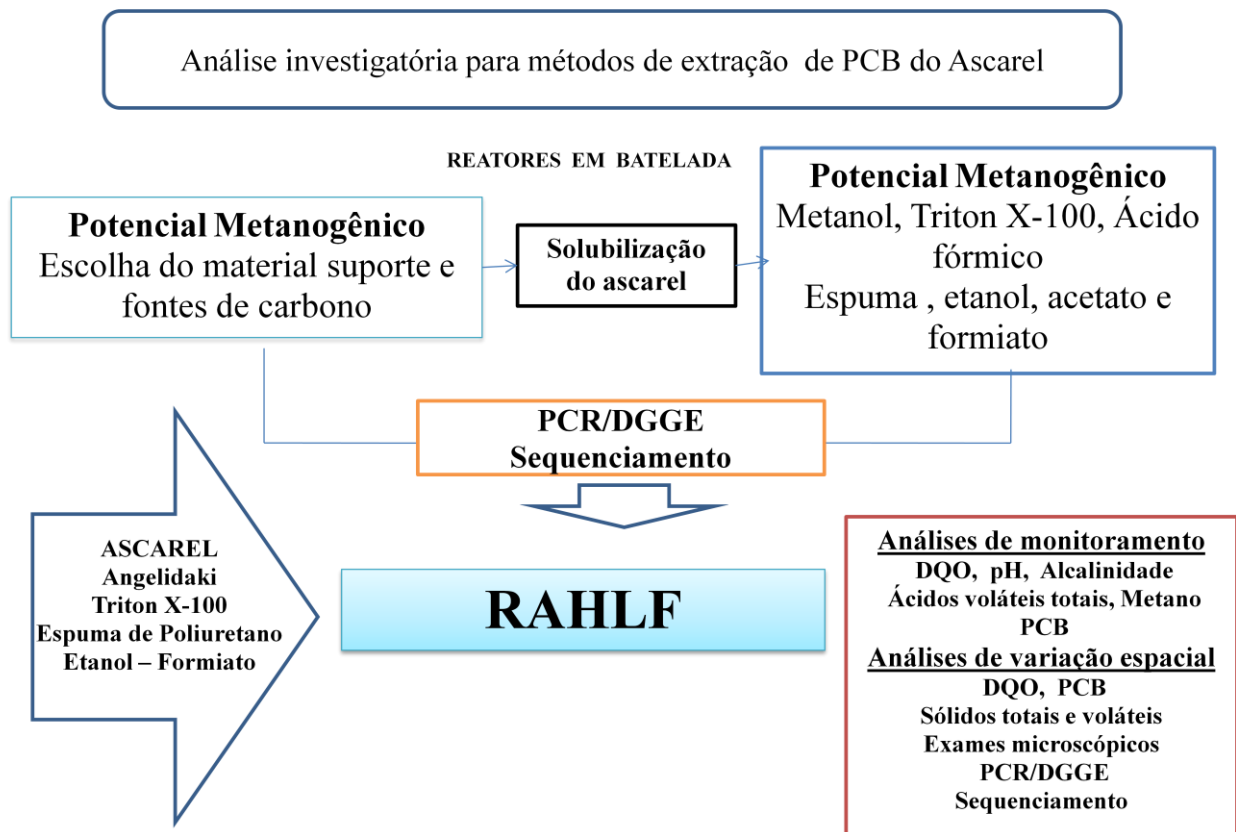
O ascarel é um óleo pouco solúvel, para tanto, realizou-se investigação para definir os possíveis solventes orgânicos, tais como, acetona, n-hexano, etanol, metanol, adequados ao método de extração de PCB. Foram realizados testes em reatores em batelada para eleger o melhor solvente, bem como, co-substratos e material suporte apropriado para serem utilizados na alimentação do RAHLF.

O método de Quensen *et al.* (1988) serviu como base para a análise de PCB por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, no entanto, alguns testes preliminares foram realizados para adequação do método e análise do óleo ascarel bruto.

Material suporte, tais como, espuma de poliuretano e carvão vegetal, além de biomassa em suspensão, foram usados nos reatores em batelada. Nesses ensaios foi usado formiato de sódio como co-substrato e etanol como solvente. A partir da necessidade observada neste ensaio, foi realizada avaliação exploratória de solventes de diferentes naturezas, tais como, hexano, surfactantes e ácidos orgânicos para melhor solubilização e biodisponibilidade do ascarel. Portanto, solventes como metanol, Triton X-100 e ácido fórmico foram eleitos para realização de novo ensaio em batelada, utilizando-se espuma de poliuretano (selecionado no primeiro ensaio) e co-substratos etanol, formiato e acetato. Nesses ensaios determinou-se o potencial metanogênico, como análise indireta da degradação do ascarel.

O RAHLF foi preenchido com lodo granulado previamente imobilizado em espuma de poliuretano e foi alimentado com ascarel solubilizado em Triton X-100, meio Angelidaki (Angelidaki *et al.* 1990), etanol e formiato.

A evolução da comunidade microbiana foi avaliada através de PCR/DGGE e seqüenciamento. As etapas experimentais encontram-se detalhadas no fluxograma da Figura 4.1.



**Figura 4.1** Fluxograma das principais etapas realizadas.

## 4.1. Estudo exploratório de métodos de extração e análises de PCB

O método mais usado para quantificação de PCB é aquele que foi desenvolvido por Quensen *et al.* (1988). Este método foi desenvolvido para determinação desse composto em sedimento de água doce. Todavia, para a extração de PCB do ascarel algumas modificações foram introduzidas. Para tanto, foram realizados alguns testes preliminares para obter adequadamente a extração do PCB do óleo ascarel

### 4.1.1 Extração de PCB do ascarel

O método de extração de PCB desenvolvido por Quensen *et al.* 1988, constitui-se em duas etapas: (1) extração de PCBs e (2) purificação em coluna Florisil/cobre. Para a

extração utilizou-se 2 mL de amostra (ascarel) para 5 mL de solução de Hexano/Acetona (9:1), agitação em vórtex por 2 minutos e centrifugação a 4.000 rpm por 2 min. Retirou-se a camada superior do extrato (hexano/PCB), utilizando-se pipeta Pasteur e transferiu-se para outro frasco. A seguir adicionou-se 2,5 mL de NaCl 2%, transferindo o material para agitação em vórtex por 2 min. e centrifugação a 4.000 rpm por 2 min. A camada superior foi transferida para outro frasco e adicionou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% e, após agitação e centrifugação, foi realizado o processo de purificação da camada superior do extrato hexano/PCB em coluna contendo, como fase estacionária, mistura de 2,5 g de Florisil e 0,625 g de cobre em pó (4:1) e lã de vidro silanizada para retenção da fase estacionaria. A coluna de purificação foi confeccionada em vidro (borosilicato) com volume útil de 18 mL. O extrato foi, mais uma vez, transferido para outro frasco e quantidade não específica de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro foi adicionada para a retirada de água. O extrato purificado foi evaporado até 1 mL de volume final, o qual foi armazenado em freezer (-20 °C). Na oportunidade da análise procedeu-se o descongelamento do material e posterior análise em cromatógrafo gasoso HP 5890 série II para determinação de PCB total.

Foram testados diferentes protocolos de extração de PCB do óleo Ascarel. Inicialmente, foi utilizado o método de Quensen *et al.*, 1988, também utilizado por outros autores (Quensen *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2002; Rysavy *et al.*, 2005; Winchell e Novak, 2008).

Baseado neste método avaliou-se diferentes condições de extração, em duplicatas de amostras. Em todas as condições, as amostras foram submetidas à agitação em vórtex por 2 minutos, seguindo o protocolo de Quensen *et al.* (1988) com algumas adaptações para a melhoria de sua eficiência. Adaptações como, a adição de mais 15 minutos em banho de ultrassom e congelamento da amostra para favorecer a separação do extrato de hexano contendo o PCB, do restante da amostra. Como surrogate (padrão adicionado antes da etapa de extração) foi utilizado 1,3,5-TCB e como padrão interno, octacloronaftaleno, adicionado antes da injeção no cromatógrafo.

Os métodos foram denominados e conduzidos da seguinte forma:

1. **Método de Quensen (1988)** –descrito anteriormente;
2. **Método Hexano/Florisil** – utilizou-se apenas hexano, agitação em vórtex por dois minutos e 15 minutos em banho de ultrassom – purificação em coluna de Florisil/cobre (4:1);
3. **Método Hexano/Florisil/Sílica** – o mesmo procedimento acima, acrescentando-se 0,6 g de sílica à coluna de Florisil/cobre na etapa de purificação;
4. **Método Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisil/Sílica** – mesmo procedimento acima, porém acrescentou-se 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> após o acréscimo de *n*-hexano no início do procedimento.

A partir dos resultados obtidos, o método escolhido foi de **Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisil/Sílica**, portanto detalhado a seguir.

#### 4.1.1.1 Método Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisil/Sílica

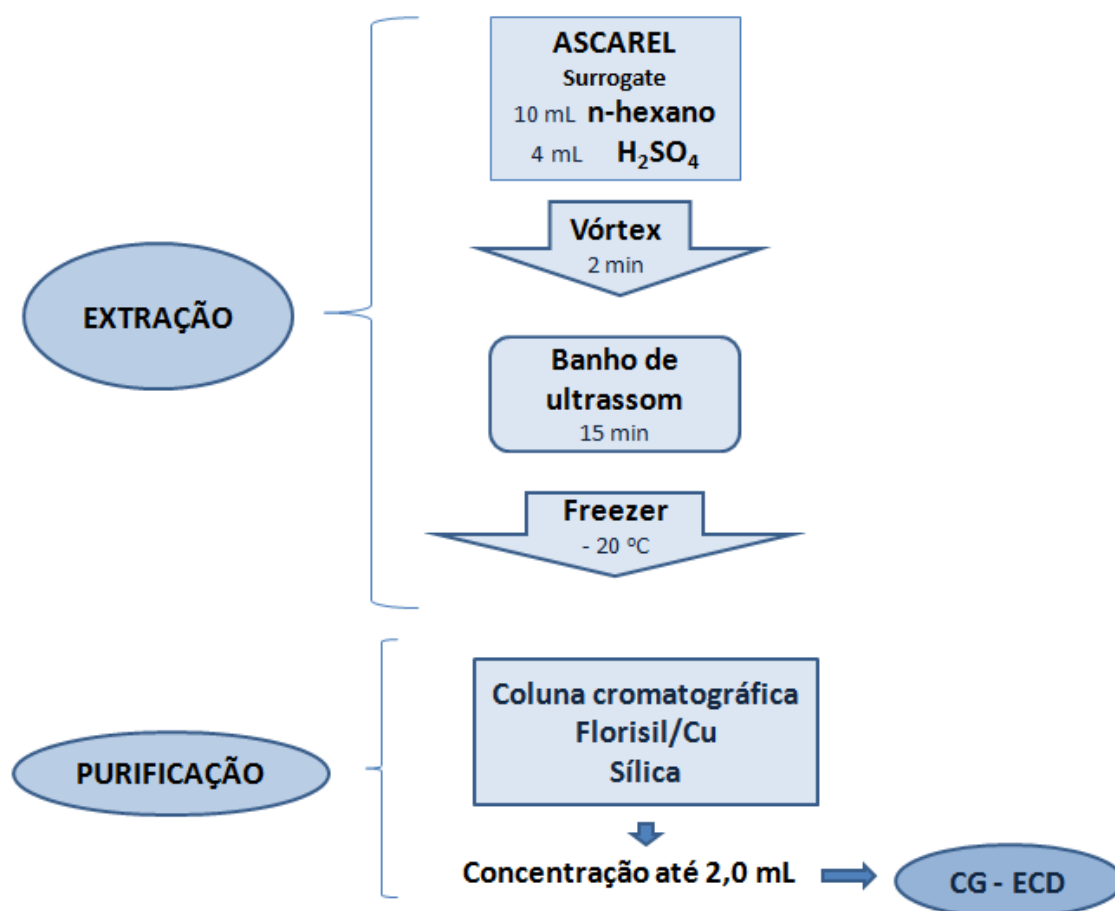
Após análise em cromatografia gasosa, escolheu-se o Método Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Sílica como adequado para ser utilizado na extração de PCB do ascarel, cujos passos de execução encontram-se descritos abaixo (Figura 4.2).

A purificação do extrato foi realizada em coluna Florisil-cobre (4:1), constituída por uma pipeta Pasteur (220 mm X 11 mm) contendo quatro partes (2,5 g) de Florisil (100 mesh) e uma parte (25 %) de cobre em pó (60 mesh), para remover o enxofre.

Após pesado, o cobre (0,781g para chegar a 0,625 g após o tratamento, considerando-se a perda) foi previamente preparado para uso na coluna: lavado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 %), em seguida com água ultra purificada e finalizando com acetona e então,



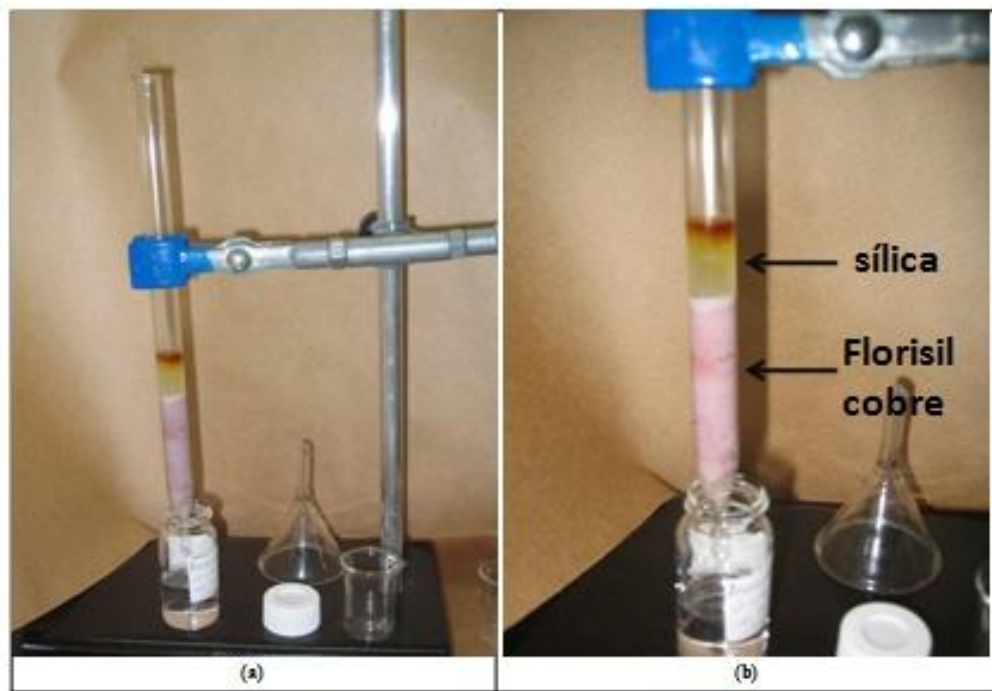
seco em sistema a vácuo (funil de büchner e membrana celulósica RC - Vliesverstärkt– 0,2 µm – 47 mm).



**Figura 4.2** Método de extração de PCB do ascarel

Depois da secagem o cobre foi misturado ao Florisil e colocado na coluna (Figura 4.3), com o auxílio de um funil. Adicionou-se 5 mL de *n*-hexano para eluir a coluna e então, 0,6 g de sílica gel foram acrescentadas com mais 5 mL de *n*-hexano, e então a coluna estava pronta para uso na extração dos PCBs.

As amostras foram eluídas na coluna, com *n*-hexano e o volume foi ajustado por evaporação a 2 mL, adicionando-se 100 µL de octacloronaftaleno (0,8 mg/L) como padrão interno antes da injeção em cromatógrafo gasoso.



**Figura 4.3** Coluna de purificação do extrato de PCB em hexano (a) vista geral da coluna e (b) detalhe das camadas de sílica e Florisil/Cu após a extração de PCB do asfarel.

## 4.2 Curva de calibração

Anteriormente, a realização da curva de calibração testes foram realizados para obter as concentrações corretas de *surrogate* e padrão interno. Além disso, testes foram realizados para verificar a influencia do meio Angelidaki e seus componentes na análise de PCB. *Surrogate* (1,3,5-TCB) é um composto adicionado antes do processo de extração para se avaliar a perda ou a eficiência durante o procedimento.

A Curva de calibração foi realizada de acordo com o método da EPA VICTORIA 6013 e ABNT NBR 13882:2008. Os PCBs foram estimados como PCB total, no caso Aroclor 1016/1260. Mistura de dois padrões de Aroclor (1016 e 1260) foi utilizada, por representarem a maioria dos picos dos outros Aroclor existentes e também por apresentarem perfil de picos de áreas relativas de PCB muito parecidos com as áreas do asfarel utilizado.

As concentrações usadas de Aroclor (1016 e 1260) para elaboração da curva foram de 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L e 20 mg/L. As diferentes concentrações

foram preparadas em triplicatas, nas mesmas condições de extração e purificação aplicadas para as amostras provenientes dos reatores anaeróbios, ou seja, em frascos antibióticos contendo meio Angelidaki, espuma de poliuretano e 0,5 mL da mistura de padrões.

#### **4.2.1 Repetitividade do método**

As determinações foram realizadas em duplicatas e executadas pelo mesmo operador. Os resultados devem ser acima de 95% de confiança. De acordo com a ABNT NBR 13882:2008, “os resultados obtidos devem ser considerados suspeitos (95% de confiança) se a diferença entre eles for maior que:  $2 + (0,1 \times M)$

Sendo,

$M =$  Média das determinações

A análise de Variância (ANOVA) foi realizada, aplicando-se o teste TUKEY, para avaliar se houve diferença entre as médias dos diferentes testes de extração.

### **4.3 Descrição do ascarel e padrões**

O Ascarel, mistura de bifenilas policloradas (PCB) e triclorobenzenos (TCB), é um óleo de coloração amarelo citrino, pouco viscoso e aparência límpida. No caso específico desse trabalho, o ascarel foi proveniente da concessionária de fornecimento de energia elétrica BANDEIRANTES, situada na região de São José dos Campos. As referências do óleo que foram enviadas pela empresa foram as seguintes: TR-01 ETD JAC – Ref ano 1977 fab. BB – tipo TD3LF – no. série P 8775 NGE – TRTCM 30031.

Também foram utilizados os padrões Aroclor 1016, 1221, 1232, 1242, 1248, 1254, 1260, adquiridos da Sigma Aldrich. Foram preparadas soluções de 2 mg/L cada padrão Aroclor e injetadas em cromatografo gasoso para análise e comparação dos picos, que são característicos para cada padrão.

#### 4.4 Método de análise e extração de PCB

A determinação de PCB total e dos diferentes Aroclor foi realizada em cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard, 5890 series II equipado com detector de captura de elétrons (ECD) – coluna capilar Elite – 5 Perkin Elmer (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). Temperatura inicial do forno: 100 °C a 160 °C (2 minutos), a 15 °C/min até 235 °C e até 270°C (36 min.) a 5 °C/min. Temperatura do injetor de 280 °C (*splitless*) e do detector de 300 °C.

O detector de captura de elétrons é uma ferramenta extremamente sensível na análise de compostos organoclorados e amplamente utilizado na rotina da maioria dos laboratórios de pesquisa (Shibamoto, 1998).

#### 4.5 Composição do meio de cultura

Em todas as fases do trabalho experimental foi utilizado meio de cultivo Angelidaki (Angelidaki *et al.*, 1990), e solução de vitaminas (Wolin *et al.*, 1963) (Tabela 4.1). O meio de cultura, solução de vitaminas, solução de bicarbonato de sódio e etc. foram preparados de acordo com as técnicas para a manipulação de anaeróbios estritos como descritos por Vazoller (1995). As soluções foram esterilizadas em membrana de 0,22 µm ou por autoclavação. Bicarbonato de sódio (10%) foi adicionado para tamponar o meio.

**Tabela 4.1 Composição do Meio Angelidaki**

<b>Componente</b>	<b>Concentração Estoque (g/L)</b>	<b>Volume (mL)</b>	
<b>1. Meio basal (Angelidaki <i>et al.</i>, 1990)</b>			
<i>Solução A *</i>			
NH <sub>4</sub> Cl	100		
NaCl	10	<b>10</b>	
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5		
<i>Solução B **</i>			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	200	<b>2</b>	
<i>Solução C (metais traços e selenito)*</i>			
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05		
ZnCl <sub>2</sub>	0,05		
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,038		
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05	<b>1</b>	
AlCl <sub>3</sub>	0,05		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05		
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,092		
EDTA	0,5		
HCl concentrado	1 mL		
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,1		
<b>2. Vitaminas (Wolin <i>et al.</i>, 1963)*</b>			
Ácido fólico	0,010		
Ácido p-aminobenzóico	0,025		
Ácido pantotênico	0,025		
Ácido tióico	0,025		
Biotina	0,010	<b>2</b>	
Vitamina B1 (Tiamina)	0,025		
Vitamina B2 (Riboflavina)	0,025		
Vitamina B5 (Nicotinamida)	0,025		
Vitamina B6 (Piridoxina)	0,050		
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	0,0001		

Método de esterilização: \* (filtração em membrana) e \*\* (autoclavação)

## **4.6 Inóculo**

O inóculo utilizado em todas as fases deste trabalho, foi proveniente de reator anaeróbico de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB) utilizado no tratamento de água residuária de avicultura (Avícola Dacar -Tietê -SP). Antes de ser utilizado, o lodo foi homogeneizado em liquidificador e submetido a fluxo de N<sub>2</sub> (100%) por 10 minutos.

A maioria dos trabalhos de degradação anaeróbia de compostos tóxicos utiliza inóculo previamente adaptado. Porém, no presente trabalho foi utilizado inóculo não adaptado ao ascarel. Esse inóculo foi usado no Laboratório de Processos Biológicos em pesquisas sobre degradação anaeróbia de compostos, tais como, BTEX, benzeno, tolueno, PCP (De Nardi, 2002, Ribeiro, 2005, Cattony, 2005 e Gusmão, 2005). Este inóculo possui boa diversidade microbiana, o que o torna excelente para a utilização em reatores para a degradação de compostos tóxicos (Hirasawa, 2007).

## **4.7 Potencial Metanogênico de reatores em batelada contendo ascarel**

Dois ensaios de Potencial Metanogênico foram realizados, sendo um deles com esgotamento da matéria orgânica e o outro sem o prévio esgotamento. Nos dois casos foram usadas diferentes fontes de carbono (etanol e formiato), bem como diferentes meios suportes (espuma de poliuretano, carvão vegetal) ou biomassa suspensa com a finalidade de definir a condição nutricional mais adequada para utilizar no reator contínuo de leito fixo. Porém, por ser um óleo pouco solúvel houve a necessidade de se realizar outros ensaios para a seleção de solvente apropriado ao ascarel, inclusive a realização de ensaio para a avaliação do Potencial Metanogênico em reatores contendo ascarel e diferentes solventes.

#### **4.7.1 Ensaio 1 - Potencial metanogênico com diferentes materiais suportes e doadores de elétrons**

O potencial metanogênico foi avaliado em diferentes suportes, tais como, espuma de poliuretano, carvão vegetal, além de testes com a biomassa em suspensão. Este ensaio foi realizado em duas ocasiões, uma delas, com esgotamento da matéria orgânica e a outra sem esgotamento, com a diferença de que foram inseridas mais duas condições com biomassa em suspensão e formiato (reator 11 - com etanol e reator 12 – com ascarel) no ensaio com esgotamento da matéria orgânica.

Nas duas etapas foi avaliado o potencial metanogênico em reatores em batelada contendo ascarel. Os reatores foram preparados em frascos antibióticos (triplicata) de 100 mL (volume reacional de 50 mL), sendo 50 mL de *headspeace* N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (70/30%), vedados com tampas em Teflon e lacres de alumínio, de acordo com as técnicas de manipulação anaeróbia estrita descrita por Vazoller (1995), Os frascos reatores continham meio de cultura Angelidaki (Angelidaki *et al.* 1990), inóculo (10%) e dois diferentes materiais suporte (carvão vegetal e espuma de poliuretano) e outros com biomassa em suspensão; com ou sem etanol como solvente e formiato como fonte de carbono (co-substrato). A quantidade de material suporte foi calculada de acordo com a área superficial. Os reatores foram incubados em estufa com agitação orbital de 150 rpm e temperatura de 30 °C. A composição detalhada de cada reator encontra-se descrita na Tabela 4.2. A melhor condição obtida para a degradação de PCB foi utilizada na alimentação do reator anaeróbio de leito fixo com células imobilizadas em espuma de poliuretano.

A avaliação da degradação foi feita pela quantificação indireta por meio da análise de metano com auxílio de cromatógrafo gasoso Gow Mac – Series 150, equipado com detector de condutividade térmica e coluna de aço inox Poropak Q, de 1/8” X 2m, temperatura do injetor igual a temperatura da coluna de 50 °C, e temperatura do detector de 80 °C. O volume de amostra injetado foi de 1000 µL (1,0 mL). A retirada do gás presente nos frascos foi realizada com seringa de 1,0 mL, a cada duas horas no primeiro dia, a cada três horas no segundo dia, três vezes por dia na primeira semana e uma vez ao dia na segunda semana.

**Tabela 4.2** Componentes dos reatores do ensaio 1

<b>Reator</b>	<b>Material suporte/ Biomassa</b>	<b>Inóculo (mL)</b>	<b>Meio Angelidaki (mL)</b>	<b>Sulfeto sódio 5% (mL)</b>	<b>Etanol (46 g/L) (mL)</b>	<b>Ascarel ( mL)</b>	<b>Formiato (mL) (10 mM - 680 mg/L)</b>
<b>1(controle)</b>	<b>Suspensão</b>	<b>5,0</b>	<b>44,7</b>	<b>0,3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>2</b>	<b>Suspensão</b>	<b>5,0</b>	<b>44,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>3</b>	<b>Suspensão</b>	<b>5,0</b>	<b>43,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>-</b>
<b>4</b>	<b>Suspensão</b>	<b>5,0</b>	<b>44,2</b>	<b>0,3</b>	<b>-</b>	<b>0,5</b>	<b>-</b>
<b>5</b>	<b>Espuma Poliuretano</b>	<b>5,0</b>	<b>43,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>
<b>6</b>	<b>Espuma Poliuretano</b>	<b>5,0</b>	<b>43,9</b>	<b>0,3</b>	<b>-</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>
<b>7</b>	<b>Carvão vegetal</b>	<b>5,0</b>	<b>43,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>
<b>8</b>	<b>Carvão vegetal</b>	<b>5,0</b>	<b>43,9</b>	<b>0,3</b>	<b>-</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>
<b>9</b>	<b>Espuma Poliuretano</b>	<b>5,0</b>	<b>44,4</b>	<b>0,3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,3</b>
<b>10</b>	<b>Carvão vegetal</b>	<b>5,0</b>	<b>44,4</b>	<b>0,3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,3</b>
<b>11</b>	<b>Suspensão</b>	<b>5,0</b>	<b>43,9</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>-</b>	<b>0,3</b>
<b>12</b>	<b>Suspensão</b>	<b>5,0</b>	<b>43,9</b>	<b>0,3</b>	<b>-</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>

Os reatores 11 e 12 foram utilizados somente no ensaio com esgotamento da matéria orgânica.



A massa de material suporte foi determinada pela comparação da área superficial dos suportes utilizados, considerando os valores do laudo fornecido pelo CCDM – UFSCar (certificado de ensaio AMPO5 – 000129 BET – determinação da Área Superficial) Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** Área superficial dos suportes (CCDM – UFSCar)

<b>Material suporte</b>	<b>Area superficial (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Massa (g)</b>
Espuma	43.8	0,26* e 0,62**
Carvão vegetal	3.5	0,33

(\*) ensaio com suportes e (\*\*) ensaio com solventes

#### **4.7.2 Solventes para solubilização do PCB**

No ensaio de solubilização do ascarel foram utilizados os seguintes solventes: DMSO (dimetilsulfóxido), dioxano, SDS (10%), Tween 80, ácido fórmico, ácido acético, metanol, hexano/acetona (1:1), etanol, Triton X-100 (10%, 1%, 0,1% e 0,01%), acetona e hexano. Ensaio controle foi confeccionado, sem solvente, contendo somente ascarel (Tabela 4.4). Inicialmente, colocou-se num tubo de vidro, com tampa contendo teflon, 0,5 mL de ascarel, 1,0 mL de cada solvente separadamente e agitou-se em vórtex e então, adicionou-se lentamente sob agitação, 10 mL de meio de cultura Angelidaki para observação da solubilização ou não do ascarel.

Após a realização dessa fase do teste com os diferentes solventes, pesou-se quantidade equivalente de espuma (0,15 g de espuma) para 10 mL de meio Angelidaki. Os frascos foram agitados em vórtex para proporcionar a adsorção do ascarel à espuma e permaneceram sob agitação lenta em estufa sob agitação orbital de 150 rpm, a temperatura de 30° C por 12 horas. Após este período, foi realizada extração do PCB, com hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisol/Sílica.

**Tabela 4.4** Solventes utilizados no ensaio 2

Reator	Solvente	Reator	Solvente
1	Controle (sem solvente)	9	Hexano/Acetona (1:1)
2	DMSO	10	Etanol
3	Dioxano	11	Triton X-100 (10%)
4	SDS (10%)	12	Triton X-100 (1%)
5	Tween 80	13	Triton X-100 (0.1%)
6	Ácido Fórmico	14	Triton X-100 (0.01%)
7	Ácido Acético	15	Acetona
8	Metanol	16	Hexano

### 4.7.3 Ensaio 2 - Potencial metanogênico com ascarel e diferentes solventes

Esses ensaios foram realizados com metanol, Triton X-100 e ácido fórmico para solubilização do ascarel em reatores em batelada contendo espuma de poliuretano como material suporte.

Os reatores foram preparados da mesma maneira que o primeiro ensaio de potencial metanogênico, em triplicatas de frascos antibióticos de 100 mL (volume reacional de 50 mL), 50 mL de *headspace* N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (70/30%), vedados com tampas em Teflon e lacres de alumínio, de acordo com as técnicas de manipulação anaeróbia estrita descrita por Vazoller (1995). Os frascos reatores continham meio de cultura Angelidaki (Angelidaki *et al.* 1990), 0,5 mL de inóculo e 0,62 g de espuma de poliuretano, e incubados em estufa com agitação orbital (150 rpm) a temperatura de 30 °C. A composição detalhada de cada reator encontra-se na Tabela 4.5. O prévio esgotamento da matéria orgânica foi observado através da diminuição da produção de metano em cromatógrafo gasoso Gow Mac – Series 150, equipado com detector de condutividade térmica, três vezes ao dia.

Após uma semana, as fontes de carbono (etanol, formiato ou acetato), ascarel e solventes foram adicionados aos reatores, posteriormente à estabilização da diminuição da produção de metano. A determinação de metano foi realizada a cada duas horas no primeiro dia e a cada 3 horas no segundo dia e depois três vezes ao dia (manhã, tarde e noite).

#### 4.8 Avaliação do potencial metanogênico

A concentração de metano presente no *headspace* (volume livre) do biogás dos reatores em batelada foi determinada para avaliar o potencial da produção de metano da biomassa na presença ou não de ascarel e uma fonte de carbono (formiato ou etanol).

Com a finalidade de se manter a produção acumulada de gás os frascos não foram despressurizados a cada retirada de amostra. Os valores de STV foram analisados nas diferentes condições com relação ao meio suporte e fonte de carbono e apenas nos reatores que não continham ascarel, pois com a elevação da temperatura acima de 300 °C, pode haver a liberação de dioxinas (compostos tóxicos), portanto, este procedimento foi evitado.

A conversão dos valores das áreas de metano alcançadas a mmols de CH<sub>4</sub> foi realizada por meio da equação da reta padrão nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Os valores de metano obtidos para o volume de amostragem (1 mL) foram convertidos para o volume livre de cada frasco, a partir da equação 1:

$$\text{No. de mols de CH}_4 \text{ no } \textit{headspace} \text{ (mmol)} = \frac{[\text{CH}_4] \text{ amostra (mmol)} \times \text{volume do } \textit{headspace} \text{ (mL)}}{\text{volume injetado da amostra}}$$

Os ajustes dos dados da produção de metano por sólidos totais voláteis foram realizados utilizando-se o programa Microcal Origin<sup>®</sup> através da sigmóide de Boltzmann, utilizando o algoritmo de otimização de Levenberg-Marquardt e posterior análise diferencial para determinar a velocidade máxima de produção de metano.

**Tabela 4.5.** Composição dos reatores do ensaio 3

<b>Reatores</b>	<b>Meio suporte</b>	<b>Inóculo (mL)</b>	<b>Meio Angelidaki (mL)</b>	<b>Redutora sulfeto de sódio 5%</b>	<b>SOLVENTE (mg/L) (0,5 mL)</b>	<b>Ascarel (mL)</b>	<b>Fonte de carbono 10 mM</b>
<b>1</b> (controle)	ESPUMA	5,0	44,7	0,3	-	-	-
<b>2</b> (controle)	ESPUMA	5,0	43,6	0,3	-	0,5	Etanol / Formiato
<b>3</b>	ESPUMA	5,0	43,1	0,3	METANOL 1,6 g/L	0,5	Etanol/ Formiato
<b>4</b>	ESPUMA	5,0	43,1	0,3	METANOL 790 mg/L	0,5	Etanol/ Formiato
<b>5</b>	ESPUMA	5,0	43,1	0,3	METANOL 395 mg/L	0,5	Etanol/ Formiato
<b>6</b>	ESPUMA	5,0	43,1	0,3	TRITON 100 X (10%) (1:1)	0,5	Etanol/ Formiato
<b>7</b>	ESPUMA	5,0	43,1	0,3	TRITON 100 X (10%) (1:10)	0,5	Etanol/ Formiato
<b>8</b>	ESPUMA	5,0	43,1	0,3	ACIDO FÓRMICO 1,2 g/L	0,5	Etanol/ Acetato
<b>9</b>	ESPUMA	5,0	43,1	0,3	ÁCIDO FORMICO 600 mg/L	0,5	Etanol/ Acetato

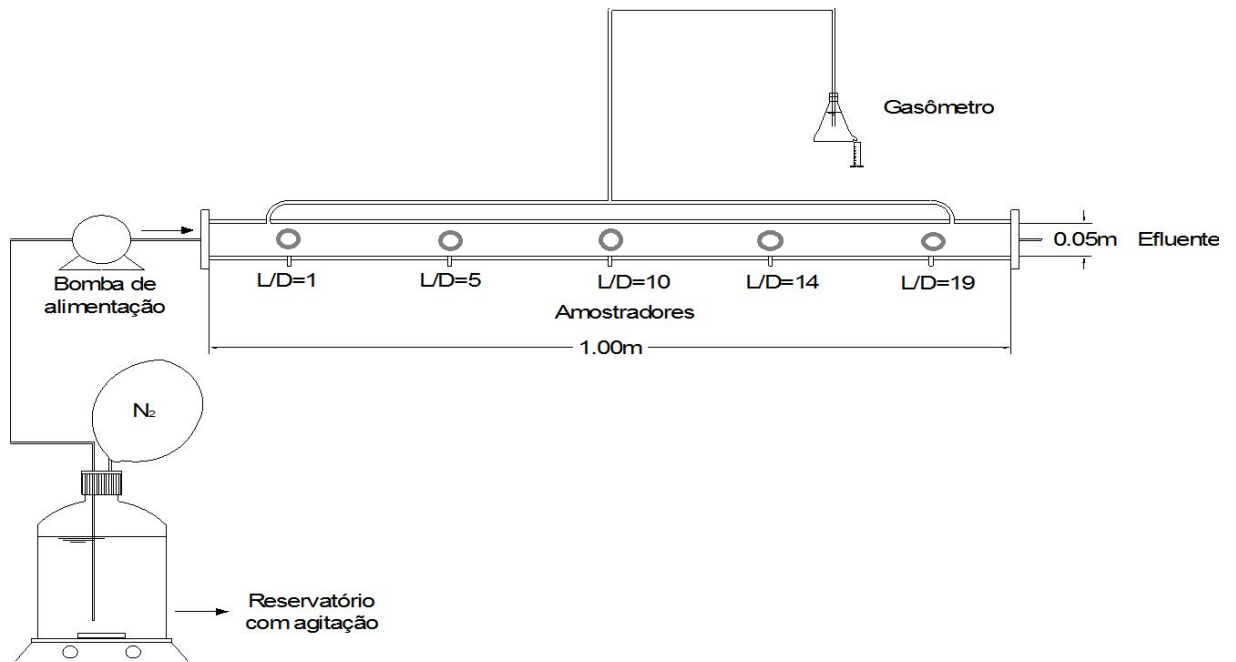
## 4.9 Operação do RAHLF

Um reator horizontal de leito fixo (RAHLF), preenchido com espuma de poliuretano e inóculo, foi utilizado para a remoção de ascarel (Figura 4.5). O reator foi confeccionado em vidro boro-silicato com 1,0 m de comprimento (L) e 5,0 cm de diâmetro interno (D), com relação comprimento por diâmetro (L/D) de 20 e volume total de 2000 mL. O reator foi instalado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), em câmara climatizada ( $30\pm 1^\circ\text{C}$ ). Na parte superior foram colocados os pontos de amostragem para coleta e saída de gás. Ao longo do comprimento do reator foram instalados cinco pontos de coleta, colocados em posições correspondentes a L/D de 1, 5, 10, 14, 19, por onde as amostras líquidas e de biomassa imobilizada foram coletadas.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) foi de 24 horas, baseado no volume útil de 800 mL. O meio Angelidaki contendo as fontes de carbono e ascarel solubilizado em Triton X-100, foi mantido sob agitação (200 rpm) em frasco de alimentação de volume reacional total de 4 L, sob refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ) e enviado ao RAHLF através de bomba peristáltica (Minipuls 3<sup>®</sup>, Gilson<sup>®</sup>) com vazão de 33,3 mL/h. Inicialmente, fase de adaptação da biomassa, o reator foi alimentado somente com meio de nutrientes Angelidaki, solução tampão de bicarbonato de sódio 10% e as fontes de carbono (10 mM), etanol (460 mg/L), metanol (790 mg/L) e formiato (680 mg/L).

### 4.9.1 Análises físico-químicas de monitoramento

Análises físico-químicas e cromatográficas foram realizadas em amostras coletadas do RAHLF, cujos parâmetros, métodos, frequência encontram-se descritos na Tabela 4.6. As análises cromatográficas para a determinação da concentração de PCB foram adaptadas a partir do método descrito por Quensen *et al.* (1988).



**Figura 4.4.** Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada.

**Tabela 4.6** Frequência das análises

Parâmetro	unidade	Método	Frequência	Referências
pH		Potenciométrico	1 x semana	APHA (2005)
DQO bruta	mg/L	Espectrofotométrico	2 x semana	APHA (2005)
Metano	$\mu\text{mol/L}$	Cromatográfico (CG)	2 x semana	
Ácidos Voláteis Totais	mgHAc/L	Titulométrico	1 x semana	Dillalo e Albertson (1961)
Alcalinidade	mgCaCO <sub>3</sub> /L	Titulométrico	1 x semana	Dillalo e Albertson (1961) modificado por Ripley <i>et al.</i> (1986)
PCB	mg/L	Cromatográfico (CG)	2 x semana	Quensen <i>et al.</i> (1990)
Ácidos voláteis	mg/L	Cromatográfico (CG)	2 x semana	Moraes <i>et al.</i> (2000)
Vazão	mL/h	Volumétrico	Diariamente	

## 4.10 Caracterização da diversidade microbiana

### 4.10.1 Exames microscópicos

#### 4.10.1.1 Microscopia óptica e de fluorescência

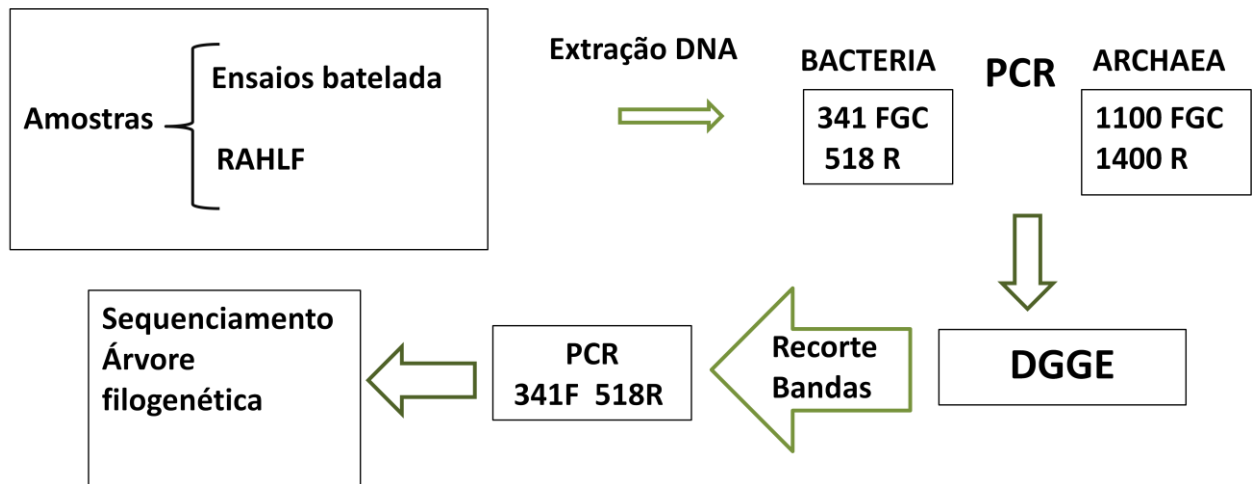
As amostras dos reatores foram observadas em lâmina contendo ágar 2% e recobertas por lamínula. As análises microscópicas foram realizadas em microscópio Olympus BX60, de contraste de fase e de fluorescência, em câmera de captura de imagem acoplada e software Image Pro Plus. Tabela com morfologias e frequência de observação foi elaborada para cada amostra analisada.

#### 4.10.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras do RAHLF foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura do IFSC e do LCE/DEMA/UFSCar. Alíquotas de cubos de espuma de poliuretanos foram coletados e colocados em solução de 2,5 mL GTA (Glutaraldeído) e tampão fosfato (0.1 M pH 7.3 mL), em geladeira por 12 horas; banhados por 3 vezes (10 minutos cada) em solução tampão fosfato (0,1 M) pH 7,8; desidratadas em solução etanólica (50%, 70% , 80%, 90%, 95% e 100%) por 10 minutos. As espumas foram cortadas ao meio e coladas ao suporte metálico, secas em estufa a 60 °C, armazenadas em dessecador e submetidas a banho de ouro antes de serem analisadas (Araújo, 2001).

#### 4.10.2 Análises filogenéticas

A diversidade microbiana referente à biomassa dos reatores em batelada e reator anaeróbio horizontal de leito fixo (na fase de adaptação e nos perfis) foi avaliada usando-se a técnica de PCR/DGGE. As Bandas resultantes do DGGE foram recortadas e amplificadas pelo PCR e seqüenciadas para análise filogenética. A Figura 4.6 mostra um esquema das análises realizadas.



**Figura 4.5** Fluxograma experimental da análise filogenética da comunidade microbiana

##### 4.10.2.1 Coleta de amostra e Extração de DNA

A coleta das amostras dos reatores em batelada se deu após o término da operação e no caso do RAHLF, as espumas foram coletadas antes do acréscimo do ascarel, no primeiro perfil, segundo perfil e no término da operação. As amostras foram centrifugadas com tampão PBS (1X) e armazenadas a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

O procedimento de extração do DNA genômico foi realizado de acordo com o método de Griffiths et al. (2000) modificado. As amostras de DNA foram observadas em agarose gel (0,8%) eletroforético.



## 4.10.2.2 PCR/DGGE

Para *primers* filogenéticos do Domínio *Bacteria* (968 FGC e 1392 R) foram utilizadas as condições de amplificação descritas por Nielsen *et al.* (1999) e para *primers* do Domínio *Archaea* (1100 FGC e 1400 R) foram utilizadas as condições descritas por Kudo *et al.* (1997). Para o Domínio *Bactecia* também foram utilizados os primers 341 FGC e 518 R de acordo com Muyzer *et al.*, 1993 (Tabela 4.7). O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1,4 % para ser utilizado na eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) segundo Muyzer *et al.* (1993).

**Tabela 4.7** Primers utilizados no PCR/DGGE

Grupo de Microrganismos	Primers	Referência
<i>Archaea</i>	1100 F (5'-AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAC CGAG-3') 1400 R (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GGG GCG GGG GCA CGG GGGG-3')	Kudo <i>et al.</i> (1997)
<i>Bacteria</i>	968 F (5'-AAC CGC GAA GAA CCT TAC-3') 1392 R (5'-AACG GGC GGT GTG TAC-3')	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacteria</i> Muyzer	341 R (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') 518 R (5'-ATT ACC GCG GCT GG-3')	Muyzer <i>et al.</i> (1993)

Para as reações de amplificação do fragmento do 16S rRNA (PCR) foram usados 0,5  $\mu$ M de cada *primer*, 5  $\mu$ M de dNTPs (Invitrogen®), (0,5  $\mu$ L) 1 Unidade de Taq DNA polymerase (Invitrogen®), e aproximadamente 2  $\mu$ L de DNA genômico. O programa para amplificação do gene 16S rRNA seguiu as etapas que são mostradas na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8** Programação da reação de PCR para amplificação do RNAr 16S

Domínio	Desnaturação inicial	No. ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
<i>Archaea</i>	94 °C 5 minutos	35	94 °C 1 minuto	55 °C 1 minuto	72 °C 1 minuto	72 °C 7 minutos	4 °C $\infty$
<i>Bacteria</i> e Muyzer	94 °C 7 minutos	35	94 °C 45 segundos	55 °C 45segundos	72 °C 1 minuto	72 °C 10 minutos	4 °C $\infty$

O produto da PCR, com o grampo GC, foi utilizado para o DGGE e o preparo das placas foi realizado de acordo com Sakamoto (2001). Para o Dominio *Archaea*, o gradiente de concentração de gel utilizado foi de 40% e 70%. Para o Dominio *Bacteria* foi usado gradiente de 45% e 65% (Muyzer *et al.* 1993). As soluções do gel gradiente desnaturante foi preparada com gel acrilamida (40%), solução TAE 50X, formamida e uréia. Para as placas de gel foram utilizados 14 mL do gel na concentração almejada, 100 µL de APS 10% (persulfato de amônia) e 10 µL de Temed (tetrametiletilenodiamina).

As placas solidificadas do gel foram transferidas para a cuba eletroforética contendo 140 mL de TAE 50X em 7 L de água ultra-purificada. As amostras foram aplicadas nos poços do gel (24 µL de amostra e 6 µL de corante para DGGE) e permaneceram na cuba (75 Volts) a 65 °C por 16 horas. Transcorrido o tempo de corrida, os géis foram transferidos para uma bandeja com água destilada e brometo de etídio por 15 minutos e então, foi observada em fotodocumentador Eagle Eye TM III (Stratagene) sob exposição a 254 nm UV, acoplada a computador com o programa Eagle Sight para análise e armazenamento das imagens.

#### 4.10.2.3 Sequenciamento e análise das sequencias do 16S rRNA

As bandas do DGGE foram recortadas e transferidas para eppendorf contendo 50 µL de tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) e armazenadas em temperatura de 4 °C por 24 horas. Posteriormente, os fragmentos de DNA foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o seu produto foi purificado utilizando-se o Kit de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* da GE Healthcare. O produto do PCR purificado foi submetido à reação de seqüenciamento com 2 µL de template, 3 µL de água ultra-purificada esterilizada, 3 µL de *primer* 10 pMol, 1 µL do tampão Save Money e 1 µL de Big dye. O programa do termociclador utilizado foi o seguinte: 94 °C por 2 minutos para desnaturação inicial, e mais 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos (desnaturação), 50 °C por 15 segundos (anelamento) e 60 °C por 2 minutos (extensão), enfim 4 °C ∞ para resfriamento.

As amostras foram precipitadas com 40 µL de isopropanol 65% por 30 minutos a 14000 rpm e lavadas com 200 µL de etanol 60% por 5 minutos a 14000 rpm. As amostras

foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e ressuspendidas com  $15\text{ }\mu\text{L}$  de formamida e choque térmico ( $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de serem colocadas no seqüenciador ABI PRISM 310).

As seqüências parciais de 16S rRNA obtidas foram analisadas no programa Seqman (Lasergene DNA Star) e comparadas com as seqüências de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). Os nucleotídeos alinhados foram utilizados para construir a árvore filogenética de consenso utilizando o algoritmo de *Neighbor-joining* (Saitou *et al.* 1987) do *software Mega versão 5.0* (Tamura *et al.* 2011).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação dos protocolos de extração de PCB

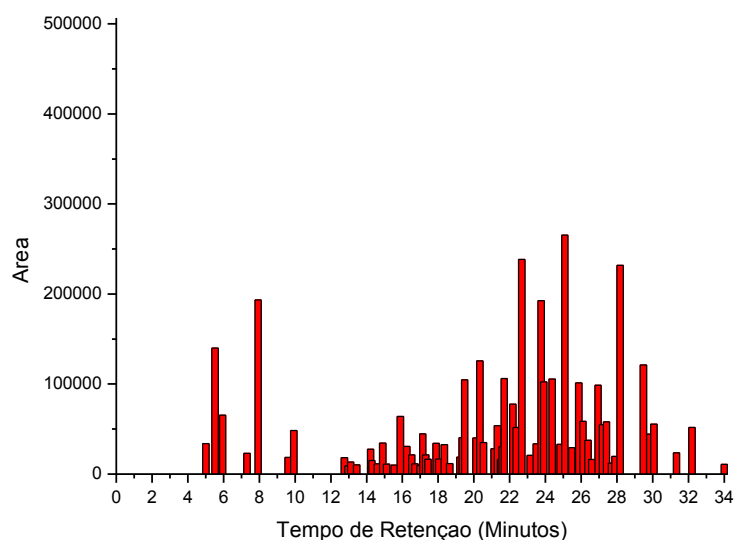
O método de Quensen *et al.* (1988) serviu como base para a análise de PCBs, no entanto, testes preliminares foram realizados para adaptação do método na otimização da análise de ascarel em reator anaeróbio de leito fixo contendo espuma de poliuretano. Foram utilizados 1,3,5-TCB como surrogate (padrão adicionado no início da extração para verificação da perda ocorrida no processo) e octacloronaftaleno (OCN) como padrão interno. O acréscimo de ácido sulfúrico, após a adição de *n*-hexano, à etapa inicial de extração propiciou melhor retirada de impurezas da amostra de ascarel. Portanto, esta etapa foi mantida no procedimento de extração. A submissão da amostra ao ultrassom por 15 minutos foi adicionada ao processo de extração, bem como, uma camada de sílica foi acrescentada à coluna de Florisil/Cu na etapa de purificação da amostra.

Após análise comparativa (em cromatografia gasosa) da concentração de PCB nas diferentes condições que foram testadas, escolheu-se o método de extração **Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisil/Sílica**, pois apresentou valor da concentração de PCB (no ascarel) mais alto. Os valores médios da concentração de PCB para os diferentes testes de extração foram 642,22 mg/L para o método com Hexano/Florisil/Sílica, 687,97 mg/L para o método Florisil/Sílica e 733,29 mg/L para o método de Quensen. Por meio da Análise de Variância (ANOVA) *one-way* e teste estatístico Tukey constatou-se que não houve diferença significativa dos valores médios de concentração para os quatro métodos de extração analisados (Tabela 5.1).

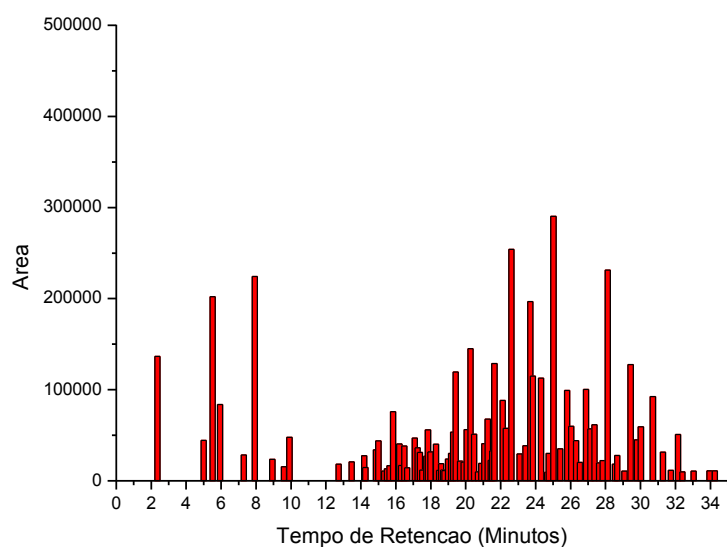
**Tabela 5.1** Concentração total de PCB no Aroclor para os diferentes testes de extração

Métodos de Extração	Áreas Cromatográficas (média)	DESVIO PADRÃO ±	Repetitividade (R)	Concentração de PCB (mg/L)
Hexano/Florisil/Sílica	4521020	1096327	452104.025	642,22
Hexano/Florisil	4840695	458315.6	484071.495	687,97
Quensen	5157290	421598.8	515730.97	733,29
<b>Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisil/Sílica</b>	<b>5955841</b>	895356.9	595586.075	<b>847,59</b>

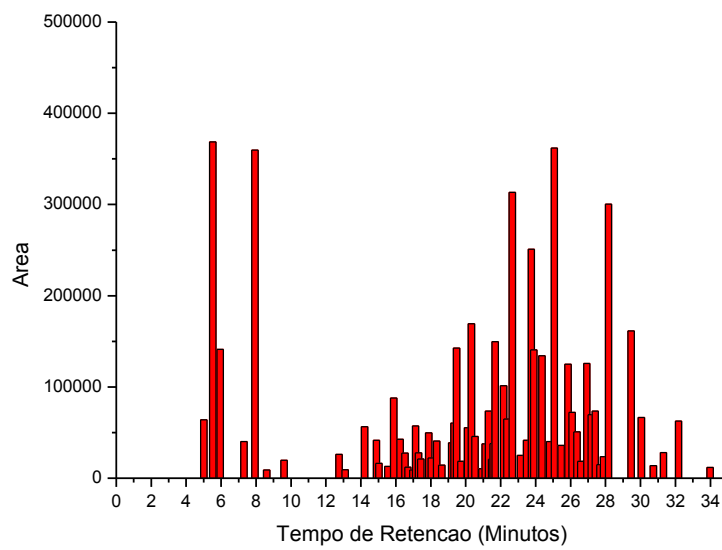
A partir dos cromatogramas resultantes dos quatro diferentes métodos de extração foram plotados os valores das áreas de PCB (Figuras 5.1 a 5.4). Observou-se que os maiores picos de área relativa de PCB foram obtidos com o método de extração com *n*-hexano e ácido sulfúrico e uma camada de Sílica/Florisisil/Cu na etapa de purificação do extrato.



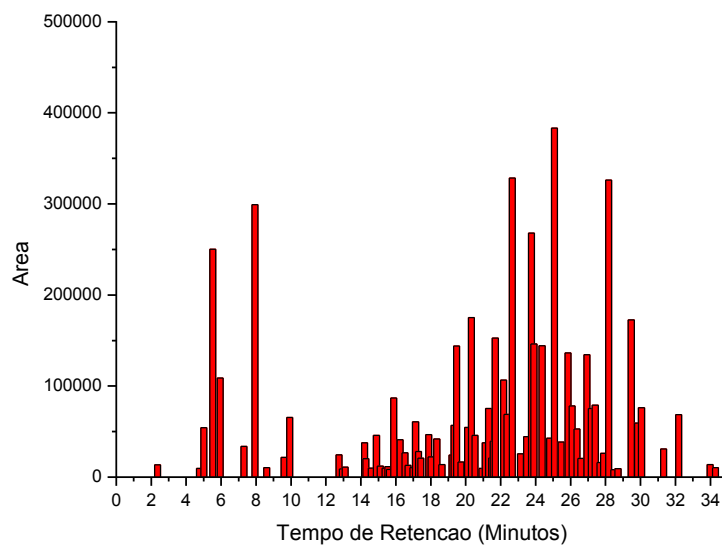
**Figura 5.1** Áreas de PCB do ascarel dos cromatogramas obtidos no Método de Hexano/Florisisil/Silica.



**Figura 5.2** Áreas dos cromatogramas de PCB do ascarel obtidas no Método de Quensen.



**Figura 5.3** Áreas dos cromatogramas de PCB do ascarel obtidas no Método de Hexano/Florisol.



**Figura 5.4** Áreas dos cromatogramas de PCB do ascarel obtidas no Método de Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisol/Silica

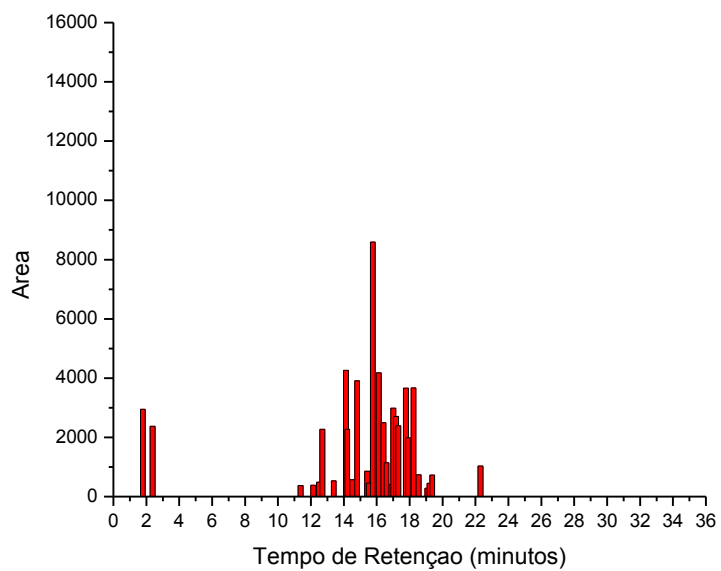
O método de extração **Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisol/Silica** foi utilizado em todas as fases deste trabalho para a análise da concentração de PCB do ascarel, inclusive para a confecção da curva de calibração, que foi realizada nas mesmas condições aplicadas às amostras.

### 5.1.1 Padrão de PCB

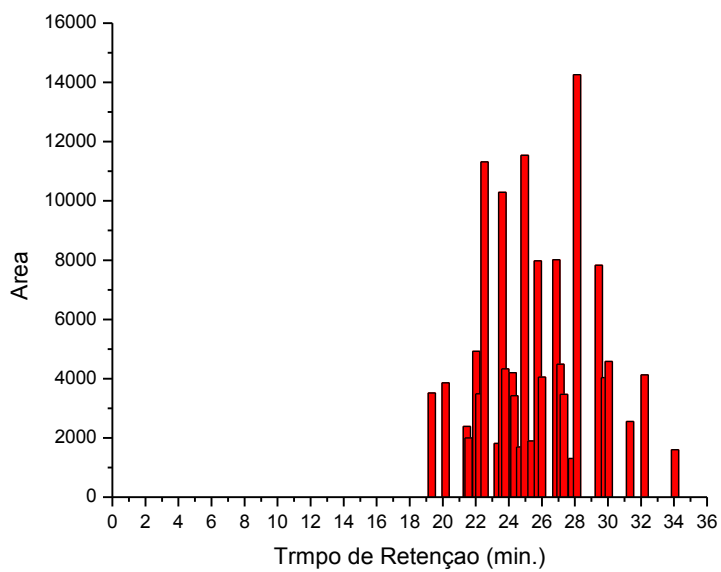
Os valores das áreas dos picos das amostras dos padrões de Aroclor 1016 e 1260 (2 mg/L) são apresentados a seguir (Figura 5.5). Para cada padrão de PCB obteve-se perfil cromatográfico característico. Os padrões 1016 e 1260 foram utilizados para a elaboração da curva de calibração, por apresentarem a maioria dos picos dos outros padrões de PCB (1232, 1242, 1248, 1254 e 1221) (Figuras 5.6 e Figura 5.7). Os cromatogramas brutos destes padrões encontram-se no Anexo I.

As áreas observadas no início do cromatograma podem ser referentes aos ruídos do *n*-hexano. Bem como, o *surrogate* 1,3,5-TCB apareceu por volta de 5 minutos e OCN (octacloronaftaleno) aos 34 minutos. Após uma comparação dos cromatogramas dos padrões com o perfil encontrado nos cromatogramas do ascarel, observou-se que era muito semelhante à mistura dos padrões 1260 e 1016, constatando que o ascarel pode conter misturas de diferentes padrões de Aroclor (Poster et al. 2004, Martínez et al. 2005).

Como o padrão de áreas do ascarel utilizado neste trabalho é muito parecido com padrões de Aroclor 1016 e 1260 (Figura 5.8), de acordo com a ABNT NBR 13882:2008, esses dois padrões foram efetivos para a realização da curva de calibração.



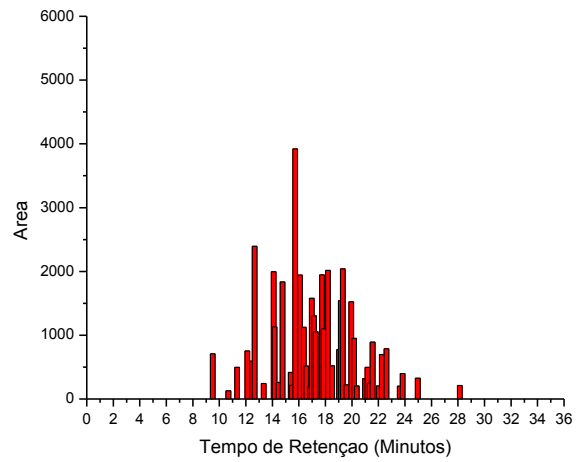
(a)



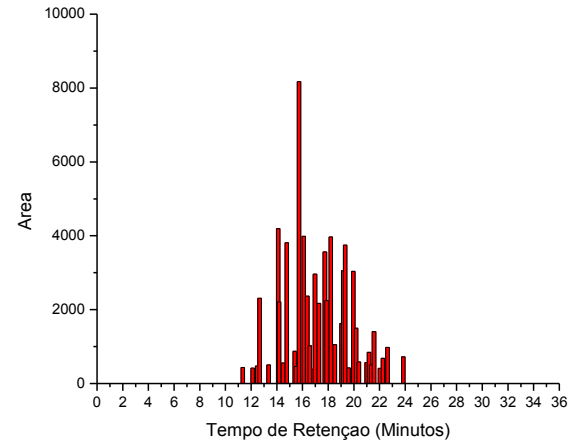
(b)

**Figura 5.5** Áreas cromatográficas dos padrões Aroclor (2,0 mg/L) 1016 (a) e 1260 (b)

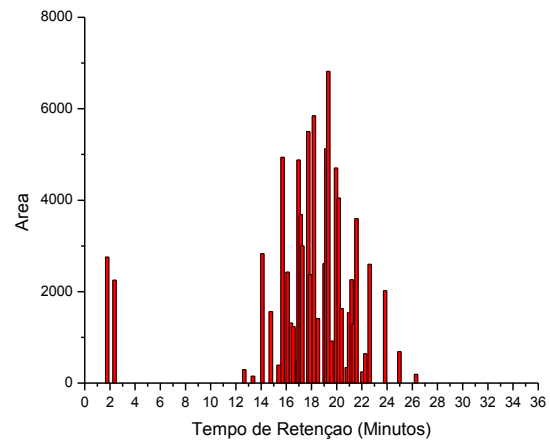




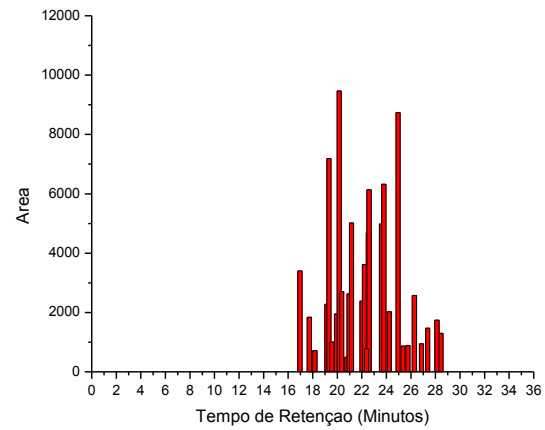
(a)



(b)

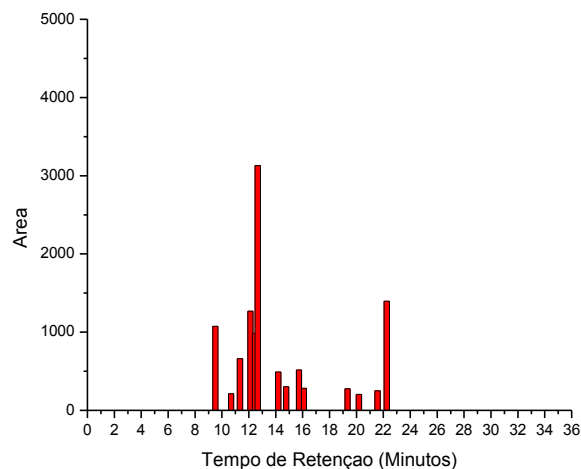


(c)

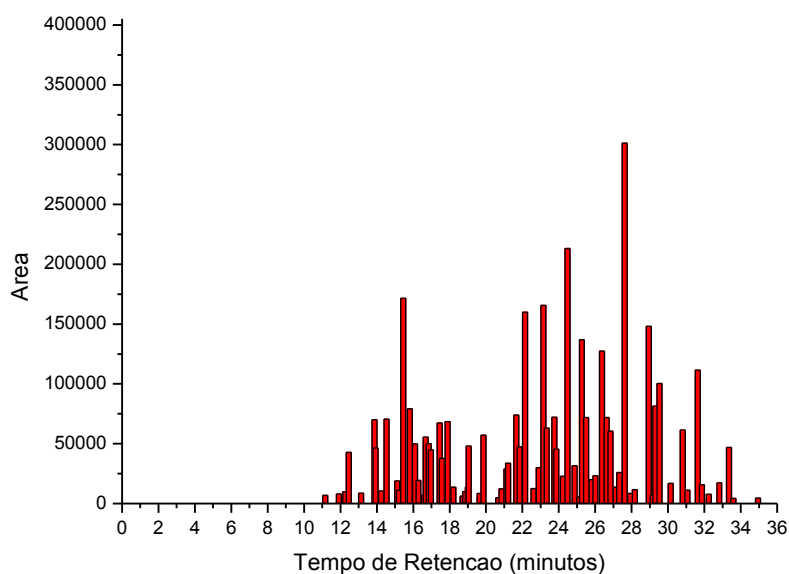


(d)

**Figura 5.6** Áreas cromatográficas dos padrões Aroclor (2,0 mg/L) 1232 (a), 1242 (b), 1248 (c) e 1254 (d)



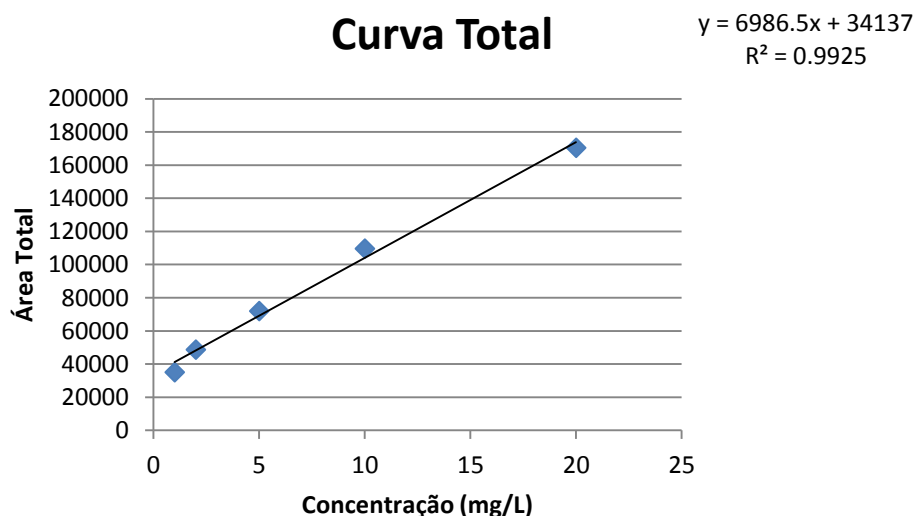
**Figura 5.7** Áreas cromatográficas do padrão Aroclor 1221 (2,0 mg/L)



**Figura 5.8** Áreas cromatográficas da mistura dos padrões 1016 e 1260 (2mg/L)

A curva de calibração foi elaborada em triplicatas, a partir da mistura dos padrões 1016 e 1260 para 1 mg/L, 2mg/L, 5mg/L, 10mg/L e 20mg/L (Figura 5.9). A linearidade do detector foi determinada a partir da soma das áreas dos picos de PCBs. Os picos de menor área relativa foram desconsiderados. As condições de extração, purificação e análise

cromatográfica aplicadas aos padrões para execução da curva de calibração foram as mesmas utilizadas para as amostras provenientes dos reatores anaeróbios.



**Figura 5.9** Curva de calibração da mistura dos Padrões 1016 e 1260

## 5.2 Potencial Metanogênico de reatores em batelada contendo Ascarel

Angelidaki et al. (2009) realizaram ensaio visando validar método de potencial metanogênico. Os autores verificaram que diferentes inóculos podem ser utilizados, inclusive lodo granulado de reator UASB. Além disso, verificaram também que a matéria orgânica residual deve ser esgotada previamente em período de 2 a 5 dias. Assim, neste ensaio de potencial metanogênico foi utilizado inóculo procedente de UASB utilizado no tratamento de água resíduária de avicultura, por possuir excelentes características na degradação de compostos tóxicos (Gusmão, 2005).

A avaliação indireta da degradação anaeróbia de PCB foi verificada em teste de potencial metanogênico com biomassa imobilizada em material suporte. Neste trabalho foram usados dois materiais suportes: carvão vegetal e espuma de poliuretano. Os PCBs possuem propriedades adsorventes (Hutzinger et al. 1974), Deste modo, o material suporte mais adequado são aqueles com alto grau de superfície de contato. Todavia, há poucos trabalhos na literatura relativos ao uso de material suporte para imobilização de biomassa na degradação de PCB. Fava (1996) realizou ensaio comparando a utilização de pérolas de vidro e Triton X-100 na degradação aeróbia de Aroclor 1221 por *Pseudomonas* sp. CPE1. O autor relatou que este

material suporte foi importante para a biodisponibilidade dos PCB para os microrganismos. Na et al. (2000), caracterizaram bactérias que usaram PCB imobilizado em espuma de poliuretano e concluíram que as espumas podem adsorver rapidamente grandes quantidades de PCB. Além disso, os microrganismos aderidos ao biofilme foram capazes de degradar maior quantidade de PCB, em relação aqueles em suspensão.

A produção de metano foi utilizada para avaliar a degradação de PCB na presença de fontes de carbono (etanol 46 g/L e formiato 680 mg/L) adequadas para o desenvolvimento de bactérias anaeróbias e arqueias metanogênicas. O ascarel foi adicionado na proporção 1/100 (v/v). Como o perfil da produção de metano foi muito semelhante nos ensaios sem ou com esgotamento da matéria orgânica, a produção de metano e análise de PCB foi realizada somente no ensaio com prévio esgotamento da matéria orgânica, como recomendado por Angelidaki et al. 2009.

Nos reatores que não continham material suporte (biomassa planctônica), com ou sem ascarel e com etanol e/ou formiato como fonte orgânica (R2, R3 e R11), o valor máximo da produção de metano foi de  $4,6 \times 10^{-6}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV, após 50 horas. No entanto, aqueles que continham somente formiato como fonte de carbono (R12), os valores ( $3,0 \times 10^{-4}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV) foram alcançados após 2h. Nos reatores que continham espuma de poliuretano com etanol, formiato e ascarel (R5), com ascarel e formiato (R6), e somente com formiato (R9), a máxima produção de metano correspondeu, respectivamente a  $3,9 \times 10^{-4}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV (em 49 h);  $2,2 \times 10^{-4}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV (5 horas) e  $2,7 \times 10^{-4}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV (2 h). Todavia, a menor produção de metano ( $8,2 \times 10^{-6}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV, 39 h) foi obtida no reator que continha apenas ascarel, sem qualquer outra fonte de carbono ou material suporte.

Nos reatores com carvão vegetal como suporte para biomassa, com ascarel, etanol e formiato (R7) os valores máximos foram de  $2,1 \times 10^{-4}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV em 33 horas. No entanto, os reatores que continham ascarel e formiato (R8), ou somente formiato (R10) esses valores foram muito próximos ( $2,8 \times 10^{-4}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV), em 2 horas de ensaio. O formiato é fonte orgânica para arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, portanto, era esperado que nos reatores (6, 8, 9, 12) que continham apenas este composto, tivessem maior produção de metano em menor tempo. Contrariamente, nos reatores que tinham como fonte de carbono o etanol (2, 3, 5, 7 e 11), molécula mais complexa que o formiato, maior tempo foi

necessário para ser metabolizado, provavelmente, em acetato, para posterior uso pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas.

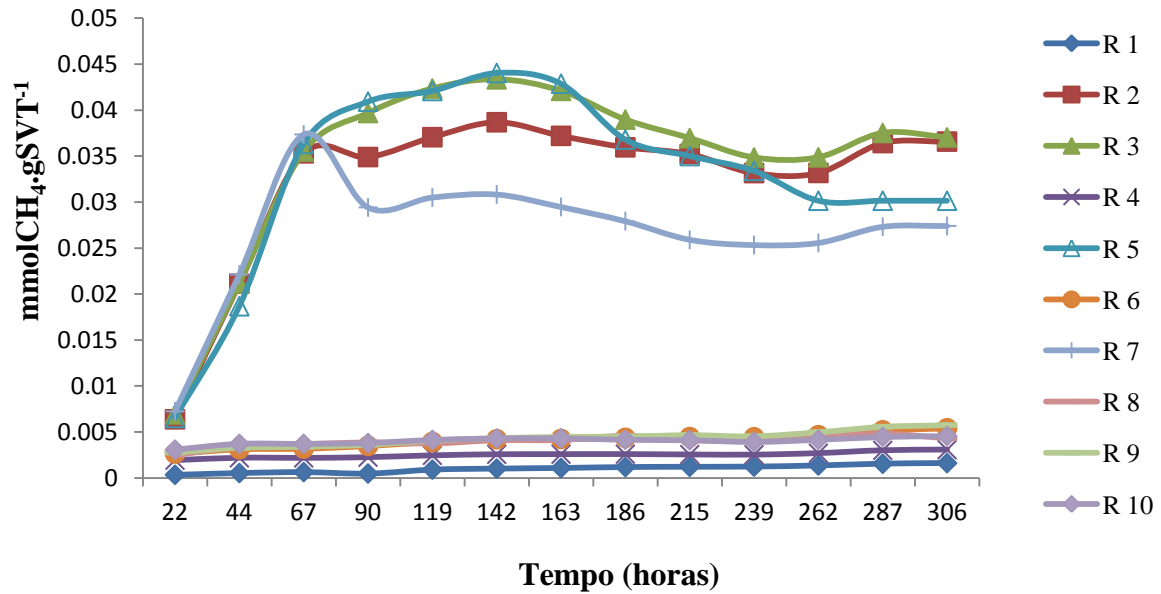
Os ajustes dos dados foram realizados utilizando-se o programa Microcal Origin através da do método da sigmóide de Boltzman e posterior análise diferencial (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2** Velocidade máxima da produção de metano do ensaio 1 com esgotamento da matéria orgânica

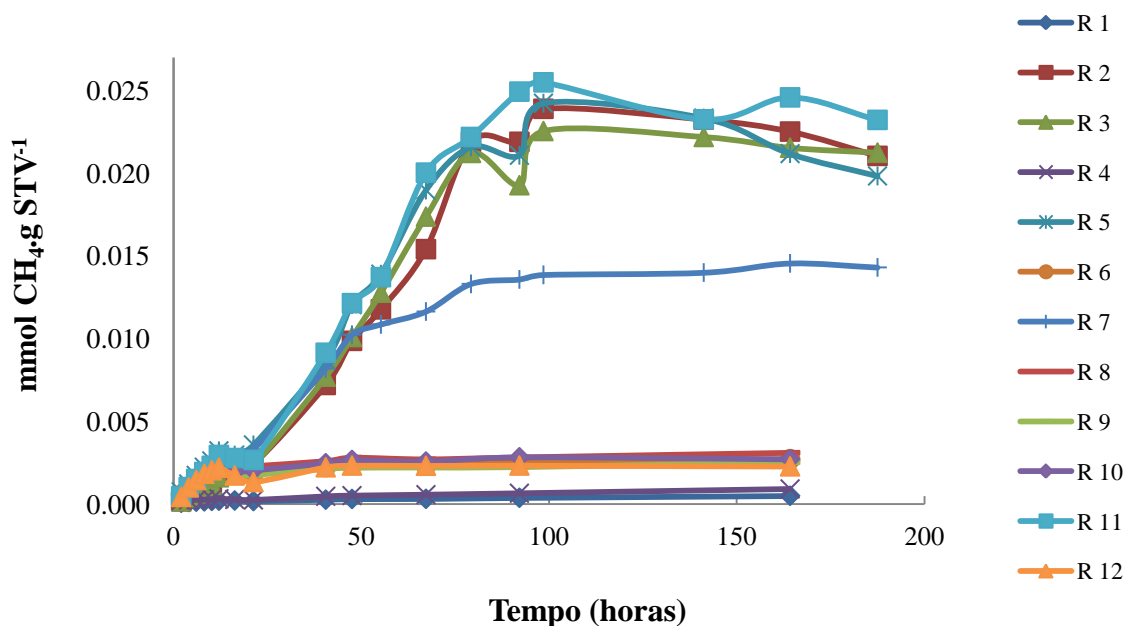
Reator	Material suporte	Condição	Velocidade Máxima (mmolCH <sub>4</sub> /mLgSTV)	Tempo (horas)
1	Suspensão	controle	$4,1 \times 10^{-6}$	2
2	Suspensão	etanol	$4,2 \times 10^{-4}$	52,3
3	Suspensão	ascarel, etanol	$4,1 \times 10^{-4}$	49,2
4	Suspensão	ascarel	$8,2 \times 10^{-6}$	38,6
5	Espuma de poliuretano	ascarel, etanol, formiato	$3,9 \times 10^{-4}$	49,2
6	Espuma de poliuretano	ascarel, formiato	$2,2 \times 10^{-4}$	4,7
7	Carvão vegetal	ascarel, etanol, formiato	$2,1 \times 10^{-4}$	33,4
8	Carvão vegetal	ascarel, formiato	$2,7 \times 10^{-4}$	2
9	Espuma de poliuretano	formiato	$2,4 \times 10^{-4}$	2
10	Carvão vegetal	formiato	$2,9 \times 10^{-4}$	2
11	Suspensão	etanol, formiato	$4,6 \times 10^{-4}$	49,2
12	Suspensão	ascarel, formiato	$3,0 \times 10^{-4}$	2

A produção de metano pode ser observada nos gráficos, nos reatores do ensaio em que não foi realizado o prévio esgotamento da matéria orgânica, nos quais se acrescentou as fontes de carbono e ascarel no início do experimento (Figura 5.10) e no ensaio com o prévio esgotamento da matéria orgânica, procedeu-se a adição das fontes após seis dias (Figura 5.11).

No ensaio com esgotamento da matéria orgânica, obteve-se os mais baixos valores de produção média de metano para os reatores 1 (controle, somente meio e lodo) e 4 (com ascarel e sem fontes de carbono).



**Figura 5.10** Produção de metano em função do tempo nos reatores em batelada do ensaio 1, sem esgotamento da matéria orgânica. **Reatores em suspensão:-** R1 (controle), R2 (etanol), R3 (ascarel, etanol), R4 (ascarel); **Espuma de poliuretano:-** R5 (ascarel, etanol, formiato), R6 (ascarel, formiato), R9 (formate); **Carvão vegetal:-** R7 (ascarel, etanol, formiato), R8 (ascarel, formiato), R10 (formiato).



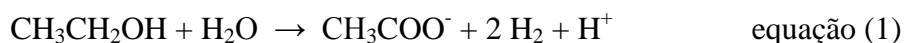
**Figura 5.11** Produção de metano em função do tempo nos reatores em batelada do ensaio 1, com esgotamento da matéria orgânica. **Reatores em suspensão:-** R1 (controle), R2 (etanol), R3 (ascarel, etanol), R4 (ascarel), R11 (etanol, formato), R12 (ascarel, formiato); **Espuma de poliuretano:-** R5 (ascarel, etanol, formiato), R6 (ascarel, formiato), R9 (formate); **Carvão vegetal:-** R7 (ascarel, etanol, formiato), R8 (ascarel, formiato), R10 (formiato).

Os reatores 2, 3, 5 e 7, que continham etanol, como fonte orgânica foram os que tiveram a maior produção de metano, indiferente de conter ascarel, formiato ou material suporte. Nesses reatores obteve-se  $2,1 \times 10^{-4}$  a  $4,6 \times 10^{-4}$  mmol CH<sub>4</sub>/mLgSTV. Portanto, a presença de etanol influenciou a produção desse gás. No reator 7, com carvão vegetal, contendo ascarel, etanol e formiato observou-se diminuição da produção de metano após 80 horas.

No ensaio com esgotamento da matéria orgânica foram acrescentadas mais duas condições com biomassa planctônica (reatores 11 com etanol e formiato e reator 12 com ascarel e formiato). O perfil da produção de metano foi muito similar ao ensaio sem esgotamento da matéria orgânica, pois todos os reatores que continham etanol na sua composição tiveram a maior produção de metano.

Portanto, no caso de se utilizar o ensaio apenas para monitoramento do processo de degradação, sem um maior aprofundamento do estudo do processo da produção de metano, o potencial metanogênico pode ser realizado sem o prévio esgotamento da matéria orgânica.

O etanol contribuiu como fonte de carbono para o crescimento microbiano, como evidenciado pela produção de metano, que foi mais elevada em presença de etanol. Ao etanol também pode ser atribuído o papel de doador de elétrons, pois é oxidado a acetato, favorecendo a atividade das arqueias metanogênicas, e aumentando a eficiência do processo de descloração do PCB. O acetato produzido a partir da degradação de etanol com a liberação de íons hidrogênio pode ser observado na equação a seguir (equação 1):

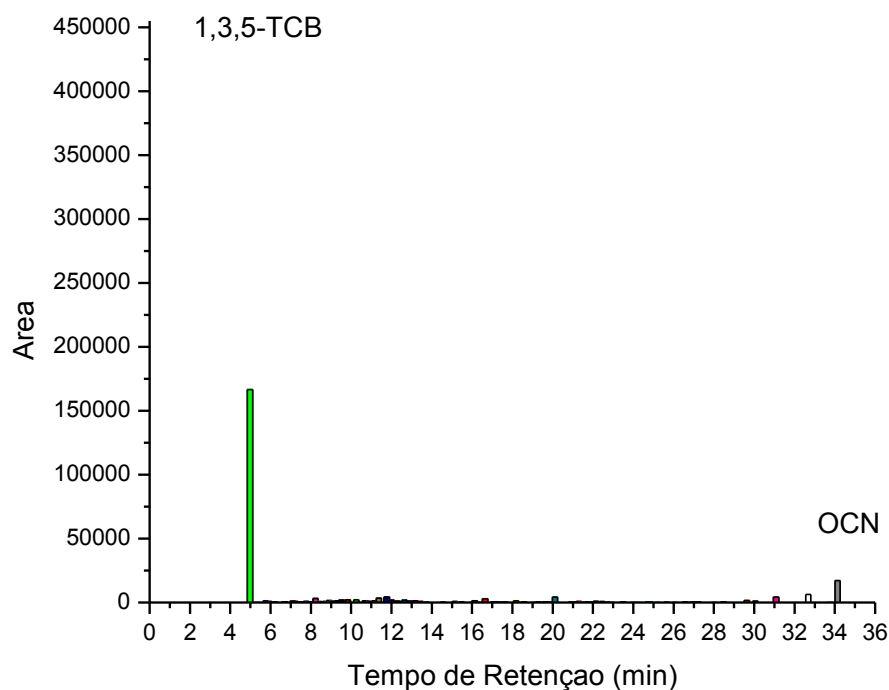


Wiegel & Wu (2000) discutem sobre os fatores que podem afetar a degradação dos PCBs, como pH, temperatura, disponibilidade de fontes de carbono, H<sub>2</sub> como doador de elétrons e a presença ou não de outro acceptor de elétrons além do PCB. Condições e fatores ambientais afetam o crescimento, bem como o metabolismo de diferentes microrganismos e com isso, influenciam a extensão e a velocidade de descloração do PCB. Além disso, a adsorção de PCB poderá ser diferente em solos e sedimentos.

A espuma de poliuretano foi selecionada como material suporte a ser utilizado nos ensaios seguintes por conter maior superfície de contato para auxiliar na adsorção do ascarel.

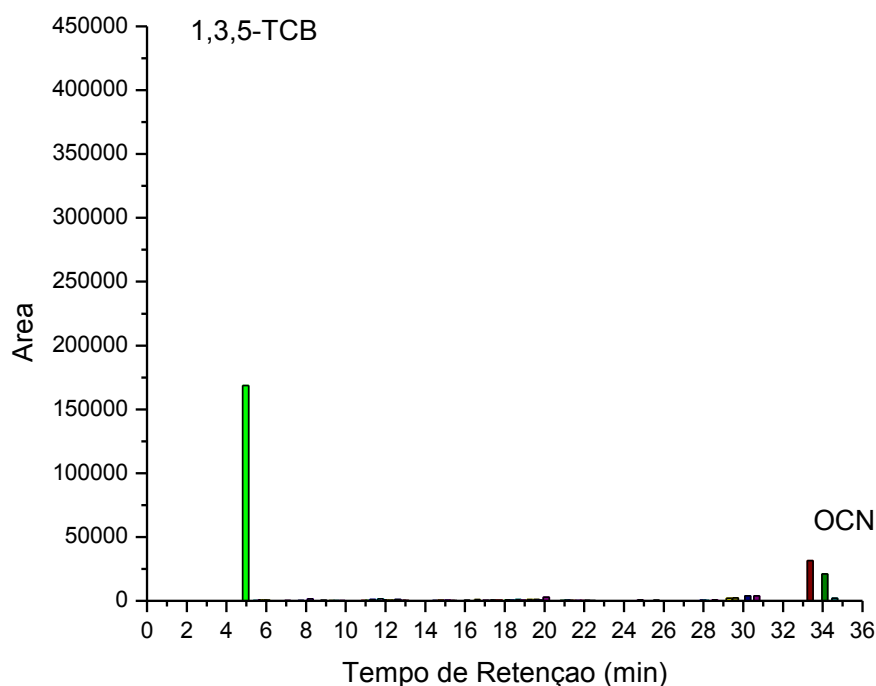
Observou-se que, mesmo na presença de Ascarel, a comunidade microbiana foi capaz de produzir metano, ou seja, provavelmente, o ascarel não inibiu as arqueias metanogênicas.

As concentrações de PCB foram avaliadas, somente, nos reatores do ensaio com esgotamento da matéria orgânica. As amostras foram submetidas ao método de extração com Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisil/Sílica. Os picos das áreas relativas de PCB dos cromatogramas foram plotados no programa Origin Pro8 para melhor visualização e padronização dos gráficos, sem os picos da linha de base. Os valores das principais áreas relativas foram somados e comparados com as concentrações da curva de calibração (Figuras 5.12 a 5.23), bem como o cromatograma da amostra inicial (Figura 5.24)

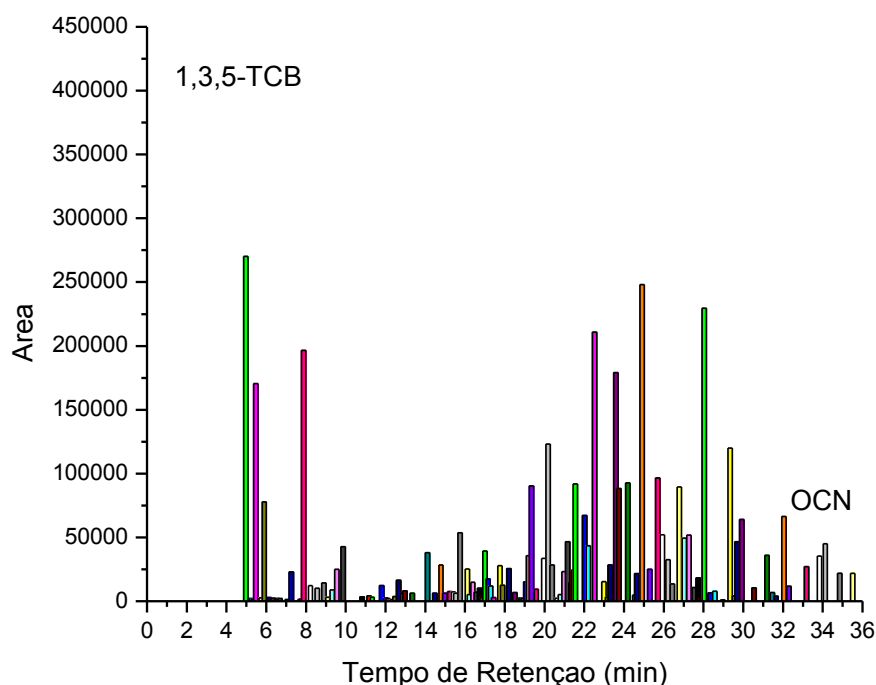


**Figura 5.12** Cromatograma das áreas de PCB em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em suspensão controle (sem ascarel e fontes de carbono) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)**

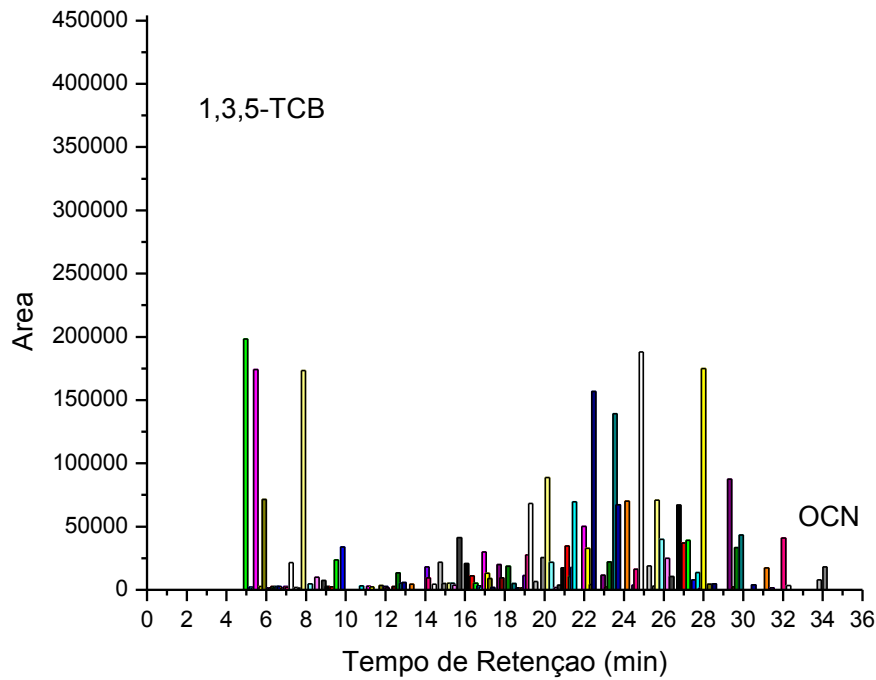




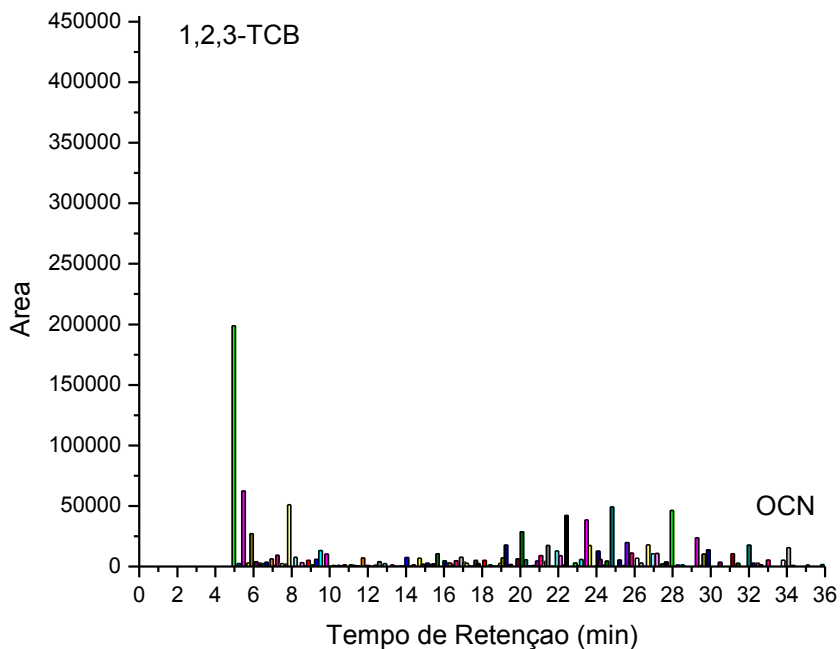
**Figura 5.13** Cromatograma das áreas de PCB em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em suspensão (com etanol e sem ascarel) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)**



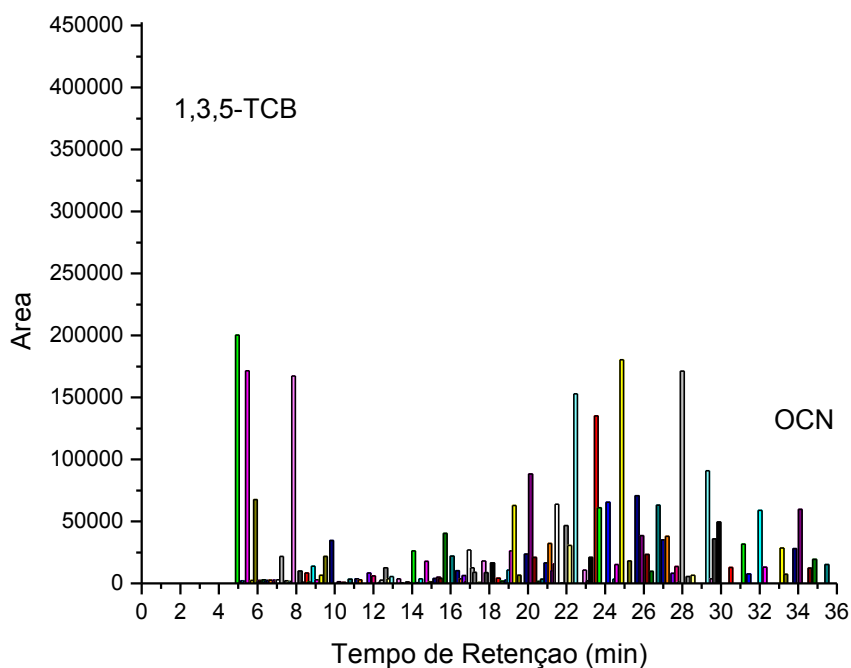
**Figura 5.14** Cromatograma das áreas de PCB em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em suspensão (com etanol e ascarel) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)**



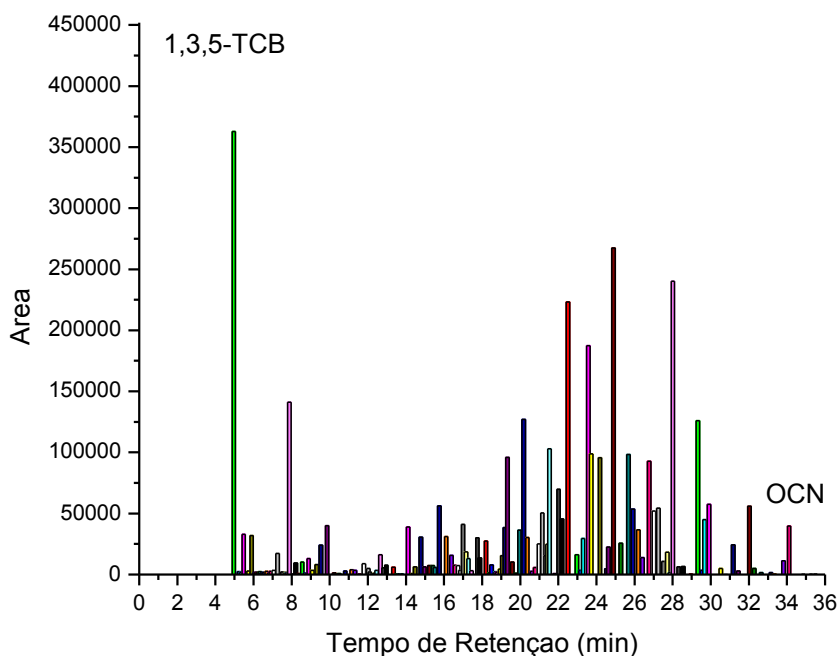
**Figura 5.15** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em suspensão (com ascarel)**. (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)



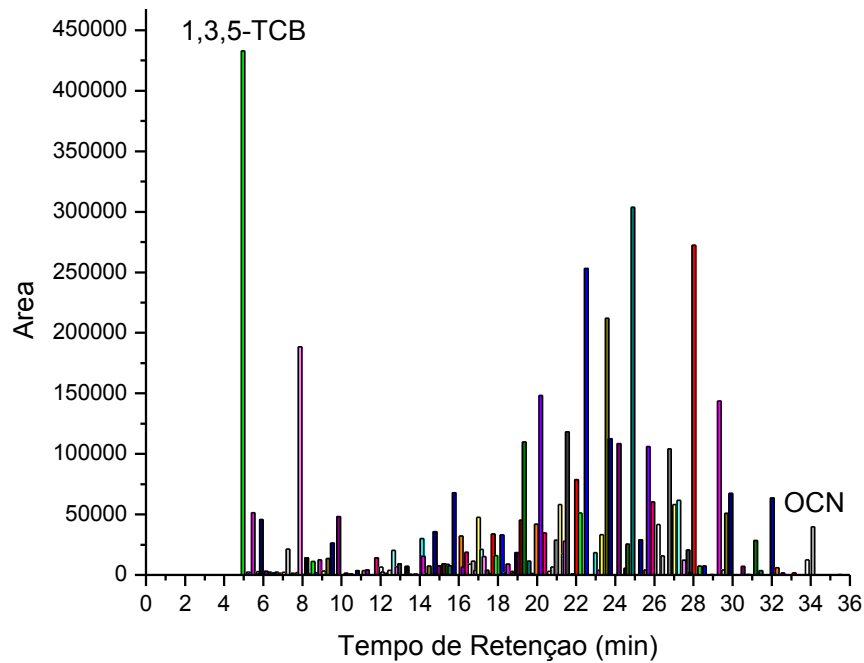
**Figura 5.16** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em espuma de poliuretano (com etanol, ascarel e formiato)**. (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)



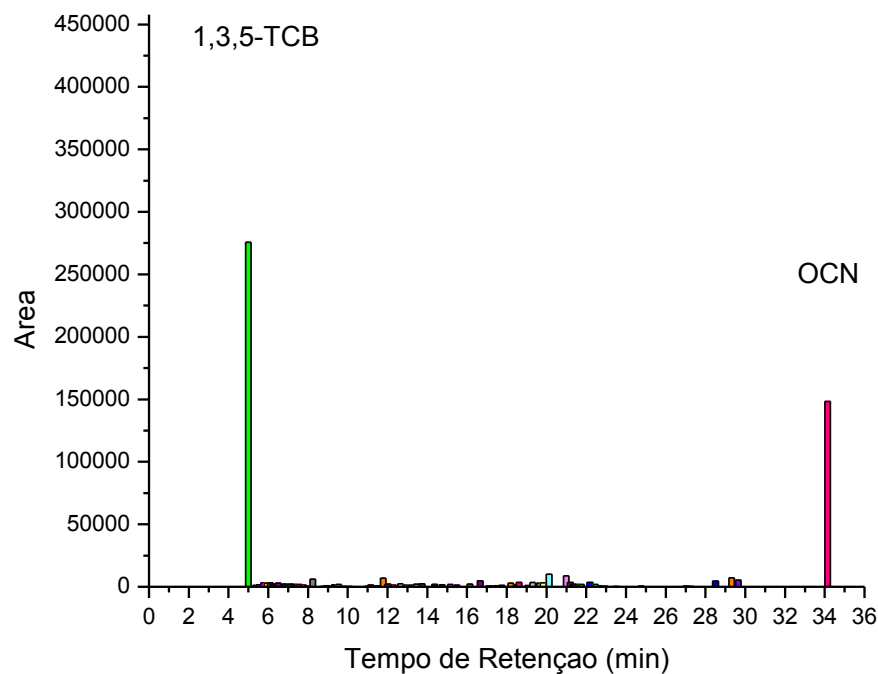
**Figura 5.17** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em espuma de poliuretano (ascarel e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)**



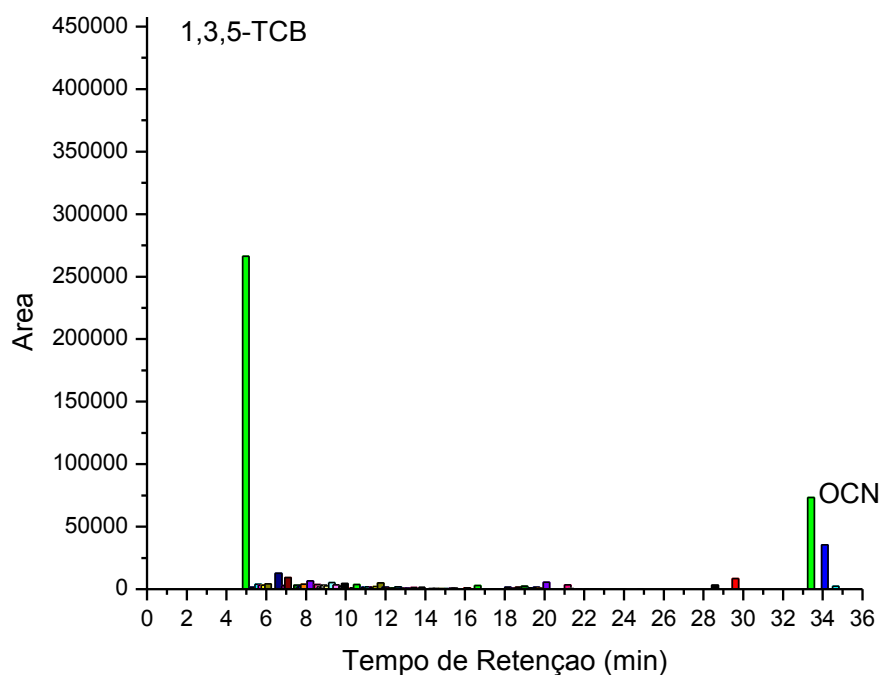
**Figura 5.18** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em carvão vegetal (com etanol, ascarel e formiato) (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)**



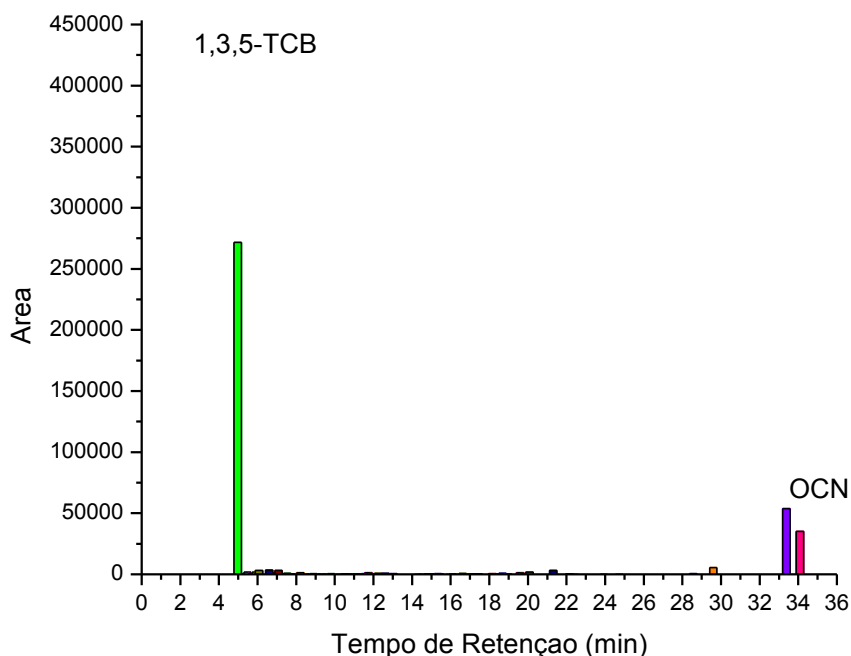
**Figura 5.19** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em carvão vegetal (com ascarel e formiato).** (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)



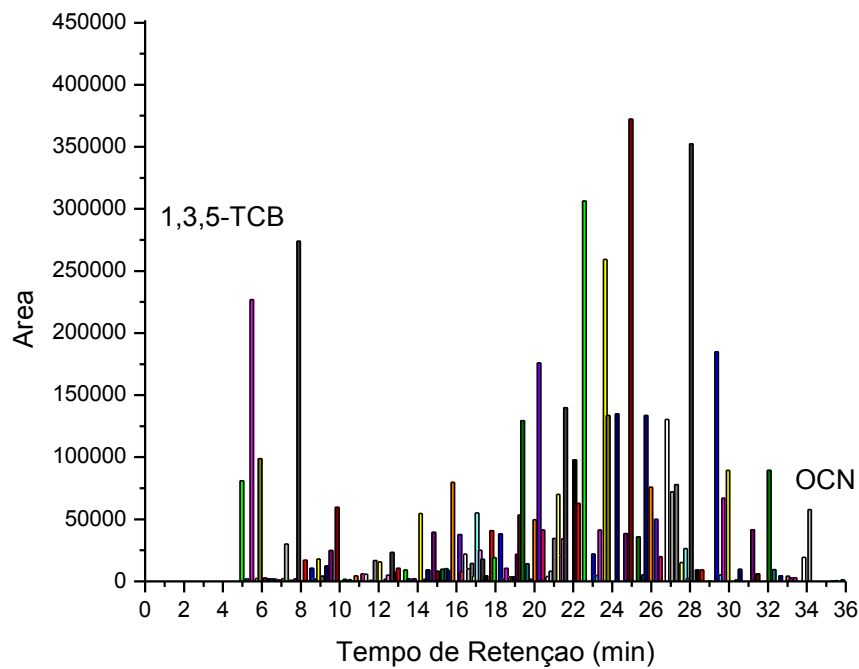
**Figura 5.20** Cromatograma das áreas em função do tempo de Retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em espuma de poliuretano (com formiato)** (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN).



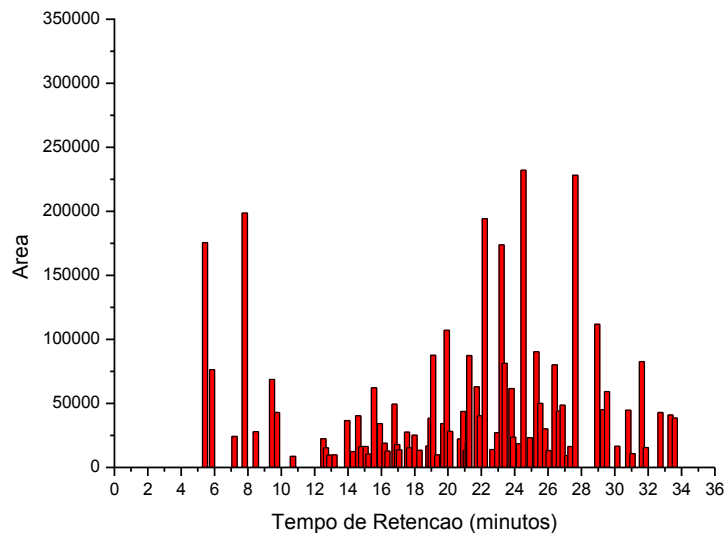
**Figura 5.21** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em carvão vegetal (com formiato (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)).**



**Figura 5.22** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em suspensão (com etanol e formiato). (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)**



**Figura 5.23** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico com diferentes materiais suportes: **Reator com biomassa em suspensão (com ascarel e formiato)**. (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)



**Figura 5.24** Cromatograma das áreas de PCB em função do tempo de retenção da amostra **inicial** dos ensaios em batelada (biomassa planctônica, com ascarel, etanol e formiato). (surrogate – 1,3,5-TCB e padrão OCN)

Desse modo, calculou-se a concentração total de PCB utilizando-se padrão 1016 e 1260, para a amostra inicial e as finais (após 15 dias de operação) dos diferentes reatores de batelada (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3** Concentração total de PCB em Aroclor 1016 e 1260

Reator	Mateial suporte	Substrato	Concentração Total Final PCB (mg/L)	Remoção de PCB (%)	Metano (mmolCH <sub>4</sub> /mLgSTV)
<b>Inicial</b>	Suspensão	Etanol e Formiato	600,7		-
<b>3</b>	Suspensão	Etanol	417,9	30,4	<b>4,1 x 10<sup>-4</sup></b>
<b>4</b>	Suspensão	Controle, sem fonte orgânica	397,1	33,8	8,2 x 10 <sup>-6</sup>
<b>12</b>	Suspensão	Formiato	700,1	-	<b>3,0 x 10<sup>-4</sup></b>
<b>5</b>	Espuma de Poliuretano	Etanol e formiato	86,7	<b>85,6</b>	<b>3,9 x 10<sup>-4</sup></b>
<b>6</b>	Espuma de Poliuretano	Formiato	349,7	41,7	<b>2,2 x 10<sup>-4</sup></b>
<b>7</b>	Carvão Vegetal	Etanol e formiato	494,7	17,6	<b>2,1 x 10<sup>-4</sup></b>
<b>8</b>	Carvão Vegetal	Formiato	564,0	6,1	<b>2,7 x 10<sup>-4</sup></b>

A concentração de PCB em Aroclor 1016 e 1260, adicionada foi de 600,7 mg/L (reator inicial, com biomassa em suspensão, etanol e formiato). Após, 15 dias de operação observou-se que nos reatores com biomassa em suspensão (R3, R4 e R12) a produção de metano foi favorecida devido a adição direta de formiato (R12) e indiretamente via etanol (R3), respectivamente, de  $3,0 \times 10^{-4}$  mmol CH<sub>4</sub>/gSTV e  $4,1 \times 10^{-4}$  mmol CH<sub>4</sub>/mLgSTV. No reator (R4), sem fonte orgânica, esse valor foi de  $8,2 \times 10^{-6}$  mmol CH<sub>4</sub>/mLgSTV. Provavelmente, essa produção de metano foi sustentada por alguns compostos orgânicos provenientes do inóculo. Em relação ao valor total final de ascarel (700,1 mg/L) verificou-se que no R12 (formiato), a concentração foi próxima àquela adicionada; ou seja, formiato de sódio serviu apenas como fonte orgânica para sustentar metanogênese hidrogenotrófica. Nos demais reatores, R3 (etanol e ascarel) e R4 (sem fonte orgânica, mas com ascarel) foi verificado que parcela do ascarel adicionado (34%) foi degradado. Provavelmente, nesses reatores, os co-substratos, etanol e aqueles provenientes do inóculo favoreceram essa possibilidade de degradação, quando comparado com formiato.

Nos reatores com espuma de poliuretano na presença de etanol e formiato (R5) ou somente com formiato (R6) ocorreu, provavelmente, adsorção do ascarel, tanto na superfície desse material, como, também no biofilme. Por conseguinte, maior remoção do tóxico nessa condição. Destaca-se, ainda, que a presença de etanol favoreceu a solubilização do óleo. Desse modo, no R5 obteve-se 85% de degradação de PCB do óleo, enquanto, naquele somente com formiato (R6) essa possibilidade foi de 42%. A maior produção de metano observada no R5 ( $3,9 \times 10^{-4}$  mmol  $\text{CH}_4/\text{mLgSTV}$ ) justifica-se devido a presença de etanol e formiato, em relação ao R6 ( $2,2 \times 10^{-4}$  mmol  $\text{CH}_4/\text{mLgSTV}$ ), somente com formiato.

Nos reatores com carvão vegetal, com etanol, formiato e ascarel (R7) ou, somente, com formiato e ascarel (R8) a produção de metano foi semelhante àquele reator com espuma de poliuretano e formiato (R6). Portanto, mesmo com a adição de etanol no R7, a metanogênese foi desfavorecida quando carvão vegetal foi usado como material suporte. Nessas condições nutricionais verificou-se apenas 12% de degradação do ascarel. Portanto, carvão vegetal não foi material suporte favorável à degradação do ascarel e metanogênese.

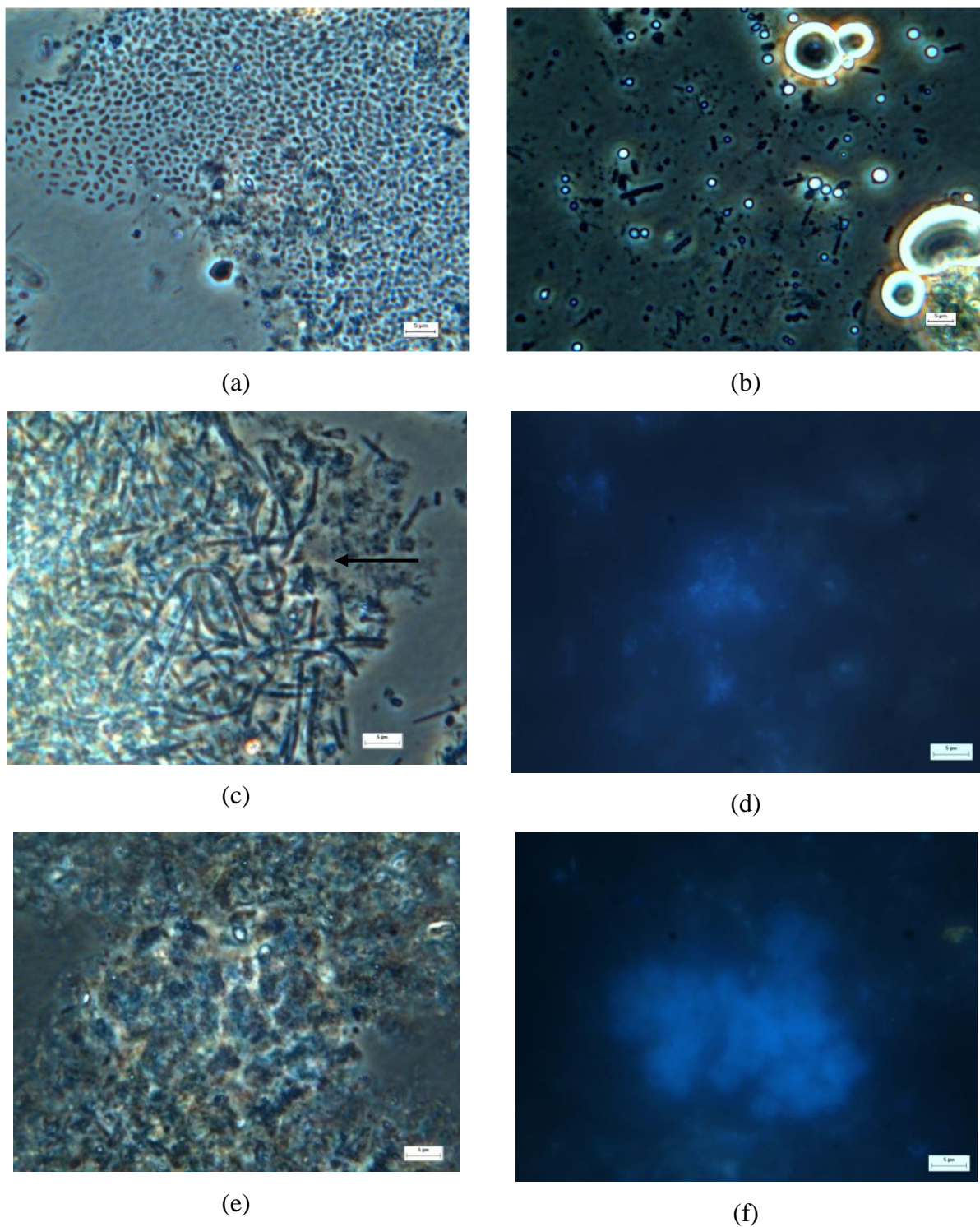
Sob a luz dessas observações o material suporte mais adequado para imobilização da biomassa e degradação do óleo foi a espuma de poliuretano. Além disso, a adição de etanol favoreceu a solubilização do ascarel, aumentando a disponibilidade do PCB.

## **5.2.2 Análise da comunidade microbiana**

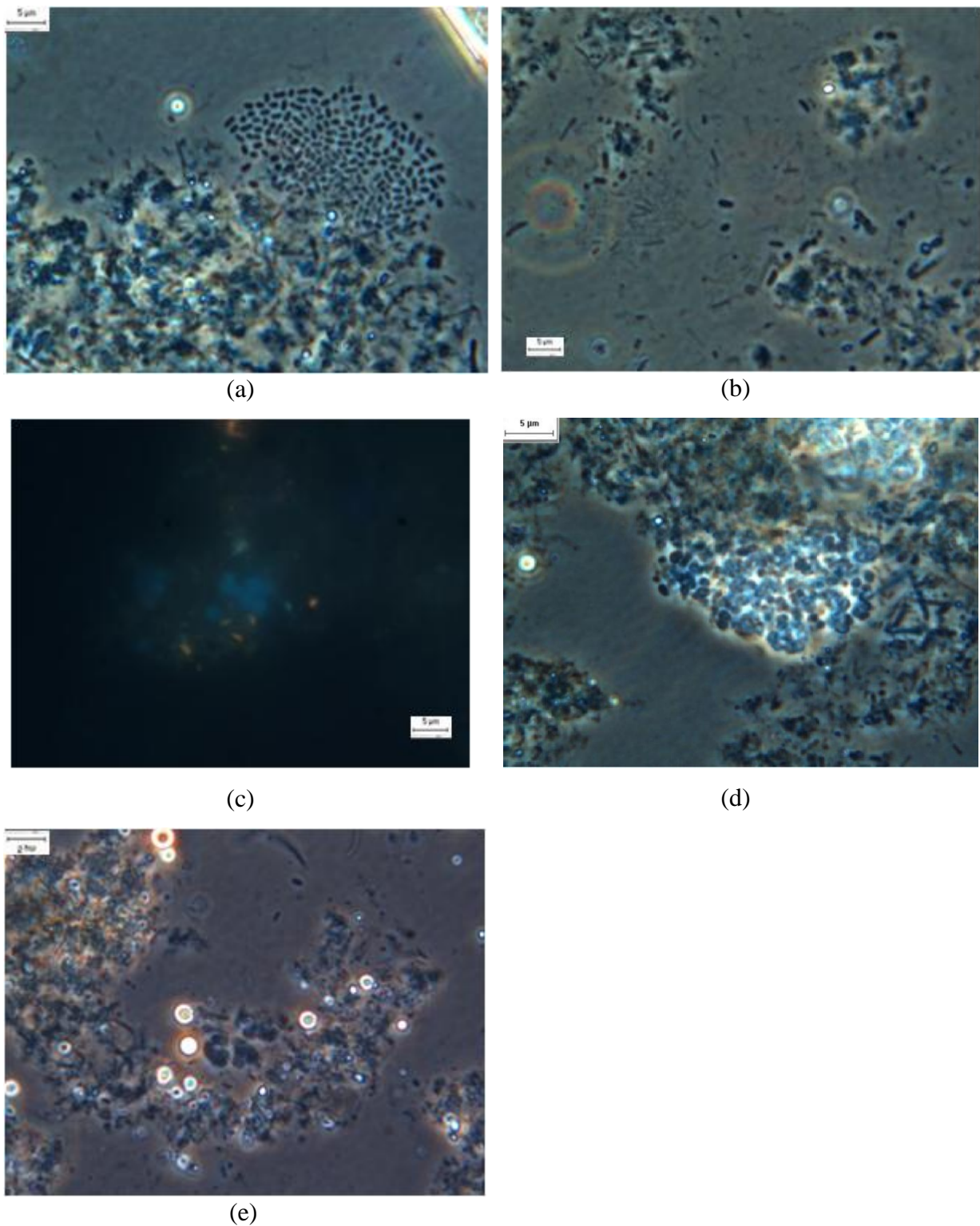
### **5.2.2.1 Exames microscópicos**

Ao final do ensaio em batelada as amostras foram analisadas em microscópio óptico de contraste de fase e fluorescência. A presença de morfologias semelhantes a *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, cocos, cocobacilos e bacilos fluorescentes e não fluorescentes foi confirmada nos exames microscópicos (Figura 5.25 e 5.26 e Tabela 5.4).





**Figura 5.25** Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X): (a) cocobacilos, (b) bacilos e cocos; (c) *Methanosaeta* (d) bacilos fluorescentes; e (e), *Methanosarcina* em contraste de fase, (f) *Methanosarcina* em fluorescência



**Figura 5.26** Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X): (a) cocobacilos, (b) bacilos e filamentos (c) *Methanosarcina* em fluorescência; (d) *Methanosarcina* em contraste de fase; (e) cocos e bacilos.

Nas amostras dos reatores com a maior produção de metano foi observado predominante diversidade de morfologias semelhantes as arqueias methanogênicas

acetoclásticas (*Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp.) e hidrogenotróficas (bacilos fluorescentes). *Methanosaeta* possui estrutura típica de células rodeadas por bainha tubular. Tais arqueias utilizam somente acetato como fonte de carbono (Bergeys, 2001), enquanto, *Methanosarcina* pode usar metanol, acetato, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> e metilaminas como fonte de carbono (Bergeys, 2001). Hirasawa *et al* (2008) verificaram por meio de FISH (Hibridação *in situ* com Fluorescência) predomínio de arqueias metanogênicas (59,5%) em relação ao Domínio Bacteria (44,8%) no lodo granulado usado nesse trabalho como inóculo para ensaios de potencial metanogênico.

**Tabela 5.4** Frequência das morfologias nos reatores em batelada do ensaio 1

MORFOLOGIA	Reatores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Methanosarcina</i> sp.		-	++	++	+	+++	++	+	-	++	++	+++	+
<i>Methanosaeta</i> sp.		-	+++	+++	+	++	+++	++	+	++	++	+	++
Bacilos fluorescentes		-	+	+	-	++	-	-	-	-	-	++	-
Bacilos extremidade afilada		-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
Bacilos extrem. arredondada		-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Bacilos delgados		-	+	+	-	+	+	++	+	++	+	+	+
Bacilos esporulados		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Cocos (grandes)		-	++	+++	-	-	-	+	-	-	-	-	-

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

### 5.2.2.2 Análise filogenética

Após 15 dias de incubação, foram coletadas as amostras dos reatores do ensaio de Potencial Metanogênico (com diferentes materiais suportes e prévio esgotamento da matéria orgânica). Para o Domínio Bacteria, realizou-se somente o PCR/DGGE, com primers (968F – 1392 R), porém, não foi possível amplificar as bandas recortadas do DGGE.

Portanto, realizou-se, posteriormente PCR/DGGE com primers específicos (341 FGC – 518 R), descritos por Muyzer *et al.*, (1993), porém não foi efetuado o seqüenciamento das bandas. Cada reator apresentou padrão de bandas que foi comparado com aquele obtido para o inóculo (Figura 5.27).

Por meio da análise do dendograma do DGGE pelo coeficiente de similaridade de Pearson, para o Domínio *Bacteria* (Figura 5.27), foi possível observar padrão de bandas específico para cada reator agrupado de acordo com o material suporte. Os reatores 7 (ascarel,

formiato e etanol) e 8 (ascarel e formiato), ambos, com biomassa imobilizada em carvão vegetal, apresentaram 90% de similaridade da comunidade microbiana. Estes reatores apresentaram 84% de similaridade com o reator 4, contendo ascarel e biomassa em suspensão. Deve-se destacar que em termos de degradação de PCB, obteve-se para esses três reatores as seguintes remoções, 18%, 6% e 34%, respectivamente. Portanto, nessa análise comparativa evidencia-se que ocorreu alteração das populações, sendo favorecidas aquelas com biomassa em suspensão e, por conseguinte, possibilitando maior remoção do tóxico.

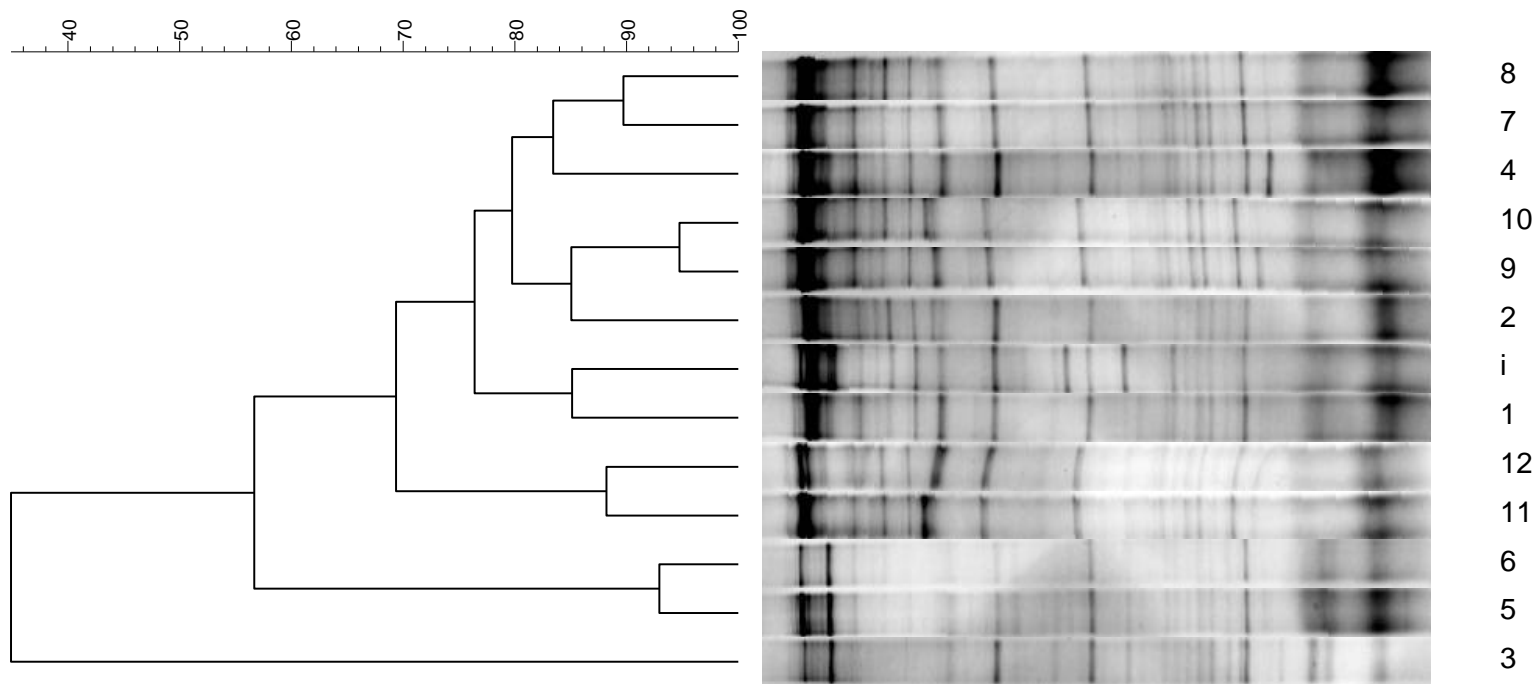
Os reatores com espuma de poliuretano R6 (ascarel e formiato) e R5 (ascarel, etanol e formiato) apresentaram similaridade de 94%. Nessas condições, a remoção de PCB foi de 42% e 86%, respectivamente. Portanto, provavelmente, etanol presente somente no R5 favoreceu a disponibilidade do ascarel obtendo-se maior remoção nessa condição. Todavia, a adição desse co-substrato não refletiu em alteração das populações de bactérias anaeróbias nos reatores, uma vez que foram similares em 94%.

Os reatores 11 (etanol e formiato) e 12 (ascarel e formiato) com biomassa em suspensão, também ficaram agrupados com 88% de similaridade. Todavia, o reator 3 (ascarel e etanol), com biomassa em suspensão ficou mais distante dos outros, com similaridade de 54%. Provavelmente, nessa última condição ocorreu seleção das populações de bactérias anaeróbias envolvidas na degradação do tóxico, uma vez que se obteve 30% de remoção. No reator 12, isso não aconteceu, porque a concentração de ascarel ficou praticamente a mesma.

Obteve-se 84% de similaridade entre reator controle (R1) e inóculo, pois a condição imposta a este reator, sem ascarel, sem co-substrato ou material suporte, acarretou alterações na população bacteriana contida no inóculo.

Para o reator 9 (espuma de poliuretano e formiato) e reator 10 (carvão vegetal e formiato) obteve-se similaridade de 94%. Portanto, não foi observada mudança brusca na diversidade de populações para essas condições, pois apesar de diferirem no material suporte, continham a mesma fonte orgânica. Para o reator 2 (biomassa em suspensão com etanol) obteve-se 84% de similaridade com os reatores 9 e 10. Comparando o agrupamento dos reatores que continham ascarel nos diferentes materiais suportes, observou-se que os reatores com espuma de poliuretano (5 e 6) e com carvão vegetal (7 e 8) ficaram agrupados com 94% e 90% respectivamente, independente da fonte de carbono. Provavelmente, o biofilme formado no material suporte propiciou a formação de consórcio microbiano, que se

configurou conforme as condições impostas pelo suporte. No entanto, nos reatores, com biomassa em suspensão isto não foi observado, mesmo porque o reator 3 ficou externo ao agrupamento formado, ou seja, 64% de modificação na comunidade bacteriana, em relação as outras amostras.



**Figura 5.27 Dendrograma do DGGE para Domínio Bacteria (341F e 518R Muyzer et al., 1993) do ensaio 1 – calculado pelo índice de similaridade de Pearson no programa Bionumerics. Concentração do gel: 45 – 65%. Reatores em suspensão:- R1 (controle), R2 (etanol), R3 (ascarel, etanol), R4 (ascarel), R11 (etanol, formiato), R12 (ascarel, formiato); espuma de poliuretano:- R5 (ascarel, etanol, formiato), R6 (ascarel, formiato), R9 (formiato); Carvão vegetal:- R7 (ascarel, etanol, formiato), R8 (ascarel, formiato), R10 (formiato).**

No dendograma de DGGE para Domínio *Archaea* (Figura 5.28), observou-se alteração das populações para as diferentes condições dos reatores em batelada do ensaio de Potencial Metanogênico. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para comparar a similaridade entre os reatores. Desse modo, observou-se que os grupos foram reunidos de acordo com os diferentes materiais suportes (espuma de poliuretano e carvão vegetal) ou biomassa em suspensão.

Nos reatores com biomassa suspensa as populações metanogênicas se assemelharam em 89% a 98% no reator 1 (controle, em suspensão e ascarel), reator 2 (suspensão com etanol), reator 3 (suspensão com ascarel e etanol), reator 11 (suspensão, ascarel, etanol e formiato) e reator 12 (suspensão, ascarel e formiato). Para o reator 4 (suspensão e ascarel) obteve-se 78% de similaridade em relação aos demais. Essa diferença foi observada também na produção de metano, ou seja, somente na condição sem co-substrato orgânico (R4), a produção de metano ( $8,2E-6$  mmol  $CH_4/gSTV$ ) foi menor que os demais reatores, cujos valores foram de  $3,0E-4$  mmol  $CH_4/gSTV$  a  $4,1E-4$  mmol  $CH_4/gSTV$ . Deve-se ressaltar que o lodo granulado proveniente de reator UASB usado nesse trabalho como inóculo dos reatores em batelada era predominantemente metanogênico (Hirasawa et al., 2007), portanto, ligeiras alterações foram relacionadas diretamente com a fonte orgânica, considerando-se que as arqueias metanogênicas encontram-se fisiologicamente no final da cadeia alimentar sob condição anaeróbia. Portanto, somente a carência de substrato orgânico poderá levar a alteração na diversidade populacional.

Os reatores 5 (formiato, etanol e ascarel) e 9 (formiato), com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano, tiveram similaridade de 94%. Portanto, a adição de etanol não refletiu alteração das populações de arqueias metanogênicas. Todavia, refletiu na quantidade final de metano; ou seja,  $3,9E-4$  mmol  $CH_4/gSTV$  e  $2,2E-4$  mmol  $CH_4/gSTV$ , respectivamente. Provavelmente, incremento adicional de acetato e  $H_2/CO_2$  proveniente da metabolização do etanol favoreceu maior produção de metano no reator 5.

Apesar dos reatores 5 e 9 conterem o mesmo material suporte que o reator 6, tiveram similaridade de 82%, provavelmente esta diferença ficou por conta da presença do tóxico, que interferiu indiretamente na composição da população de arqueias metanogênicas. O reator 6 continha apenas formiato, como fonte orgânica.

No caso do carvão vegetal como material suporte, o agrupamento decorreu de maneira muito semelhante, ou seja, os dois reatores (7 e 8) que continham ascarel, tiveram 95% de similaridade e 89% em relação ao reator 10, que continha, somente, formiato, como fonte orgânica.

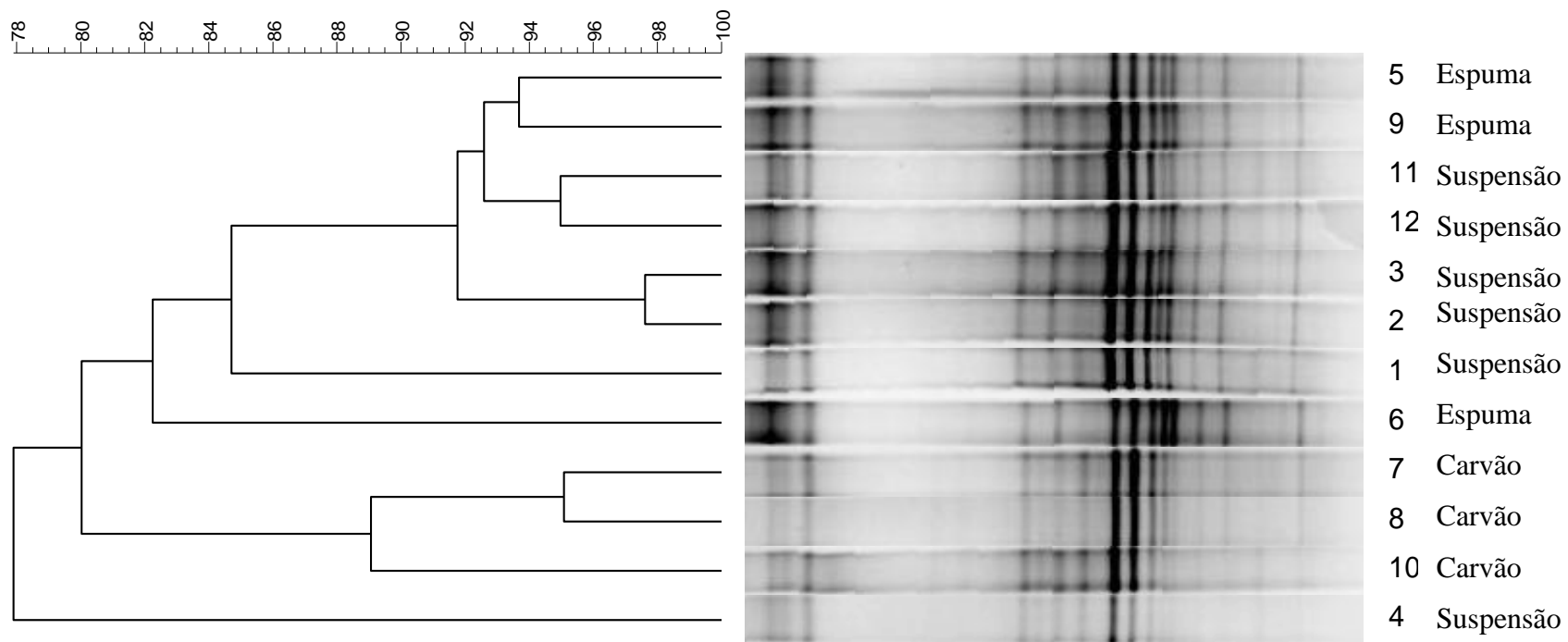
As bandas de DGGE foram recortadas (Figura 5.29), somente para o Domínio Archaea, amplificadas por PCR e sequenciadas para identificação dos microrganismos metanogênicos. Considerando-se que as bandas representem, cada uma delas, uma população diferente, houve diferença de 22% nos padrões de banda do reator 4 para o Domínio *Archaea*, no qual a produção de metano foi menor. Porém, algumas bandas ocorreram em todos os reatores. Os microrganismos do Domínio *Archaea* que foram sequenciados a partir das bandas recortadas do DGGE estão descritos na Tabela 5.5.

As duas ordens resultantes do sequenciamento das bandas do DGGE para as arqueias metanogênicas foram *Methanosarcinales* e *Methanomicrobiales*. Nem todas as bandas foram classificadas, porém observou-se que as bandas de **A** a **G** foram similares em 98% a *Methanosaeta* sp. As bandas **H**, **J** e **K**, foram pertencentes a ordem *Methanomicrobiales*, similares em 97% ao gênero *Methanolinea* sp.. A árvore filogenética foi elaborada por meio da análise comparativa das sequencias do RNAr 16S das bandas do /DGGE agrupadas com similaridade acima de 94% (Figura 5.28).

A presença de *Methanosaeta* sp. foi marcante nas bandas iniciais (de A a G), nos reatores em suspensão: 12 - banda1A (ascarel e formiato); reatores com carvão vegetal: 10 - banda3D e 3B (formiato), reator 7 - bandas 6D e 6G (ascarel, etanol e formiato) e reator 8 – bandas 5E e 5F (ascarel e formiato); reatores com espuma de poliuretano: reator 9 – banda 4B (formiato), reator 6 – banda 7C (ascarel e formiato).

Árvore Filogenética dos reatores do Ensaio 1 (Potencial Metanogênico em diferentes suportes) dos membros do Domínio *Archaea* baseado na análise comparativa da sequencia do gene 16S rRNA é mostrada na Figura 5.30.



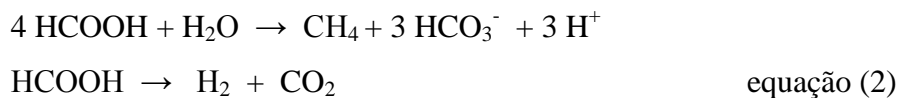


**Figura 5.28 Dendrograma do DGGE para Domínio Archaea (1100FGC e 1400R) do ensaio 1 – calculado pelo índice de similaridade de Pearson no programa Bionumerics. Concentração do gel: 40 – 70%. Reatores em suspensão:- R1 (controle), R2 (etanol), R3 (ascarel, etanol), R4 (ascarel), R11(etanol, formiato), R12 (ascarel, formiato); espuma de poliuretano:- R5 (ascarel, etanol, formiato), R6 (ascarel, formiato), R9 (formiato); Carvão vegetal:- R7 (ascarel, etanol, formiato), R8(ascarel, formiato), R10 (formiato).**

Este gênero está relacionado com a metanogênese acetoclástica. O etanol pode ser usado por algumas bactérias anaeróbias levando a formação de acetato, provavelmente, favorecendo a manutenção da *Methanosaeta*, especialista no uso desse composto (Ramos-Padrón et al. 2011). Os autores encontraram este gênero em estudos em poços arenosos de armazenamento de resíduos de extração de Betume tratado com gipsita ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Esses microrganismo também foram observados em grânulos de UASB alimentados com resíduo sintético de cervejaria por Kovacik et al. 2010.

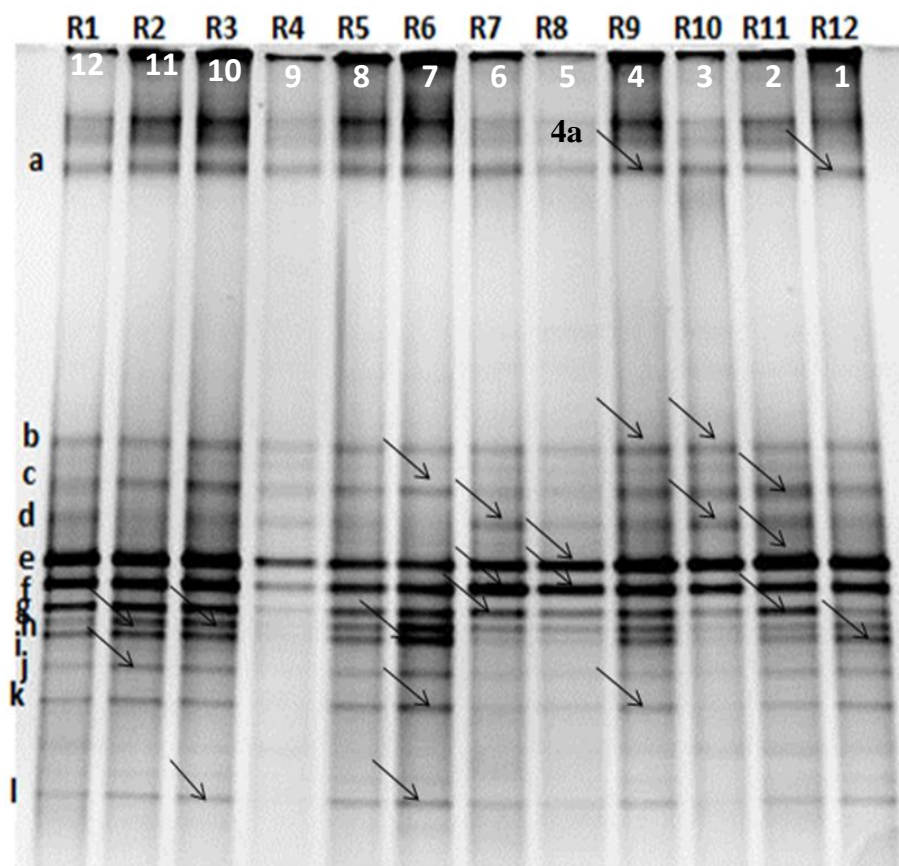
Obteve-se também similaridade de 97% com arqueias semelhantes a *Methanolinea* (Ordem *Methanomicrobiales*) referente a bandas 11J dos reatores 2 (suspensão com etanol), também identificadas pelos autores op. Cit. Ramos-Padrón et al., 2010.

Nos reatores com espuma de poliuretano como suporte para a biomassa, reator 9 (formiato) e reator 6 (ascarel e formiato) as bandas encontradas 4Ke 7K, respectivamente, foram relacionadas a Ordem *Methanomicrobiales*. Essas arqueias são hidrogenotróficas (Ramos-Padron et al., 2011, e usam formiato (equação 2) fornecido nos reatores como fonte de carbono. a seguir a equação da degradação deste composto:

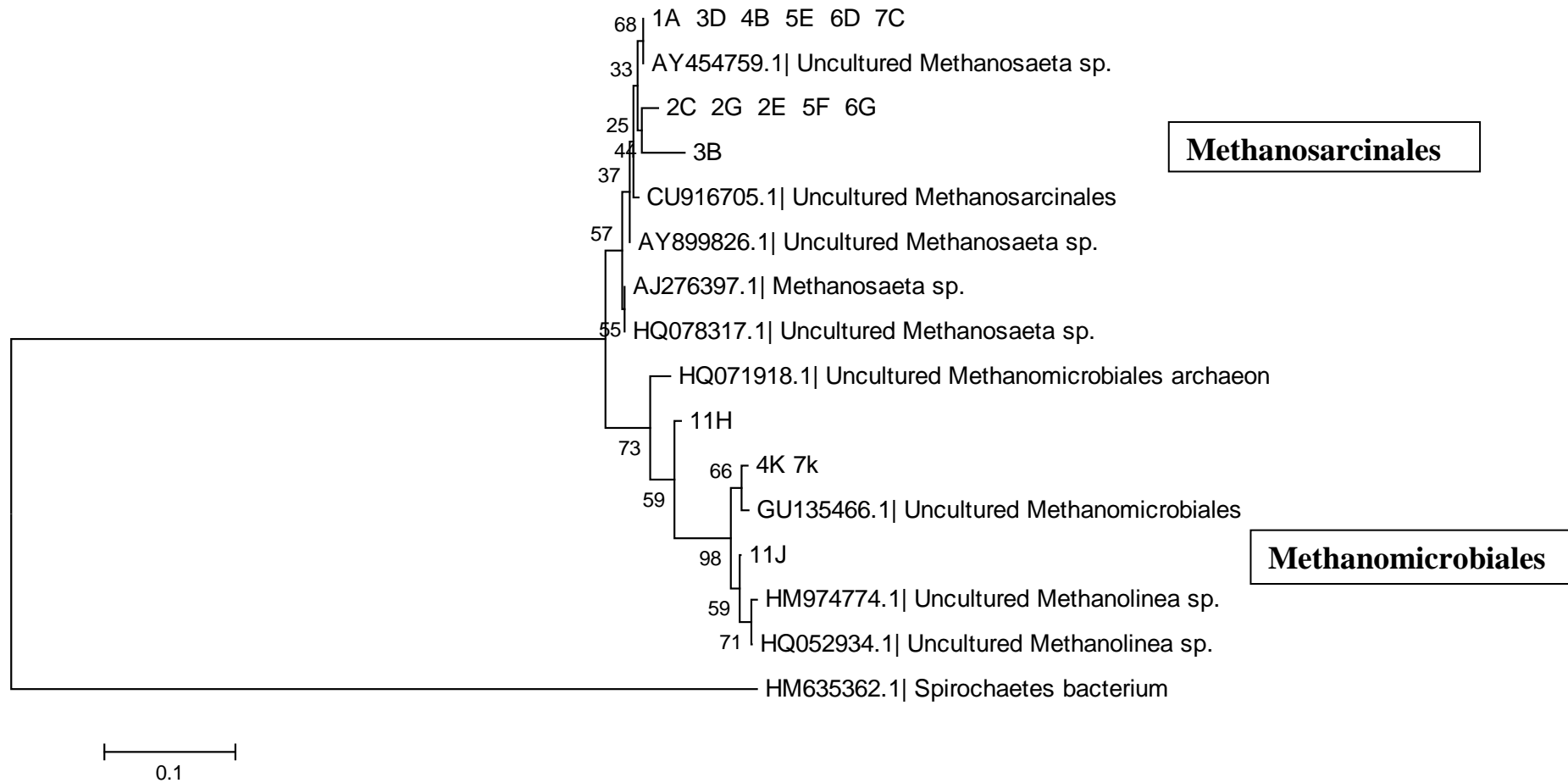


Os representantes da ordem *Methanomicrobiales* são responsáveis pela rota hidrogenotrófica da metanogênese. Condições que conferem com as impostas aos reatores, contendo formiato como fonte de carbono.

Deve-se ressaltar que embora, *Methanosarcina* não tenha sido obtida por meio do recorte de bandas do DGGE, sua presença foi constatada nos exames microscópicos. Referem-se a arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas. Ainda, foram constatados também bacilos fluorescentes hidrogenotróficos, os quais produzem metano a partir de formiato e hidrogênio e  $\text{CO}_2$ .



**Figura 5. 29** DGGE do biofilme dos reatores do ensaio 1 para o Domínio *Archaea*; as flechas indicam as bandas que foram recortadas para posterior seqüenciamento para identificação de arqueias metanogênicas, denominadas a partir da combinação das letras ao lado e os números (em branco) acima (como exemplo a banda 4a).



**Figura 5.30** Árvore Filogenética dos reatores do Ensaio 1 (Potencial Metanogênico em diferentes suportes) dos membros do Domínio *Archaea* baseado na análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA - calculado de acordo com o método Neighbor-joining, Bootstrap (500 reamostragens) com *Spirochaetes bacterium* como *outgroup*

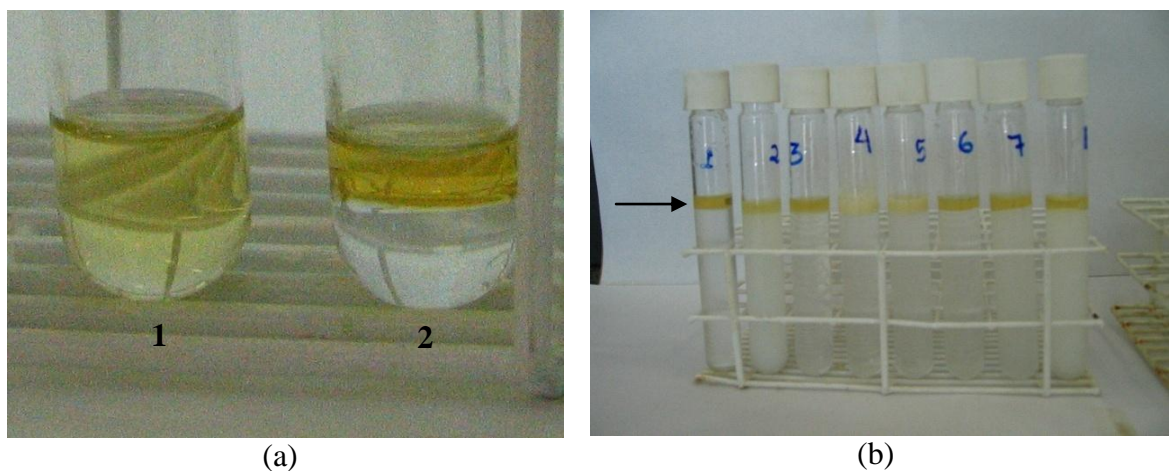
**Tabela 5.5** Relação das sequencias das bandas recortadas obtidas no Genbank nos reatores 1-12 (Material Suporte)

<b>Banda</b>	<b>Acesso - BLAST</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Similaridade</b>	<b>Referencia</b>
1A,3D,6D,4B, 5E,7C	AY899826	<i>Methanosaeta</i> sp.*	98%	Kovacik et al. 2010
	AY454759	<i>Methanosaeta</i> sp.*	99%	Piza et al., 2003 Não publicado
2G,6G,2C,2E,5F	HQ078317	<i>Methanosaeta</i> sp.*	98%	Ramos-Padrón et al., 2010
	AJ276397	<i>Methanosaeta</i> sp.*	98%	Scholten et al. 2000
3B	CU916705	Methanosarcinales archaeon*	98%	Riviere et al., 2008
4K,7K	GU135466	Methanomicrobiales*	98%	Borrel, .2009 Não publicado
11H	HQ071918	Methanomicrobiales*	94%	Ramos-Padrón et al., 2010
11J	HM974774	<i>Methanolinea</i> sp.*	97%	Callbeck et al., 2010
	HQ052934	<i>Methanolinea</i> sp.*		Ramos-Padrón et al., 2010

\* (Não cultivado)

### 5.3 Solubilidade do Ascarel

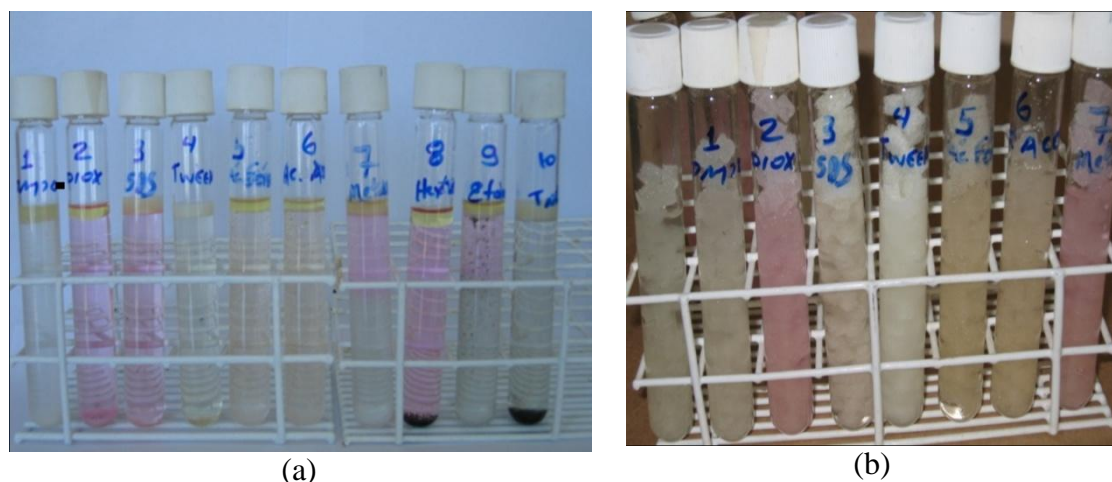
Após a constatação da necessidade do emprego de solvente orgânico para solubilização do ascarel, nessa etapa da pesquisa foi realizado ensaio para eleger solvente apropriado para solubilizar ascarel. Para tanto, foram testados alguns solventes orgânicos, tais como, DMSO, dioxano, hexano, acetona, metanol, etanol, ácido acético e ácido fórmico e surfactantes (Triton X-100, SDS 10% e Tween 80). Análise prévia visual foi realizada após o acréscimo de cada solvente. Desse modo, constatou-se que ocorreu solubilização após a adição DMSO, dioxano, hexano e acetona. Todavia, não houve solubilização após a adição de metanol, etanol, ácido acético e ácido fórmico. Nessas condições houve separação das fases (Figura 5.31). No entanto, nos testes com adição de surfactantes houve a formação de emulsão. Após a adição de meio de cultura Angelidaki ocorreu a separação de fases em quase todos os frascos, somente aqueles nos quais foram adicionados surfactantes, a emulsão continuou formada.



**Figura 5.31** Solubilização do ascarel (a) 1 – solventes orgânicos, completa solubilização – 2 – alcoóis e ácidos, separação das fases; (b) a seta indica a separação das fases após a adição do meio Angelidaki.

Adicionou-se espuma de poliuretano ao meio de cultura Angelidaki e extrato de ascarel/solvente para simular a mesma condição que seria imposta ao reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para remoção do ascarel. As amostras foram colocadas em estufa (30 °C) com agitação (150 rpm) e permaneceram durante 12 horas. Após este período, não foi observada separação de fase, provavelmente, devido à adsorção do ascarel à espuma de poliuretano (Figura 5.32). Realizou-se a extração de PCB das amostras e posterior análise por cromatografia gasosa (Detector de Captura de Elétrons). Os maiores picos

cromatográficos de PCB obtidos do óleo ascarel foram para aquelas amostras que continham metanol, Triton X-100 e ácido fórmico como solvente (Tabela 5.6).



**Figura 5.32** Solubilização do ascarel (a) antes e (b) após adição de espuma de poliuretano

**Tabela 5.6** Solubilidade de Ascarel nos diferentes solventes

Reator	Solvente (1.0 mL)	Solubilização	
		Agitação	Adição do meio Angelidaky
1	Controle	+	-
2	DMSO	+	-
3	Dioxano	+	-
4	<b>SDS (10%)</b>	+	+
5	<b>Tween 80</b>	+	+
6	Ácido Fórmico	+	-
7	Ácido Acético	+	-
8	Metanol	+	-
9	Hexano/Acetona (1:1)	+	-
10	Etanol	+	-
11	<b>Triton X-100 (10%)</b>	+	+
12	<b>Triton X-100 (1%)</b>	+	+
13	<b>Triton X-100 (0.1%)</b>	+	+
14	<b>Triton X-100 (0.01%)</b>	+	±
15	Acetona	+	-
16	Hexano	+	-

(+) = ocorreu mistura; (-) = não ocorreu mistura.

Portanto, a partir dos resultados obtidos nesses testes foi elaborado outro ensaio de potencial metanogênico em reator em batelada, todavia, contendo solventes e espuma de

poliuretano. De acordo com Fava (1996), a descloração de bifenilas foi mais efetiva quando o surfactante Triton X-100 foi usado como solvente, provavelmente, aumentando a biodisponibilidade do PCB e assim, a eficiência da sua degradação. Warner et al. (1934) avaliaram a solubilidade do PCB em seis solventes não polares, enquanto, Billingsley et al., (1999, 2002), utilizaram vários surfactantes para a solubilização de quatro congêneres de PCB adsorvidos em vidro, por conseguinte, favorecendo a sua biodegradação.

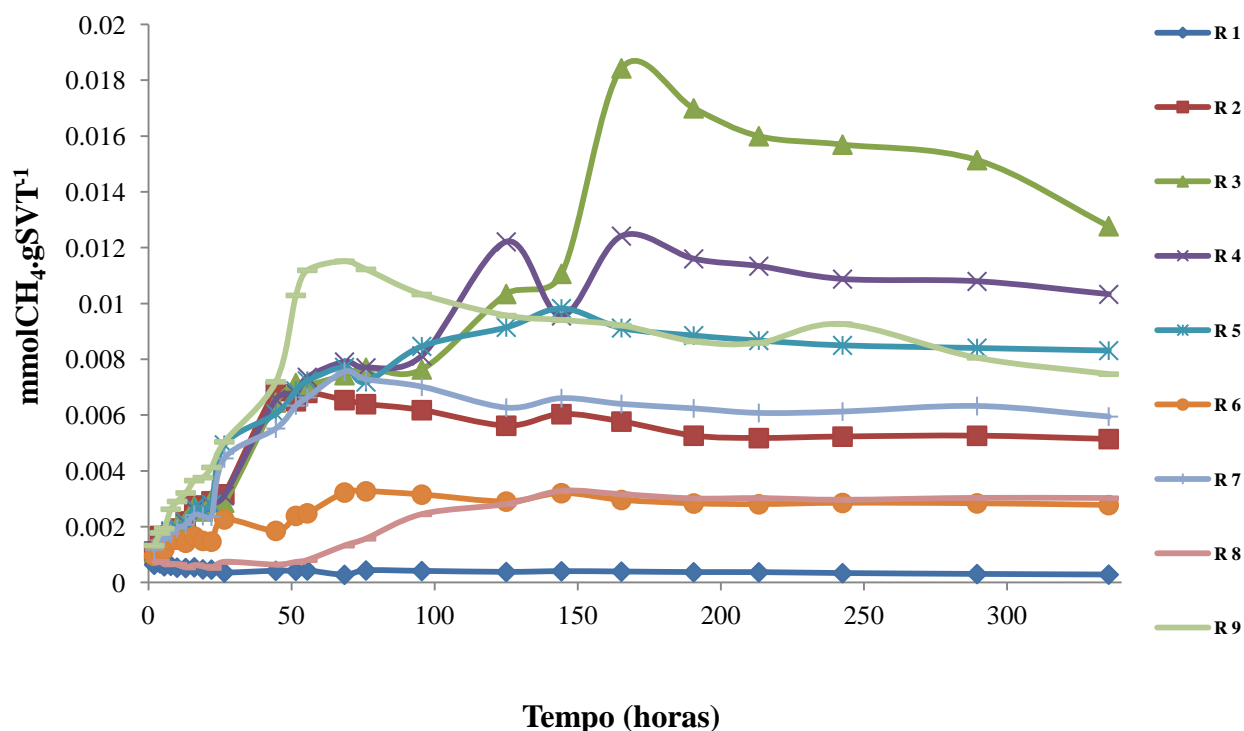
A partir da escolha de espuma de poliuretano como material suporte e das fontes de carbono adequadas, como etanol e formiato, a avaliação da degradação de PCB foi realizada a partir da produção de metano, na presença de fontes de carbono, ascarel e solventes em diferentes concentrações, tais como, metanol (1,6 g/L, 790 mg/L e 395 mg/L), Triton X-100 (10% e 1%) e ácido fórmico (1,2 g/L e 600 mg/L). A combinação de acetato, etanol ou formiato foram adicionados como fonte de carbono para o desenvolvimento de bactérias anaeróbias e arqueias metanogênicas. Destaca-se que nesses ensaios foi realizado o prévio esgotamento da matéria orgânica, sendo o acréscimo das fontes de carbono, solventes e ascarel realizado após sete dias de ensaio (Figura 5.33).

No reator 1 (controle), o qual não continha fonte de carbono ou ascarel, não houve produção de metano (Tabela 5.7). Os menores valores de metano foram obtidos para a condição do reator 6 (Triton X-100 concentrado 10%) e reator 8 (ácido fórmico 1,2 g/L), respectivamente  $5,2 \times 10^{-7}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV em 5 horas e  $8,7 \times 10^{-7}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV em 2 horas. Nas demais condições, os valores obtidos da produção de metano foram muito semelhantes; ou seja,  $2,8 \times 10^{-6}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV em 49 horas (R3 - etanol, formiato e metanol 1,6 g/L);  $2,4 \times 10^{-6}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV em 39 horas (R4 - etanol, formiato e metanol 790 mg/L) ;  $2,1 \times 10^{-6}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV em 49 horas (R5 -formiato, etanol e metanol 395 mg/L) e  $2,5 \times 10^{-6}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV em 33 horas (R7 – etanol, formiato e Triton X-100 1%) . Na condição nutricional com etanol, acetato e ácido fórmico (600 mg/L) (R9) obteve-se  $3,8 \times 10^{-6}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV em 2 horas. Neste reator foi obtido em menor tempo maior produção de metano, possivelmente pela presença do ácido fórmico que é um solvente que também pode ser utilizado como fonte e é degradado rapidamente, bem como, foi fornecido, também, o acetato como fonte de carbono.

Neste ensaio os valores da produção de metano ( $8,2 \times 10^{-7}$  a  $3,0 \times 10^{-6}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV) foram bem menores do que aqueles obtidos no ensaio 1 ( $8,2 \times 10^{-6}$  a  $3,8$



$\times 10^{-4}$  mmolCH<sub>4</sub>/mLgSTV). Provavelmente, a adição de grande quantidade de solvente pode ter inibido a produção de metano.



**Figura 5.33** Produção de metano na presença de diferentes solventes em função do tempo

**Tabela 5.7** Velocidade máxima de metano do ensaio com solventes

Reator	Solventes	Fontes de Carbono	Velocidade Máxima (mmolCH <sub>4</sub> /mLgSTV)	Tempo (horas)
1	Controle	-		
2	Controle	Etanol/ Formiato	$3,5 \times 10^{-6}$	52,3
3	Metanol 1,6 g/L	Etanol/ Formiato	$2,8 \times 10^{-6}$	49,2
4	Metanol 790 mg/L	Etanol/ Formiato	$2,4 \times 10^{-6}$	38,6
5	Metanol 395 mg/L	Etanol/ Formiato	$2,1 \times 10^{-6}$	49,2
6	Triton 100 x 10% (1:1)	Etanol/ Formiato	$5,2 \times 10^{-7}$	4,7
7	Triton 100 x 10% (1:10)	Etanol/ Formiato	$2,5 \times 10^{-6}$	33,4
8	Ácido fórmico 1,2 g/L	Etanol/ Acetato	$8,2 \times 10^{-7}$	2
9	Ácido formico 600 mg/L	Etanol/ Acetato	$3,8 \times 10^{-6}$	2

O método de extração com Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisol/Sílica foi utilizado para extrair o PCB das amostras dos reatores deste ensaio. Os valores das áreas relativas de PCB foram plotados no programa Origin Pro8 (Figuras 5.34 a 5.41). Os valores das principais áreas relativas foram somados e comparados com as concentrações da curva de calibração.

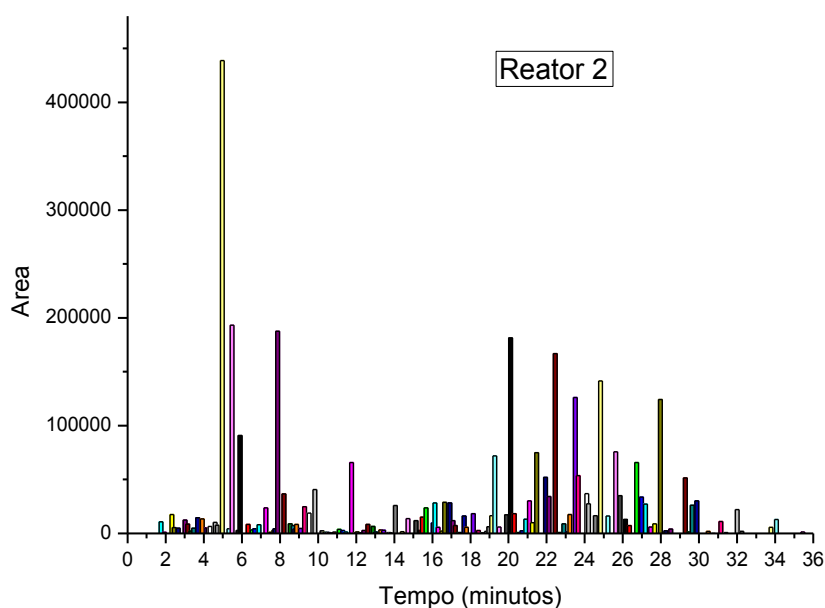
Semelhante ao ensaio anterior (Ensaio 1) obteve-se os valores das concentrações totais de PCB em Aroclor 1016/1260 a partir da curva de calibração (Tabela 5.8). Após quinze dias de operação, foram observados menores valores de PCB nos reatores 4 (Metanol 790 mg/L), 9 (Ácido fórmico 600 mg/L) e 7 (Triton X-100 1%), respectivamente, de 80,4 mg/L (86,6% de remoção), 93,2 mg/L (84,5% de remoção) e 167,7 mg/L (72,1% de remoção). Portanto, semelhante aqueles resultados obtidos no ensaio 1, foi necessário a adição de co-substratos em concentração adequada para favorecer a degradação do PCB, bem como, a presença de material suporte, nesse caso, espuma de poliuretano, para desenvolvimento de biofilme e adsorção do tóxico.

**Tabela 5.8** Concentração total de PCB nos reatores em batelada

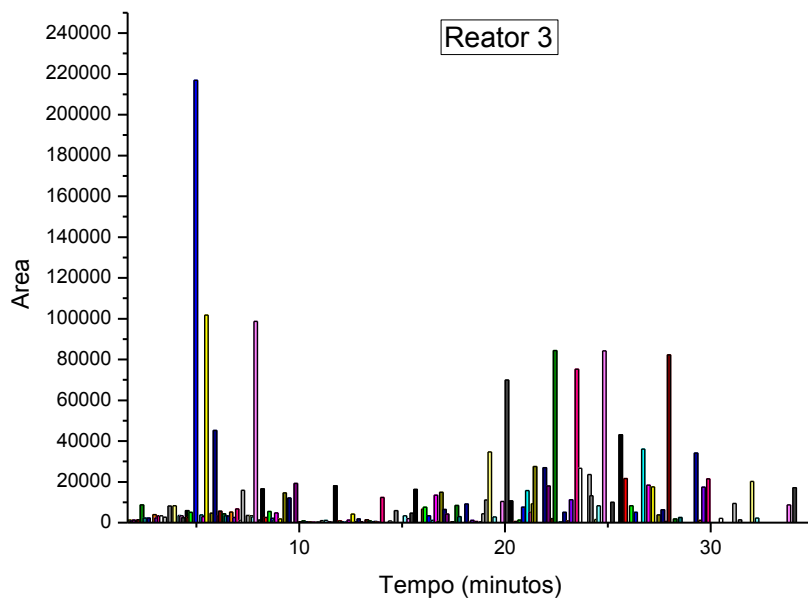
<b>Reatores</b>	<b>Condição</b>	<b>Remoção de PCB (%)</b>	<b>Concentração Total de PCB em Aroclor 1016/1260 (mg/L)</b>
<b>Inicial</b>	Amostra inicial	-	600,7
<b>1</b>	Controle	-	-
<b>2</b>	Controle/ ascarel *	21,7	470,4
<b>3</b>	Metanol * 1,6 g/L	60,2	239,2
<b>4</b>	Metanol * 790 mg/L	<b>86,6</b>	<b>80,4</b>
<b>5</b>	Metanol * 395 mg/L	58,9	246,4
<b>6</b>	Triton 100 x 10% * (1:1)	51,5	291,0
<b>7</b>	Triton 100 x 10% * (1:10)	<b>72,1</b>	<b>167,7</b>
<b>8</b>	Acido fórmico ** 1,2 g/L	48,5	309,1
<b>9</b>	Ácido fórmico ** 600 mg/L	<b>84,5</b>	<b>93,2</b>

Fonte de carbono (\*) formiato e etanol; (\*\*) etanol e acetato

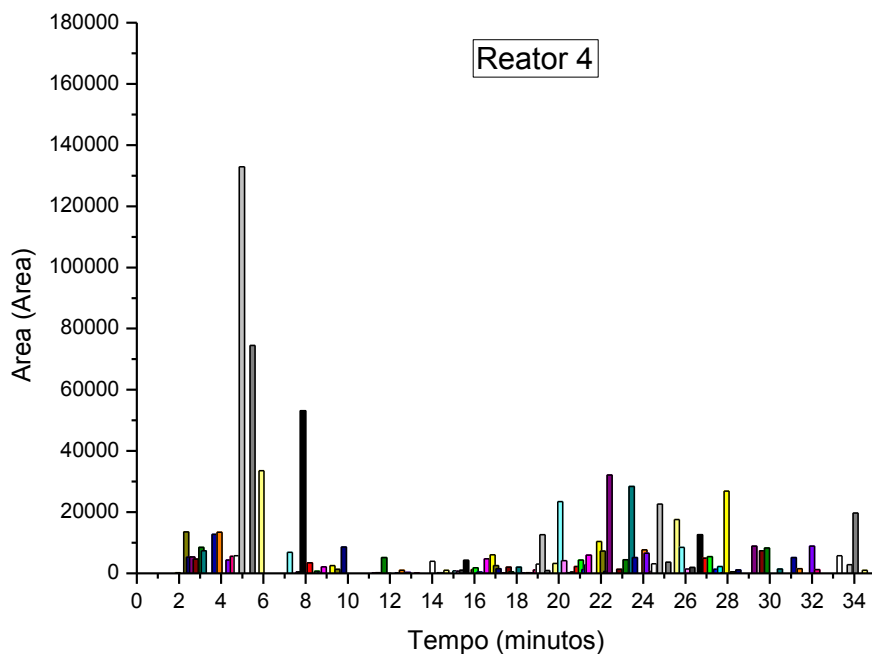
Em relação ao ensaio 1, observou-se maior variação nas áreas dos picos de PCB, ou seja, na concentração de PCB em Aroclor 1016/1260. Provavelmente, os solventes contribuíram para a disponibilização do PCB no meio reacional. A partir desses últimos ensaios, escolheu-se a melhor condição para a alimentação do RAHLF; ou seja, espuma de poliuretano como material suporte para imobilização da biomassa anaeróbia, meio Angelidaki contendo ascarel solubilizado em Triton X-100 (1%), metanol (395 mg/L), formiato (680 mg/L) e etanol (46 g/L).



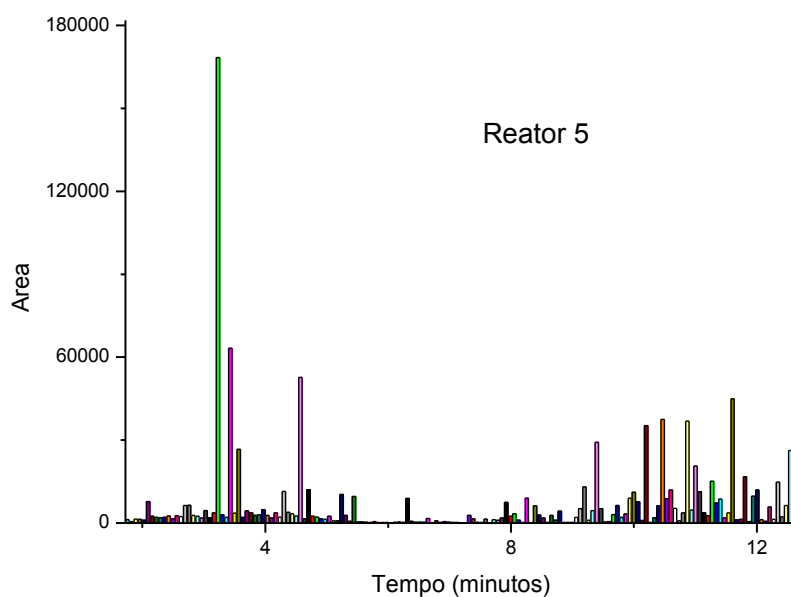
**Figura 5.34** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico: **Reator sem solvente (com ascarel, etanol e formiato)**



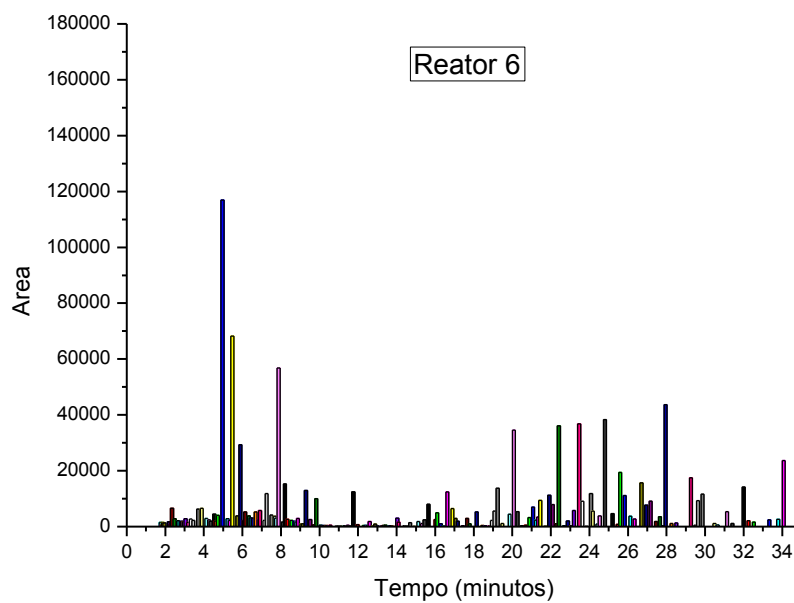
**Figura 5.35** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico: **Reator com metanol (1,6 g/L), ascarel, etanol e formiato**



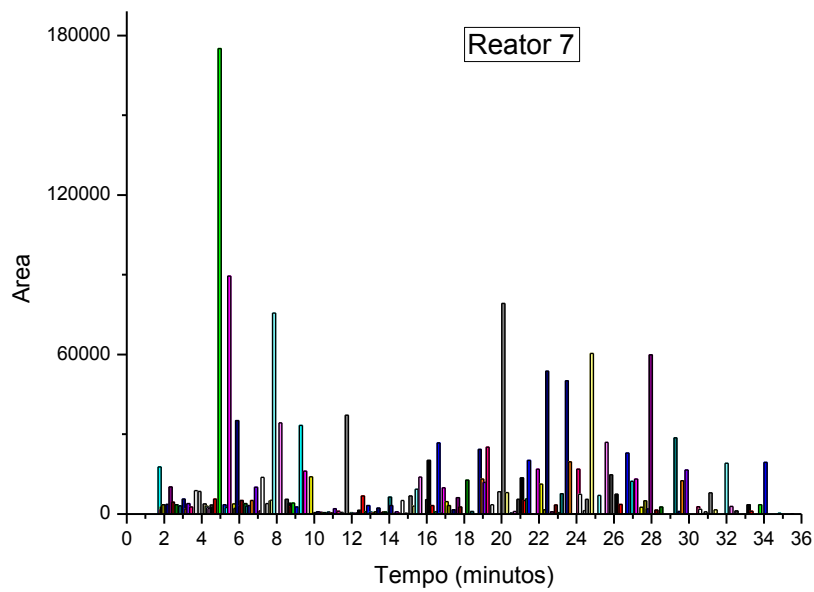
**Figura 5.36** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico: **Reator com metanol (790 mg/L), ascarel, etanol e formiato**



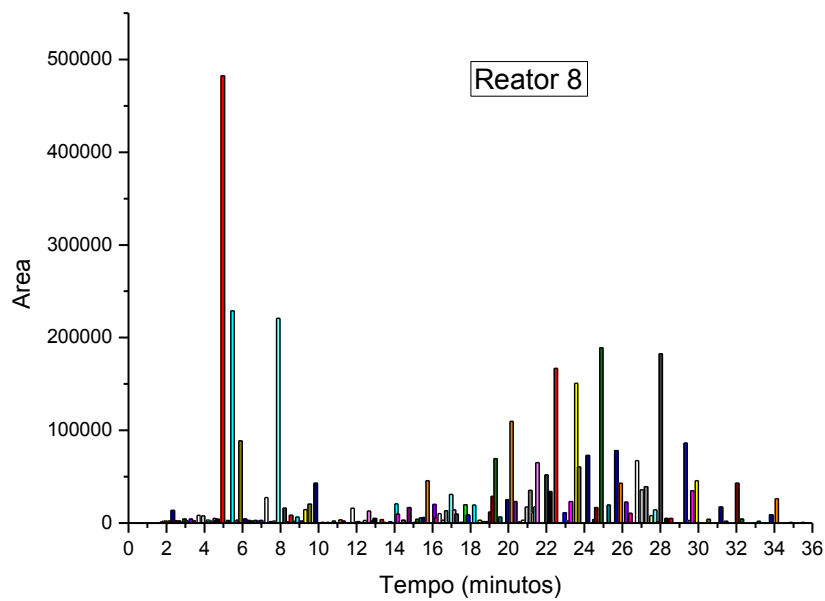
**Figura 5.37** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico: **Reator com metanol (395 mg/L), ascarel, etanol e formiato**



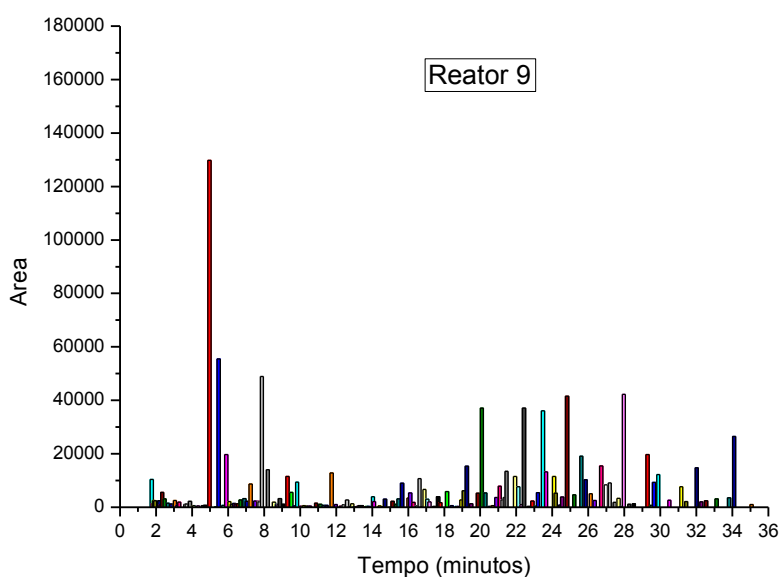
**Figura 5.38** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico: **Reator com Triton X 100 10% (1:1), ascarel, etanol e formiato**



**Figura 5.39** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico: **Reator com Triton X 100 10% (1:10), ascarel, etanol e formiato**

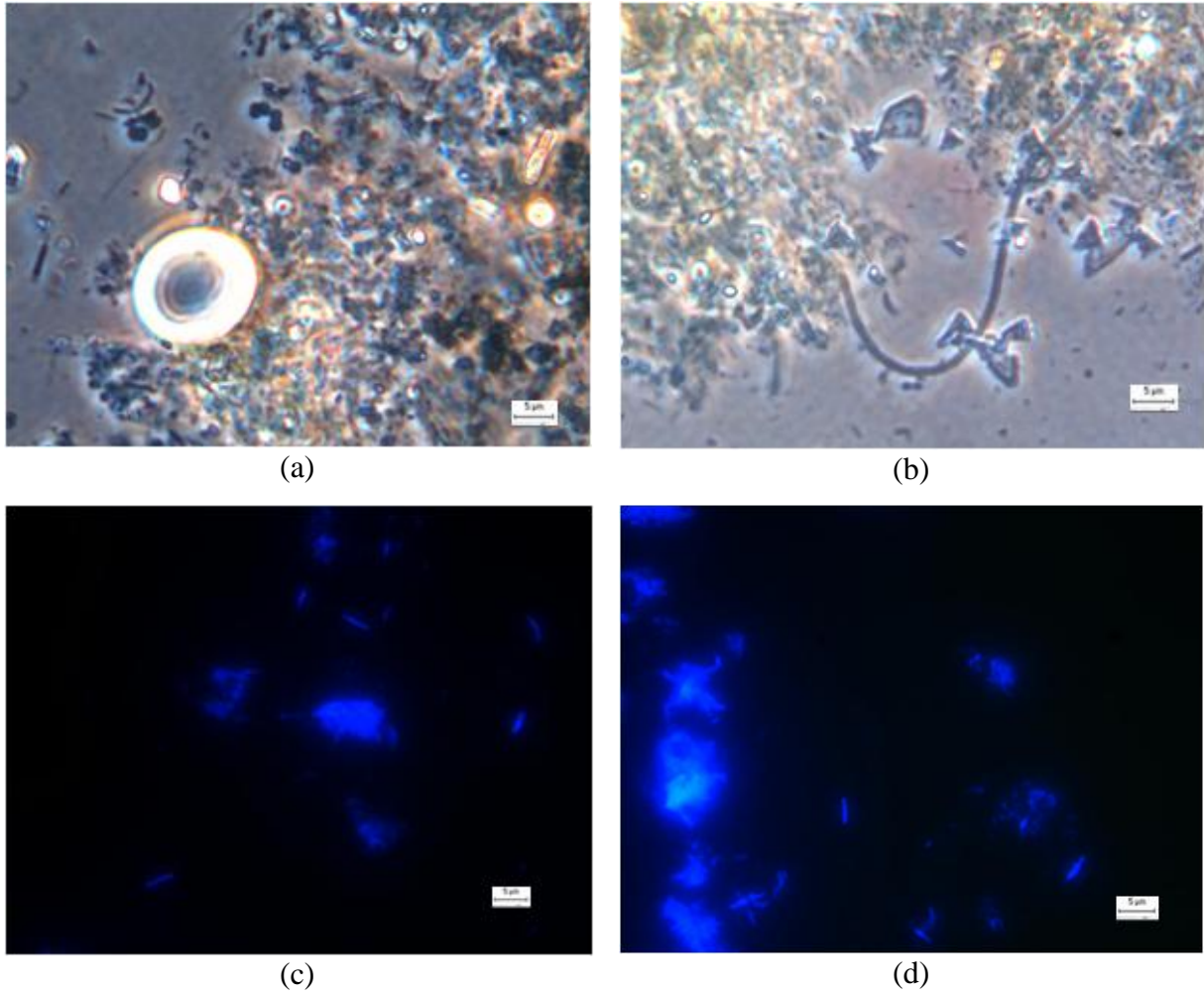


**Figura 5.40** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de potencial metanogênico: **Reator com Ácido fórmico (1,2 g/L), ascarel, etanol e acetato**



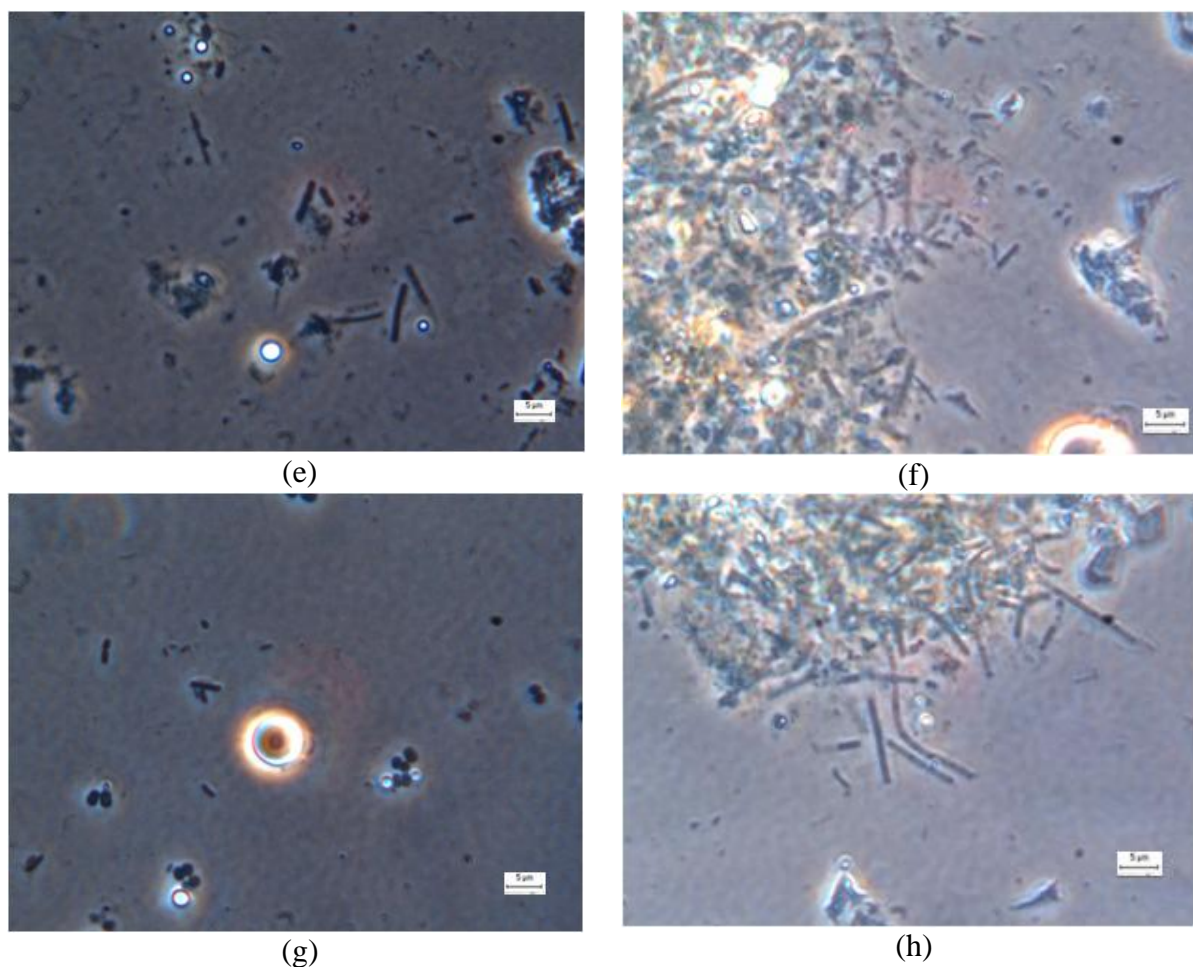
**Figura 5.41** Cromatograma das áreas em função do tempo de retenção do ensaio de Potencial Metanogênico: **Reator com Ácido fórmico (600 mg/L), ascarel, etanol e acetato**

As amostras desse ensaio foram analisadas em microscópio óptico de contraste de fase e fluorescência em duas etapas, após uma semana (Figura 5.42 e 5.43) da adição das fontes de carbono e do ascarel e no final do ensaio em batelada, (14 dias de operação) (Figura 5.44). Nas amostras foi observada a presença de morfologias semelhantes à *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, cocos, cocobacilos, bacilos fluorescentes e bacilos não fluorescentes.



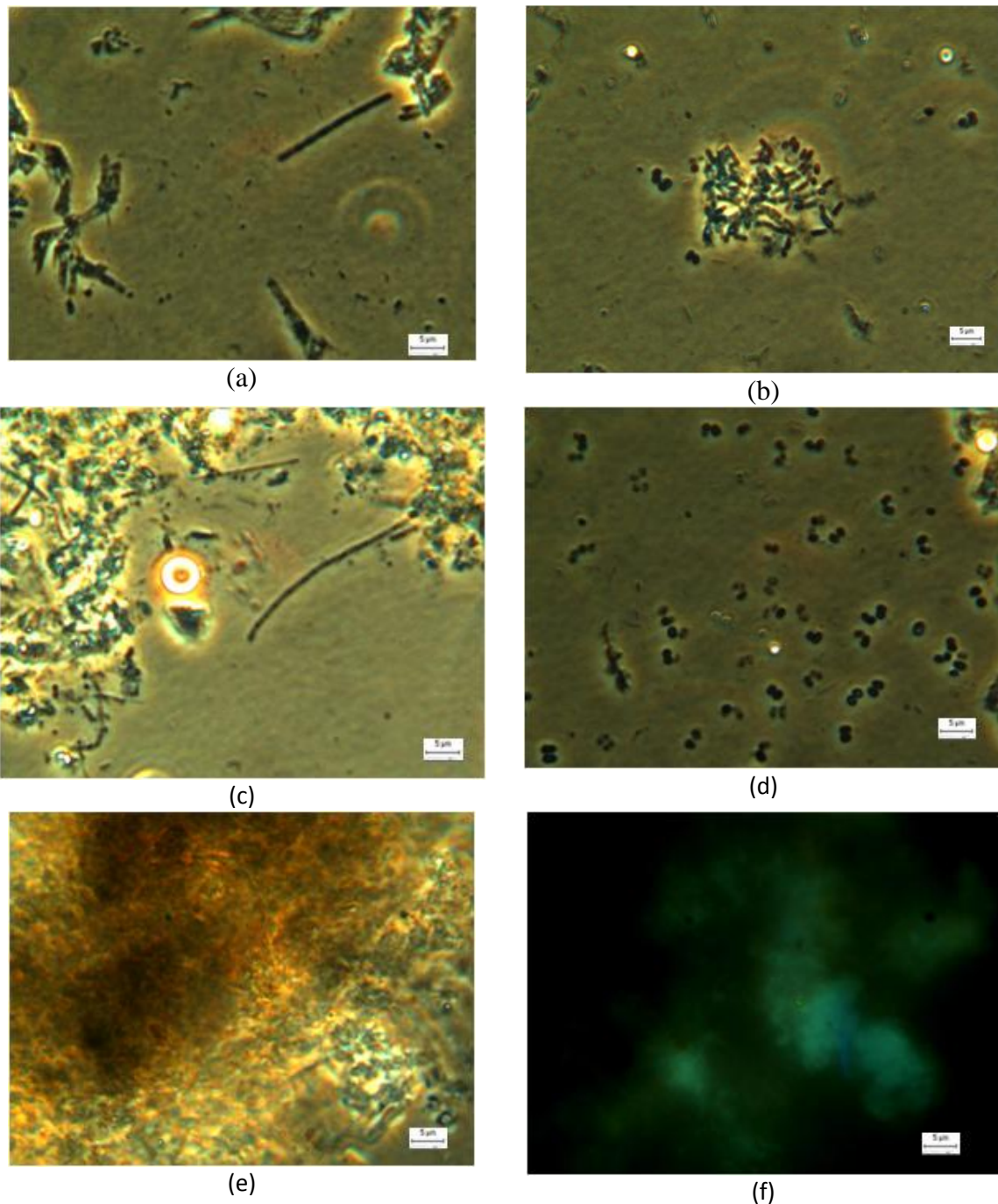
**Figura 5.42** Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X) após uma semana: (a) e (b) bacilos, cocos e *Methanosaeta* (em contraste de fase); (c) e (d), bacilos fluorescentes (em fluorescência).





**Figura 5.43** Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X) após uma semana (em contraste de fase): (f), (h) *Methanosaeta*; (e) e (h) bacilos e cocos.

Após uma semana, foram observados predomínio de bacilos fluorescentes, favorecidos, provavelmente, pela adição de formiato de sódio, como co-substrato metabólico (Figura 5.43). Bem como, foi possível observar diversidade de morfologias, tais como, cocos, bacilos, além da presença de *Methanosaeta*.



**Figura 5.44** Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X) em contraste de fase: (a), (b) e (c) cocos, bacilos e filamentos (d) cocobacilos; (e) *Methanosarcina* em contraste de fase; (f) *Methanosarcina* em fluorescência;

Ampla diversidade morfológica, tais como, bacilos, cocobacilos, diplococos e cistos característicos de *Methanosarcina* foram visualizados nos reatores em batelada ao final da operação. Atentando-se para as morfologias observadas na primeira semana, a presença de bacilos fluorescentes foi dominante, devido à presença de fontes que favoreceram seu aparecimento, enquanto que a presença das *Methanosarcina* foi predominante, nesta segunda

fase de análise, devido, provavelmente, a presença do acetato e H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Bergey's, 2001) (Tabela 5.9 e Tabela 5.10).

**Tabela 5.9** Frequência das morfologias observadas nos reatores em batelada após uma semana de operação

MORFOLOGIA	Reatores	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
<i>Methanosarcina</i> sp.		-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.		-	++	++	++	++	-	++	++	-
Bacilos fluorescentes		-	+++	+++	+++	++++	++	+++	+++	+++
Bacilos extremidades arredondadas		+	++	++	-	-	+++	++	++	++
Bacilos delgados		+	++	++	++	++		++	++	++
Bacilos gordos		-	-	-	-	-	++	-	-	-
Bacilos com grânulos		-	++	-	-	-	-	-	-	-
Bacilos esporulados		+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cocos (grandes)		-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
Cocos em cadeia		-	-	-	-	-	-	-	++	++
Filamentos		-	-	++	++	++	-	++	++	++

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

**Tabela 5.10** Frequência das morfologias observadas nos reatores em batelada após duas semanas de operação

MORFOLOGIA	Reatores	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
<i>Methanosarcina</i> sp.		-	++	-	++	++	-	+++	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.		-	+++	++	+++	-	-	+++	-	+++
Bacilos fluorescentes		-	+	++	++	+	-	++	++	++
Bacilos com extremidades afiladas		-	-	-	-	-	-	++	-	-
Bacilos extremidades arredondadas		-	+++	+++	+++	+++	-	-	++	++
Bacilos delgados		-	-	-	-	-	-	-	-	++
Bacilos esporulados		-	++	++	-	-	-	-	++	-
Cocos (grandes)		-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
Filamentos		-	+++	++	++	+++	-	++	++	++
Filamento septado		-	-	++	-	-	-	-	-	-

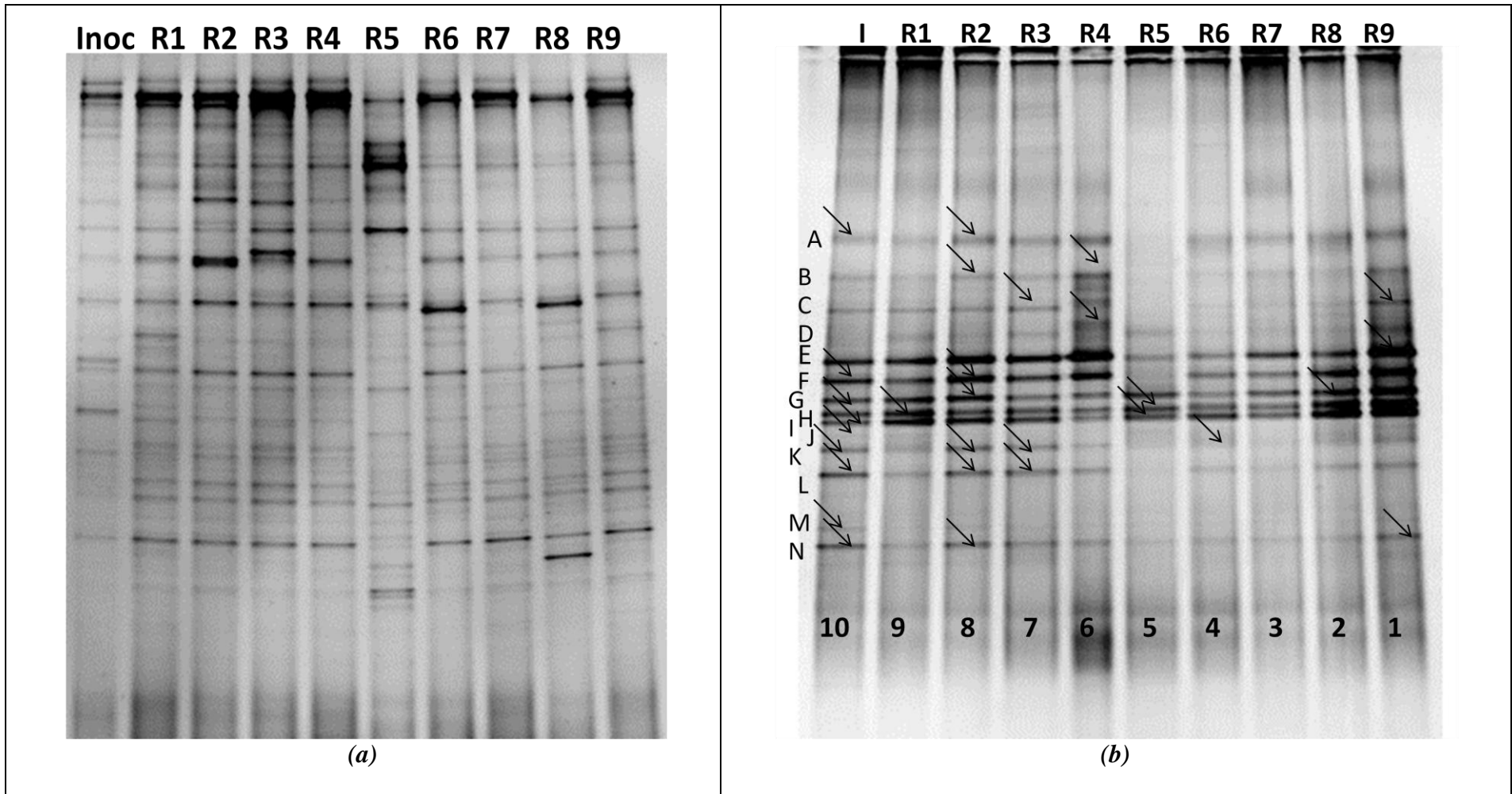
(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados

As culturas microbianas foram identificadas utilizando-se as metodologias moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR), DGGE e seqüenciamento de fragmentos do gene 16S RNAr. Foi realizado PCR das amostras dos reatores para o Domínio Bacteria e Domínio Archaea com *primers* específicos pra cada grupo. Cada reator apresentou padrão de bandas que foi comparado com o padrão de banda presente no inóculo. Observou-se que não houve grandes diferenças na maioria das comunidades de cada reator para o Domínio *Bacteria* (Fig. 5.45 a), porém considerando-se que cada banda represente uma

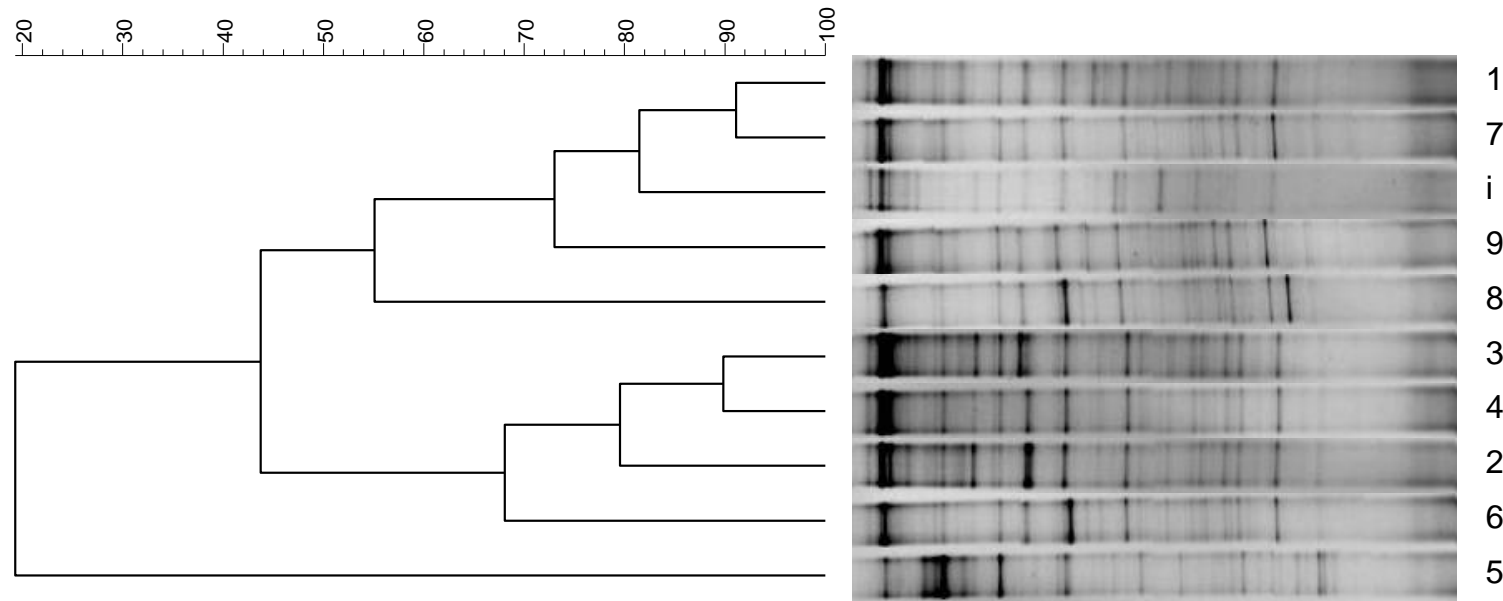
população, observou-se diferença de 80% nos padrões de banda entre o reator 5 (metanol 395 mg/L) e reator 8 (ácido fórmico 1,2 g/L). Com relação ao Domínio *Archaea*, observou-se alteração no padrão de bandas em relação ao inóculo (Figura 5.47 b), isto se deveu, provavelmente, ao fato que alguns solventes favoreceram o crescimento de algumas arqueias metanogênicas, enquanto aqueles solventes em alta concentração inibiram outras.

Em relação ao Domínio Bacteria (primers de Muyzer *et al.*, 1993) observou-se que houve diferença no padrão de bandas do DGGE (Figura 5.46). Aparentemente foram formados agrupamentos com relação aos solventes utilizados. O reator 5, que continha ascarel, metanol (395 mg/L), etanol e formiato, foi o grupo mais distante do inóculo, ou seja, similaridade de 20%. Os reatores 1 (controle) e 7 (Triton X-100 1%) tiveram 91% de similaridade, todavia, em relação ao inóculo, a similaridade foi de 80%. No entanto, apresentaram 80% de similaridade com o inóculo e reator 9 (ácido fórmico – 600 mg/L), etanol e acetato, com 72% de similaridade destes grupos anteriores e, ainda, o reator 8 (ácido fórmico – 1,2 g/L), acetato e etanol, com 55% de similaridade deste ultimo.

Os reatores 3 e 4 apresentaram aproximadamente 90% de similaridade para Domínio Bacteria. Na composição desses dois reatores foi adicionado o mesmo solvente (1,6 mg/L e 790 mg/L de metanol, respectivamente) e fontes de carbono (etanol e acetato). No entanto, apresentaram 78% de similaridade com o reator 2, que tinha somente ascarel, mais acetato e etanol, e apresentaram 70% de similaridade com o reator 6 (Triton X-100 10%), mais etanol e formiato.



**Figura 5.45** DGGE do biofilme dos reatores do ensaio de Potencial Metanogênico com diferentes solventes. (a) *D. Bacteria* com os primers 341 FGC e 518 R de Muyzer (1993) e (b) *D. Archaea*; as flechas indicam as bandas que foram recortadas para posterior seqüenciamento e identificação dos grupos

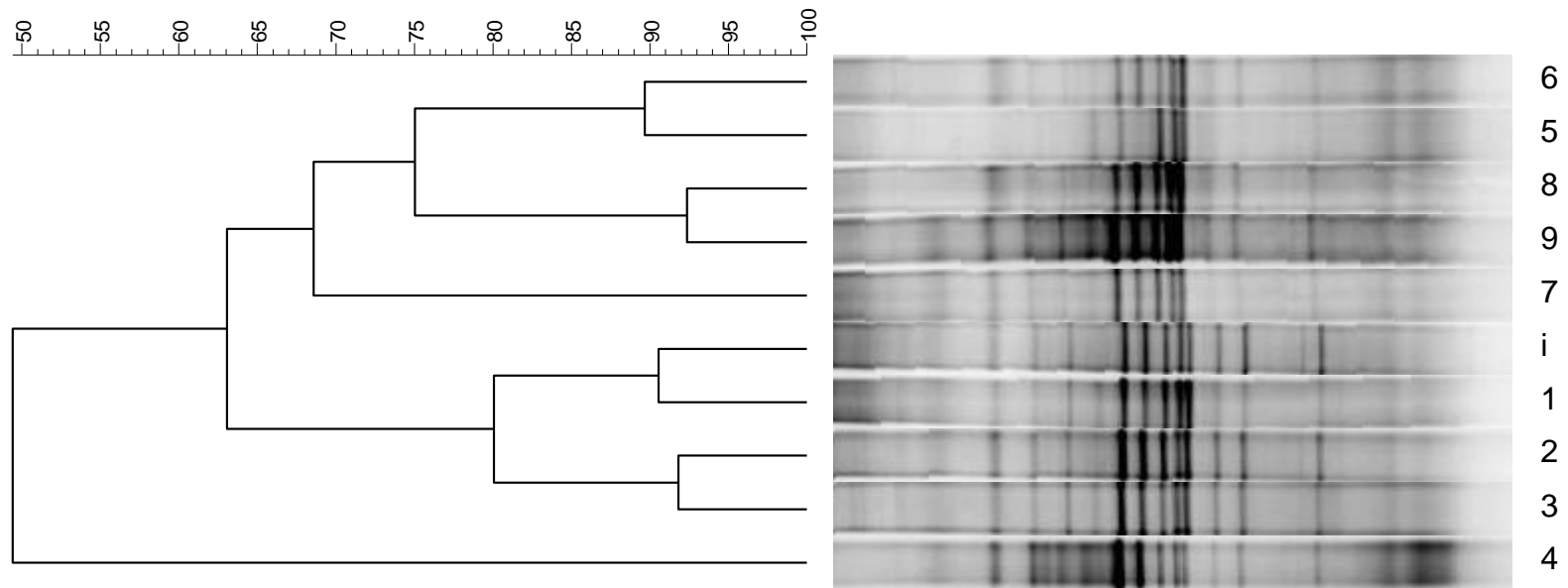


**Figura 5.46 Dendrograma do DGGE para Domínio Bacteria** (Muyzer, 1993) Reatores com espuma de poliuretano:- 1(controle), 2(controle com ascarel), 3(ascarel, metanol – 1,6 g/L), 4(ascarel, metanol - 790 mg/L), 5(ascarel, metanol – 395 mg/L), 6 (ascarel, Triton X-100 10% 1:1), 7(ascarel, Triton X-100 10% 1:10), 8(ascarel, ácido fórmico – 1,2 g/L), 9 (ascarel, ácido fórmico 600 mg/L).

Em relação ao Domínio *Archaea* (Figura 5.47) foi possível observar que não foi muito diferente do Domínio *Bacteria*, não ocorreu agrupamento evidente para o padrão de bandas de cada reator. Os reatores 6 (Triton X-100 10%) e reator 5 (metanol – 395 mg/L) apresentaram 90% de similaridade, sendo que a única semelhança entre esses dois grupos foi a adição de etanol e formiato. Provavelmente, tais substratos foram seletivos no crescimento e manutenção de determinadas populações. Esse grupo correlacionou em 75% de similaridade com aquele dos reatores 8 e 9, ambos, contendo ácido fórmico como solvente. As populações obtidas nos reatores 8 e 9 foram 92% similares, o que justifica esta contigüidade entre os dois grupos.

Os reatores 1 e inóculo foram similares em 90%, também é justificável pela proximidade dos grupos, pois no reator controle não foi adicionado nenhum outro composto, além do meio de cultura, o que o torna muito semelhante ao inóculo inicial. No entanto, estes grupos apresentaram 80% de similaridade ao reator 2 (controle com as fontes etanol e formiato) e reator 3 (metanol 1,6 g/L, etanol e formiato). Os reatores 2 e 3 foram 92% similares entre si. A diferença da composição dos reatores foi fundamental na diversidade microbiana, alterando a sua constituição, devido à diferença entre os tipos de solventes e suas concentrações. Possivelmente, essas alterações estejam relacionadas ao aumento da biodisponibilidade dos compostos na superfície de contato da espuma e à ação dos diferentes solventes. Tanto, neste como no primeiro ensaio, não houve alteração evidente na população de arqueias metanogênicas perante a presença do tóxico.

As bandas de DGGE para o Domínio *Archaea* foram recortadas e submetidas a PCR e sequenciamento para identificação molecular. Os microrganismos encontrados neste ensaio foram semelhantes ao do ensaio 1. As duas ordens encontradas de arqueias metanogênicas foram *Methanosarcinales* e *Methanomicrobiales*. Nem todas as bandas foram classificadas, entretanto observou-se que as bandas de **A, B, C, D, E, F, G e H** foram pertencentes a ordem das *Methanosarcinales* e gênero *Methanosaeta* sp., apresentando similaridade maior que 98%. As bandas **I, J, K, L e M** foram pertencentes a ordem *Methanomicrobiales*, gêneros *Methanolinea* e *Methanoregula* com similaridade acima de 97%. A árvore filogenética construída com base na análise comparativa das sequências do RNAr 16S das bandas do PCR/DGGE foram agrupadas com similaridade acima de 97% (Figura 5. 48 e Tabela 5.11).



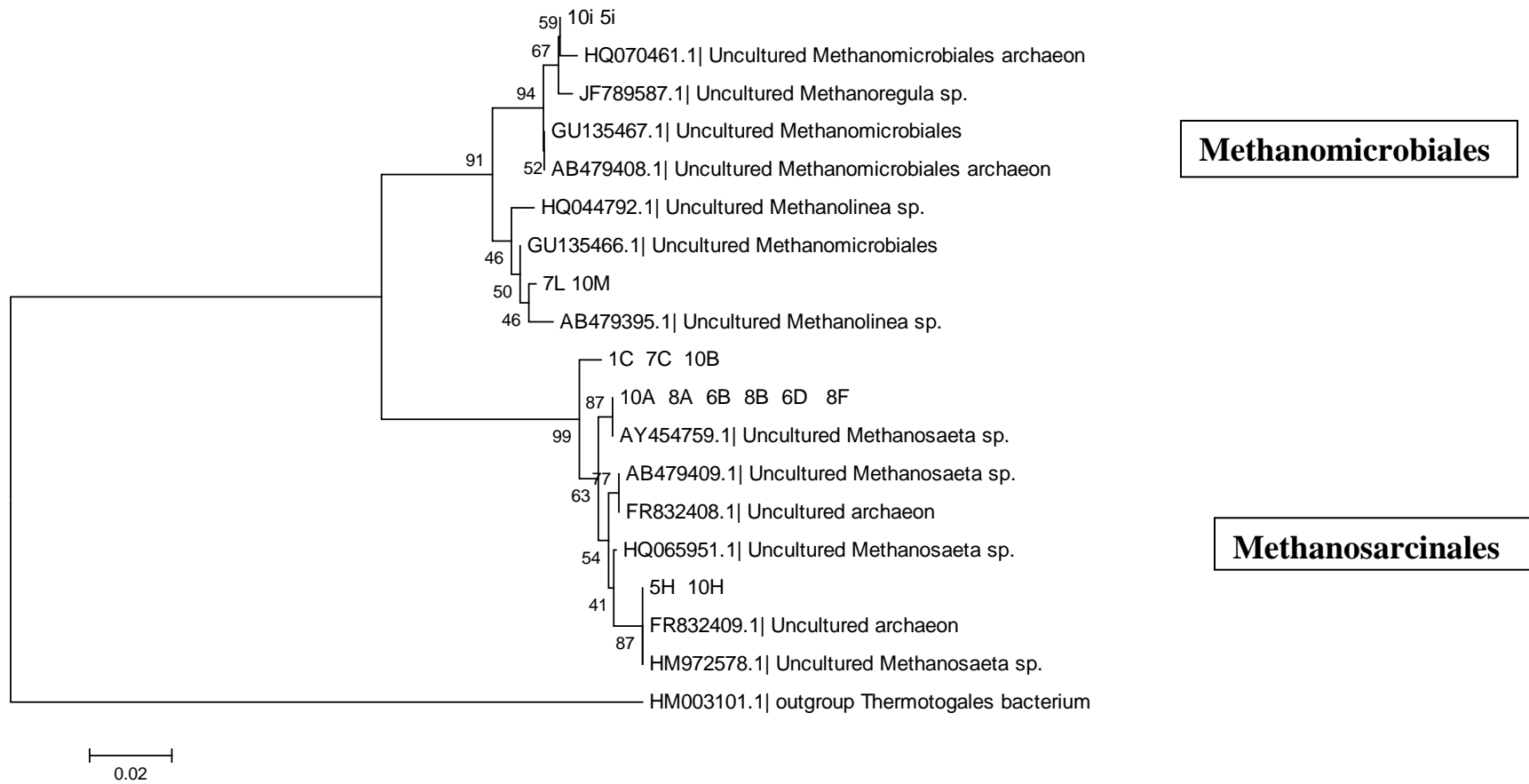
**Figura 5.47 Dendograma do DGGE para Domínio Archaea (Nielsen et al., 1999) – utilizou-se o índice de similaridade de Pearson no programa Bionumerics. Reatores com espuma de poliuretano:- 1(controle), 2(controle com ascarel), 3(ascarel, metanol – 1,6 g/L), 4(ascarel, metanol - 790 mg/L), 5(ascarel, metanol – 395 mg/L), 6 (ascarel, Triton X-100 10% 1:1), 6(ascarel, Triton X-100 10% 1:10), 7(ascarel, ácido fórmico – 1,2 g/L), 9 (ascarel, ácido fórmico 600 mg/L).**



O gênero *Methanosaeta* foi predominante nas bandas iniciais (A a H) e está relacionado com a metanogênese acetoclástica. O referido gênero utiliza acetato para o seu metabolismo, produzindo metano e CO<sub>2</sub>, provavelmente, a partir da degradação do etanol, por algumas bactérias anaeróbias, favorecendo a manutenção dessas arqueias. Ramos-Padrón et al. (2011) encontraram estas arqueias metanogênicas no estudo da comunidade microbiana de poços arenosos usados no tratamento de resíduos de extração de betume. Estas arqueias também foram encontradas em lodo granulado mesófilo de reator UASB usado no tratamento de resíduo de indústria de produção de cerveja (Yashiro et al. 2011)..

Os representantes da ordem Methanomicrobiales são responsáveis pela rota hidrogenotrófica da metanogênese. Dentro deste grupo, foram observados dois gêneros diferentes *Methanoregula* sp. e *Methanolinea* sp.. O primeiro gênero citado foi encontrado por Hubert et al. (2011) em reservatórios arenosos de petróleo, bem como em reator UASB (Yashiro et al., 2011). São descritos como bacilos (1,0-2,6 X 0,5 μm) de extremidades retas, mesófilos (30-33 °C) e pH ótimo entre 7,0-7,6 e utilizam formiato e hidrogênio para o seu crescimento (Bergeys, 2001).

O gênero *Methanolinea*, também foi encontrado em grânulos de UASB usado no tratamento de resíduo de cervejaria (Yashiro et al., 2011). Referem-se a arqueias metanogênicas hidrogenotróficas na forma de bacilos multicelulares filamentosos sem mobilidade. Este mesmo gênero foi isolado de poços de areia tratando resíduos de extração de betume (Ramos-Padrón et al. 2011)..



**Figura 5.48** Árvore Filogenética dos reatores do Ensaio de Potencial Metanogênico em diferentes solventes dos membros do Domínio Archaea baseado na análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA - calculado de acordo com o método Neighbor-joining (Bootstrap = 500 reamostragens). Grupo externo utilizado foi o Thermotogales bacterium

**Tabela 5.11** Relação das seqüências das bandas recortadas obtidas no Genbank nos reatores 1-9 (diferentes solventes)

<b>Banda</b>	<b>Acesso - BLAST</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Similaridade</b>	<b>Referencia</b>
10A,8A,6B,8B, 6D,8F	AB479409	<i>Methanosaeta</i> sp.*	99%	Yashiro et al., 2011
	AY454759	<i>Methanosaeta</i> sp.*	99%	Piza et al., 2003 não publ.
10B,1C,7C	FR832408	<i>Archaeon</i> *	98%	Chaganti,S., 2010 não publ.
	HQ065951	<i>Methanosaeta</i> sp.*		Ramos-Padron et al., 2010
5H, 10H	FR832409	<i>Archaeon</i> *	98%	Riviere et al., 2008
	HM972578	<i>Methanosaeta</i> sp.*		
7I, 10M	GU135466	Methanomicrobiales*	97%	Chaganti,S., 2010
	AB479395	<i>Methanolinea</i> sp.*		Yashiro et al. 2010
	HQ044792	<i>Methanolinea</i> sp.*		Ramos-Padron et al., 2010
10L, 5L	JF789587	<i>Methanoregula</i> sp.*	99%	Hubert et al. 2011
	HQ070461	Methanomicrobiales archaeon*		Ramos-Padron et al., 2010
10J	GU135467	Methanomicrobiales*	98%	Borrel, G. 2009
	AB479408	Methanomicrobiales archaeon*		Yashiro et al. 2010

\* (Não cultivado)

## **5.5. Operação e monitoramento do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo**

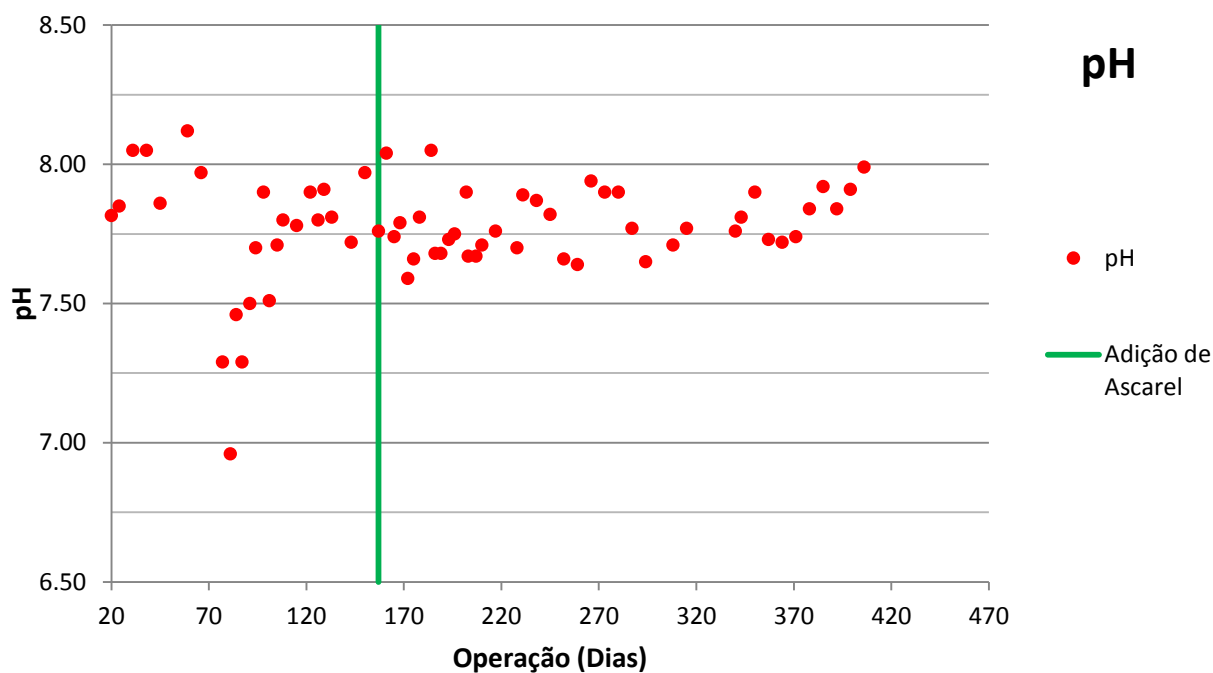
Após longo período de adaptação (157 dias) do reator alimentado somente com meio de cultura Angelidaki, solução tampão de bicarbonato de sódio 10% e fontes de carbono, etanol e formiato, além de metanol como solvente coadjuvante, foi introduzido o ascarel diluído previamente em Triton X-100 (1%). O metanol foi retirado após a observação de alteração de alguns dos parâmetros físico-químicos no RAHLF, durante o período de adaptação, como aumento da alcalinidade a ácidos voláteis e DQO, além da diminuição da alcalinidade a bicarbonato.

Após a introdução do ascarel solubilizado em Triton X-100 (10%), amostras foram coletadas diariamente nas primeiras três semanas e depois, duas vezes por semana, para a realização das análises físico-químicas, incluindo ácidos e PCB total. A quantidade de ascarel deveria ser aumentada paulatinamente, a cada dez dias, para que o reator pudesse se adaptar a adição de PCB. No entanto, observou-se que parte do óleo ficava aderida à parede do reator, então a quantidade de ascarel não foi aumentada para evitar a obstrução da passagem da solução de nutrientes ao longo do reator, ou mesmo para se evitar caminhos preferenciais.

Os valores de sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF) do inóculo foram de 39 g/L, 32 g/L e 7 g/L, respectivamente.

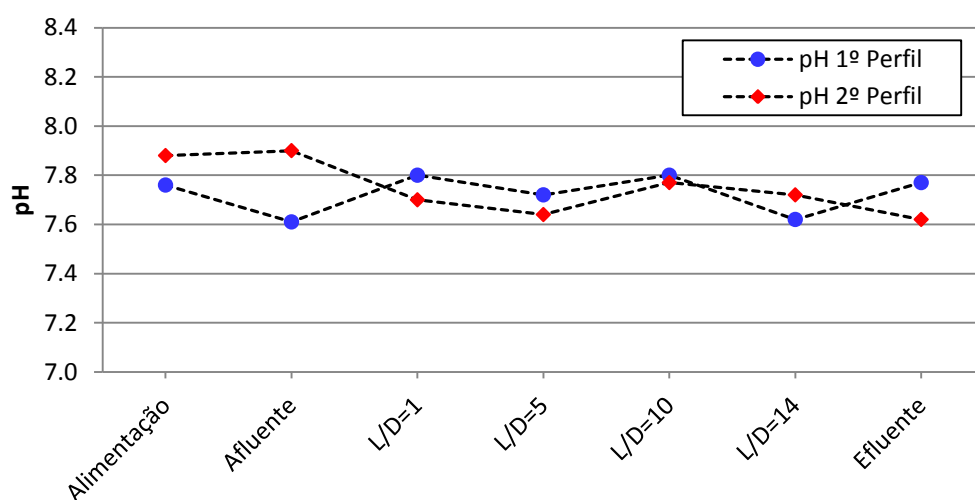
Na alimentação do reator, foi utilizado ascarel diluído em Triton X-100 (1%) em 4 L de meio Angelidaki contendo as soluções estoque e fontes de carbono, Formiato (10 mM) e etanol (10 mM). O ascarel utilizado neste trabalho estava abaixo da concentração permitida, ou seja, abaixo de 50 ppm (partes por milhão).

Os valores de pH para afluente e efluente foram entre 7,0 e 8,0, mesmo após a adição de ascarel (Figura 5.49). Houve diminuição dos valores de pH, menores que 7,0, após o período de 70 dias, momento em que foi decidido retirar o metanol do meio de alimentação, pois a sua metabolização pelos microrganismos, aumentava a oferta de hidrogênio no meio contribuindo para a acidificação do reator.



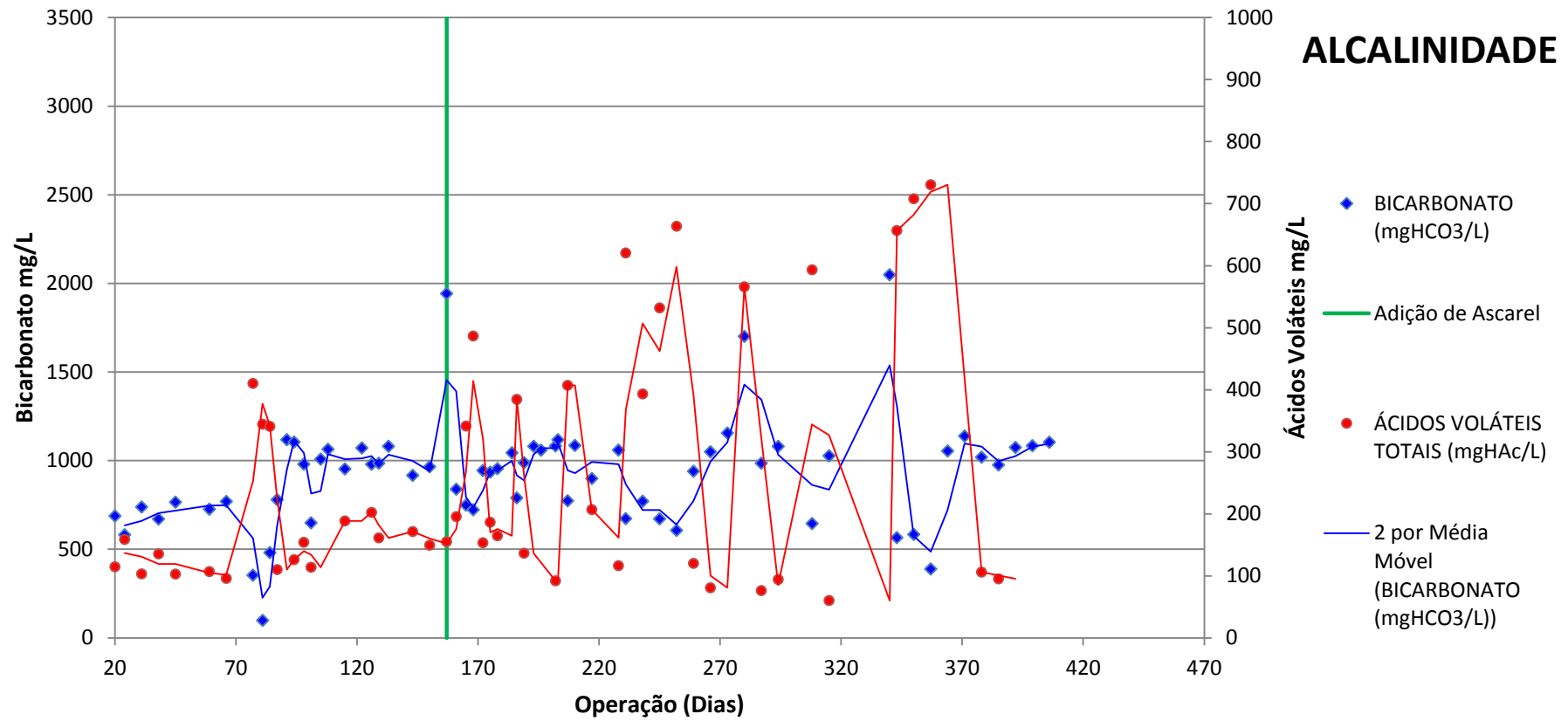
**Figura 5.49** Variação temporal de pH no RAHLF. A linha verde representa o início da adição de ascarel

Não houve alterações evidentes nos valores de pH nos perfis, ao longo do reator (Figura 5.50). Notou-se que os valores de pH mantiveram-se entre 7,5 e 8,0, ou seja, estabilidade no processo de degradação foi observada ao longo do reator. O primeiro e segundo perfis foram realizados após 224 (67 dias após a introdução do ascarel) e 312 (155 dias após ascarel) dias de operação do RAHLF.



**Figura 5.50** Variação espacial de pH do RAHLF

Em relação a alcalinidade, não houve muita variação após o acréscimo de ascarel (Figura 5.51). Nesta fase, os valores de alcalinidade a bicarbonato passaram de 955 mgHCO<sub>3</sub>/L para 1.942 mgHCO<sub>3</sub>/L, após uma semana, porém, na segunda quinzena os valores voltaram as médias anteriores, ou seja, 723 mgHCO<sub>3</sub>/L. A alcalinidade a ácidos voláteis totais aumentou de 149 mgHAc/L para 487 mgHAc/L e, somente, após 30 dias de operação com ascarel, esse valor foi de 153 mgHAc/L. Apesar da alteração constante de alcalinidade a ácidos voláteis ao longo do período de operação do reator após a adição do ascarel, o sistema manteve-se estável quanto aos outros parâmetros físico-químicos. Gusmão (2005) avaliou a remoção de BTEX em RAHLF. Segundo a autora, eram observadas alterações constantes nos valores de alcalinidade a ácidos voláteis de aproximadamente 300 mgHCO<sub>3</sub>/L a 700 mgHCO<sub>3</sub>/L.



**Figura 5.51** Variação temporal da alcalinidade no RAHLF  
 A linha verde representa o início da adição de ascarel

As linhas nos gráficos de DQO representam os momentos diferenciados nas fases da operação do RAHLF (Figura 5.52), como a suspensão do metanol do meio de alimentação (70 dias), quando foi adicionado ascarel (~170 dias) ao reator, além dos dois perfis realizados e aos duzentos dias, quando ocorreu uma trinca no reator. Nesse momento foi necessária a troca do reator, mantendo a biomassa na posição que se encontrava no reator quebrado, para manter ao máximo a condição que estava sendo aplicada ao RAHLF anteriormente a sua quebra.

Os valores médios de DQO afluente (meio angelidaki, etanol e formiato) foram de 1.270 mg/L. Porém, após a adição de ascarel, os valores médios aumentaram para 1.940 mg/L. Os valores de DQO efluente, no período de adaptação do lodo no reator, foram de 260 mg/L e 45 mg/L, respectivamente, na etapa inicial e após estabilização, antes da adição do ascarel. Após, acréscimo do tóxico no reator estes valores aumentaram para 128 mg/L e, depois de 30 dias, obteve-se 78 mg/L de DQO efluente (Figura 5.53).

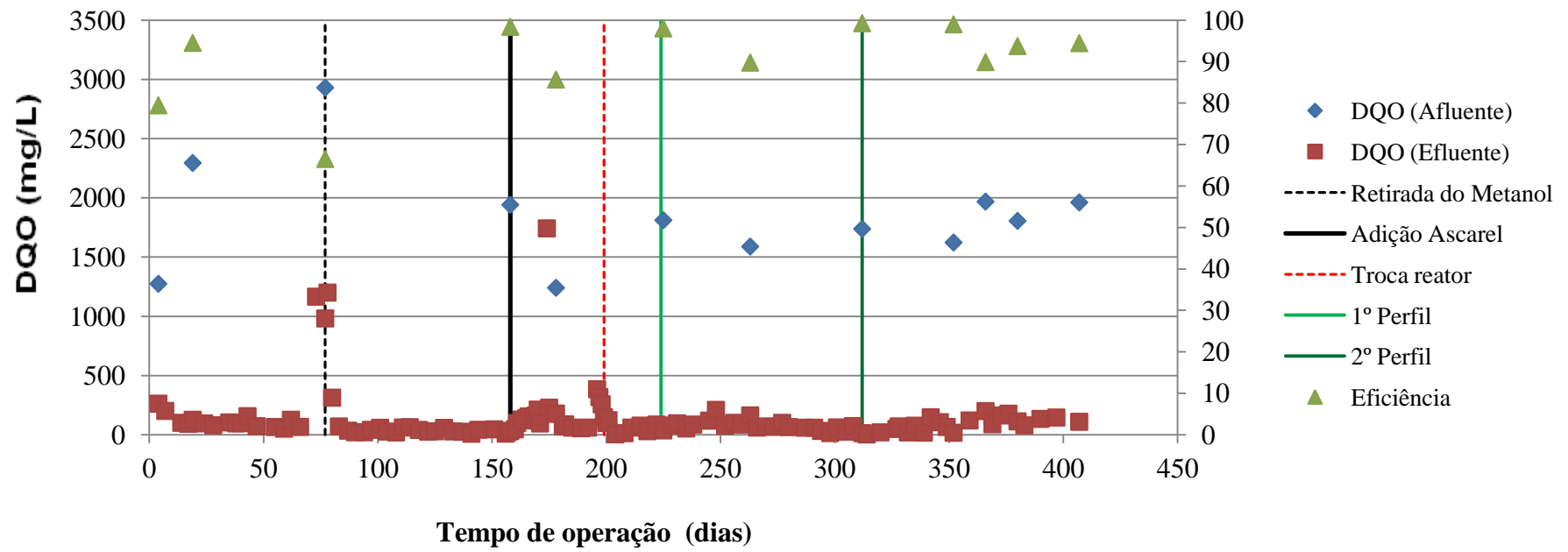
Alta eficiência de remoção de matéria orgânica foi verificada, mesmo após o acréscimo de ascarel, ou seja, obteve-se eficiência acima de 90% (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 Valor médio de eficiência da remoção de matéria orgânica no RAHLF

<b>Fases de operação</b>	<b>Início com metanol</b>	<b>Antes de ascarel</b>	<b>Após ascarel</b>	<b>Total</b>
<b>Eficiência média (%)</b>	80,1	84,9	94,2	90,7

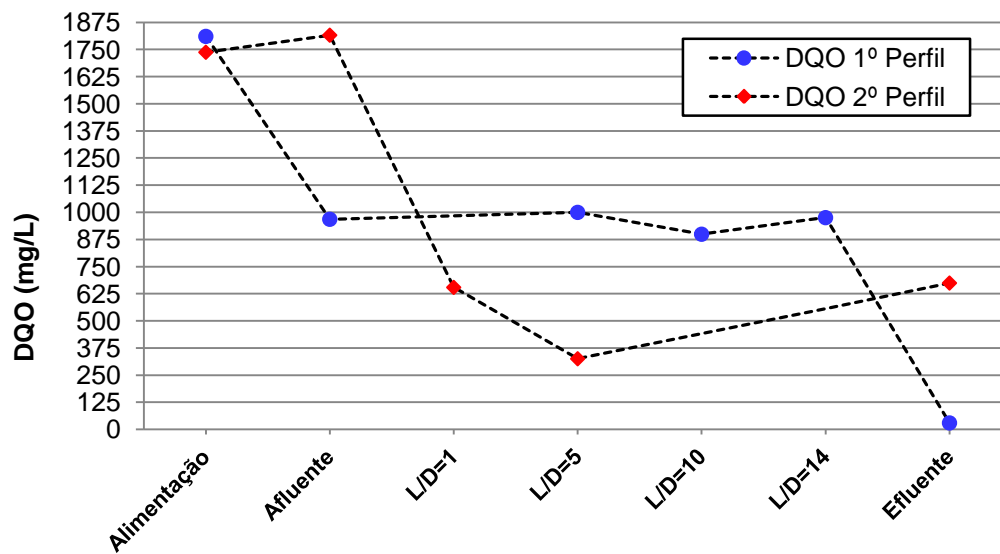
Observou-se que a eficiência de remoção foi maior depois que o ascarel foi adicionado, contrapondo a fase inicial com metanol, que levou a acidificação do sistema. Portanto, o ascarel não prejudicou consideravelmente o sistema em relação a remoção de matéria orgânica.





**Figura 5.52** Variação temporal da demanda Química de Oxigênio no RAHLF

Em relação à variação espacial de remoção de matéria orgânica, foi observada alteração significativa (Figura 5.53). No entanto, no segundo perfil, os valores encontrados foram menores (325 mg/L), ou seja, devido a maior estabilização do sistema nesta fase de operação do RAHLF (Tabela 5.13). Durante a retirada de amostra nos perfis ocorria a liberação de óleo, o que prejudicou os resultados nas análises, bem como, de tempos em tempos, ocorria a liberação de uma quantidade considerável de óleo no efluente, caracterizando uma alta dos valores de DQO.



**Figura 5.53** Variação espacial da DQO no RAHLF

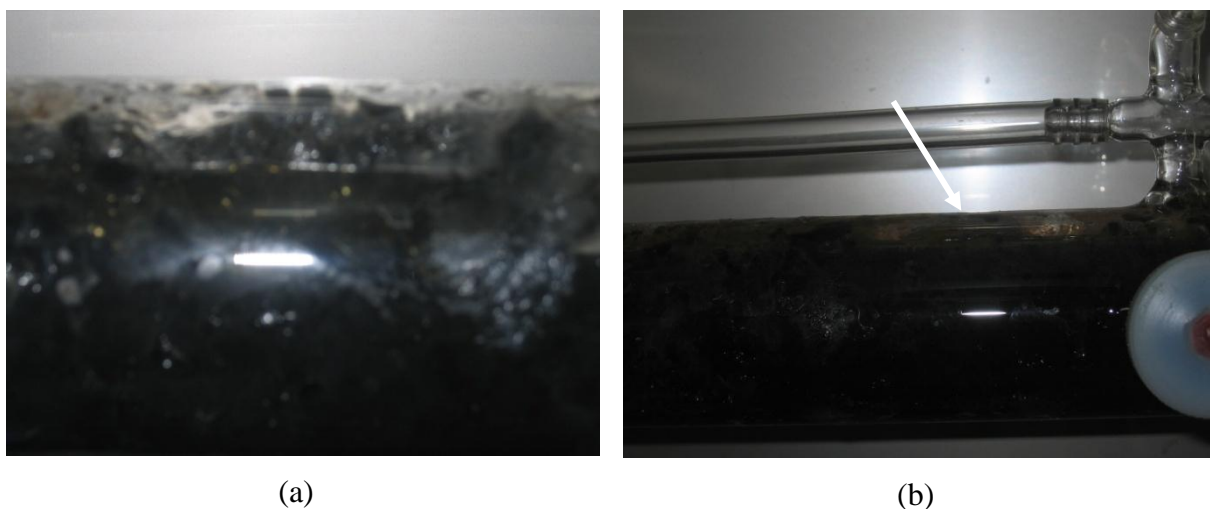
Como o ascarel foi adicionado ao RAHLF em concentrações muito baixas, no fator de diluição de 1:1000, não foi possível analisar a concentração final de PCBs tanto no afluente como no efluente. Pois, os picos dos cromatogramas eram muito baixos, semelhantes a ruídos e não a efetivos picos de PCBs. Portanto, este dado não pode ser analisado e os cromatogramas brutos das extrações realizadas nas amostras do RAHLF encontram-se no Anexo.

## 5.5.4 Análise da comunidade microbiana

É importante delinear a evolução da comunidade microbiana no reator, pois ocorreu visível alteração no seu aspecto durante os diferentes períodos de operação, resultante desta transformação. A seguir, será apresentado o desenvolvimento da comunidade microbiana através de fotos do RAHLF em diferentes fases (antes da adição do ascarel e nos perfis), microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

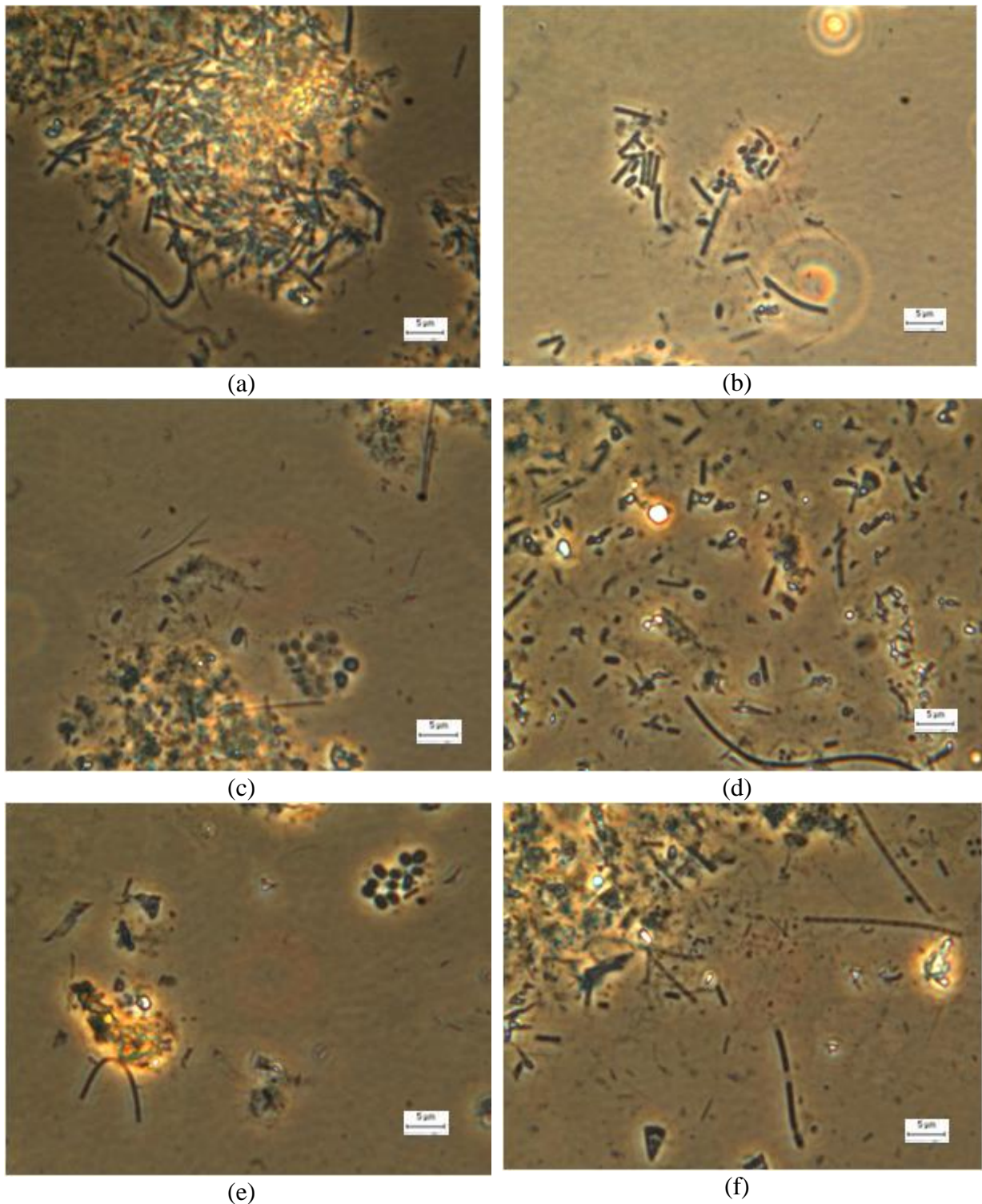
### 5.5.4.1 Fase de adaptação do RAHLF e após adição de ascarel

Observou-se que, no início de operação do reator, tanto na fase de adaptação, como na fase inicial da adição do ascarel, a biomassa aderida à espuma de poliuretano apresentou coloração escura, além da presença de bolhas de gás nos interstícios do RAHLF, fase em que o reator se encontrava em plena atividade (Figura 5.54).



**Figura 5.54** Reator com coloração escura. (a) fase inicial de operação com ascarel; (b) início do acúmulo de ascarel na parede superior do RAHLF.

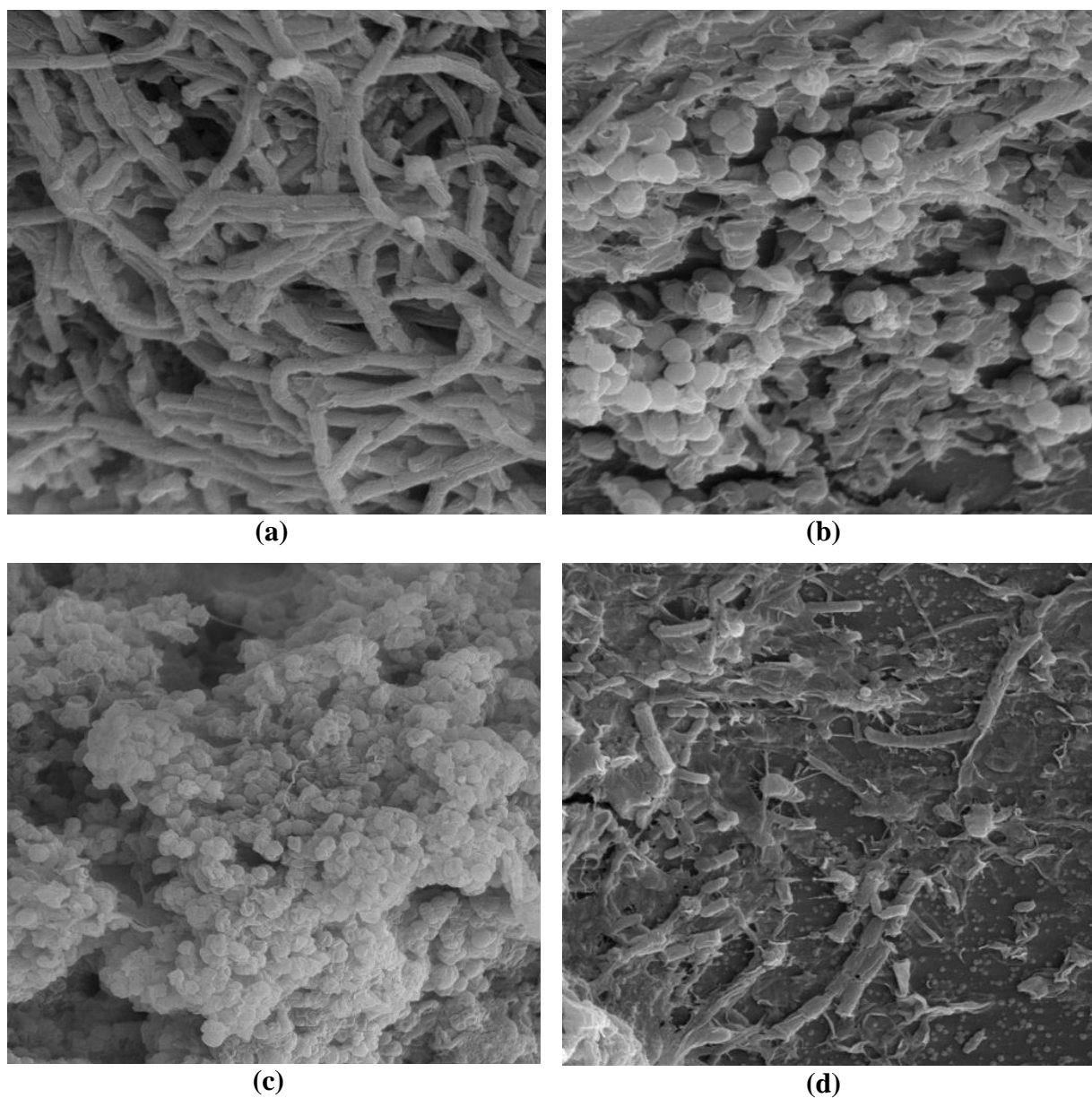
As morfologias que foram observadas em microscopia óptica nesta fase foram variadas, ou seja, bacilos, cocos, cocobacilo e muito filamentos semelhantes a *Methanosaetas* sp, principalmente na posição L/D 5 do reator (Figura 5.55).



**Figura 5.55** Morfologias observadas em microscópio óptico (2000X). (a) e (f) semelhantes a *Methanosaetas* sp.; (b) e (e) bacilos e coco bacilos; (c) morfologia semelhante a formação inicial de sarcinas; (d) bacilos e filamentos.

Nas amostras do RAHLF analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), no IFSC-USP, antes da adição de ascarel ao RAHLF, (nos pontos L/D 1, L/D 10 e L/D 14)

foram constatadas morfologias semelhantes a *Methanosarcina*, *Methanosaeta*, além de alguns cocos e diversos bacilos na formação inicial de biofilme microbiano na espuma de poliuretano (Figura 5.56).



**Figura 5.56** Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF antes do acréscimo de ascarel, morfologias semelhantes a (a) *Methanosaeta*, (b) e (c) *Methanosarcina*, (d) cocos e bacilos diversos, início da formação do biofilme na superfície da espuma de poliuretano(5000X).

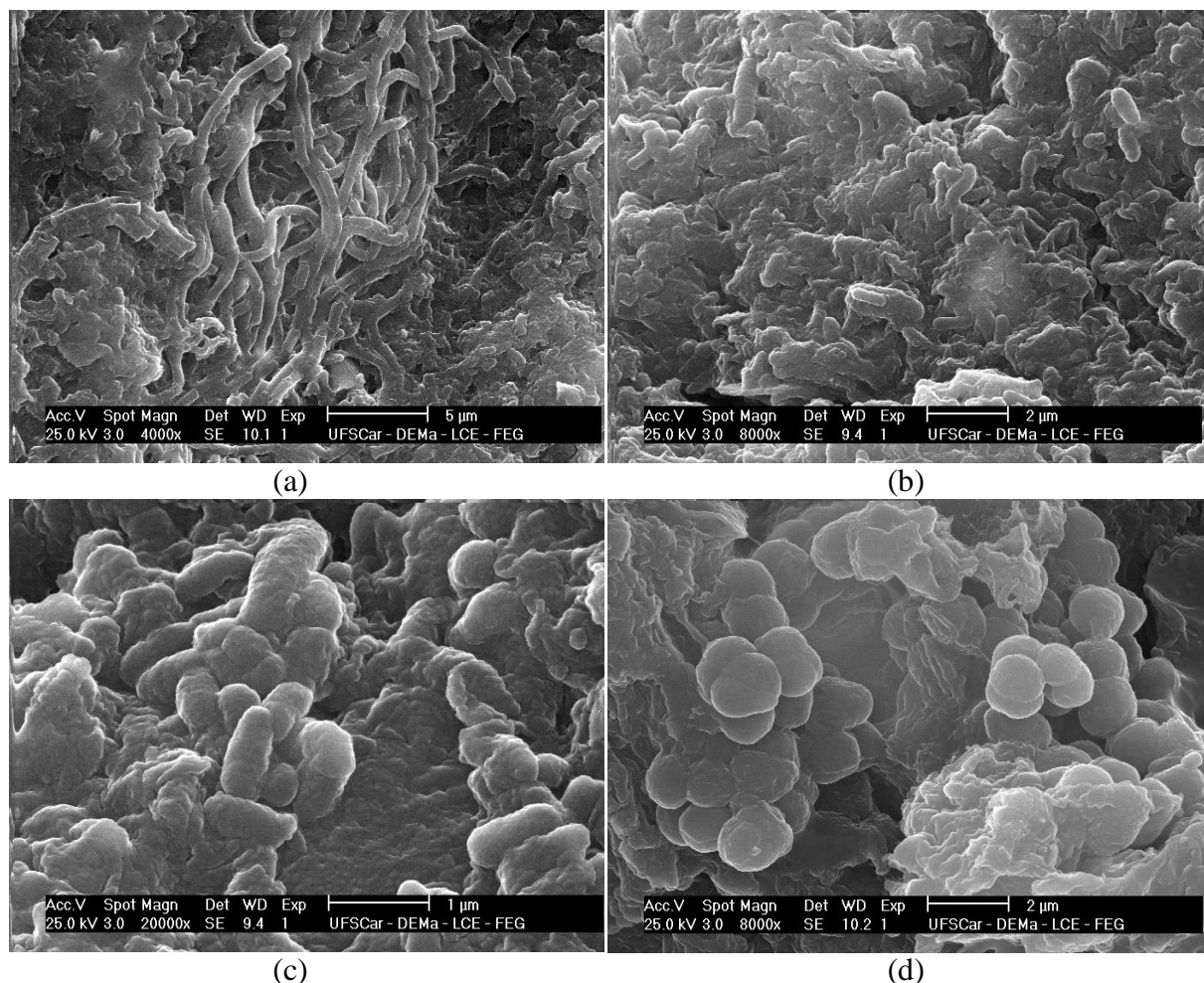
Foram realizados dois perfis espaciais no RAHLF, após a adição do ascarel, com intervalo de aproximadamente dois meses cada um. Após 200 dias de operação (40 dias após a adição do ascarel) observou-se o aparecimento de coloração amarelada ao redor do óleo que

ficou aderido à parede do reator (Figura 5.57). A porção inicial do reator adquiriu coloração esbranquiçada, devido à quantidade de polímero formado.



**Figura 5.57** Formação de biofilme ao longo do RAHLF. (a) início da adesão do óleo a parede do reator; (b) e (c) biofilme amarelado formado na porção L/D 14 e L/D 19 do reator, respectivamente; (d) e (e) polímero de coloração esbranquiçada; (f) biofilme colorido na parte central (L/D 10) do reator.

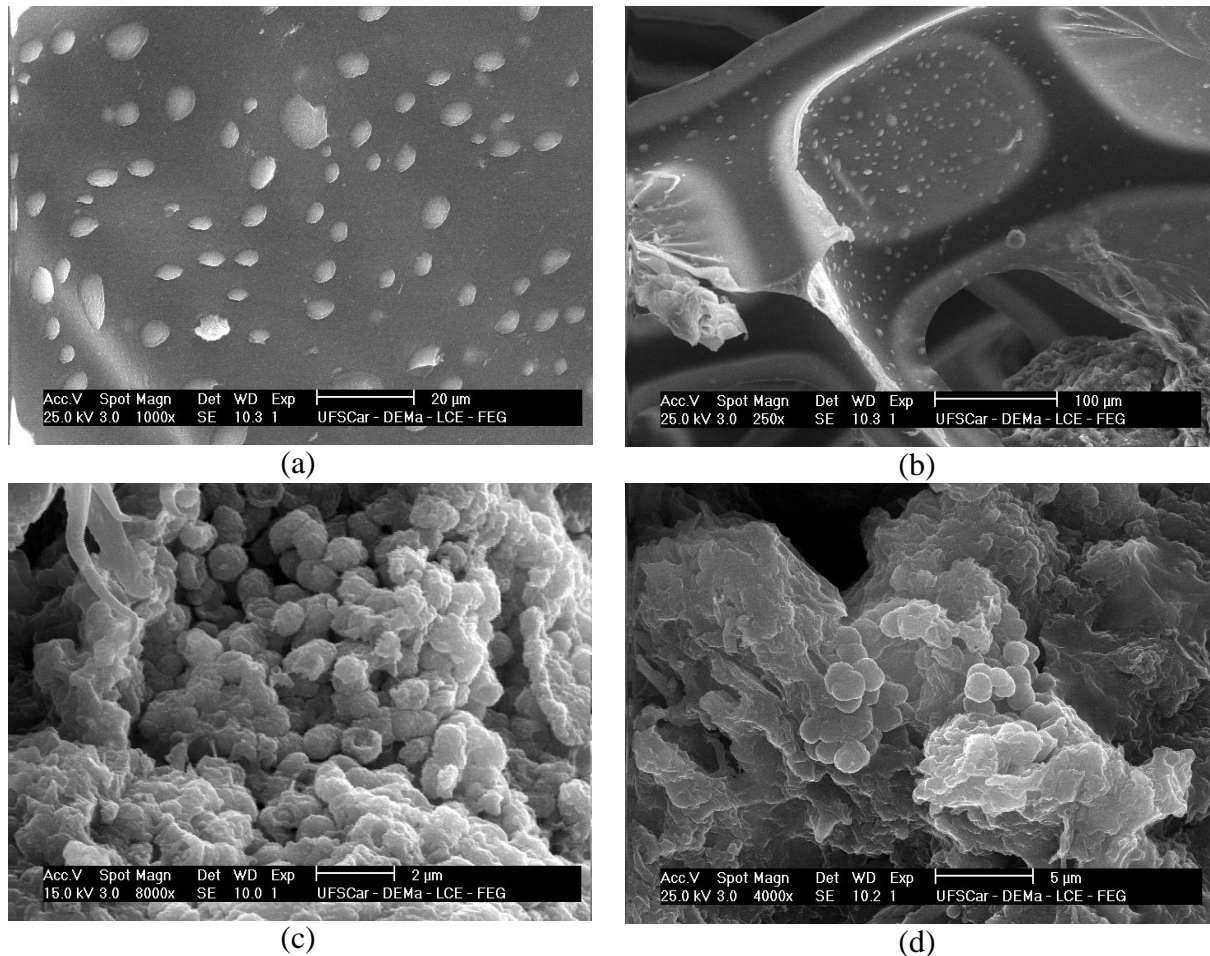
Após a adição de ascarel ao RAHLF as amostras foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). No primeiro perfil espacial (nos pontos de amostragens L/D 1, L/D 5, L/D 10, L/D 14 e L/D 19) foram observadas morfologias semelhantes a *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Figura 5.58).



**Figura 5.58** Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após o acréscimo de ascarel, no primeiro perfil: morfologias semelhantes a (a) *Methanosaeta*, (L/D 1); (b) e (c) bacilos e presença de polímero extracelular, (L/D 1 e L/D5); (d) *Methanosarcina*, (L/D 10).

A presença de polímero extracelular no RAHLF foi observada em toda a sua extensão, o que ocorreu devido, provavelmente, ao estresse ambiental imposto aos microrganismos, como por exemplo, a adição de substância tóxica (Sheng et al., 2010).

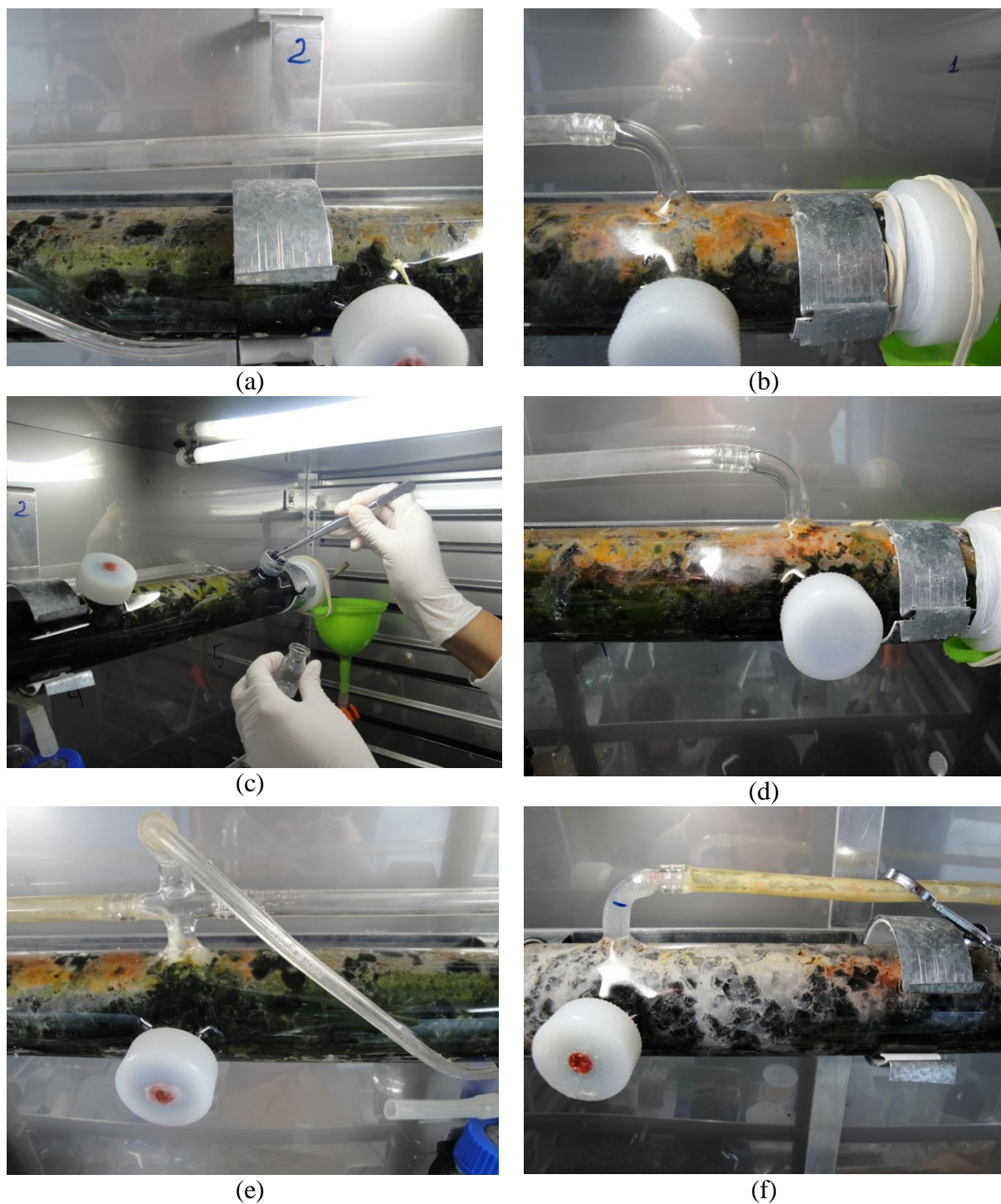
Na última saída do reator (L/D 19), observou-se a presença de óleo aderido à superfície da espuma e cocos semelhantes a *Methanosarcina* (Figura 5.59).



**Figura 5.59** Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após acréscimo de ascarel: (a) e (b) gotículas de óleo aderidas a espuma de poliuretano na saída do reator (L/D 19); (c) e (d) *Methanosarcina* e exopolímero L/D 19.

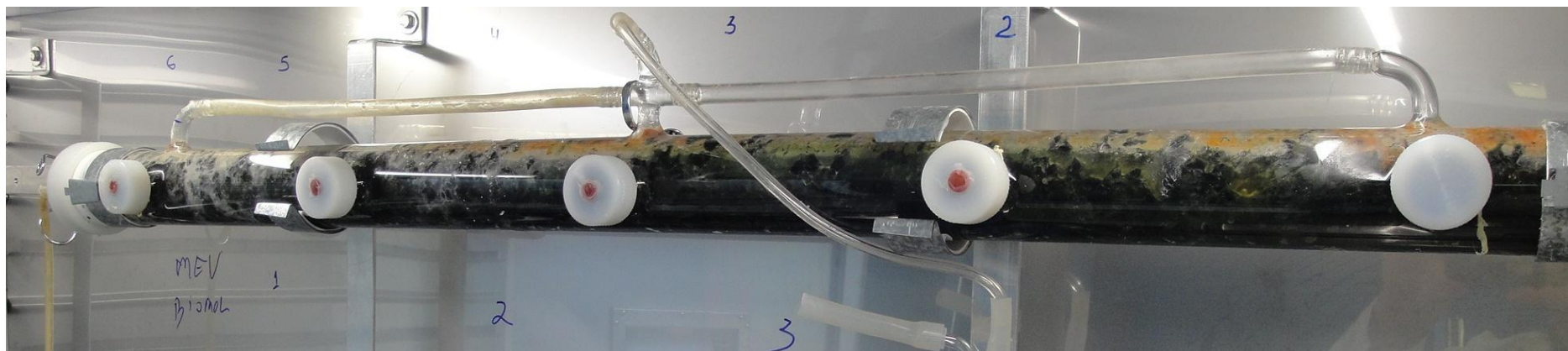
O biofilme formado na parede superior do reator foi escurecendo e ganhou aspecto alaranjado e com o tempo biofilme esverdeado foi se espalhando ao seu redor. Os biofilmes de coloração laranja escuro e biofilme verde predominaram da parte mediana (L/D 10) até o final do reator (L/D 19). No entanto, polímero esbranquiçado manteve-se na parte inicial do reator (L/D 1) com invasão inicial do biofilme alaranjado e do esverdeado (Figura 5.60) no final de operação do reator.





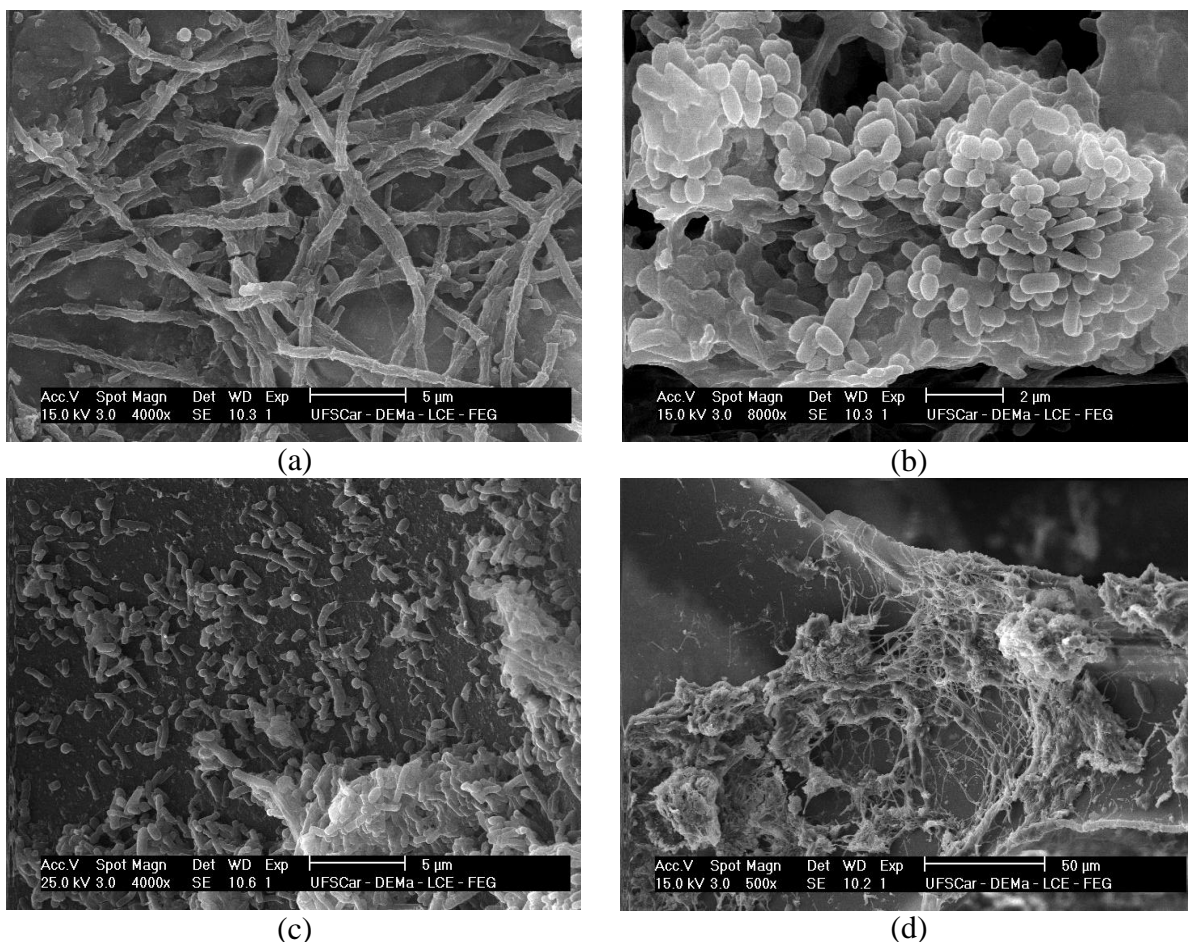
**Figura 5.60** Formação de biofilme ao longo do RAHLF: (a) e (e) biofilme verde e laranja na região mediana do reator (L/D 10); (b) e (d) biofilmes alaranjado e verde na porção final do reator (L/D 19); (c) coleta de material para microscopia e análise de Biologia Molecular; (f) polímero de coloração esbranquiçada no início do reator (L/D 1).

Na fase final de operação do RAHLF, após oito meses (240 dias após a adição do ascarel) observou-se coloração variando do preto, verde escuro ao alaranjado (Figura 5.61).

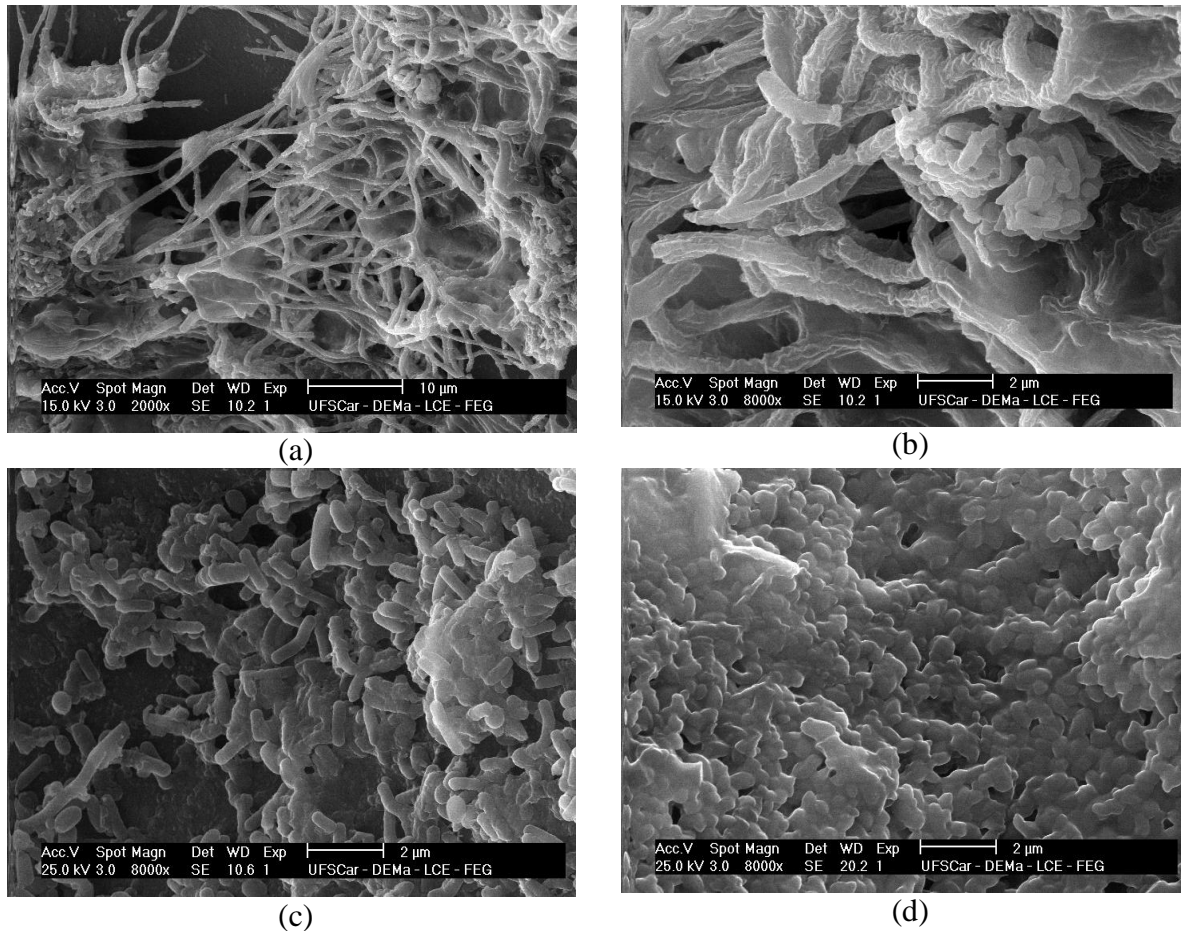


**Figura 5.61** RAHLF na fase final de operação

No segundo perfil as amostras do RAHLF foram analisadas após a adição de ascarel, aproximadamente, cinco meses (312 dias de operação), nos pontos de amostragens inicial (L/D 1), médio (L/D 10) e final (L/D 19). Constataram-se as mesmas morfologias observadas anteriormente (Figuras 5.62 e 5.63).

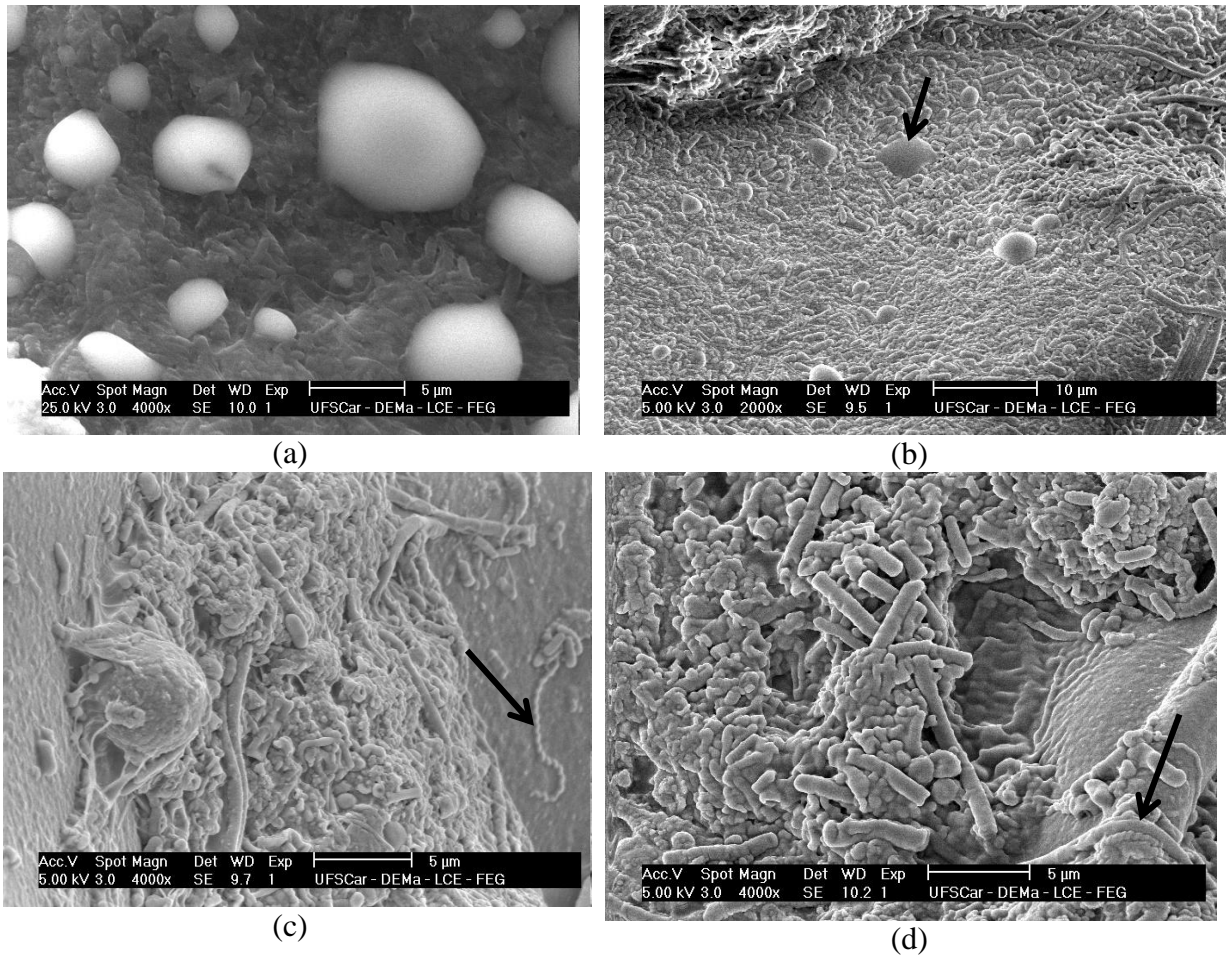


**Figura 5.62** Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após acréscimo de ascarel: (a) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp.; (b) cocobacilos e bacilos envoltos por exopolímeros; (c) e (d) colonização da espuma de poliuretano por *Methanosaeta* sp. e bacilos.

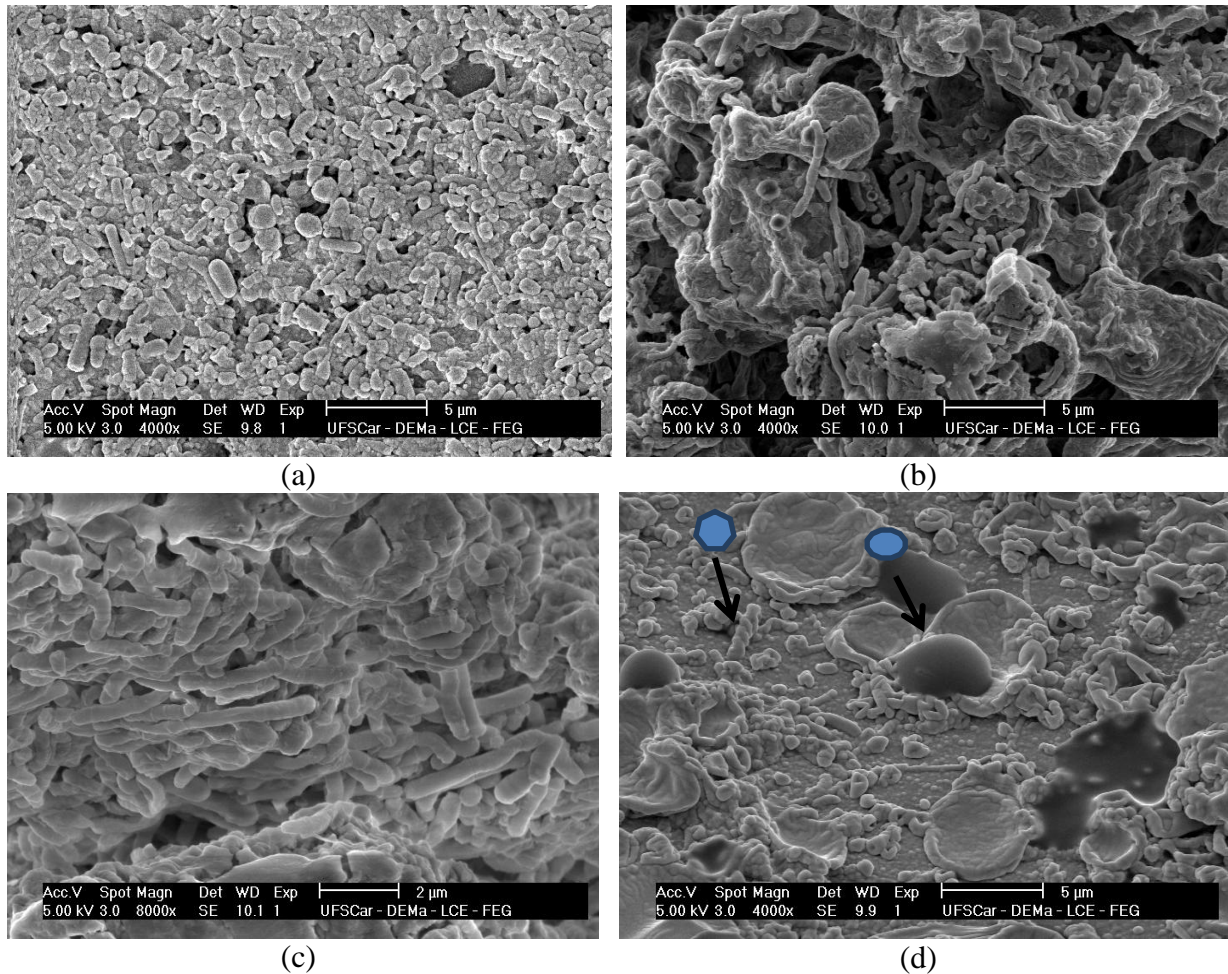


**Figura 5.63** Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após do acréscimo de ascarel: (a) e (b) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. na formação de biofilmes; (c) e (d) bacilos envolvidos por exopolímeros.

O biofilme formado ao redor do óleo aderido na parede do RAHLF foi analisado em MEV (Figuras 5.64 e Figura 5.65). Neste biofilme pôde-se observar variedade de formas e tamanhos de bacilos envolvidos por polímero extracelular, bem como, a presença de gotículas de óleo envoltas por microrganismos de diferentes morfologias.

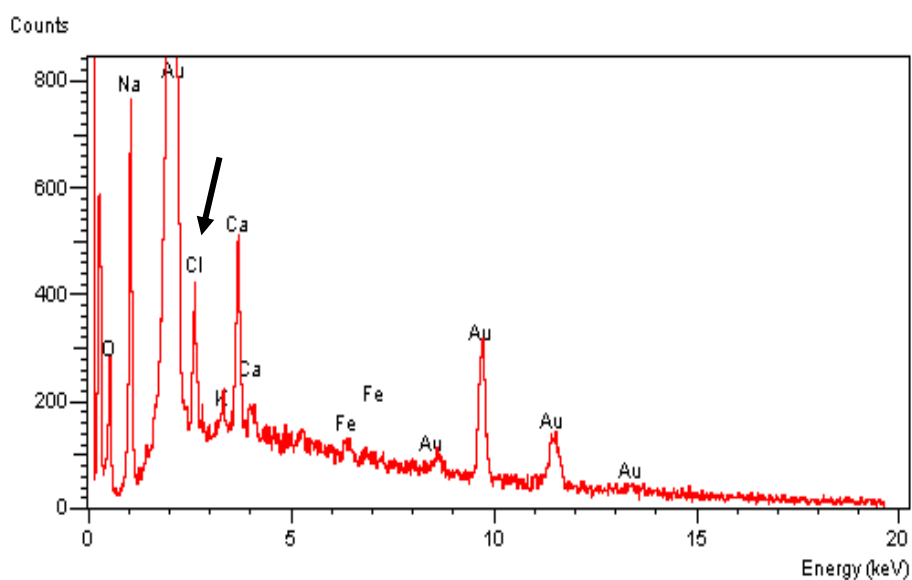
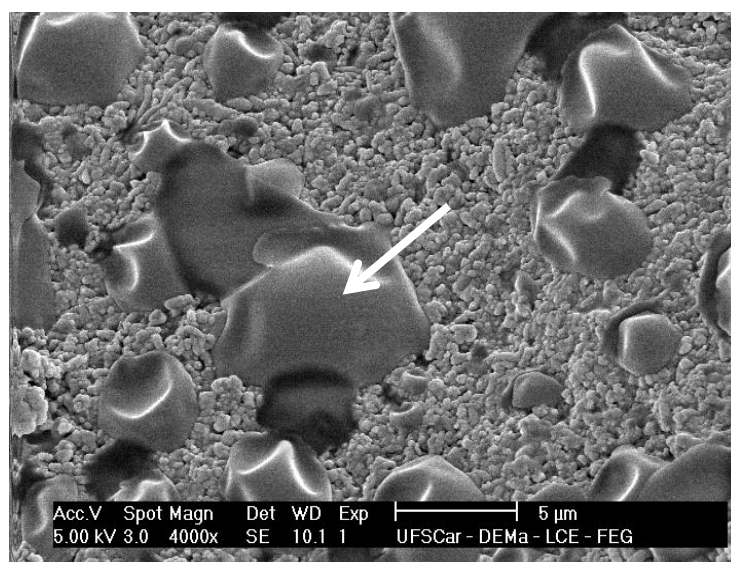


**Figura 5.64** Fotomicrografia eletrônica de varredura do RAHLF do biofilme do RAHLF após acréscimo de ascarel no segundo perfil: (a) e (b) biofilme formado ao redor das gotículas do óleo; (c) e (d) bacilos, filamentos, espiroquetas e exopolímero.



**Figura 5.65** Fotomicrografia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF após acréscimo de ascarel no segundo perfil: (a), (b) e (c); bacilos envoltos por exopolímero, filamentos, espiroquetas e cocos; (d) biofilme formado ao redor das gotículas do óleo e morfologia semelhante a espiroqueta.

Foi realizada microanálise (EDS), no LCE-DEMa/UFSCar, de amostra do óleo com biofilme. Além dos elementos naturalmente encontrados resultantes da própria análise, como o ouro, alguns constituintes do meio Angelidaki foram observados, tais como, sódio, cálcio e ferro. Também, foi encontrado cloro, que é componente do PCB (Figura 5.66).



**Figura 5.66** Fotomicrografia do biofilme crescido ao redor do ascarel e a análise por EDS da amostra, na parte indicada.

#### 5.5.4.4 Análise Filogenética no RAHLF

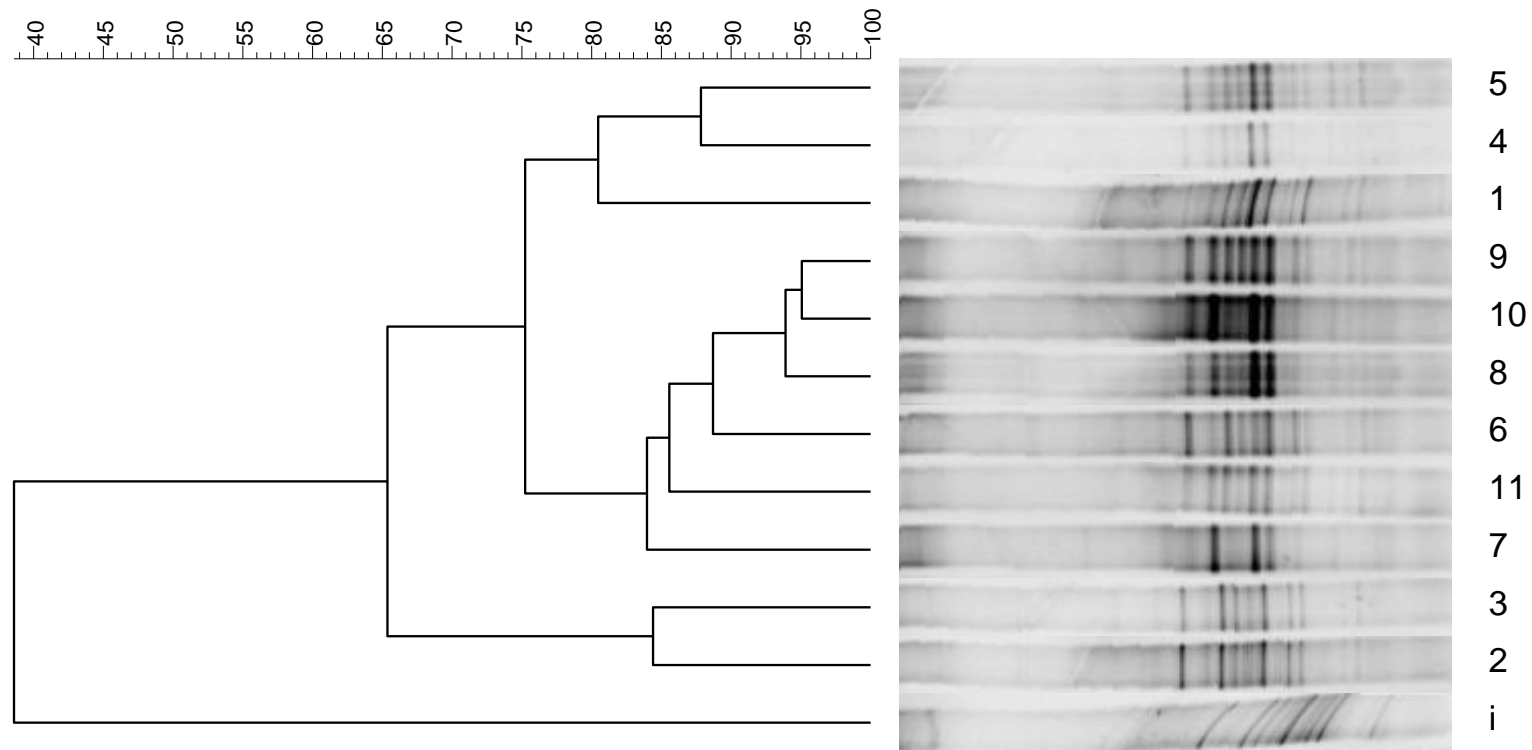
A diversidade da comunidade microbiana do biofilme do RAHLF foi analisada por meio do DGGE, além da identificação filogenética de bandas desse gel, nas diferentes etapas de operação.

A estrutura da comunidade por PCR/DGGE foi analisada pela diferença de padrão de bandas das amostras do reator com o padrão de bandas presente no inóculo. As amostras foram coletadas antes da adição do ascarel (156 dias), no primeiro perfil (224 dias) e 2º. Perfil (312 dias) e denominadas de entrada (L/D 1), 3ª. (L/D 10) e 5ª. (L/D 19). A Figura 5.67 mostra o dendograma para o Domínio *Archaea* com *primers* 1100 FGC e 1400R (Kudo et al. 1997). A amostra número 10, denominada de suporte, foi uma amostra composta de todas as amostras (L/D 1, L/D5, L/D 10, L/D14 e L/D19) do reator coletadas no segundo perfil e a amostra 11 foi coletada do biofilme amarelado aderido a parede do RAHLF.

Antes da adição do ascarel no RAHLF observou-se diferença no padrão de bandas para o Domínio *Archaea*, em relação ao padrão do inóculo. Isso se deveu ao fato de que a comunidade microbiana na entrada do reator (L/D 1) recebeu carga direta de matéria orgânica, ponto onde se inicia a sua degradação.

Todavia, após a adição do ascarel, no primeiro perfil, ocorreu evidente alteração no padrão das bandas, pois era de se esperar que com o acréscimo de substância tóxica ocorresse essa alteração, que foi muito maior na entrada do reator. Muito provavelmente as populações que suportam melhor a presença do tóxico foram selecionadas após esta fase.





**Figura 5.67** Dendrograma do DGGE para Domínio *Archaea* do biofilme do RAHLF – (gradiente do gel 40 – 70%): i (inóculo); antes de acrescentar ascarel:- 1 (L/D1), 2 (L/D10) e 3 (L/D19); após acréscimo de ascarel - 1°. Perfil:- 4 (L/D1), 5 (L/D10) e 6 (L/D19); 2°. Perfil:- 7 (L/D1), 8 (L/D10) e 9 (L/D19); 10 (biomassa composta aderida ao suporte) e 11 (biomassa do biofilme de coloração amarelada aderida ao óleo acumulado na parede do reator).

O inóculo foi o grupo mais distante, com similaridade de 40%, das outras amostras do RAHLF, portanto, pode-se deduzir que ocorreu alteração na diversidade de populações no biofilme formado no reator. Aparentemente houve a formação de três agrupamentos no dendograma, ou seja, a similaridade entre as amostras 3 (L/D19 antes do ascarel) e a 2 (L/D10 antes ascarel) foi de 85% e estas tiveram 65% de similaridade com o restante do grupo. A similaridade entre as amostras 5 (L/D10 1º. Perfil) e 4 (L/D1 1º. Perfil) foi de 87% e a amostra 1 (L/D1 antes do ascarel) teve 80 % de similaridade com estas amostras.

O outro grupo foi composto pelas amostras (9, 10, 8, 6, 11 e 7) do RAHLF que foram coletadas após o 2º. Perfil e, a similaridade entre elas foi de 85% a 95%. A amostra 9 (L/D 19 2º. Perfil) e amostra 10 (biomassa composta) foram similares em 95% e a amostra 8 (L/D 10) teve 93% de similaridade com estas amostras 9 e 10. No entanto, a amostra 6 (L/D19 1º. Perfil) teve 87% de similaridade com este grupo de amostras. A amostra 11 (biofilme amarelo após 2º. Perfil) teve 85% de similaridade e a amostra 7 (L/D 1 no 2º. Perfil) foi 84% similar com as amostras deste grupo.

As bandas do PCR/DGGE que foram recortadas e seqüenciadas são indicadas na Figura 5.68. Duas Classes diferentes para o Domínio *Archaea* foram encontradas no sequenciamento do RNAr 16S das bandas do PCR/DGGE, *Methanobacteria* e *Thermoplasmata*. Em relação a primeira Classe, as arqueias foram relacionadas com duas Ordens, como nos outros ensaios, ou seja, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*.

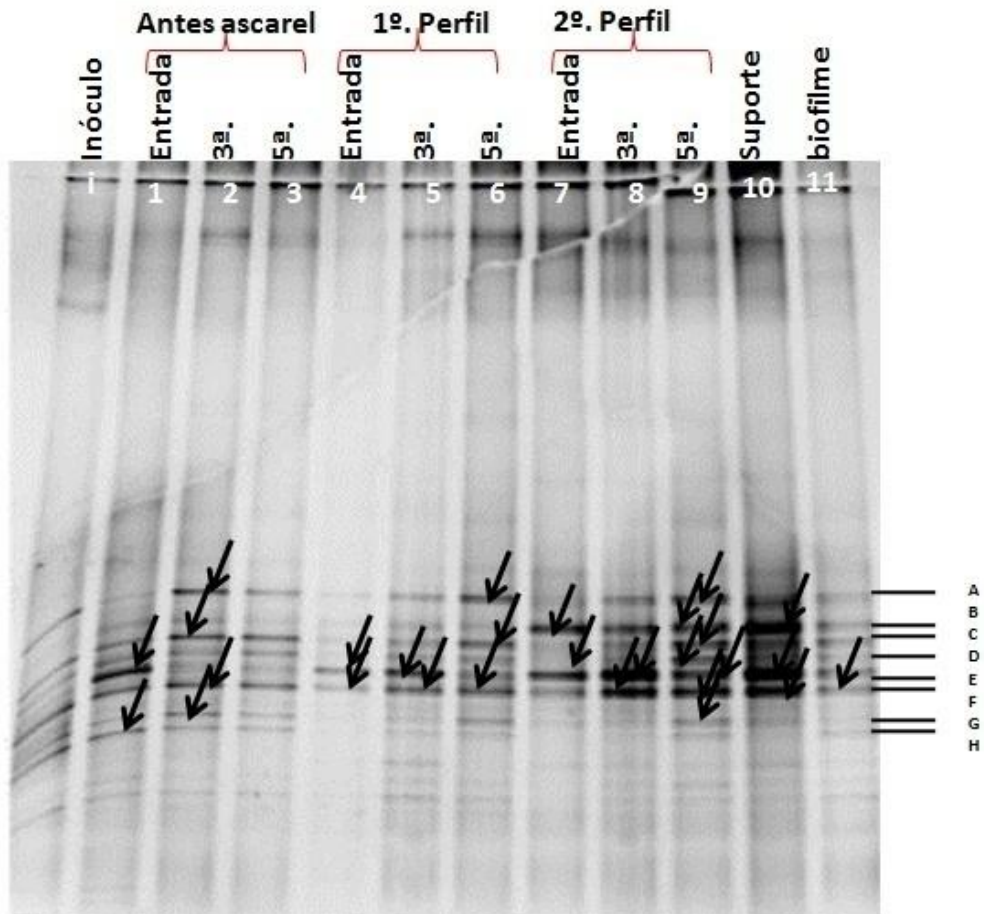
*Thermoplasmata* referem-se a microrganismos anaeróbios facultativos e termoacidófilos. Em ambiente natural requerem matéria em decomposição para o seu crescimento (Bergeys, 2001). Este grupo foi encontrado na banda 9A (L/D19 2º. Perfil) com 98% de similaridade, provavelmente, a constante alteração na alcalinidade a ácidos volateis que foi observada no reator pode ter favorecido o aparecimento deste grupo, como também, por estar num tempo de operação do reator bem adiantado; além disso, a matéria orgânica em decomposição pode ter contribuído para o seu desenvolvimento.

As bandas 10B (amostra composta 2º. Perfil), 5F (L/D10 1º. Perfil), 6F (L/D19 1º. Perfil), 11F (biofilme) e 2G (L/D10 antes do ascarel), foram similares a microrganismos pertencentes a Ordem *Methanomicrobiales*, especificamente ao gênero *Methanolinea* sp. e a um consórcio degradador de tolueno. Este gênero foi encontrado em estudos de poços

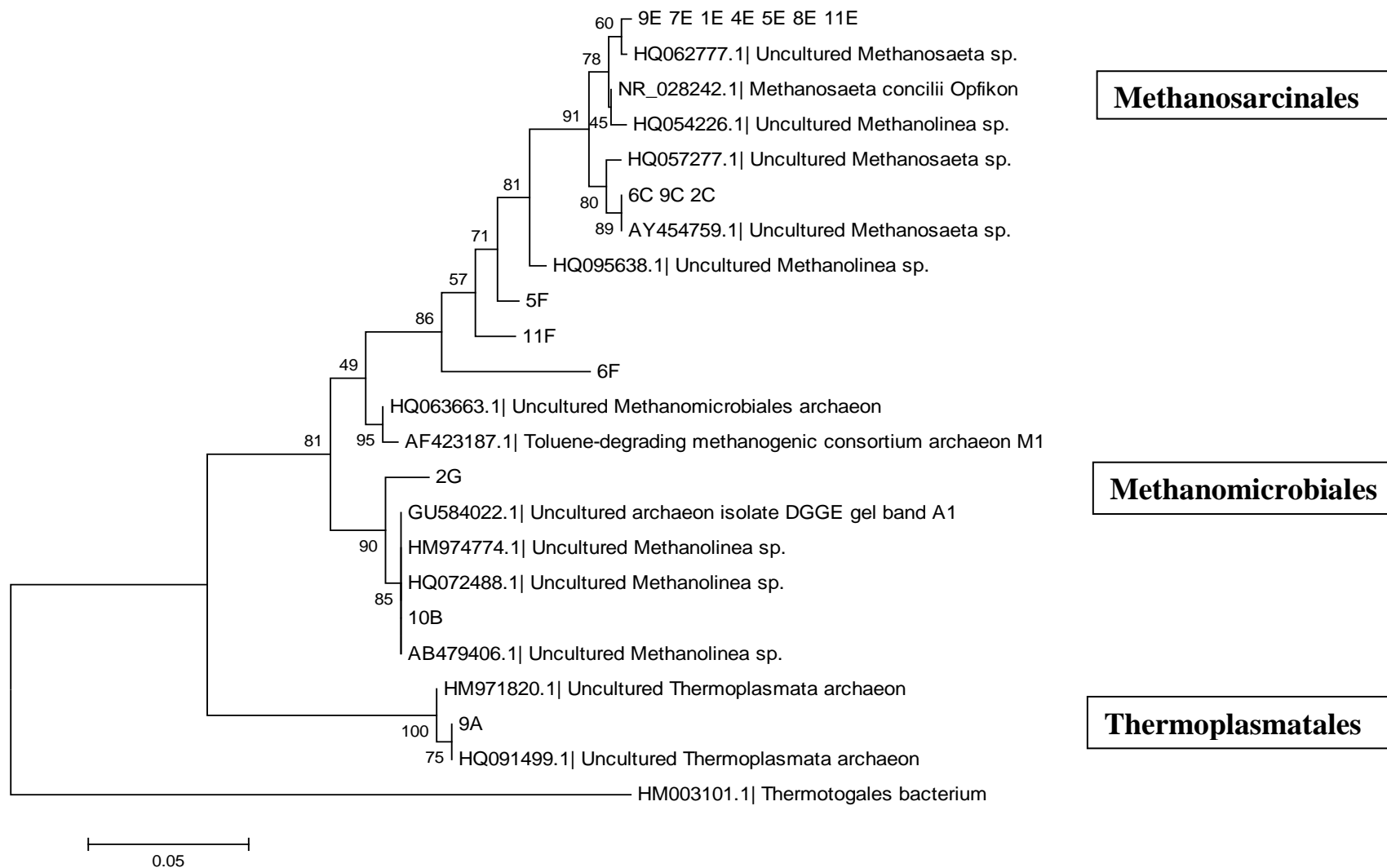
arenosos de armazenamento de resíduos de extração Betume, tratados com gipsita ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Ramos-Padron et al. (2011). As arqueias pertencentes a este grupo são hidrogênotróficas, portanto, a adição de formiato favoreceu a sua manutenção no reator.

As bandas 6C (L/D19 1º. Perfil), 9C e 9E (L/D19 2º. Perfil), 2C (L/D10 antes do ascarel), 7E (L/D1 2º. Perfil), 1E 9L/D1 antes do ascarel) 4E (L/D1 1º. Perfil) , 8E (L/D10 2º. Perfil) e 11E (biofilme), foram relacionadas a microrganismos da Ordem Methanosarcinales. O gênero *Methanosaeta* que predominou em todas as fases de operação do RAHLF, são os principais consumidores de acetato e estão relacionados com a metanogênese acetoclástica. O acetato, proveniente da degradação anaeróbia do etanol, beneficiou a manutenção desta população microbiana.

O genero *Methanosarcina* sp. não foi encontrado entre as bandas sequenciadas, porém, foram observados em exames microscópicos realizados nas amostras do reator. A relação das sequências das bandas obtidas no Genbank (NCBI) está incluída na Tabela 5.16. A partir da análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA foi construída a árvore filogenética (Figura 5.69 ).



**Figura 5.68** DGGE das diferentes fases e trechos (L/D) do RAHLF – Domínio *Archaea* (40% - 70%). As flechas indicam as bandas que foram recortadas, denominadas a partir da combinação das letras ao lado e os números acima: i (inóculo); antes de acrescentar ascarel:- 1 (L/D 1), 2 (L/D 10) e 3 (L/D 19); após acréscimo de ascarel - 1º. Perfil:- 4 (L/D 1), 5 (L/D 10) e 6 (L/D 19); 2º. Perfil:- 7 (L/D 1), 8 (L/D 10) e 9 (L/D 19); 10 (biomassa composta aderida ao suporte) e 11 (biomassa do biofilme de coloração amarelada aderida ao óleo acumulado na parede do reator).



**Figura 5.69** Árvore Filogenética das amostras do RAHLF para o Domínio *Archaea* baseado na análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA - calculado de acordo com o método Neighbor-joining (Bootstrap = 500 reamostragens).

**Tabela 5.13** Relação das seqüências das bandas recortadas obtidas no Genbank do DGGE do RAHLF para o Domínio Archaea

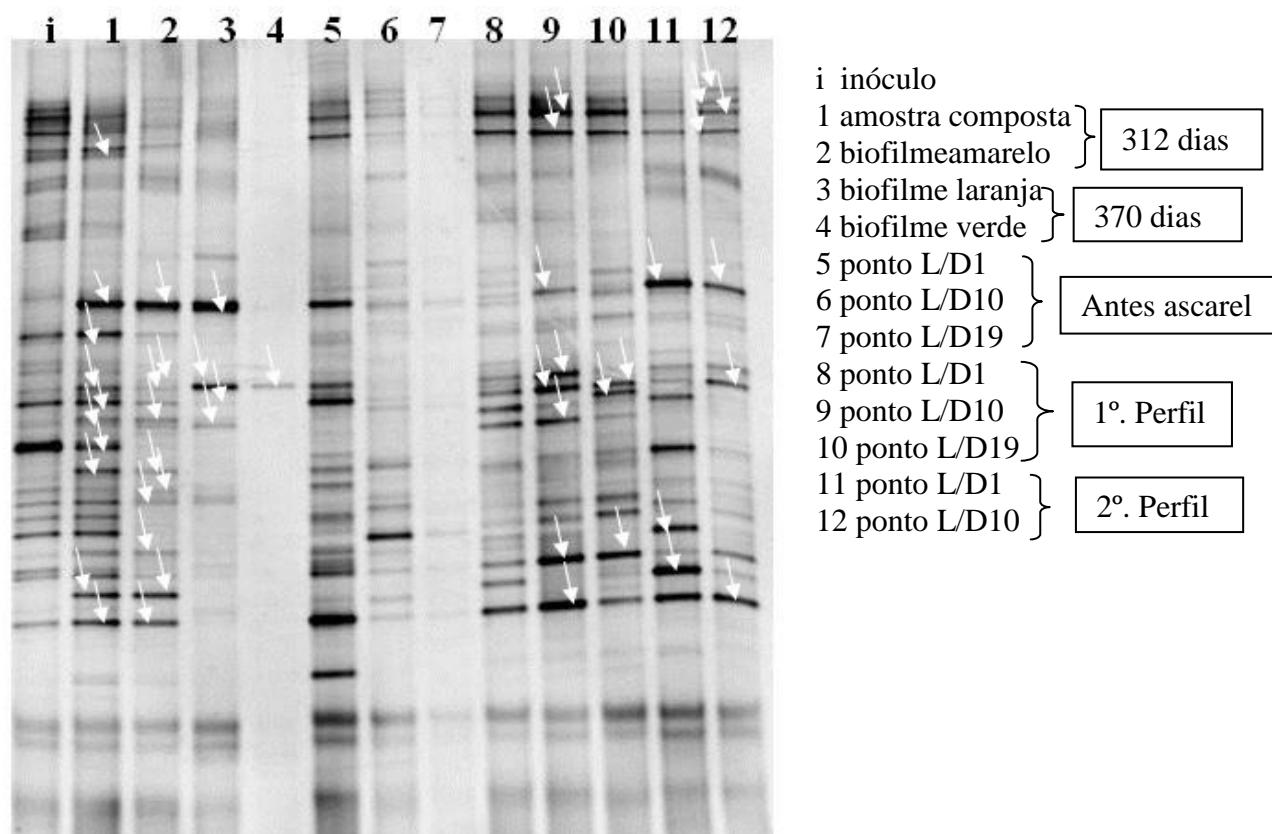
<b>Banda</b>	<b>Acesso - BLAST</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Similaridade</b>	<b>Referencia</b>
9A	HQ091499	<i>Thermoplasma archaeon</i> *	99%	Ramos-Padron et al., 2010
	HM971820	<i>Thermoplasma archaeon</i> *	98%	Callbeck et al., 2010 sub. diret.
6C, 9C, 2C	AY454759	<i>Methanosaeta</i> sp.*	100%	Piza et al., 2003
	HQ057277	<i>Methanosaeta</i> sp.*	99%	Ramos-Padron et al., 2010
9E, 7E, 1E, 4E	HQ062777	<i>Methanosaeta</i> sp.*	99%	Ramos-Padron et al., 2010
8E, 11E	NR_028242	<i>Methanosaeta concilii</i> Opfikon		Eggen et al. 2009
5F	HQ095638	<i>Methanolinea</i> sp.*	97%	Ramos-Padron et al., 2010
11F	HQ054226	<i>Methanolinea</i> sp.*	94%	Ramos-Padron et al., 2010
2G	HM974774	<i>Methanolinea</i> sp.*	96%	Callbeck et al., 2010
	HQ072488	<i>Methanolinea</i> sp.*	97%	Ramos-Padron et al., 2010
	HQ063663	Methanomicrobiales archaeon*	92%	Ramos-Padron et al., 2010
6F	AF423187	Consórcio metanogênico degradador de Tolueno archaeon	91%	Ficker et al. 1999
10B	AB479406	<i>Methanolinea</i> sp.*		Yashiro et al. 2011
	GU584022	Archaeon* DGGE band	99%	Pan et al. 2011 (não publicado)

\* (Não cultivado)

Para o Domínio *Bacteria* foram utilizados, inicialmente *primers* genéricos (968FGC e 1392R) proposto por Nielsen *et al.* (1999), para a realização do PCR/DGGE (Anexo III). As bandas foram recortadas, porém, não foi possível a sua amplificação por PCR, mesmo após várias tentativas de modificações no procedimento, como adição de tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8,0), alteração no tempo de anelamento na PCR, bem como, na concentração de template.

Portanto, os *primers* 341 FGC e 518 R (Muyzer *et al.*, 1993) foram utilizados para a realização do PCR/DGGE, gradiente 45-65% (Figura 5.70) seguido de recorte das bandas e posterior seqüenciamento do RNAr 16S.

Para o Domínio *Bacteria* foram coletadas amostras de biomassa do RAHLF antes e depois da adição do ascarel, nos perfis e após sete meses de operação, momento no qual o biofilme esverdeado encontrava-se por toda a extensão do reator (amostra 4).



**Figura 5.70** DGGE para o Domínio *Bacteria* 45-65% (341FGC e 518R)

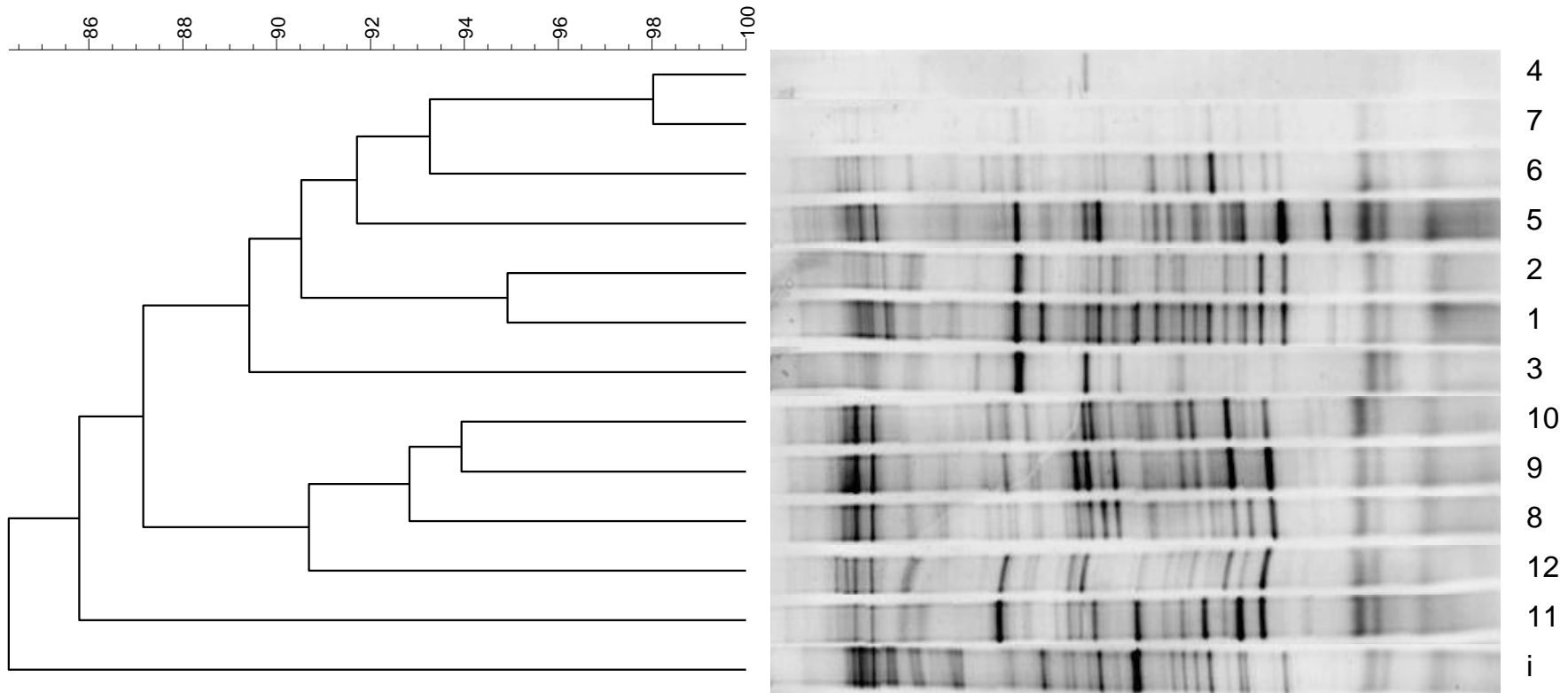
Notou-se que a amostra 4 (biofilme esverdeado) teve padrão de bandas muito diferente das demais; ou seja, aproximadamente 5 bandas. A amostra 7, (L/D 19 antes do ascarel), também observou-se padrão diferente, provavelmente, ocorreu alteração das populações devido as características hidrodinâmicas do reator e, por conseguinte, diferente distribuição da matéria orgânica.

No dendograma realizado para o Domínio Bacteria (*primers* de Muyzer et al., 1993) (Figura 5.71) notou-se que as amostras 4 (biofilme esverdeado 370 dias) e 7 (L/D 19 antes do ascarel) tiveram 98% de similaridade, com a amostra 6 (L/D 10 antes do ascarel), que tiveram 93% de similaridade e 92% com a amostra 5 (L/D 1 antes do ascarel). A amostra 1 (composta) teve 95% de similaridade com a amostra 2 (biofilme amarelado) e estas duas amostras tiveram 90% de similaridade com o grupo acima (amostras 4,7,6 e 5), os quais tiveram 89% de similaridade com o biofilme alaranjado coletado aos 370 dias de operação do RAHLF.

Um segundo agrupamento formado no dendograma mostrou que as amostras do 1º Perfil, 10 e 9 (L/D 19 e L/D 10, respectivamente), obtiveram uma similaridade de 94% e a amostra 8 (L/D 1), também do 1º Perfil, teve 93% de similaridade com estas amostras e 91% com a amostra 12 (L/D 10) do 2º Perfil. A amostra 11 (L/D1), coletada no 2º Perfil ficou fora destes grupos com 86% de similaridade.

As alterações do padrão de bandas das amostras podem estar relacionadas ao aumento da biodisponibilidade dos compostos na superfície da espuma e nas diferentes porções do reator, bem como, aos subprodutos formados resultantes da biodegradação nas diferentes partes do RAHLF. Pode-se observar que a comunidade do biofilme do reator sofreu alteração com a adição do tóxico, pois houve evidente alteração no padrão de bandas após a adição do óleo ascarel.





**Figura 5.71** Dendrograma do DGGE para Domínio Bacteria (45 – 65%) do RAHLF –: i (inóculo); 1 (biomassa composta aderida ao suporte), 2 (biomassa do biofilme de coloração amarelada aderida ao óleo acumulado na parede do reator), 3(biofilme alaranjado), 4 (Biofilme esverdeado); antes de acrescentar ascarel:- 5 (L/D1), 6 (L/D 10) e 7 (L/D 19); após acréscimo de ascarel - 1°. Perfil:- 8 (L/D 1), 9 (L/D 10) e 10 (L/D 19); 2°. Perfil:- 11(L/D 1), 12 (L/D 10).

Do DGGE foram recortadas e sequenciadas quarenta e seis bandas e apenas vinte bandas foram recuperadas e relacionadas aos grupos microbianos (Tabela 5.14). As bandas recortadas foram numeradas de 1 a 12 e ordenadas para cada amostra, em letras na ordem de A, B, C, em diante.

As bandas obtidas foram associadas aos Filos Spirochaetas (Classe Spirochaetes), Thermotogae (Thermotogae), Firmicutes (Clostridia), Proteobacteria (Classes: Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria e Deltaproteobacteria), Synergistes (Synergistia), Chloroflexi (Chloroflexi), Chlorobi (Chlorobia) e a bactérias não cultivadas.

Chloroflexi são bactérias fototróficas verdes não sulfurosas, tipicamente filamentosas (95 % de similaridade). Tais bactérias realizam fotossíntese anoxigênica, são conhecidas como o principal grupo de bactérias capazes de degradar compostos clorados. Este grupo foi relacionado às bandas resultantes da amostras do biofilme amarelado (amostra 2) formado ao redor do óleo que ficou aderido à parede do RAHLF e coletado após o segundo perfil. Provavelmente, estas bactérias utilizaram PCB do óleo ascarel. Segundo Bedard (2007), a principal Classe de microrganismos que degrada PCB é Dehalococoidetes, a qual faz parte do Filo Chloroflexi. Nesta mesma amostra, também foram relatados grupos de microrganismos pertencentes a Classe Spirochaetes, Deltaproteobacteria, Betaproteobacteria e bactéria não cultivadas.

Uma bactéria não cultivada (95 % de similaridade) foi relacionada à banda 2D (biofilme amarelo), proveniente de sedimento de rio e marinho, submetidos a bioestimulação e bioaumentação com compostos clorados (dibenzo-dioxinas e furanos policlorados), Ahn *et al.* (2008). Provavelmente, tais bactérias foram também capazes de usar PCB contidos no ascarel. Na amostra 1 (biomassa composta do reator), foram encontrados os Filos Proteobacteria (delta/epsilon subdivisão – Classe Deltaproteobacteria), Proteobacteria (Classe Betaproteobacteria) e Firmicutes (Clostridia). *Pelobacter* sp. foi relacionado ao crescimento de biofilme em reator UASB utilizado no tratamento de água resíduária de cervejaria (Fernandez et al., 2008). As Classes Beta, Gamma, Delta e Epsilon, do Filo Proteobacteria foram relacionadas ao período de consolidação de biofilme, por serem grupo com metabolismo diversificado. Nesta mesma amostra, um outro grupo da Classe

Betaproteobacteria, pertencente a Família Camamonadaceae foi relacionado a amostra costeira marinha (Mou et al. 2008).

*Dethiosulfatibacter* sp. (96% similaridade) pertencente ao Filo Firmicutes foi encontrado na amostra de biomassa composta e foi relatado em cultura enriquecida com compostos organoclorados, tais como, 1,2,4-triclorodibenzo-p-dioxina, conjuntamente com Dehalococcoides, principal grupo capaz de degradar os PCB (Bunge et al. 2008).

Embora os resultados do DGGE realizados com os primers de Muyzer et al. 1993, para o gradiente 40-70%, não terem sido utilizados neste trabalho, vale a pena salientar que algumas das bandas foram sequenciadas, entre elas aquelas das amostras 3 (biofilme laranja) e 4 (biofilme verde). Tais amostras foram relacionadas à Família Chlorobiaceae, gênero *Chlorobium* sp. com 93% de similaridade a amostras estudadas no Lago Shira (Rússia) por Lunina et al. (2007). Referem-se a bactérias fototróficas anoxigênicas, apresentam clorossomos como aparato para a realização da fotossíntese (acesso GenBank EF153291).

Essa mesma Família Chlorobiaceae também foi encontrada nas amostras 4 e 9 do DGGE (gradiente 45-65%). Ambas as amostras foram coletadas após o segundo perfil, quando o reator já apresentava o desenvolvimento de biofilme de coloração esverdeada, o que pode ser explicado pela presença desse grupo de bactérias fototróficas anoxigênicas.

A ordem Termotogales foi observada nas amostras 1, 9 e 10 e foram similares a microrganismos pertencentes a Termotogales mesófilos que podem se desenvolver em temperaturas abaixo de 46 °C, em reservatórios de óleo e ambientes contaminados com hidrocarbonetos (Nesbø et al., 2010). O ascarel é um óleo constituído não só por PCB e TCB (triclorobenzenos), mas também por hidrocarbonetos, o que pode levar a crer que este grupo esteja envolvido na degradação destes compostos do óleo.

A amostra 9 que foi coletada no primeiro perfil apresentou similaridade (94%) com representantes da Ordem Methylococcales (Kwon et al. 2010), especificamente com *Methylomonas* sp., as quais usam metano, que certamente estava sendo produzido no RAHLF durante esta fase de operação.

A árvore Filogenética do RAHLF dos membros do Domínio Bacteria foi baseada na análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA e calculada de acordo com o método Neighbor-joining (Figura 5.72). Ampla variedade de Filos foi encontrada no reator, o que denota que consórcio microbiano foi desenvolvido no reator e houve alteração dos grupos microbianos nas diferentes fases de operação.

Silva et al. 2011 analisou, por meio de clonagem e sequenciamento, a comunidade microbiana do biofilme formado ao redor do óleo que ficou aderido à parede do reator. Segunda a autora, foram analisados 78 clones relacionados aos Filos Thermotogae (29,5%), Proteobacteria (15,4%), Firmicutes (7,7%), Synergistetes (5,1%), Spirochaetes (3,8%), Aminanaerobia (3,8%), Deferribacteres (1,3%), Cholori (1,3%) Chloroflexi (1,3%), além de 30,8% de bactéria não cultivada. Esses grupos foram coerentes com os resultados obtidos no presente trabalho, pois apenas os Filos Synergistes, Deferribacteres e Aminanaerobia não foram encontrados nos resultados do sequenciamento das bandas que foram recortadas do DGGE com *primers* de Muyzer *et al.* (1993).

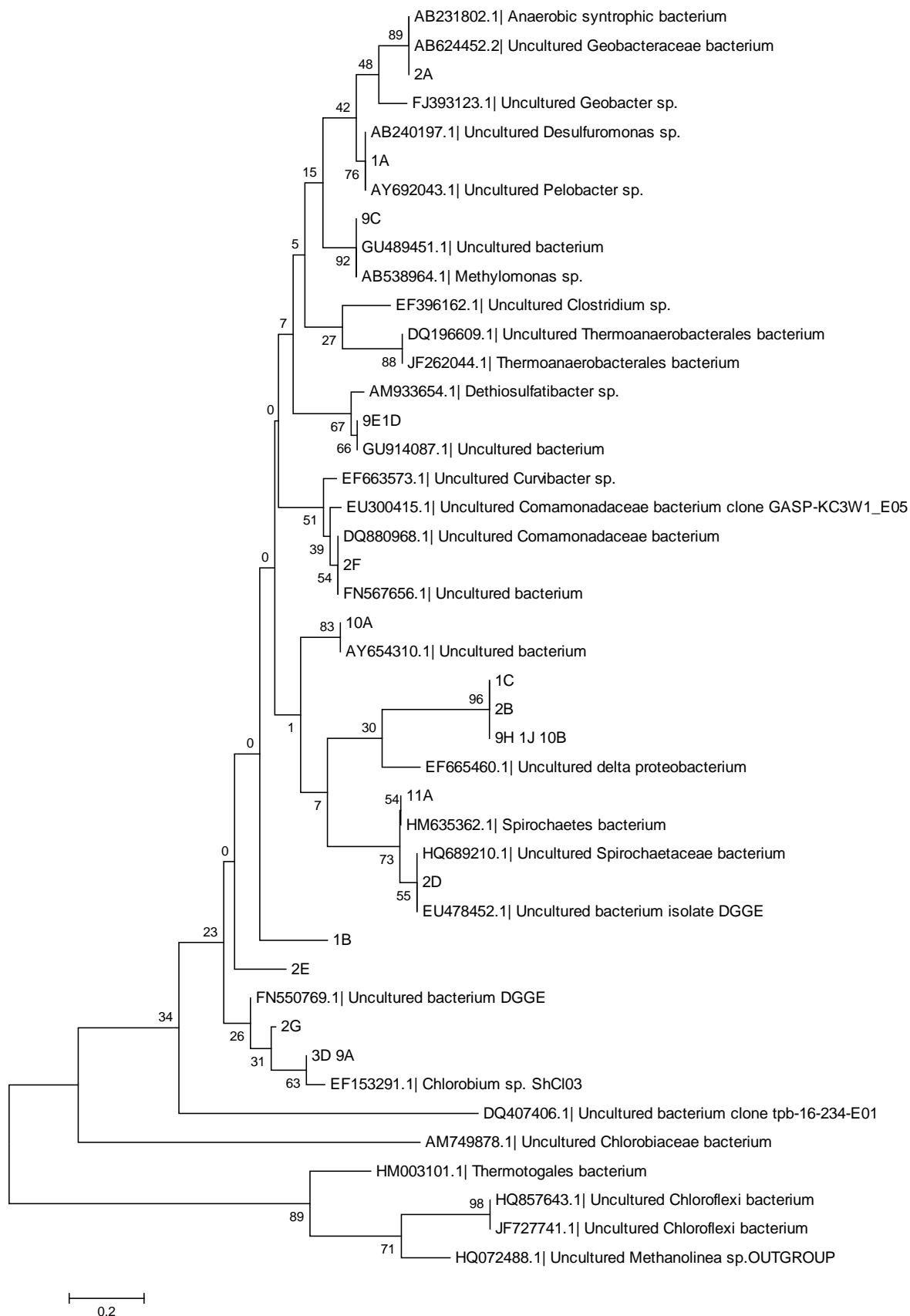


Figura 5.72 Árvore Filogenética do RAHLF dos membros do Domínio Bacteria baseado na análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA - calculado de acordo com o método Neighbor-joining.(Bootstrap = 500 reamostragens)

**Tabla 5.14** Relação das seqüências das bandas recortadas obtidas no Genbank do DGGE do RAHLF (Domínio Bacteria)

Bandas	BLAST	Microrganismo	Similaridade	Referência
1A	AY692043	<i>Pelobacter</i> sp. *	92%	Fernandez et al. 2008 não publicado
	AB240197	<i>Desulfuromonas</i> sp.*		Huang et al. 2005 não publ. e Chen, C. 2005
1B	DQ880968	Comamonadaceae bacterium*	95%	Mou et al. 2008
	EF663573	<i>Curvibacter</i> sp.*	100%	Jangid et al. 2007 submissão direta
1C	EF396162	<i>Clostridium</i> sp. isolate DGGE*	97%	Liu et al. 2011
	JF262044	Thermoanaerobacterales bacterium		Slobodkina et al. 2011 não publicado
9E	GU914087	bacterium*	91%	Quan,Z.-X, 2010 não publicado
1D	AM933654	<i>Dethiosulfatibacter</i> sp.	96%	Bunge et al. 2008
2A	AB231802	Anaerobic syntrophic bacterium	98%	Chen et al., 2005 não puplicado
	AB624452	Geobacteraceae bacterium*		Nakasaki et al. 2011 não publicado
2B	HQ857643	<i>Chloroflexi</i> bacterium*	95%	Wang et al. 2011
	JF727741	<i>Chloroflexi</i> bacterium *		
2D	EU478452	bacterium isolate DGGE*	95%	Ahn et al. 2008
2E	FJ393123	Geobacter sp. clone MFC-B162-F09*	97%	Borole et al. 2010 submissão direta
	EF665460	Delta proteobacterium *		Jangid et al. 2007 não publicado
2F	EU300415	Comamonadaceae bacterium*	93%	Jangid et al. 2007
	FN567656	bacterium *	94%	Liu et al. 2011
2G	FN550769	bacterium *	96%	Cornish, S. L. 2010
	DQ407406	bacterium*	95%	Tang et al. 2007
3D, 9A	AM749878	Chlorobiaceae bacterium*	93%	Casamayor et al. 2007 não publ.; Barberan, A. 2007
	EF153291	<i>Chlorobium</i> sp. ShCl03	93%	Lunina et al. 2009
11A	HQ689210	Spirochaetes bacterium*	95%	Cheng et al. 2010 não publicado
	HM635362	Spirochaetes bacterium		Nelson et al. 2010 não publicado
1J, 9H	HM003101	Thermotogales bacterium	100%	Nesbo et al., 2010
10B	GQ203636	bacterium*	93%	Li,Y., 2009não publicado
9C	GU489451	bacterium*	96%	Kwon et al..2010
	AB538964	<i>Methylomonas</i> sp.	94%	Ogiso et al..2009 não publicado
10A	AY654310	bacterium*	94%	Godonet al., 2004

\*não cultivados

## 6. CONCLUSÕES

---

- ✓ O método de extração adaptado de Quensen et al. (1988), **Hexano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Florisol/Sílica** foi efetivo na extração de PCB.
- ✓ A presença de ascarel não interferiu na produção de metano nos reatores em batelada.
- ✓ A remoção de PCB foi de 86% nos reatores em batelada contendo espuma de poliuretano, etanol e formiato, como fonte de carbono e metanol (790 mg/L) como solvente, de 85% nos reatores com ácido fórmico (600 mg/L) como solvente e etanol e acetato como fonte de carbono e de 72% com solvente Triton X-100 e etanol e formiato, como fonte de carbono.
- ✓ A adição de fontes de carbono alternativas pode ser necessária para auxiliar na remoção de PCB, bem como, o acréscimo de solventes capazes de solubilizar o ascarel.
- ✓ A biomassa aderida a um suporte, bem como a adição de Triton X-100 contribuiu para a biodisponibilidade dos compostos para os microrganismos e possibilitar a degradação do PCB presente no ascarel.
- ✓ Das análises das sequencias do gene 16S RNAr, a partir das bandas do DGGE, verificou-se a presença de uma grande variedade microbiana, como os Filos Spirochaetas, Thermotogae, Firmicutes, Proteobacteria(Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria e Deltaproteobacteria), Synergistes, Chloroflexi, Chlorobi e muitas bacterias ainda não cultivadas.
- ✓ Grupos microbianos, tais como Chloroflexi, que estão relacionados a degradação de PCB, foram encontrados em bandas sequenciadas das amostras do biofilme amarelado desenvolvido ao redor do óleo aderido a parede do RAHLF.

- ✓ As arqueias metanogênicas *Methanosaeta* sp. e *Methanolinea* sp., relacionadas com a metanogenese acetoclástica e hidrogenotrófica, respectivamente, estiveram presentes nos reatores.
  
- ✓ A remoção de matéria orgânica no RAHLF manteve-se elevada mesmo após a adição de ascarel.



## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

- ✓ Realizar ensaios com padrões Aroclor
- ✓ Analisar o PCB em CG/MS (cromatografia gasosa com espectrômetro de massa)
- ✓ Realizar os testes de adsorção com padrões Aroclor
- ✓ Alimentar o RAHLF com concentrações conhecidas de padrões Aroclor
- ✓ Utilizar primers específicos para bactérias degradadoras de PCB

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABNT NBR 13882 Líquidos isolantes elétricos – Determinação do teor de bifenilas policloradas (PCB). 2<sup>a</sup>. Edição. 2008.
- Abramowicz, D.A., *Aerobic and Anaerobic PCB Biodegradation of PCB: A Review; Critical Review Biotechnology* 10: 241-251, 1990.
- Abramowicz, D.A., *Aerobic and Anaerobic PCB Biodegradation in the Environment*; in the Conference on Biodegradation: Its Role in Reducing Toxicity and Exposure to Environmental Contaminants held, 26-28 Abril 1993 in Research Triangle Park, North Carolina.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs)*; Atlanta, GA/U.S.Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2000.
- Ambrosoli, R., Petruzzelli, L., Minati, J.L., Marsan, F.A., *Anaerobic PAH degradation in soil by mixed bacterial consortium under denitrifying conditions*; *Chemosphere* 60, 1231 – 1236, 2005.
- Angelidaki, I., Petersen, S. P., Ahring, B. K., *Effects of Lipids on Thermophilic Anaerobic-Digestion and Reduction of Lipid Inhibition Upon Addition of Bentonite*; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33 (4), 469-472, 1990.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyl, S., Jenicek, P., van Lier J.B., *Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays*. *Water Science & Technology*. 59, 5, 2009.

- Anh, Y-B., Liu, F., Fennell, D.E., Haggblom, M.M., *Biostimulation and bioaugmentation to enhance dechlorination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins contaminated sediments*. FEMS Microbiology Ecology, 66, 271-281, 2008.
- Araújo, J.C., *Biofilmes Anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação "in situ" com sondas fluorescentes*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2001.
- Baba, D., Yasuta, T., Yoshida, N., Kimura, Y., Miyake, K., Inoue, Y. Toyota, K., Kataiama, A., *Anaerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls by a microbial consortium originated from uncontaminated paddy soil*; World Journal Microbiology and Biotechnology, 23: 1627-1636, 2007.
- Bedard, D.L., May, R.J., *Characterization of the Polychlorinated Biphenyls in the Sediments of Woods Pond: Evidence for Microbial Dechlorination of Aroclor 1260 in Situ*; Environmental Science and Technology 30, 237-245, 1996.
- Bedard, D.L., Van Dort, H.M., May, R.J., Smullen, L.A., *Enrichment of microorganisms that sequentially meta, para-dechlorinate the residue of Aroclor 1260 in Housatonic River sediment*; Environmental Science and Technology 31, 3308–3313, 1997.
- Bedard, D.L., Pohl, E.A, Bailey, J.J., Murphy, A., *Characterization of the PCB Substrate Range of Microbial Dechlorination Process LP*; Environmental Science and Technology 39, 6831-6838, 2005.
- Bedard, D.L., *A Case Study for Microbial Biodegradation: Anaerobic Bacterial Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls-From Sediment to Defined Medium*; Annu. Rev. Microbiol.,62:253-270, 2008.
- Bícego, M.C., Taniguchi, S., Yogui, G.T., Montone, R.C., Silva, D.A.M., Lourenço, R.A., Martins, C.C., Sasaki, S.T., Pellizari, V.H., Weber, R.R., *Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil*; Marine Pollution Bulletin 52, 1784-1832, 2006.

- Billingsley, K.A., Backus, S.M., Ward, O.P., *Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by Pseudomonas sp. LB400*. Applied Microbiology Biotechnology, 52: 255-260, 1999.
- Billingsley, K.A., Backus, S.M., Wilson, S., Singh, A., Ward, O.P., *Remediation of PCBs in soil by surfactant washing and biodegradation in the wash by Pseudomonas sp. LB400*. Biotechnology Letters, 24: 1827-1832, 2002.
- Bolaños, M. L. R., *Tratamento de fenol em reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas*; Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J., Gallardo, S., *Polychlorinated biphenyls and their biodegradation*; Process Biochemistry 40: 1999-2013, 2005.
- Bunge, M., Wagner, A., Fischer, M., Andreesen, J.R., Lechner, U., *Enrichment of a dioxin-dehalogenation Dehalococcoides species in two-liquid phase cultures*. Environmental Microbiology, 10 (10) 2670-2683, 2008.
- Cattony, E.B.M., *Remoção de etanol, benzeno e toluene em reator anaeróbico horizontal de leito fixo na presença de sulfato*. 121f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 2005.
- Chang, B.V., Liu, W.G., Yuan, S.Y., *Microbial dechlorination of three PCB congeners in river sediment*; Chemosphere 45, 849-856, 2001.
- Chen, M., Hong, C.S., Bush, B., Rhee, G-Y., *Anaerobic Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls by Bacteria from Hudson River Sediments*; Ecotoxicology and Environmental safety **16**, 95 – 105, 1988.
- Committee on Remediation of PCB-Contaminated Sediments, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council (NRC). *A Risk Management Strategy for PCB-Contaminated Sediment*; 452 p; The National Academies Press 2001. [http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=10041&page=1](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=10041&page=1)

- Cutter, L., Sowers, K. R., May, H.D., *Microbial Dechlorination of 2,3,5,6-Tetrachlorobiphenyl under Anaerobic Conditions in the Absence of Soil or Sediment*; Applied and Environmental Microbiology 64, 2966-2969, 1998.
- Cutter, L.A., Watts, J.E.M., Sowers, K.R., May, H.D., *Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl*; Environmental Microbiology 3, 699–709, 2001.
- Damianovic, M. H. R. Z., *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*; Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- De Nardi, I. R., *Degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*; Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- Dillalo, R., Albertson, O. E., *Volatile acids by direct titration*; Journal WPCF, v. 33, p. 356-365, 1961.
- EPA Victoria Method 6013. Determination of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Waste Oils by Gas Chromatography with electron Capture Detector. Australia, 2003.
- Fagervold, S. K., Watts, J. E. M., May, H. D., Sowers, K. R., *Sequential Reductive Dechlorination of meta-Chlorinated Polychlorinated Biphenyl Congeners in Sediment Microcosms by Two Different Chloroflexi Phylotypes*; Applied and Environmental Microbiology 71, 8085-8090, 2005.
- Fava, F., The presence of glass beads or Triton X-100 in the medium enhances the aerobic dechlorination of Aroclor 1221 in *Pseudomonas* sp CPE1 culture. *Chemosphere*, 32(8): 1469-1475, 1996.
- Fernández, N., Díaz, E.E., Amils, R., Sanz, J.L., *Analysis of Microbial Community during Biofilm Development in an Anaerobic Wastewater Treatment reactor*. Microbiology Ecology, 56: 121-132, 2008.

- Foresti, E., Zaiat, M., Cabral, A. K. A., Del Nery, V., *Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) reactor for paper industry wastewater treatment*; Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 12, p. 235-239, 1995.
- Garrit, G.M., Boone, D.R., Castenholz, R.W., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2a. Edition, 2001.
- Griffiths R.I., Whiteley A.S., O'Donnell A.G., *Rapid Method for coextraction of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition*; Applied and Environmental Microbiology, 66, 5488-5491, 2000.
- Grishchenkov, V.G., Slep'en'kin, A.V., Boronin, A.M., *Anaerobic Degradation of Biphenyl by the Facultative Anaerobic Strain Citrobacter freundii BS2211*; Applied Biochemistry and Microbiology Vol. 38, 125 – 128, 2002.
- Gusmão, V.R., *Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator horizontal de leito fixo visando a remoção de BTEX*. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- Hirasawa, J.K., *Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de Biologia Molecular*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007
- Hubert, C.R., Oldenburg, T.B., Fustic, M., Gray, N.D., Larter, S.R., Penn, K., Rowan, A.K., Seshadri, R., Sherry, A., Swainsburry, R., Voordouw, G., Voordouw, J.K., Head, I.M., *Massive dominance of Epsilonproteobacteria in formation waters from a Canadian oil sands reservoir containing severely biodegraded oil*. Environmental Microbiology, 2011.
- Hutzinger, O., Safe, S., Zitko, V., *The Chemistry of PCBs*. CRC Press, New York, 1974.
- Instrução Normativa SEMA/STC/CRS N. 1 de 10 de junho de 1983.

- Kimura, M., *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*; *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120, 1980.
- Kinner, L.L., Manahan, S.E., Larsen, D.W., *Gasification of waste-contaminated soil by the ChemChar process*; *Journal of Environmental Science and Health A28*, 697–727, 1993.
- Kovacik, W.P., scholten, J.C.M., Culley, D., Hickey, R., Zhang, W., Brockman, F.J., *Microbial dynamics in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) bioreactor granules in response to short-term changes in substrate feed*. *Microbiology*, 156, 2418-2427, 2010.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M., MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. 2001.
- Kudo, Y., Nakajima, T., Miyaki, T., Oyaizu, H., *Methanogen flora of paddy soils in Japan*; *FEMS Microbiology Ecology*, v. 23, p. 39-48, 1997.
- Kwon, S., Kim, T-S., Yu, G.H., Jung, J-H., Park, H-D., *Bacterial Community Composition and Diversity of a Full-Scale Integrated Fixed-Film Activated Sludge System as Investigated by Pyrosequencing*. *Journal Microbiology Biotechnology*, 20 (12) 1717-1723, 2010.
- Leigh, M. B., Pellizari, V. H, Uhlík, O., Sutka, R., Rodrigues, J., Ostrom, N. E., Zhou, J., Tiedje, J. M., *Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs)*; *The ISME Journal* 1, 134–148, 2007.
- Lei Estadual 12.288 de 22 de fevereiro de 2006
- Lima, C.A.A., *Tratamento de esgoto sanitário em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF): escala piloto*; Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- Lunina, O.N., Bryantseva, I.A., Akimov, V.N., Rusanov, I.I., Barinova, E.S., Lysenko, A.M., Rogozin, D.Y., Pimenov, N.V., *Anoxigenic Phototrophic Bacterial Community of Lake Shira (Khakassia)*. *Microbiology*, 76,4, 469-479, 2007.

- Martinez, H.A.R., Rodriguez, G.C., Castillo, D.H., *Determination of PCB in Transforme Oil Using Gas Chromatography with Mass Spectroscopy and Aroclors (A1254:A1260)*, J. Mex. Chem. Soc., 49(3), 263-270, 2005.
- 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, Recife- PE. Anais. Editora Universitária - UFPE, p. 2813-2823, 2000.
- Mousa, M. A., Ganey, P.E., Quensen III, J.F., Madhukar, B.V., Chou, K., Giesy, J.P., Fischer, L. J., Boyd, S.A., *Altered Biologic Activities of Commercial Polychlorinated Biphenyl Mixtures after Microbial Reductive Dechlorination*. Environmental Health Perspectives, V106, 6, 1998.
- Muyzer, G., Waal, E. C., Uitterlinden, G., *Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S RNAr*; Applied and Environmental Microbiology 59, 695-700, 1993.
- Na, K., Lee, Y., Lee, W., Huh, Y., Lee, J., Lee, J., Kubo, M., Chung, S., *Characterization of PCB-Degrading Bacteria Immobilized in Polyurethane Foam*; Journal of Bioscience and Bioengineering, 90-4, 368-373, 2000.
- Natarajan, M.R., Wu, W.-M, Sanford, R., Jain, M.K., *Degradation of biphenyl by methanogenic microbial consortium*; Biotechnology Letters **21**, 741 – 745, 1999.
- Nesbø, C.L., Kumaraswamy, R., Dlutek, M., Ford Doolittle, W., Foght, J., *Searching for Mesophilic Thermotogales Bacteria: “Mestogas” in the Wild*. Applied and Environmental Microbiology, 4896-4900, 2010.
- Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G., *Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals*; Protein Engineering., **12**, 3–9, 1999.



- Oliveira, S.W.B, Moares, E. M.; Adorno, M. A. T.; Varesche, M. B. A.; Foresti, E.; Zaiat, M., *Formaldehyde degradation in an anaerobic packed-bed bioreactor*; Water Research, v. 38, p. 1685-1694, 2004.
- Pellizari, V. H., Bezborodnikov, S., Quensen III, J. F., Tiedje, J.M., *Evaluation of Strains Isolated by Growth on Naphthalene and Biphenyl for Hybridization of Genes to Dioxygenase Probes and Polychlorinated Biphenyl-Degrading Ability*; Applied And Environmental Microbiology 62, 2053–2058, 1996.
- Penteado, J.C.P., Vaz, J.M., *O legado das Bifenilas Policloradas (PCBs)*; Química Nova, Vol.24, N°. 3, 390-398, 2001.
- Poster, D.L., Schantz, M.M., Leigh, S.D., Wise, S.A., *Standard reference Materials (SRMs) for the Calibration and Validation of Analytical Methods for PCBs (as Aroclor Mixtures)*. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology, 109, 245-266, 2004
- Quensen III, J.F., Tiedje, J.M., Boyd, S.A., *Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls by Anaerobic Microorganisms from sediments*; Science, 242, 1988.
- Quensen III, J.F., Boyd, S.A., Tiedje, J.M., *Dechlorination of Four Commercial Polychlorinated Biphenyl Mixtures (Aroclor) by Anaerobic Microorganisms from Sediments*; Applied and Environmental Microbiology, 2360-2369, 1990.
- Ramos-Padrón, E., Bordenave, S., Lin, S., Bhaskar, I.M., Dong, ., Sensen, C.W.Fournier, J., Voordouw, G, Gieg, L.M., *Carbon and Sulfur Cycling by Microbial Communities in a Gypsum-Treated Oil Sands Tailings Pond*. Environmental Science and Technology, 45, 439-446, 2011.
- Resolução CONAMA número 19 de 19 de setembro de 1994
- Ribeiro, R., *Recuperação de águas contaminadas com gasolina utilizando reatores de leito fixo*. 150f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005

- Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., *Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes*; Journal Water Pollution Control Fed., 58, 406-411, 1986.
- Rockne, K.J., Strand, S.E., *Anaerobic Biodegradation of Naphthalene, Phenanthrene, and Biphenyl by a Denitrifying Enrichment Culture*; Water Research Vol 35, 291 – 299, 2001.
- Rysavy, J. P., Yan, T., Novak, P.J., *Enrichment of anaerobic polychlorinated biphenyl dechlorinators from sediment with iron as a hydrogen source*; Water Research 39, 569-578, 2005.
- Saitou, N., Nei, M., *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*; Molecular Biology and Evolution v. 4, p. 406-425, 1987
- Sarti, A., *Avaliação de desempenho do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) no tratamento de substrato sintético simulando esgoto doméstico*; Dissertação de Mestrado. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos/USP. 1998.
- Sheng, G-P., Yu, H-Q., Li, X-Y., *Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review*. Biotechnology Advances, 28, 882-894, 2010.
- Shibamoto, T., *Chromatographic Analysis of Environmental and Food Toxicants*; Chromatographic Science Series Volume: 77 CRC Press/New York, 1998.
- Silva, M.R.L., Sakamoto, I.K., Correa, R.C., Varesche, M.B.A., *Caracterização da comunidade bacteriana adaptada ao Ascarel*. Resumo expandido, DAAL. 2011.
- Smits T.H.M., Devenoges, C., Szynalski, K., Maillard, J., Holliger, C., *Development of a real-time PCR method for quantification of three genera Dehalobacter, Dehalococcoides and Desulfobacterium in microbial communities*;
- Standard Methods for the Examination of water and wastewater, 21<sup>th</sup> ed. APHA/AWWA/Water Environment Federation, Washington, DC, USA, 2005.

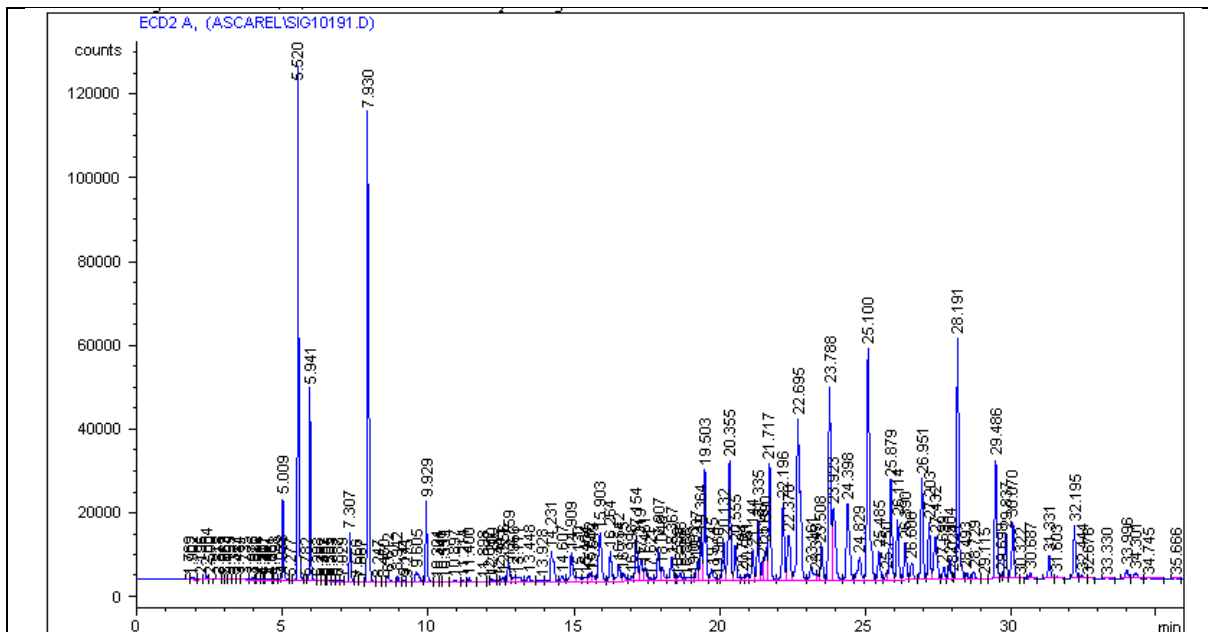
- Tamura, K., Peeterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology Evolution, 2011.
- Telh, M., *Avaliação do uso de reator aneróbio horizontal de leito fixo no tratamento da vinhaça sob condições termofílicas*; Dissertação de Mestrado. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos/USP. 2001.
- Tiedje, J.M., Quensen III, J.F., Chee-Stanford, J., Schimel, J.P., Boyd, S.A., *Microbial reductive dechlorination of PCBs*; Biodegradation 3: 231-240, 1993.
- Vazoller, R.F., *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. Tese de Doutorado. São Carlos: Escolade Engenharia de São Carlos/USP. 1995.
- Warner, J.C., Scheib, R.C., Svirbely, W.J., *The Solubility of Biphenyl in Non-Polar Solvents*. 1934.
- Wiegel, J., Wu, Q., *Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls, MiniReview*, FEMS Microbial Ecology, 32, 1-15, 2000.
- Winchell, L.J., Novak, P.J., *Enhancing polychlorinated biphenyl dechlorination in fresh water sediment with biostimulation and bioaugmentation*; Chemosphere 71, 176–182, 2008.
- Wollin, E. A., Wollin, M.J., Wolfe, R.S., *Formation of Methane by Bacterial Extracts*; The Journal of Biological Chemistry. 238, 8, 1963.
- Wu, Q, Bedard, D., Wiegel, J, *Influence of Incubation Temperature on the Microbial Reductive Dechlorination of 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Two Freshwater Sediments*; Applied and Environmental Microbiology 62, 4174–4179, 1996.
- Wu, Q., Wiegel, J., *Two anaerobic polychlorinated biphenyldehalogenating enrichments that exhibit different para-dechlorination specificities*. Applied and Environmental Microbrobiology 63, 4826–4832, 1997.

- Wu, Q, Bedard, D., Wiegel, J, *Effect of Incubation Temperature on the Route of Microbial Reductive Dechlorination of 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Contaminated and PCB-Free Freshwater Sediment*; Applied and Environmental Microbiology 63, 2836-2843, 1997.
- Wu, Q, Sowers, K. R., May, H.D., *Microbial Reductive Dechlorination of Aroclor 1260 in Anaerobic Slurries of Estuarine Sediments*; Applied and Environmental Microbiology 64, 1052–1058, 1998.
- Wu, Q, Sowers, K. R., Watts, J.E.M., May, H.D., *Identification of a Bacterium That Specifically Catalyzes the Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls with Doubly Flanked Chlorines*; Applied and Environmental Microbiology 68, 807–812, 2002.
- [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Yan, T., LaPara T.M., Novak, P.J., *The reductive dechlorination of 2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl in three different sediment cultures: evidence for the involvement of phylogenetically similar Dehalococcoides-like bacterial populations*; FEMS Microbiology Ecology 65, 248-261, 2006.
- Yan, T., LaPara T.M., Novak, P.J., *The Impact of Sediment Characteristics on PCB-dechlorinating Cultures: Implications for Bioaugmentation*; Bioremediation Journal 10, 143-151, 2006.
- Yang, S., Yoshida, N., Baba, D., Katayama, A., *Anaerobic Biodegradation of Biphenyl in various paddy soils and river sediment*; Chemosphere (2007), doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.002
- Yashiro, Y., Sakai, S., Ehara, M., Miyazaki, M., Yamaguchi, T., Imachi, H., *Methanoregula formicica* sp. Nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 53-59, 2011.

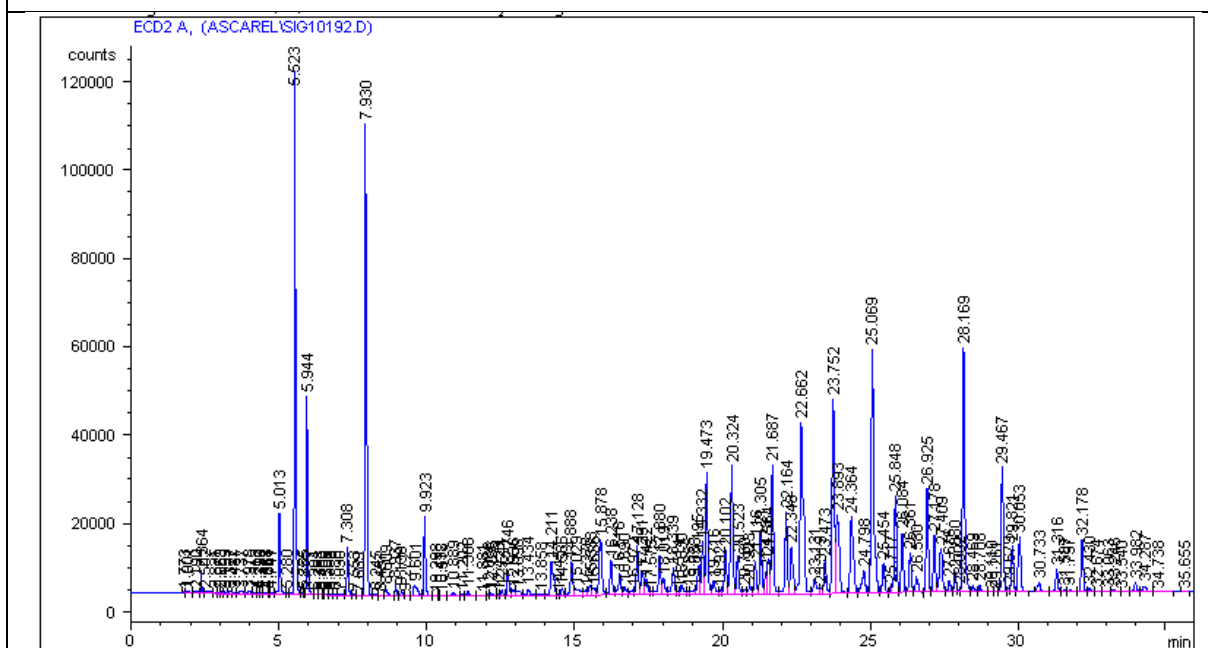
Yoshida, N., Takahashi, N., Hiraishi, A., *Phylogenetic Characterization of a Polychlorinated-Dioxin-Dechlorinating Microbial Community by Use of Microcosm Studies*; Applied and Environmental Microbiology 4325-4334, 2005.

Zaiat, M.; Vieira, L. G. T., Foresti, E., Spatial and temporal variations in monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor treating synthetic substrate; Water Research, **31**, 1760-1766, 1997.

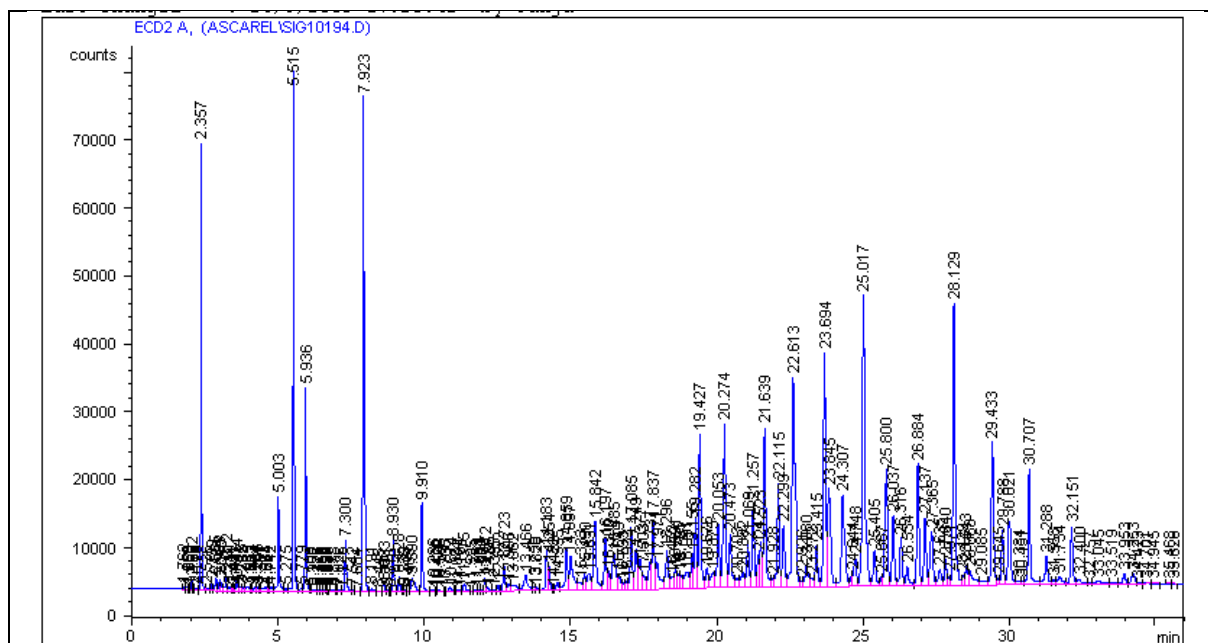
# ANEXO I



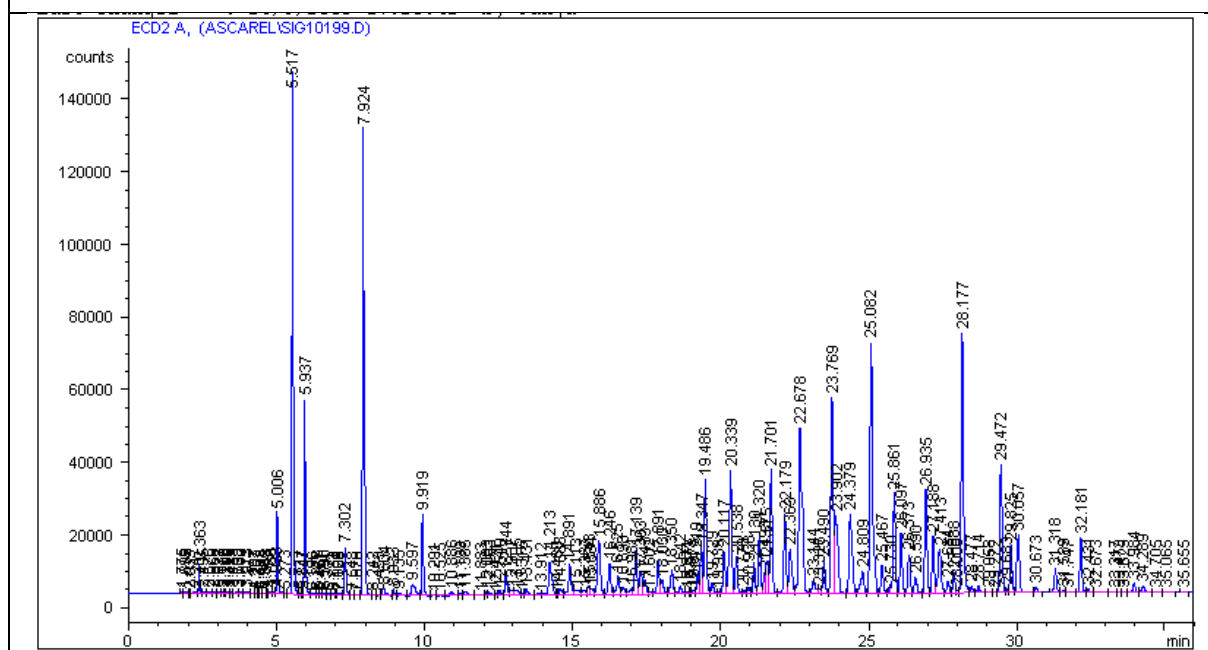
(a) Extração Hexano/Florisil/Silica



(b) Hexano/Florisil



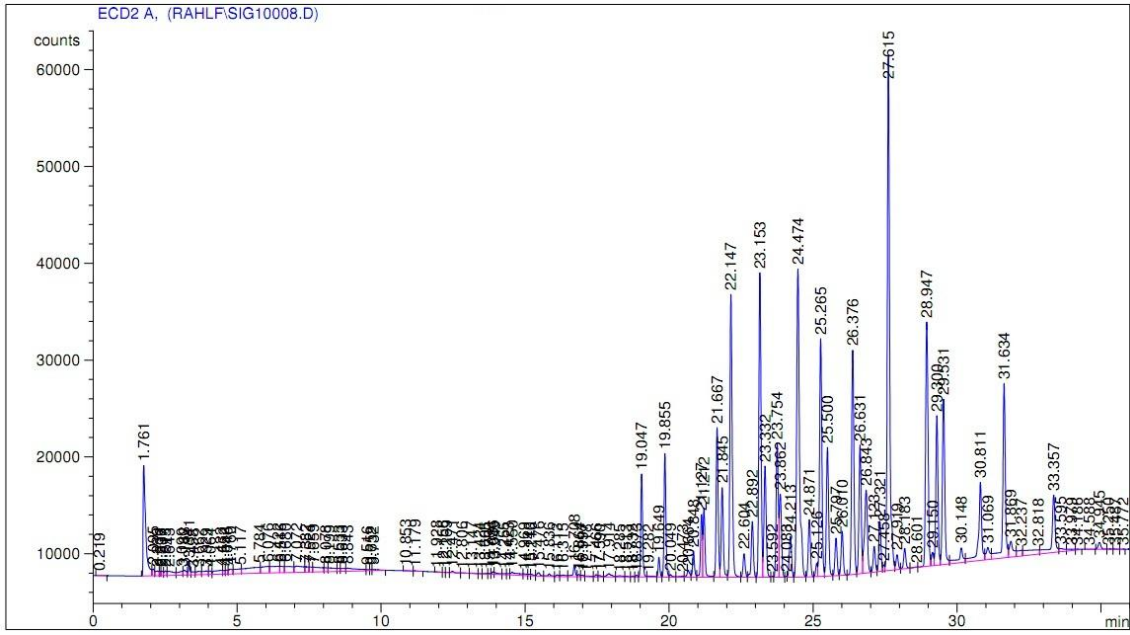
(c) Método de Quensen (1988)



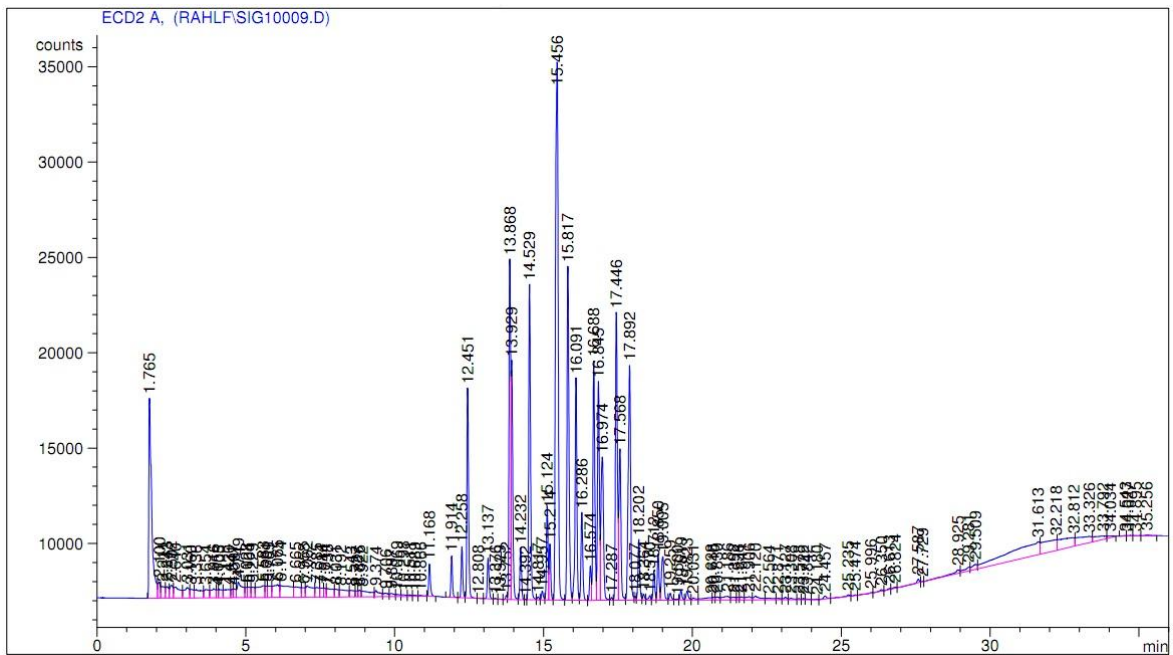
(d) Hexano/ácido sulfúrico/Florisol/Sílica

Cromatogramas dos diferentes métodos de extração que foram testados inicialmente:

- (a) Método de Hexano(extração)/Florisol/Silica (purificação); (b) Método de Hexano/Florisol;  
 (c) Método de Quensen et al. (1988); (d) Método de Hexano/Ácido Sulfúrico  
 (extração)/Florisol/Sílica (purificação)



Cromatograma do Padrão Aroclor 1260 (2mg/L) com alta cloração



Cromatograma do Padrão Aroclor 1016 (2mg/L) com baixa cloração

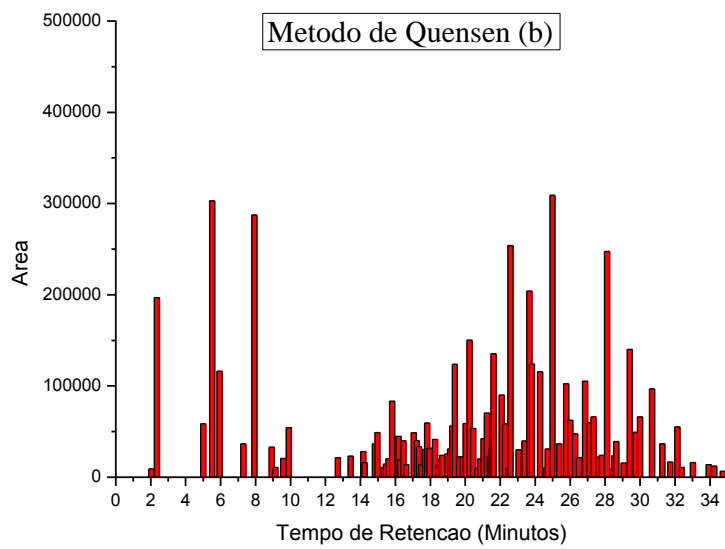
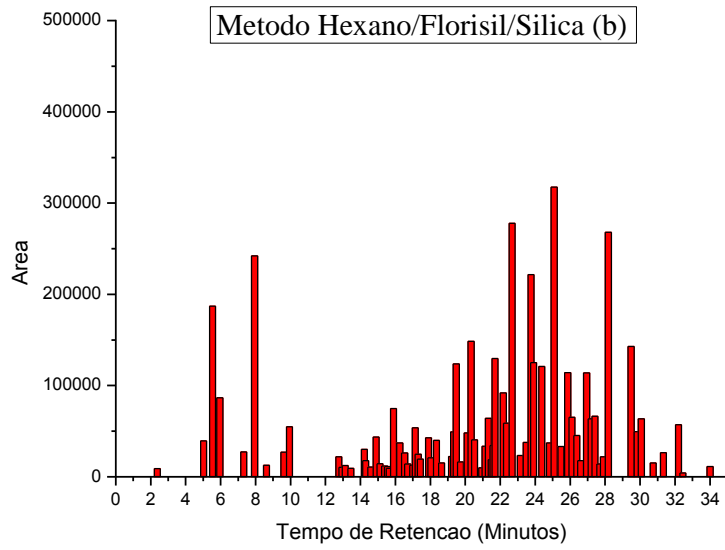


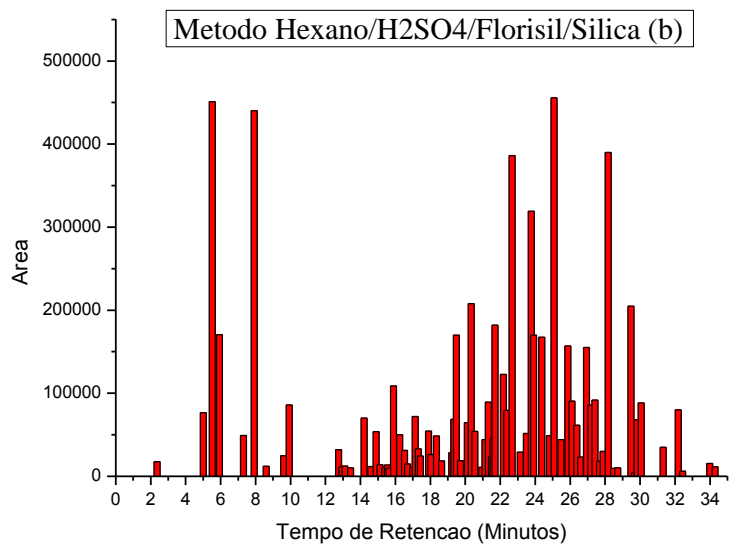
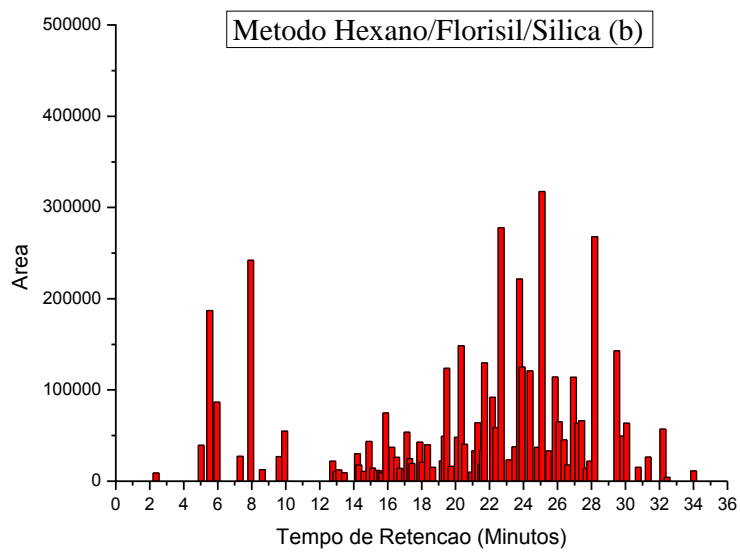
## Valores médios de metano (mmoles/gSTV) do ensaio sem esgotamento da M.O.

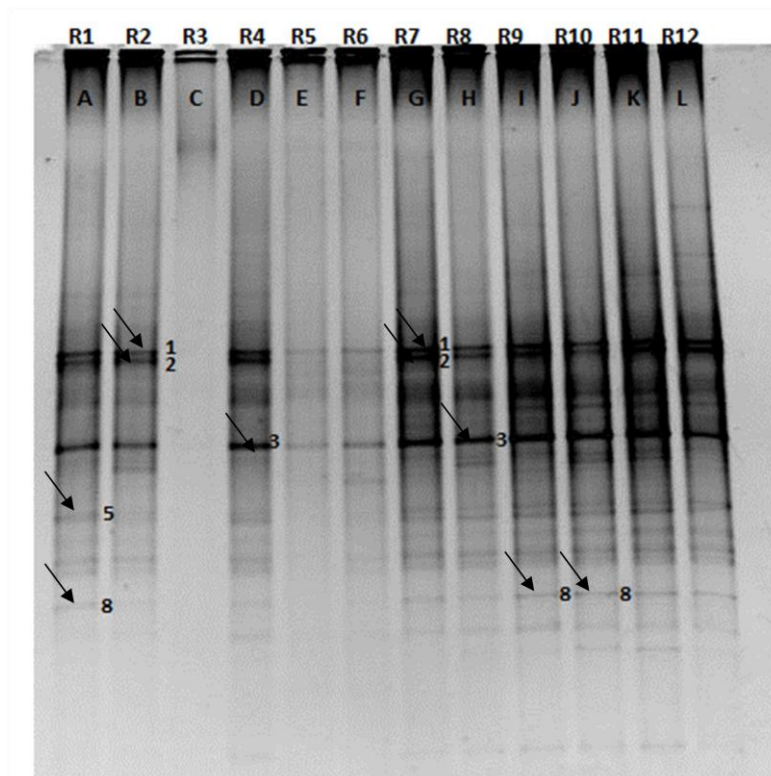
Tempo horas	R1	R2	R3	R4	R5	R	R7	R8	R9	R10
22	0,000345	0,006375	0,006914	0,00193	0,006527	0,005124	0,007246	0,002504	0,002759	0,003073
44	0,000537	0,021128	0,021162	0,00219	0,018671	0,014008	0,022123	0,003393	0,003268	0,003703
67	0,000639	0,035303	0,035496	0,002176	0,036326	0,024666	0,037352	0,003679	0,003385	0,003703
90	0,000481	0,034897	0,039683	0,002251	0,040922	0,003489	0,02942	0,00386	0,003592	0,003801
119	0,000906	0,037051	0,042343	0,00245	0,042083	0,003922	0,030503	0,003767	0,004063	0,004134
142	0,001016	0,038678	0,043346	0,002565	0,044036	0,004209	0,030826	0,004098	0,004316	0,004301
163	0,001083	0,037201	0,042095	0,00258	0,042867	0,004236	0,029468	0,004136	0,004457	0,00431
186	0,001182	0,035957	0,03897	0,002585	0,036796	0,00436	0,027925	0,004586	0,004501	0,004152
215	0,00121	0,035225	0,036959	0,002544	0,035008	0,004445	0,025908	0,004129	0,004653	0,004097
239	0,001232	0,033154	0,034846	0,002528	0,03339	0,004426	0,025333	0,004033	0,004524	0,003917
262	0,001353	0,033168	0,034868	0,00269	0,030145	0,00465	0,025563	0,004442	0,004974	0,004148
287	0,001546	0,036415	0,037517	0,003002	0,030145	0,005179	0,027318	0,004812	0,005565	0,004462
306	0,001613	0,036576	0,037035	0,003073	0,030145	0,005403	0,027406	0,004318	0,005746	0,004562

## Valores médios de metano (mmoles/gSTV) do ensaio com esgotamento da M.O.

Tempo horas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
2.0	0.00007	0.00016	0.00016	0.00021	0.00074	0.00056	0.00075	0.00079	0.00054	0.00057	0.00046	0.00043
4.0	0.00012	0.00040	0.00041	0.00024	0.00121	0.00099	0.00128	0.00125	0.00104	0.00113	0.00102	0.00101
6.0	0.00014	0.00064	0.00065	0.00026	0.00173	0.00146	0.00182	0.00168	0.00152	0.00163	0.00150	0.00145
8.2	0.00016	0.00094	0.00088	0.00026	0.00223	0.00190	0.00227	0.00208	0.00194	0.00204	0.00193	0.00183
10.2	0.00019	0.00121	0.00116	0.00029	0.00260	0.00213	0.00257	0.00240	0.00205	0.00224	0.00231	0.00204
12.1	0.00020	0.00171	0.00162	0.00032	0.00322	0.00233	0.00312	0.00277	0.00228	0.00247	0.00296	0.00220
16.3	0.00021	0.00230	0.00223	0.00027	0.00296	0.00205	0.00280	0.00219	0.00173	0.00195	0.00278	0.00172
21.3	0.00017	0.00241	0.00237	0.00024	0.00357	0.00188	0.00330	0.00229	0.00176	0.00204	0.00267	0.00133
40.5	0.00026	0.00720	0.00770	0.00046	0.00871	0.00224	0.00819	0.00259	0.00213	0.00247	0.00914	0.00222
47.5	0.00030	0.00986	0.01010	0.00051	0.01205	0.00242	0.01023	0.00280	0.00221	0.00266	0.01214	0.00232
55.2		0.01177	0.01278		0.01389		0.01086				0.01371	
67.2	0.00031	0.01541	0.01738	0.00056	0.01898	0.00233	0.01164	0.00270	0.00222	0.00257	0.02003	0.00231
79.2		0.02189	0.02122		0.02160		0.01331				0.02219	
92.1	0.00038	0.02190	0.01927	0.00065	0.02108	0.00250	0.01358	0.00282	0.00224	0.00282	0.02493	0.00233
98.5		0.02389	0.02255		0.02423		0.01385				0.02549	
141.2		0.02324	0.02219		0.02333		0.01399				0.02326	
164.2	0.00050	0.02252	0.02154	0.00091	0.02118	0.00271	0.01455	0.00310	0.00252	0.00271	0.02458	0.00228
187.5		0.02105	0.02124		0.01983		0.01430				0.02322	







DGGE das amostras dos reatores para o Dominio *Bacteria* (968 FGC e 1392 R), Nielsen *et al.* (1999)