

**Eduardo Bosco Mattos Cattony**

**Remoção de etanol, benzeno e tolueno em reator  
anaeróbio horizontal de leito fixo na presença de  
sulfato**

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP
EXEMPLAR REVISADO
Data de entrada no Serviço... 28 / 06 / 05
Ass.: <i>Levan</i>

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Hidráulica e Saneamento.

**Orientadora: Profa. Dr. Maria Bernadete Amâncio Varesche.**



DEDALUS - Acervo - EESC



31100052186

Class. TESE EESC

Curr. 144L

Tombo T169105

Sysno 1453973

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

C369r

Cattony, Eduardo Bosco Mattos

Remoção de etanol, benzeno e tolueno em reator anaeróbico horizontal de leito fixo na presença de sulfato / Eduardo Bosco Mattos Cattony. -- São Carlos, 2005.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Benardete Amâncio Varesche.

1. Tolueno. 2. Benzeno. 3. Etanol. 4. Reator anaeróbico. 5. Biofilme. 6. Redução de sulfato. 7. PCR-DGGE. I. Título.



**FOLHA DE JULGAMENTO**

Candidato: Bacharel **EDUARDO BOSCO MATTOS CATTONY**

Tese defendida e julgada em 29-04-2005 perante a Comissão Julgadora:



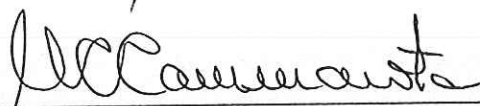
Profª. Dra. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA** (Orientador)  
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovado



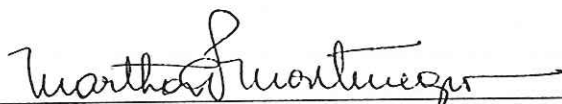
Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovado



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

aprovado



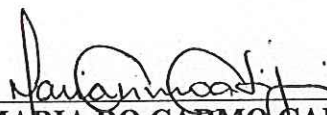
Profª. Dra. **MARTHA DE ALMEIDA PRADO MONTENEGRO**  
(Fundação Nacional de Saúde/FUNASA)

aprovado



Profª. Dra. **MIRNA JANUÁRIA LEAL GODINHO**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO



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

*Em memória de meu querido avô  
Pedro de Queiróz Cattony*

## **AGRADECIMENTOS**

Professora Maria Bernadete pela orientação e incentivo, sem o qual este trabalho não teria acontecido.

CAPES pela concessão da bolsa.

Minha família e minha querida Estela.

A Beth e a Janja, pela amizade e paciência na hora das infinitas dúvidas.

A todos os meus amigos do LPB pelo convívio no laboratório.

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas.....	vi
Lista de símbolos e abreviaturas.....	viii
<b>Resumo.....</b>	<b>ix</b>
<i>Abstract</i> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1. Bactérias redutoras de sulfato.....	5
3.2. Arquêas metanogênicas.....	9
3.3. Biodegradação de compostos aromáticos.....	11
3.4. Caracterização microbiana.....	17
3.5. Reação de polimerização em cadeia.....	19
3.6. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante.....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Meios de cultivo.....	25
4.2. Inóculo.....	31
4.3. Ensaio em reatores em batelada.....	31
4.4. Ensaio contínuo em reator anaeróbico horizontal de leito fixo.....	32
4.4.1. Material suporte para crescimento microbiano.....	32
4.4.2. Condições operacionais.....	33
4.4.3. Amostragem.....	35
4.5. Análises físico-químicas.....	36
4.6. Análises cromatográficas.....	36
4.7. Modelo cinético.....	37
4.8. Exames microscópicos.....	38
4.9. Análises de biologia molecular.....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
5.1. Ensaio de enriquecimento em batelada.....	42
5.2. Ensaio contínuo com tolueno e benzeno.....	49

5.3. Ensaio complementares.....	83
6. <b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
7. <b>RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>93</b>
8. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>109</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade e afiliação de microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos saturados e aromáticos na ausência de oxigênio.....	13
Figura 2. Cinco mecanismos possíveis para a ativação do anel de benzeno.....	15
Figura 3. Dissociação da molécula de DNA no gel desnaturante de DGGE.....	20
Figura 4. Diferentes seqüências de pares de bases podem ser separados.....	21
Figura 5. Diagrama das fases experimentais.....	24
Figura 6. Reatores em batelada.....	31
Figura 7. Esquema do reator anaeróbico horizontal de leito fixo.....	32
Figura 8. Morfologia dos alvéolos.....	33
Figura 9. Diagrama das fases operacionais 1, 2, 3, 4 e 5 em RAHLF.....	34
Figura 10. Diagrama do modelo cinético proposto.....	37
Figura 11. Variação temporal de matéria orgânica (DQO), sulfato e produção de metano em reatores em batelada alimentados com meio Beller.....	43
Figura 12. Variação temporal de matéria orgânica (DQO), sulfato e produção de metano em reatores em batelada alimentados com meio Zinder....	43
Figura 13. Variação temporal de ácido láctico e etanol em reatores em batelada alimentados com meio Beller.....	44
Figura 14. Variação temporal de ácido láctico e etanol em reatores em batelada alimentados com meio Zinder.....	44
Figura 15. Morfologias observadas em microscopia de contraste de fase e fluorescência de amostras dos reatores em batelada alimentados com meio Zinder.....	47
Figura 16. Morfologias observadas em microscopia de contraste de fase e fluorescência de amostras dos reatores em batelada alimentados com meio Beller.....	48
Figura 17. Variação temporal da matéria orgânica (expressa em DQO) nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.....	51
Figura 18. Variação temporal da DQO nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.....	52



Figura 19.	Varição temporal de sulfato nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.....	53
Figura 20.	Varição temporal de sulfato nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.....	53
Figura 21.	Varição temporal do pH nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.....	55
Figura 22.	Varição temporal do pH nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.....	55
Figura 23.	Varição temporal da geração de alcalinidade nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.....	56
Figura 24.	Varição temporal da geração de alcalinidade nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.....	56
Figura 25.	Varição temporal da geração de ácidos nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.....	58
Figura 26.	Varição temporal da geração de ácidos nas diferentes fases operacionais com benzeno.....	58
Figura 27.	Varição temporal de sólidos suspensos voláteis nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.....	60
Figura 28.	Varição temporal de sólidos suspensos voláteis nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.....	60
Figura 29.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e ácido acético na fase de enriquecimento (fase 1) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.....	62
Figura 30.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e ácido acético na fase de enriquecimento (fase 1) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno.....	63
Figura 31.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e tolueno na fase 2 (2,0 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.....	63
Figura 32.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e benzeno na fase 2 (2,0 mg.l <sup>-1</sup> de benzeno) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno.....	64
Figura 33.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e tolueno na fase 3 (5,0 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.....	64

Figura 34.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e benzeno na fase 3 (5,0 mg.l <sup>-1</sup> de benzeno) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno .....	65
Figura 35.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e tolueno na fase 4 (7,0 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.....	65
Figura 36.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e benzeno na fase 4 (7,0 mg.l <sup>-1</sup> de benzeno) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno .....	66
Figura 37.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e tolueno na fase 5 (9,0 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.....	66
Figura 38.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e benzeno na fase 5 (10,0 mg.l <sup>-1</sup> de benzeno) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno.....	67
Figura 39.	Microscopia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF na fase 4 (com 7,0 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno).....	70
Figura 40.	Microscopia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF na fase 4 (com 7,0 mg.l <sup>-1</sup> de benzeno).....	71
Figura 41.	Microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência de amostras do biofilme durante a operação do RAHLF na fase 3 (com 5,0 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno).....	72
Figura 42.	Microscopia óptica de contraste de fase de amostra do biofilme do RAHLF na fase 3 (com 5,0 mg.l <sup>-1</sup> de benzeno).....	73
Figura 43.	Gel de DGGE (gradiente de 45-55%) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para Domínio <i>Bacteria</i> dos pontos C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais.....	74
Figura 44.	Gel de DGGE (gradiente de 45-55%) com set de <i>primers</i> específico para Domínio <i>Bacteria</i> no ponto de amostragem C/D 20 em todas as fases operacionais do RAHLF com tolueno.....	75
Figura 45.	Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para Domínio <i>Bacteria</i> dos pontos C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.....	76



Figura 46.	Gel de DGGE (gradiente de 45-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para Domínio <i>Bacteria</i> no ponto de amostragem C/D 20 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.....	77
Figura 47.	Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com <i>primers</i> específico para BRS dos pontos C/D 0 e 4 em todas as fases operacionais do RAHLF com tolueno.....	78
Figura 48.	Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para BRS no ponto de amostragem C/D 20 em todas as fases operacionais do RAHLF com tolueno.....	78
Figura 49.	Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para BRS dos pontos de amostragem C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.....	79
Figura 50.	Gel de DGGE (gradiente de 40-65%) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para BRS do ponto de amostragem C/D 20 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.....	80
Figura 51.	Géis de DGGE (A, gradiente de 40-60% – B, gradiente de 45-55%,) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para Domínio <i>Archaea</i> dos diferentes pontos de amostragem do RAHLF alimentado com tolueno: (A) amostras de C/D 0, 4, 8 e 20 na fase 3 (com 7,0 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno) e (B) amostras de C/D 0 nas fases 1, 4 e 5.....	81
Figura 52.	Gel de DGGE (gradiente de 45-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para Domínio <i>Archaea</i> dos pontos de amostragem C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.....	82
Figura 53.	Gel de DGGE (gradiente de 45-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de <i>primers</i> específico para Domínio <i>Archaea</i> do ponto de amostragem C/D 20 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.....	83
Figura 54.	Variação temporal da matéria orgânica (expressa em DQO), nas diferentes fases operacionais do RAHLF no ensaio complementar com benzeno.....	85
Figura 55.	Variação temporal da matéria orgânica (expressa em DQO) nas diferentes fases operacionais do RAHLF no ensaio complementar com tolueno.....	85

Figura 56.	Varição temporal do sulfato nas diferentes fases operacionais do RAHLF no ensaio complementar com tolueno.....	86
Figura 57.	Varição temporal do sulfato nas diferentes fases operacionais do RAHLF no ensaio complementar com benzeno.....	86
Figura 58.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e benzeno ( $7 \text{ mg.l}^{-1}$ ) no ensaio complementar.....	87
Figura 59.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e benzeno ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) no ensaio complementar.....	88
Figura 60.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e benzeno ( $15 \text{ mg.l}^{-1}$ ) no ensaio complementar.....	88
Figura 61.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e tolueno ( $9 \text{ mg.l}^{-1}$ ) no ensaio complementar.....	89
Figura 62.	Varição espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e tolueno ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) no ensaio complementar.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características fenotípicas e filogenéticas das BRS.....	7
Tabela 2	Características fenotípicas e filogenéticas das arqueas metanogênicas.....	11
Tabela 3	Energia livre das reações de transformação anaeróbia de benzeno e tolueno.....	16
Tabela 4	Composição do meio de cultivo Zinder.....	26
Tabela 5	Composição da solução de vitaminas para meio Zinder.....	26
Tabela 6	Composição da solução traço de metais para meio Zinder.....	27
Tabela 7	Composição para o meio de cultura para BRS.....	28
Tabela 8	Solução de vitaminas para meio BRS.....	29
Tabela 9	Composição dos elementos traços para meio BRS.....	29
Tabela 10	Solução de selenito-tungstato para meio BRS.....	30
Tabela 11	Solução de tiamina para meio BRS.....	30
Tabela 12	Solução de vitaminas B <sub>12</sub> para meio BRS.....	30
Tabela 13	<i>Primers</i> usados nos experimentos com PCR.....	39
Tabela 14	Reações realizadas pelo metabolismo energético de <i>Desulfobulbus propionicus</i> .....	45
Tabela 15	Diversidade morfológica observada em amostras dos reatores em batelada.....	49
Tabela 16	Carga orgânica volumétrica referente a DQO aplicada, removida e residual, nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.....	50
Tabela 17	Carga orgânica volumétrica referente a DQO aplicada, removida e residual, nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.....	50
Tabela 18	Valores do SSV das espumas de poliuretano após a fixação de biomassa e ao final da operação do reator.....	59
Tabela 19	Valores do SSV das espumas de poliuretano após a fixação de biomassa e ao final da operação do reator.....	59
Tabela 20	Parâmetros cinéticos aparentes do processo do ensaio com tolueno..	67

Tabela 21	Parâmetros cinéticos aparentes do processo do ensaio com benzeno.	68
Tabela 22	Diversidade biológica do biofilme nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.....	69
Tabela 23	Diversidade morfológica do biofilme nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.....	69
Tabela 24	Parâmetros cinéticos aparentes do processo.....	90



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

### *Símbolos*

$C_{DQO}$	Concentração de matéria orgânica (mg DQO.l <sup>-1</sup> )
$C_{DQO\_R}$	Concentração de matéria orgânica residual (mg DQO.l <sup>-1</sup> )
$C_{SO_4^{2-}}$	Concentração de sulfato (mg sulfato. l <sup>-1</sup> )
$C_{TOLUENO}$	Concentração de composto aromático (mg <sub>tolueno</sub> . l <sup>-1</sup> )
$C_{BENZENO}$	Concentração de composto aromático (mg <sub>benzeno</sub> . l <sup>-1</sup> )
D	Diâmetro do reator
k (h <sup>-1</sup> )	Coefficientes cinéticos aparentes para cada conversão
C	Comprimento do reator
v <sub>s</sub>	Velocidade superficial

### *Abreviaturas*

DQO	Demanda química de oxigênio
BTEX	Benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
RAHLF	Reator anaeróbico horizontal de leito fixo
TDH	Tempo de detenção hidráulica
PCR	Reação de polimerização em cadeia
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
UASB	Reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo
SSV	Sólidos suspensos voláteis

## RESUMO

Cattony, E. B. M. (2005). *Remoção de etanol, benzeno e tolueno em reator anaeróbio horizontal de leito fixo na presença de sulfato*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

A princípio, foram realizados ensaios de enriquecimento em reatores em batelada, sob agitação, para avaliar a melhor condição nutricional, meio Beller ou meio Zinder, para crescimento microbiano e remoção de sulfato. Posteriormente, esta melhor condição nutricional foi usada para crescimento microbiano e remoção de etanol, tolueno e benzeno em ensaios contínuos em dois reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), sob condições de redução de sulfato. Os sistemas foram inoculados com lodo de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo tratando águas residuárias provenientes de abatedouro de aves. Os RAHLF consistiram de biomassa imobilizada em espumas de poliuretano submetidas a concentrações de 91 e 550 mg.l<sup>-1</sup> de sulfato ferroso e sulfato de sódio, respectivamente, para promoção de ambiente sulfetogênico. Tolueno e benzeno foram adicionados, separadamente nos reatores, em concentrações iniciais de 2,0 mg.l<sup>-1</sup>, seguidas de aumentos que variaram até as concentrações finais de 9 e 10 mg.l<sup>-1</sup>, para tolueno e benzeno, respectivamente. O etanol foi adicionado em ambos reatores a concentração inicial de 170 mg.l<sup>-1</sup>, seguido de aumento de até 960 mg.l<sup>-1</sup>. Os reatores foram operados a 30 (± 2) °C com tempo de detenção hidráulica de 12 h. A eficiência na remoção da matéria orgânica nos dois reatores foi próxima a 90% com taxa máxima de degradação de tolueno de 0,06 mg<sub>tolueno</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>SSV</sub>.d<sup>-1</sup>, e 0,07 mg<sub>benzeno</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>SSV</sub>.d<sup>-1</sup>, para benzeno. A redução de sulfato foi de 99,9% em todas as condições nutricionais nos dois reatores. A caracterização microscópica do biofilme revelou diversas morfologias e o perfil de DGGE mostrou variação nas populações de BRS e de representantes do Domínio *Bacteria* em geral, o que foi associado com as crescentes concentrações de tolueno e benzeno nos meios de alimentação. Finalmente, o presente trabalho demonstrou que unidades compactas de RAHLF, sob condições sulfetogênicas, oferecem alternativa para a biorremediação *in situ* de compostos aromáticos.

**Palavras chave:** Tolueno, benzeno, etanol, reator anaeróbio, biofilme, redução de sulfato e PCR-DGGE.

## ABSTRACT

Cattony, E. B. M. (2005). *Ethanol, Toluene and Benzene Removal in a Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Biomass Reactor in the Presence of Sulfate*. Ph. D. Thesis – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

Previously, enrichment assays in batch reactors were used to evaluation of best nutritional condition, Beller or Zinder medium, to microorganism growth and sulfate removal. Further, the chosen nutritional condition was used in two horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactors under sulphate-reducing condition, which were exposed to different amounts of ethanol, toluene and benzene. The systems were inoculated with sludge taken from up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors treating refuses from a poultry slaughterhouse. The HAIB reactors comprised of an immobilized biomass on polyurethane foam and ferrous and sodium sulphate solutions were used (91 and 550 mg.l<sup>-1</sup>, respectively), to promote a sulphate-reducing environment. Toluene and benzene were added at an initial concentration of 2.0 mg.l<sup>-1</sup> followed by an increased range of different amendments. Ethanol was added at an initial concentration of 170 mg.l<sup>-1</sup> followed by an increased range of 960 mg.l<sup>-1</sup>. The reactors were operated at 30 (± 2) °C with hydraulic detention time of 12 h. Organic matter removal efficiency of 90%, in both systems, with a maximum toluene degradation rate of 0.06 mg<sub>toluene</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>VSS</sub>.d<sup>-1</sup> and with a maximum benzene degradation rate of 0.07 mg<sub>benzene</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>VSS</sub>.d<sup>-1</sup>. Sulfate reduction was close to 99.9% for all-nutritional amendments in both systems. Biofilm microscopic characterization revealed a diversity of microbial morphologies and DGGE-profiling showed a variation of *bacterial* and sulphate reducing bacteria (SRB) populations, which were, significantly, associated with toluene and benzene amendments. Thus, this work demonstrates that compact units of HAIB reactors, under sulphate reducing conditions, are a potential alternative for *in situ* aromatic compounds bioremediation.

**Key-words:** Toluene, benzene, ethanol, anaerobic reactor, biofilm, sulfate reducing and PCR-DGGE.



## 1. INTRODUÇÃO

O saneamento ambiental é tema indiscutivelmente importante na medida que a necessidade da preservação e recuperação de ecossistemas naturais vem se tornando problema grave para a sociedade. A atividade humana gera diversos resíduos que muitas vezes apresentam compostos orgânicos de difícil degradação (recalcitrantes). Dentro desta categoria estão o tolueno e benzeno que podem ser tóxicos e poluentes ambientais quando em altas concentrações (MANOHAR & KAREGOUDAR, 1998). Estes hidrocarbonetos aromáticos estão presentes no dia-a-dia da sociedade humana de forma diversificada (BALBA *et al.*, 1998; BOOPATHY *et al.*, 1998; CORSEUIL & FERNANDES, 1999). O tolueno é largamente empregado na produção do benzeno, tintas, vernizes, colas, celulose, borracha, óleos, resinas e diversas outras aplicações (BALBA *et al.*, 1998). O benzeno é utilizado como matéria-prima e intermediário na produção de substâncias químicas, como por exemplo, estireno, fenol, ciclohexano, anidro maleico, e também utilizado em indústria de detergentes, de explosivos, farmacêutica, de inseticidas, de fotogravura, da borracha, de plásticos, de solventes e removedores de tintas (BOOPATHY *et al.*, 1998).

A contaminação de águas subterrâneas, por benzeno e tolueno causada pelo vazamento de tanques de postos de combustíveis, tornou-se problema mundial e, recentemente, tem chamado a atenção no Brasil. Além do benzeno e tolueno, o etilbenzeno e xilenos (BTEX) estão entre os compostos aromáticos mais problemáticos, encontrados na gasolina, devido a sua razoável solubilidade em água o que reflete em alto potencial de contaminação (COATES & ANDERSON, 2000; CORSEUIL *et al.*, 2004). No Brasil, onde a gasolina é composta de mistura de 76% de gasolina e 24% de etanol, o problema de contaminação se torna maior, na medida em que, o etanol aumenta a solubilidade dos compostos aromáticos em água (CORSEUIL *et al.*, 2004).

Para o tratamento de águas contaminadas com compostos aromáticos, processos anaeróbios têm sido preferencialmente estudados, para biorremediação *in situ*, nos últimos anos (CUNNINGHAM *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2005). DAMIANOVIC (1997), BOLAÑOS (2001), OLIVEIRA (2001) e DE NARDI (2002), analisaram a degradação de compostos orgânicos aromáticos em reatores anaeróbios horizontais de

leito fixo (RAHLF) e verificaram que a associação de microrganismos, na forma de biofilmes, foi determinante para a remoção de pentaclorofenol (PCP), fenol, formaldeído e BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), respectivamente.

Portanto, dentro deste contexto a microbiologia tem papel fundamental. A capacidade de catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, fizeram das bactérias a principal alternativa para os problemas gerados pelos rejeitos lançados no meio ambiente ou mesmo em sistemas de tratamento (KORDA *et al.*, 1997).

O estudo da comunidade microbiana no ambiente ou em sistema de tratamento é de crucial importância para o entendimento dos processos metabólicos envolvidos na degradação. O uso de técnicas de Biologia Molecular para descrever populações em comunidades naturais vem ocorrendo desde meados de 1980 (AMANN *et al.*, 1995). Esta nova abordagem de pesquisa vem ganhando força devido às limitações das técnicas da microbiologia tradicional.

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm identificado a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em sítios contaminados com hidrocarbonetos aromáticos, sugerindo, que este grupo de microrganismos, apresente adaptações metabólicas para a degradação destes compostos (VOORDOUW *et al.* 1990; REUTER *et al.* 1994; LEU *et al.* 1998; ROONEY-VARGA *et al.* 1999; WATANABE *et al.* 2000).

Sendo assim, favorecer o crescimento de BRS em sistemas de tratamento, visando a remoção de compostos aromáticos, pode ser vantajoso. Efluentes industriais ricos em sulfato e hidrocarbonetos, também poderiam ser alvo desta abordagem de tratamento. Esgotos sanitários apresentam, costumeiramente, concentrações baixas que variam entre 50 a 200 mg.l<sup>-1</sup> de sulfato, enquanto que certos despejos industriais podem conter alguns milhares de miligrama por litro (CALLADO, 1992). Diversas atividades industriais utilizam enxofre de forma diversificada, como por exemplo, na forma de sulfato de sódio e dióxido de enxofre. Porém, o sulfato é a forma de enxofre mais comumente encontrada, no efluente destas indústrias, devido a processos oxidativos. O sulfato pode ser encontrado no efluente das indústrias de papel e celulose, da fermentação alcoólica, de material fotográfico, no efluente gerado por curtumes e de diversas indústrias alimentícias (LENS *et al.*, 1998).

Sendo assim, este projeto de pesquisa visou dar continuidade ao estudo da remoção do BTEX realizado por DE NARDI *et al.* (2002), em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). No presente trabalho consórcio microbiano

submetido a presença de sulfato foi estudado. Dentro deste contexto, o uso de RAHLF foi analisado quanto a sua capacidade de enriquecer biofilme sulfetogênico capaz de remover tolueno e benzeno, constituindo desse modo, nova alternativa para a biorremediação *in situ* de compostos aromáticos.

A princípio, foram realizados ensaios de enriquecimento em reatores em batelada sob agitação para avaliar a melhor condição de crescimento microbiano e remoção de sulfato. Posteriormente, a condição nutricional escolhida foi usada para crescimento microbiano e remoção de etanol, tolueno e benzeno em ensaios contínuos em RAHLF. A diversidade microbiana relacionada ao Domínio *Bacteria*, Domínio *Archaea* e grupo das BRS, nos diferentes ensaios, foi monitorada através da técnica PCR-DGGE e exames microscópicos.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a aplicabilidade do RAHLF, em escala laboratorial e sob condições sulfetogênicas, como alternativa para biorremediação de águas contaminadas com etanol, tolueno e benzeno.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a melhor condição nutricional para o crescimento de bactérias redutoras de sulfato em reatores em batelada.
- Avaliar a remoção de etanol, benzeno e tolueno sob condições sulfetogênicas em RAHLF.
- Avaliar a cinética de remoção do benzeno e tolueno.
- Analisar a comunidade microbiana ao longo do RAHLF nas diferentes condições nutricionais.
- Comparar a diversidade microbiana antes e após a adição de benzeno e tolueno.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BOLAÑOS (2001) e DE NARDI (2002) estudaram a aplicação de biofilmes na remoção de compostos aromáticos em reatores de leito fixo (RAHLF). BOLAÑOS (2001) observou a presença de bacilos, provavelmente relacionados com a oxidação de fenol. DE NARDI (2002) verificou no biofilme anaeróbio, em reator aplicado ao tratamento de BTEX, a presença de cistos de *Methanosarcina sp.*, *Methanosaeta sp.*, e bacilos fluorescentes. Entre as BRS prevaleceram morfologias semelhantes a *Desulfovibrio*, *Desulfococcus* e *Desulfobulbus*. Provavelmente, a associação entre arqueas e bactérias, na forma de biofilme, em ambos trabalhos, tenha potencializado a capacidade metabólica dos sistemas de tratamento.

Para o melhor entendimento da microbiologia aplicada, nos trabalhos anteriormente citados, e que foi, também, abordada no presente trabalho, a seguir, estão alguns tópicos considerados pertinentes ao estudo de consórcios microbianos na forma de biofilme para a degradação de compostos aromáticos. As inter-relações, bem como as peculiaridades de cada grupo de microrganismos, são abordadas. Posteriormente, está apresentada uma revisão sobre degradação de compostos aromáticos, por microrganismos anaeróbios, e sobre as técnicas de caracterização microbiana.

#### 3.1. Bactérias redutoras de sulfato

A classificação de bactérias redutoras do sulfato se baseia, principalmente, nas características nutricionais e morfológicas. As bactérias redutoras de sulfato são, provavelmente, um dos mais antigos microrganismos existentes sobre a terra. Constituem grupo de bactérias anaeróbias morfológicamente distintas, que têm em comum a capacidade de reduzir sulfato a sulfeto, em reações de conservação de energia (REUTER *et al.*, 1994).

Esta redução biológica ocorre através de dois caminhos: assimilação e desassimilação. Na assimilação, o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) gerado é imediatamente utilizado como fonte de enxofre na biossíntese de proteínas, aminoácidos, esqueleto de carbono de estruturas e de outros componentes bioquímicos que contém enxofre. Na dissimilação, sulfato, sulfito ou enxofre elementar, são reduzidos a sulfeto de

hidrogênio, e utilizados como aceptores finais de elétrons no metabolismo respiratório. Neste processo, o sulfeto de hidrogênio não é diretamente incorporado nos aminoácidos e outros compostos bioquímicos celulares (RABUS & WIDDEL, 1995a).

De acordo com SCHAUDER & KROGER (1993) os principais nutrientes requeridos pelas BRS são: amônia como fonte de nitrogênio; sulfato, sulfito e tiosulfato como fonte de enxofre; formiato, etanol, acetato, fumarato, malato, lactato, piruvato, propionato e succinato como fontes de carbono.

As BRS podem ser divididas em dois grupos metabólicos distintos: as oxidadoras incompletas, as quais oxidam compostos como lactato a acetato e dióxido de carbono e as oxidadoras completas (acetoclásticas), as quais oxidam completamente os substratos orgânicos, incluindo o acetato, a dióxido de carbono (WIDDEL & BACK, 1992) (Tabela 1).

Entre as redutoras incompletas, a mais versátil provavelmente é *Desulfovibrio* sp. a qual utiliza hidrogênio, lactato, piruvato, malato, fumarato, etanol, glicerol e aminoácidos. Sob condições ótimas, espécies de *Desulfovibrio* podem atingir tempo de geração de 3 a 4 horas usando hidrogênio, lactato ou piruvato (WIDDEL & PFENNING, 2001).

As redutoras completas são nutricionalmente mais versáteis em relação às incompletas. Porém, a eficiência na utilização do acetato não é a mesma para todas as oxidadoras completas. Tipos especializados como *Desulfobacter*, usam acetato como único substrato orgânico e crescem vigorosamente com tempo de geração de 20 horas (MADIGAN, 2004). As outras oxidadoras completas preferem outros ácidos orgânicos ou álcool e usam acetato muito lentamente com baixa produção celular (WIDDEL & BACK, 1992).

O habitat principal das BRS é o ambiente marinho, onde o sulfato encontra-se na concentração de 29mM (aproximadamente, 3 g.l<sup>-1</sup>) para salinidade de 35% (BATTERSBY, 1988). Além disso, são encontradas, também, em outros ambientes, incluindo solo, lodos de esgoto, sedimentos de água doce e rúmen (MADIGAN, 2004).

A competição entre as BRS e arqueas metanogênicas em reatores anaeróbios depende de vários fatores como a cinética do crescimento, termodinâmica, características de imobilização, limitação de substrato na biomassa agregada, concentração de sulfeto não ionizado, composição do meio, temperatura e pH. A competição, também pode ser influenciada pela composição da comunidade microbiana do lodo usado para a colonização do reator (VALLERO, 2003).



Tabela 1. Características fenotípicas e filogenéticas das BRS.

Gênero	Características	DNA (mol % GC)
<b>Redutoras de sulfato não oxidadoras de acetato (oxidadoras incompletas)</b>		
<i>Desulfovibrio</i>	Bacilos curvos com flagelação polar, sem esporos; Gram-negativos; contém desulfovirdina; doze espécies, uma termofílica	46-61
<i>Desulfomicrobium</i>	Bacilos móveis, sem esporos; Gram-negativos; desulfovirdina ausente; uma espécie	52-57
<i>Desulfobutulus</i>	Vibriões; Gram-negativos; móveis; desulfovirdina ausente; uma espécie	53
<i>Desulfofustis</i>	Bacilos móveis, especializados na degradação de glicolato e glioxalato	56
<i>Desulfotomaculum</i>	Bacilos retos ou curvos; móveis por flagelação peritríquia ou polar; Gram-negativos; desulfovirdina ausente; forma endósporos; quatro espécies, uma termófila; uma espécie capaz de utilizar acetato como fonte de energia	37-46
<i>Desulfomonile</i>	Bacilos; realiza a descloração redutora de 3-clorobenzoato a benzoato	49
<i>Desulfobacula</i>	Células ovais e cocóides, marinhos, capazes de oxidar vários compostos aromáticos, incluindo o tolueno a CO <sub>2</sub> ; uma espécie	42
<i>Archaeoglobus</i>	<i>Archaea</i> ; hipertermófila, temperatura ótima de 83°C; contém algumas coenzimas únicas de bactérias metanogênicas, produzem pequenas quantidades de metano durante o crescimento; H <sub>2</sub> , formiato, glicose, lactato e piruvato são doadores de elétrons, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ou SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> são aceptores de elétrons; duas espécies	41-46
<i>Desulfobulbus</i>	Células ovóides ou em forma de limão; sem esporos; Gram-negativas; desulfovirdina ausente; quando móveis, por flagelo polar único; utilizam propionato como doador de elétrons, com acetato + CO <sub>2</sub> como produtos; três espécies	59-60
<i>Desulforhopalus</i>	Bacilos curvos, com vacúolos de gás, psicrófilos; utilizam propionato, lactato ou álcoois como doadores de elétrons	48
<i>Thermodesulfobacterium</i>	Pequenos bacilos Gram-negativos; desulfovirdina presente; termofílicos, crescimento ótimo a 70°C; membros de <i>Bacteria</i> , embora contenham lipídeos com ligações éter (característica de <i>Archaea</i> )	34
<b>Redutoras de sulfato oxidadoras de acetato (oxidadoras completas)</b>		
<i>Desulfobacter</i>	Bacilos; sem esporos, Gram-negativos; desulfovirdina ausente; quando móveis, por flagelo polar único; utilizam apenas acetato como doador de elétrons, oxidando-o a CO <sub>2</sub> , pelo ciclo do ácido cítrico; quatro espécies	45-46
<i>Desulfobacterium</i>	Bacilos, alguns com visículas de gás, marinhos; capazes de crescimento autotrófico pela via do acetil-CoA; três espécies	41-59
<i>Desulfococcus</i>	Células esféricas; imóveis; Gram-negativas; desulfovirdina presente, sem esporos; utilizam ácidos graxos C <sub>1</sub> a C <sub>14</sub> como doadores de elétrons, oxidando-os totalmente a CO <sub>2</sub> ; capazes de crescimento autotrófico pela via do acetil-CoA; duas espécies	57
<i>Desulfonema</i>	Grandes bactérias filamentosas deslizantes; Gram-positivas, sem esporos; desulfovirdina presente ou ausente; utilizam ácidos graxos C <sub>2</sub> a C <sub>14</sub> como doadores de elétrons, oxidando-os totalmente a CO <sub>2</sub> ; capazes de crescimento autotrófico pela via do acetil-CoA (H <sub>2</sub> como doador de elétrons); uma espécie	35-42
<i>Desulfosarcina</i>	Células em cubos (arranjo em sarcina); Gram-negativos; sem esporos; desulfovirdina ausente; utilizam ácidos graxos C <sub>2</sub> a C <sub>14</sub> como doadores de elétrons, oxidando-os a CO <sub>2</sub> ; capazes de crescimento autotrófico pela via do acetil-CoA (H <sub>2</sub> como doador de elétrons); uma espécie	51
<i>Desulfoarculus</i>	Vibriões; Gram-negativos; móveis; desulfovirdina ausente; utilizam apenas ácidos graxos C <sub>1</sub> a C <sub>18</sub> como doadores de elétrons	66
<i>Desulfacinum</i>	Células de cocóides a ovais; Gram-negativas; utilizam ácidos graxos C <sub>1</sub> a C <sub>18</sub> , grande diversidade nutricional, capazes de crescimento autotrófico; termofílicas	64
<i>Desulforhabdus</i>	Bacilos; sem esporos; Gram-negativos; imóveis; utilizam ácidos graxos com total oxidação a CO <sub>2</sub>	52
<i>Thermodesulforhabdus</i>	Bacilo móveis Gram-negativos; termofílicos; utilizam ácidos graxos até C <sub>18</sub>	51

\*GC se refere à percentagem de citosina e guanina na molécula de DNA.

Fonte: MADIGAN *et al.*, 2004.



A relação  $DQO/SO_4^{2-}$ , também exerce influência na competição entre BRS e arqueas metanogênicas. MIZUNO *et al.* (1994), operando reatores anaeróbios quimiostáticos, usando butirato como única fonte de carbono, estudaram a interação de BRS e arqueas metanogênicas em diferentes relações de  $DQO/SO_4^{2-}$ . De acordo com os autores, quando os valores da relação diminuíram de 148 para 1,5, a composição de metano diminuiu de 82% para 13%. LI *et al.* (1996), operando a mesma configuração de reator usada por MIZUNO *et al.* (1994), porém, usando benzoato de sódio como única fonte de carbono, verificaram que para valores de  $DQO/SO_4^{2-}$  iguais a 60, 89% da DQO foi convertida em metano. Para valores de  $DQO/SO_4^{2-}$ , da ordem de 0,75, a DQO convertida a metano foi de 68%. De acordo com SPEECE (1996) e LENS *et al.* (1998), a relação  $DQO/SO_4^{2-}$  com valores inferiores a 0,67 favorecem crescimento de BRS. No entanto, para valores acima de 0,67 há favorecimento nutricional para arqueas metanogênicas.

Um reator anaeróbio horizontal de leito fixo em escala piloto, foi operado por SILVA *et al.* (2002) para tratamento de águas residuárias provenientes da indústria de peróxidos orgânicos. Os autores observaram que a relação  $DQO/SO_4^{2-}$  interferiu na eficiência de remoção de sulfato e DQO do sistema. Para valor de  $DQO/SO_4^{2-}$  de 0,5 foram obtidos os melhores resultados, 61 e 65% de eficiência de remoção de DQO e sulfato, respectivamente. Neste mesmo trabalho, os autores reportaram que a adição de etanol estimulou o crescimento das BRS que predominaram sobre as arqueas metanogênicas mesmo quando os valores da relações  $DQO/SO_4^{2-}$  foram superiores a 1.

A redução da produção de metano na presença de sulfato em biorreatores está relacionada, entre outros fatores, principalmente, ao efeito tóxico da presença de sulfeto. O efeito tóxico é causado pela formação de sulfeto não ionizado ( $H_2S$ ) que, por apresentar carga neutra, atravessa as membranas dos microrganismos e altera o pH intracelular (OUDE ELFERINK, 1995). Sendo assim, o fator limitante da toxicidade é a forma iônica do sulfeto e não a sua concentração. Em soluções, com pH 8 ou maior, praticamente todo sulfeto se encontra na forma ionizada. Quanto mais baixo o valor do pH, menor o conteúdo de sulfeto ionizado e maior o efeito tóxico sobre as células. Reatores metanogênicos típicos apresentam valores de pH entre 6 e 8, ou seja, o efeito inibitório do sulfeto é praticamente nulo. A hidrólise do sulfeto ocorre segundo as equações 1 e 2 descritas a seguir.



Além de seu efeito tóxico, o sulfeto, também pode provocar a precipitação de íons metálicos no reator e, desta forma, reduzir a biodisponibilidade destes nutrientes. Por exemplo, tanto as BRS quanto as arqueãs necessitam de  $Fe^{++}$  e, na presença de sulfeto, ocorre a formação de sulfeto ferroso (precipitado preto), a qual torna-se insolúvel, e conseqüentemente indisponível para os microrganismos (DA SILVA *et al.*, 2005).

Apesar de seu potencial tóxico, o sulfeto, também, é nutriente indispensável para os microrganismos anaeróbios e deve estar presente em pequenas concentrações para garantir a estabilidade do processo. As arqueãs apresentam adequado crescimento em concentrações de sulfeto dissolvido de  $11,5 \text{ mg.l}^{-1}$  (CHOI & RIM, 1991).

Quanto a competição por fontes de carbono, as BRS tem vantagem sobre as arqueãs. A variação de energia livre padrão  $\Delta G^{\circ}$  nas reações de consumo de substrato, tem valor menor para as BRS e, sendo assim, favorecem o crescimento deste grupo em relação às outras (OUDE ELFERINK, 1995). A cinética das reações, também favorece as BRS que tem alta afinidade pelo  $H_2$  e acetato. Segundo VISSER *et al.* (1993) a atividade das arqueãs metanogênicas hidrogenotróficas é completamente suprimida em poucas semanas quando o sulfato é adicionado em reatores com biomassa imobilizada. Apesar da alta afinidade das BRS por acetato, a conversão deste substrato em metano é largamente reportada mesmo em reatores operados na presença de sulfato (ISA *et al.*, 1986; VISSER *et al.*, 1993; YODA *et al.*, 1987; FLAHERTY & COLLERAM, 1999).

### 3.2. Arqueãs metanogênicas

Atualmente, o Domínio *Archaea* pode ser dividido em três filios: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* e *Korarchaeota*. Os organismos do filo *Crenarchaeota* (todos os membros cultiváveis são termofílicos) (ABREU *et al.*, 2001) são em sua maioria espécies hipertermofílicas. O filo *Euryarchaeota* é representado por organismos bem diversificados como, por exemplo, as arqueãs metanogênicas, as arqueãs halófilas e alguns hipertermofílicos (BERNARDER, 2000). O filo *Korarchaeota* é representado por seqüências de DNA obtidas de amostras ambientais (TAKAI & SAKO, 1999; MARTEINSSON *et al.*, 2001).

As arqueãs metanogênicas, que pertencem ao filo *Euryarchaeota*, diferem das bactérias em diversos aspectos como composição da parede celular, sensibilidade a antibióticos, maquinário celular de tradução e transcrição de DNA, necessidade de condições estritamente anaeróbias e, é claro, metabolismo metanogênico, o qual é



acompanhado de vias enzimáticas, bem como de certas coenzimas e cofatores que não são encontrados em outros organismos (SCHÄFER *et al.*, 1999). Filogeneticamente, as metanogênicas são divididas em cinco ordens, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales* e *Methanomicrobiales* (MADIGAN *et al.*, 2004).

Apesar de apresentarem ampla variedade de morfologias a taxonomia das arqueas metanogênicas baseia-se em análises, tanto, fenotípicas, quanto, filogenéticas (seqüenciamento comparativo de DNAr 16S) (Tabela 2).

A etapa final da degradação da matéria orgânica no ambiente é costumeiramente atribuída as metanogênicas. Seus habitats naturais são nichos anaeróbios, como trato digestivo de ruminantes, arrozais, sedimentos marinhos ou de lagos, fontes de águas termais e lagoas salinas. Digestores de esgoto e outros tipos de reatores geradores de biogás são habitats metanogênicos fabricados pelo homem, de onde algumas linhagens de arqueas têm sido estudadas (SMITH *et al.*, 1997, HIRASAWA *et al.*, 2004). As metanogênicas podem ser encontradas em temperaturas de 20°C e até acima de 98°C (MARIANNE & BIRGITTE, 2001).

A diversidade de mecanismos metabólicos encontrados no Domínio *Archaea* são, também, encontrados no Domínio *Bacteria*, com exceção da metanogênese (FORTERRE *et al.*, 2002). O metabolismo das metanogênicas tem como principais fontes para crescimento, hidrogênio e dióxido de carbono, formiato, acetato, compostos metilados, metanol e hidrogênio, ou álcoois e dióxido de carbono. O dióxido de carbono é o principal acceptor final de elétrons e o hidrogênio o principal doador (Tabela 1). A maioria das arqueas metanogênicas utiliza amônia e sulfeto, como fonte principal de nitrogênio e enxofre, respectivamente (MARIANNE & BIRGITTE, 2001). Apesar das arqueas metanogênicas acetotróficas não serem o grupo mais representativo no Domínio *Archaea*, em lodos anaeróbios de estações de tratamento de esgoto, 2/3 do metano produzido é originário do acetato e, apenas 1/3 do hidrogênio e dióxido de carbono (MADIGAN *et al.*, 2004).

Dependendo da espécie, arqueas metanogênicas podem ser cultivadas em meios salinos, incubadas sob atmosfera de hidrogênio e dióxido de carbono (4:1). A maioria das arqueas metanogênicas conhecidas são mesofílicas, embora tenham sido descritas espécies extremófilas: com crescimento ótimo em temperaturas muito altas ou muito baixas, ou em concentrações elevadas de sal (MADIGAN *et al.*, 2004).



Tabela 2. Características fenotípicas e filogenéticas das arqueas metanogênicas.

Gênero	Morfologia	Nº Espécies	Substratos para a metanogênese	DNA (mol % GC)
<b>Methanobacteriales</b>				
<i>Methanobacterium</i>	Bacilos curtos	8	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato	30-35
<i>Methanobrevibacter</i>	Bacilos longos	7	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato	27-31
<i>Methanosphaera</i>	Cocos	2	Metanol + H <sub>2</sub> (ambos necessários)	23-26
<i>Methanothermus</i>	Bacilos	2	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , também reduz S <sup>0</sup> (hipertermófilo)	33
<i>Methanothermobacter</i>	Bacilos	6	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato (termófilos)	32-61
<b>Methanococcales</b>				
<i>Methanococcus</i>	Cocos irregulares	3	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato, piruvato + CO <sub>2</sub> , formiato	29-35
<i>Methanothermococcus</i>	Cocos	1	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato	31-34
<i>Methanocaldococcus</i>	Cocos	4	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	31-33
<i>Methanoterris</i>	Cocos	1	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	31
<b>Methanomicrobiales</b>				
<i>Methanomicrobium</i>	Bacilos curtos	1	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato	49
<i>Methanogenium</i>	Cocos irregulares	4	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato	47-52
<i>Methanospirillum</i>	Espirilos	1	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato	45-50
<i>Methanoplanus</i>	Células discóides-achatadas	3	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato	39-50
<i>Methanocorpusculum</i>	Cocos irregulares	4	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato, álcoois	48-52
<i>Methanoculleus</i>	Cocos irregulares	6	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato, álcoois	49-61
<i>Methanofollis</i>	Cocos irregulares	2	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato	54-60
<i>Methanolacinia</i>	Bacilos irregulares	1	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , álcoois	38-45
<b>Methanosarcinales</b>				
<i>Methanosarcina</i>	Grandes cocos irregulares – pacotes	5	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , metanol, metilaminas, acetato	36-46
<i>Methanolobus</i>	Cocos irregulares – agregados	5	Metanol, metilaminas	39-46
<i>Methanohalobium</i>	Cocos irregulares	1	Metanol, metilaminas (halofílico)	37
<i>Methanococcoides</i>	Cocos irregulares	2	Metanol, metilaminas	42
<i>Methanohalophilus</i>	Cocos irregulares	3	Metanol, metilaminas, metil sulfetos (halofílico)	39-41
<i>Methanosaeta</i>	De bacilos longos a filamentos	2	Acetato	52-61
<i>Methanosalsum</i>	Cocos irregulares	1	Metanol, metilaminas, dimetilsulfeto	38-40
<b>Methanopyrales</b>				
<i>Methanopyrus</i>	Bacilos em cadeia	1	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (hipertermófilo – 110°C)	60

\*As ordens taxonômicas encontram-se apresentadas em negrito.

\*GC se refere à percentagem de citosina e guanina na molécula de DNA.

Fonte: MADIGAN *et al.*, 2004.

### 3.3. Biodegradação de compostos aromáticos

Ao longo da última década, vários trabalhos relataram a degradação anaeróbia de compostos orgânicos aromáticos.

Compostos aromáticos podem ser degradados em anaerobiose através de redução de nitrato (CORSEUIL *et al.*, 1997; BURLAND & EDWARDS, 1999;



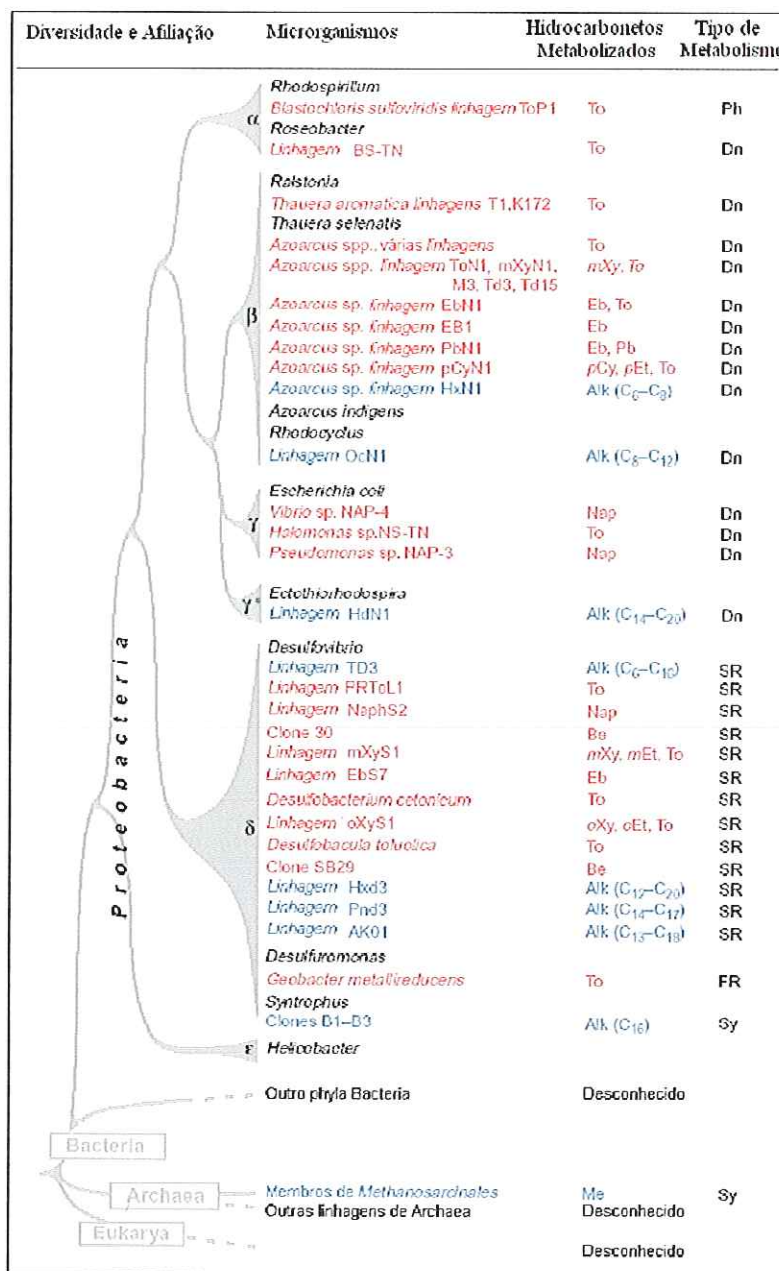
COATES *et al.*, 2002; FRANZMANN *et al.*, 2002), redução do Fe (III) (LOVLEY *et al.*, 1993; WATANABE *et al.*, 2000), redução do sulfato (COATES *et al.*, 1996; ANDERSON & LOVLEY, 2000) e mesmo através de consórcios metanogênicos (EDWARDS *et al.*, 1994; FICKER *et al.*, 1999).

RABUS *et al.* (1993) isolaram a primeira cultura pura de BRS, de sedimento marinho. Depois da identificação da cultura utilizando seqüenciamento do DNAr 16S foi proposto novo gênero e espécie denominado *Desulfobacula toluolica*, capaz de oxidar tolueno, sob condições estritamente anaeróbias (Figura 1).

A degradação de compostos aromáticos em consórcios metanogênicos foi estudada por EDWARDS *et al.* (1994), que verificaram a degradação de tolueno em cultura mista de bactérias fermentativas e arqueas metanogênicas.

RABUS & WIDDEL (1995a) observaram a completa oxidação de etilbenzeno a dióxido de carbono em condições anaeróbias. Foram isoladas duas bactérias desnitrificantes, a linhagem EbN1 e PbN1 (Figura 1), utilizando etilbenzeno e propilbenzeno, respectivamente, como doadores de elétrons e fontes de carbono. Outras linhagens desnitrificantes, definidas como ToN1 e mXyN1 (Figura 1), foram isoladas na presença de tolueno e *m*-xileno, respectivamente. RABUS & WIDDEL (1995b) sugeriram que as BRS e as desnitrificantes iniciaram a oxidação do tolueno no grupo metil com produção final de *p*-metilbenzoato.

BELLER *et al.* (1996) demonstraram, a mineralização de 80% de tolueno a dióxido de carbono por linhagem de BRS, denominada PRToL1 (Figura 1), isolada da superfície de solo contaminado por combustíveis fósseis. Verificaram também, que 15% do carbono do tolueno foi convertido em biomassa e produtos metabólicos não voláteis. Observaram que a relação estequiométrica entre moles de sulfato e moles de tolueno consumidos foi consistente com a determinação teórica, para a mineralização orgânica e redução em sulfeto de hidrogênio. Os autores, ainda, verificaram que PRToL1 apresentou 96% de similaridade filogenética com *Desulforhabdus amnigenus* (Figura 1).



**Figura 1.** Diversidade e afiliação de microrganismos com a capacidade de degradar hidrocarbonetos saturados (azul) e aromáticos (vermelho) na ausência de oxigênio. Os comprimentos das ramificações não são indicativos de distâncias filogenéticas. Por questão de orientação, alguns microrganismos aparentados, que não degradam hidrocarbonetos anaerobiamente, foram incluídos em preto. A designação de “clones” se refere às culturas enriquecidas e filogeneticamente classificadas, apesar de não terem sido isoladas. Abreviações para os hidrocarbonetos: (Alk) alcanos (o comprimento da cadeia carbônica está entre parênteses); (Be) benzeno; (pCy) *p*-cimeno; (mEt) *m*-etiltolueno; (oEt) *o*-etilbenzeno; (Eb) etilbenzeno; (Nap), naftaleno; (Pb) *n*-propilbenzeno; (To) tolueno; (mXy) *m*-xileno; (oXy) *o*-xileno; (Me), metano. Abreviações do metabolismo anaeróbico: (Dn) desnitrificação; (Fe) redução de Fe (III); (Ph) fotossíntese anoxigênica com substrato orgânico; (Sr) respiração de sulfato; (Sy), metabolismo sintrófico (consórcio microbiano).

Fonte: Adaptado de HEIDER *et al.* (1999) e WIDDEL & RABUS (2001).



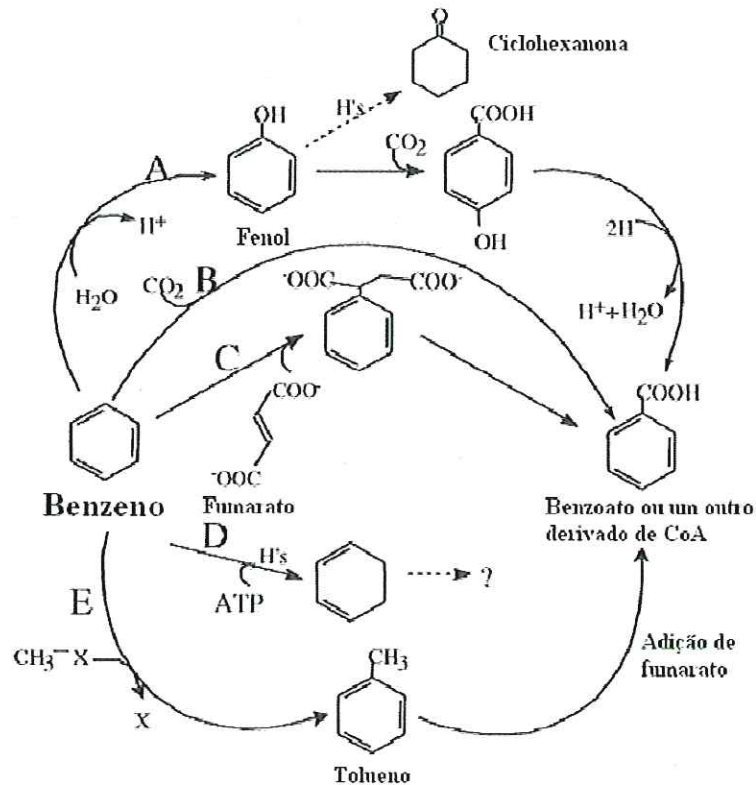
Segundo FICKER *et al.* (1999), consórcio metanogênico enriquecido, a partir de aquífero contaminado com creosoto, foi mantido por 10 anos utilizando tolueno como única fonte de carbono. As espécies desse consórcio foram caracterizadas através do uso de técnicas moleculares. O DNA total foi extraído e o DNAr 16S foi amplificado através da técnica PCR com o uso de *primers* específicos para o Domínio *Bacteria* e *Archaea*. O total de 80 clones bacterianos e 75 clones de arqueas foram analisados através da técnica RFLP (polimorfismo de fragmentos de restrição). Seis seqüências bacterianas e duas de arqueas foram encontradas em maior abundância (em seis ou mais clones), baseado na análise de RFLP. A abundância relativa de cada espécie foi estimada pelo uso da técnica FISH (Hibridação fluorescente *in situ*). A presença das espécies foi determinada qualitativamente através da técnica de hibridação slot blot aplicada diretamente ao DNA extraído do consórcio. A análise filogenética dos microrganismos dominantes sugeriu que duas espécies de arqueas estivessem relacionadas com *Methanosaeta* e *Methanospirillum*, e que uma espécie bacteriana estivesse relacionada com *Desulfotomaculum*. Outro representante bacteriano identificado não foi relacionado a nenhum gênero. Os autores propuseram que a bactéria não classificada iniciaria o ataque ao composto aromático e que os intermediários metabólicos subseqüentes seriam oxidados pelas arqueas e pela BRS.

As bactérias desnitrificantes conhecidas, com a capacidade de degradar compostos aromáticos, estão distribuídas em três das 5 sub-divisões da Divisão *Proteobacteria*; ou seja,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Figura 1) e em sua maioria são pertencentes aos gêneros *Thauera* e *Azoarcus*, da sub-divisão  $\beta$ . Todas estas bactérias utilizam benzoato e vários substratos aromáticos e não aromáticos em condições anaeróbias (HEIDER *et al.*, 1999). Entretanto, a degradação destes compostos recalcitrantes, utilizando nitrato, também ocorre na presença de BRS e de bactérias redutoras de Fe (III); tais como, *Desulfobacterium catecholicum* (SZEWZYK & PFENNING, 1987) e *Geobacter metallireducens* (LOVLEY *et al.*, 1993; WATANABE *et al.*, 2000), respectivamente (Figura 1).

As BRS têm participação fundamental na degradação de compostos aromáticos em sítios contaminados (CORSEUIL *et al.*, 1997; BOOPATHY *et al.*, 1998; KOLMERT *et al.* 2000; FRANZMANN *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2005). O potencial das BRS para degradar compostos recalcitrantes, provavelmente, é maior do que o reportado na literatura. As culturas de bactérias redutoras de sulfato (todas da sub-divisão  $\delta$  da *Proteobacteria*), algumas puras, como as relacionadas com *Desulfobacula*

*sp.* e *Desulfobacterium sp.*, foram capazes de utilizar compostos aromáticos como fonte de energia; tais como, tolueno, *m*-etiltolueno, *o*-etiltolueno, naftaleno, benzeno, etilbenzeno, *o*-etilbenzeno, *m*-xileno e *o*-xileno (Figura 1) (HEIDER *et al.*, 1999; WIDDEL & RABUS, 2001).

O metabolismo aromático anaeróbico utilizado pelas BRS ainda é pouco entendido e apresenta muitas variações. Normalmente, a aromaticidade é perdida por redução, sendo o anel aromático aberto hidroliticamente. Restrito número de intermediários metabólicos podem ser reduzidos. O mais comum de todos é o benzoil-Coa, formado como intermediário central na degradação da maioria dos compostos aromáticos (COATES *et al.*, 2002). A Figura 2 mostra 5 diferentes possibilidades de ativação da molécula do benzeno que precedem a quebra do anel aromático.



**Figura 2.** Cinco mecanismos (A, B, C, D e E) possíveis para a ativação do anel do benzeno em condições anaeróbicas. O "X" pode representar: tetrahydroftalato, S-adenosil-metionina ou cobalamina.

Fonte: COATES *et al.* (2002).

As vias periféricas que transformam os substratos de crescimento em benzoil-Coa incluem várias reações, como por exemplo, a carboxilação de compostos fenólicos, eliminação redutiva dos radicais amino ou hidroxila (usados na quebra do anel),



oxidação dos radicais metila, reações de *o*-demetilação e diminuição das cadeias alifáticas laterais (HARWOOD *et al.*, 1999).

As reações sugeridas para as transformações anaeróbias de benzeno e tolueno em condições sulfetogênicas (BURLAND & EDWARDS, 1999; CERVANTES *et al.*, 2001) estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Energia livre das reações de transformação anaeróbia de benzeno e tolueno na presença de sulfato.

Composto	Reações sugeridas	$\Delta G^{0'}$
Benzeno	$C_6H_6 + 3,75SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow$ $1,875H_2S + 1,87HS^- + 6HCO_3^- + 0,375H^+$	-200
Tolueno	$C_7H_8 + 4,5SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow$ $2,25H_2S + 2,25HS^- + 7HCO_3^- + 0,25H^+$	-205

Os valores de  $\Delta G^{0'}$  são expressos em Kilojaules (KJ) por reação (pH 7,0).

Fonte: BURLAND & EDWARDS, 1999; CERVANTES *et al.*, 2001.

CORSEUIL *et al.* (1997), utilizaram microcosmos para investigar o efeito de etanol na degradação microbiana de BTX (benzeno, tolueno e xilenos) na presença de sulfato, nitrato e íon férrico, em experimentos na ausência e presença de oxigênio. Os autores relataram que em condições aeróbias o etanol retardou a biodegradação do BTX. Somente na presença de 450 mg.l<sup>-1</sup> de sulfato, em condições anaeróbias, 300 mg.l<sup>-1</sup> de etanol estimularam a biodegradação completa de 20 mg.l<sup>-1</sup> de tolueno. O benzeno não foi degradado anaerobiamente em nenhum dos microcosmos estudados pelos autores.

Amostras retiradas de águas subterrâneas contaminadas por gasolina em Swan Coastal Plain, (Oeste australiano) foram analisadas por FRANZMANN *et al.* (2002) que relataram provável relação entre a degradação de tolueno e a redução de sulfato. A bactéria redutora de sulfato isolada da pluma de contaminação representa nova espécie e designada *Desulfosporosinus meridiei*. Testes realizados em microcosmos, com amostras de água da pluma de contaminação mostraram que linhagens de *Desulfosporosinus* foram capazes de mineralizar tolueno (0,05 mg.ml<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), somente, após adição de 480 mg.l<sup>-1</sup> de sulfato. Em cultura pura, esta BRS se mostrou incapaz de degradar o tolueno. Os autores sugeriram que no consórcio microbiano, *Desulfosporosinus meridiei* consumiria hidrogênio e ácidos orgânicos, provenientes da

fermentação do tolueno, prevenindo a acumulação destes produtos intermediários e tornando a degradação de tolueno termodinamicamente possível.

DA SILVA *et al.* (2005) utilizaram colunas de vidro para investigar os efeitos da adição de sulfato, Fe (III) ou nitrato, na a biodegradação de BTEX em soluções etanólicas, sob anaerobiose. Os autores observaram que a rápida biodegradação do etanol, próxima ao ponto de entrada da coluna, esgotou o oxigênio dissolvido no sistema, estimulando a metanogênese e diminuindo a eficiência de biodegradação dos BTEX (concentração afluyente de  $30 \text{ mg.l}^{-1}$ ) de 99% (na ausência de etanol) para valores próximos a 32% para o benzeno, 49% para o tolueno, 77% para o etilbenzeno e, 30% para os xilenos. A adição de sulfato ( $218 \text{ mg.l}^{-1}$ ), EDTA-Fe (III) ( $4,2 \text{ g.l}^{-1}$ ) ou nitrato ( $171 \text{ mg.l}^{-1}$ ), suprimiu a metanogênese e aumentou significativamente as eficiências da biodegradação. As melhores eficiências de remoção foram obtidas na presença de sulfato, sendo o tolueno o único composto aromático removido com eficiência superior a 99%. O benzeno teve eficiência de remoção próxima a 30% na presença de sulfato.

#### 3.4. Caracterização microbiana

A maioria dos microrganismos em ambientes naturais não pode ser facilmente detectada sob exames de microscopia óptica, porque as células microbianas se aderem às partículas dos sedimentos e de solos, o que dificulta a visualização das mesmas. Técnicas empregando os corantes fluorescentes como o DAPI ou laranja de acridina têm confirmado essa dificuldade. Medidas da atividade bacteriana têm sido realizadas, porém não permitem discriminar as espécies microbianas. Experimentos fisiológicos são, também, utilizados com grande sucesso para caracterizar espécies isoladas, entretanto, os procedimentos não são muito comuns para todos os microrganismos. Apenas, pequena fração de bactérias do ambiente foram isoladas e caracterizadas. O enriquecimento de culturas não é técnica totalmente adequada para o estudo de diversidade microbiana e não garante a reprodução segura das condições naturais dos microrganismos (MUYZER *et al.*, 1996).

A possibilidade de aplicar técnicas moleculares modernas e confiáveis para o estudo da comunidade microbiana em sistemas de tratamento pode auxiliar na análise de diferentes contextos da Ecologia Microbiana.

Muitos componentes celulares são analisados para a melhor caracterização dos microrganismos. As longas fitas de RNAr (RNA ribossômico) oferecem quantidade de informações que são únicas, e fazem delas uma das melhores fontes de descrição das



espécies de microrganismos. O RNAr é uma molécula ancestral, funcionalmente constante, universalmente distribuída, e moderadamente bem conservada por largas distâncias filogenéticas. Devido a variedade de diferentes e possíveis seqüências das bases do RNAr, uma similaridade em duas seqüências sempre indica relação de filogenia (MADIGAN *et al.*, 2004). A seqüência de nucleotídeos do RNAr 16S, de aproximadamente 1500 pares de bases, tem significado filogenético que poderá ser analisado a partir da crescente base de dados de seqüências de RNAr, de microrganismos cultivados e não cultivados (LUDWIG *et al.*, 1992). Porém, tal caracterização genética requer abordagens laboratoriais trabalhosas e complexas que demandam tempo e dificultam a obtenção de resultados conclusivos.

Nos últimos anos foram desenvolvidas técnicas moleculares que minimizaram este conjunto de desvantagens. Dentre estas técnicas, algumas utilizam o material genético na caracterização da comunidade microbiana, presente em amostras ambientais, através da produção de “finger-printing” genético. Tais técnicas se baseiam na caracterização parcial de regiões alvo do DNA extraído do ambiente, evitando a necessidade de clonagem e seqüenciamento. Entretanto, como resultado, estas técnicas não oferecem informações suficientes para a caracterização das espécies. Na realidade, estariam fornecendo indicação confiável da riqueza de espécies e, em alguns casos, da abundancia (MUYZER *et al.*, 1993).

WILLIAMS *et al.* (1990) propôs a utilização de uma técnica com *primers* curtos que amplificariam muitos sítios diferentes em uma mesma molécula de DNA alvo, produzindo “finger-print” distinto baseado em fragmentos com tamanhos diferentes. De acordo com os autores esta técnica é simples e eficiente. Entretanto, uma vez que não há nenhuma indicação de qual região do DNA está sendo amplificada, a técnica produz fragmentos que não podem ser analisados, posteriormente.

MUYZER *et al.*, (1993) demonstraram a amplificação de fragmentos de DNAr 16S de amostras ambientais, através da reação de polimerização em cadeia (PCR), com separação destes mesmos fragmentos através de seus diferentes comportamentos de desnaturação. Desde então, a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), tornou-se ferramenta popular na Ecologia Microbiana. Maiores esclarecimentos sobre esta técnica estão abordados nos itens a seguir.

As técnicas “análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA)” e “polimorfismo de fragmentos de restrição terminais” (T-RFLP)”, também são usadas

para a análise da diversidade microbiana em amostras ambientais (MARTINEZ-MURCIA *et al.*, 1995).

As informações de uma seqüência de RNAr, também, fornecem abordagens sistemática para o desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos que podem ser hibridadas com ácidos nucléicos de microrganismos, e assim contribuir para a quantificação da similaridade das seqüências de RNAr de comunidades naturais (WARD *et al.*, 1992). A hibridação nada mais é do que o pareamento de fitas de RNA e DNA complementares para produzir um RNA-DNA híbrido, ou o pareamento de uma fita simples de DNA para produzir um DNA-DNA híbrido (KING & STANSFIELD, 1997). Porém, a aplicação desta técnica é trabalhosa e muitas vezes questionada. Sinais fracos de hibridação, que freqüentemente ocorrem em amostras complexas de DNA, tornam a técnica limitada (GRIFFITHS *et al.*, 1996).

As determinações da proporção de guanina-citosina nas moléculas de DNA extraído são usadas para diferenciar as bactérias Gram positivas das negativas (TORSVIK *et al.*, 1990). Entretanto, tal técnica não foi capaz de diferenciar populações microbianas através desta proporção (GRIFFITHS *et al.*, 1997).

### 3.5. Reação de polimerização em cadeia

A técnica que usa a reação de polimerização em cadeia (PCR) foi desenvolvida em meados da década de 1980 e consiste na amplificação *in vitro* de determinado segmento de DNA. O PCR consiste na amplificação exponencial do DNA (reação em cadeia), onde a quantidade resultante será  $2^n$  ( $n$  = número de ciclos efetuados).

A enzima tem papel fundamental na reação; ou seja, catalisa a polimerização. Inicialmente, era utilizada a enzima Klenow (DNA polimerase de *E. coli*), molécula termo-sensível. Atualmente, utiliza-se a enzima Taq polimerase (DNA polimerase I), obtida de bactéria termo-resistente (*Thermus aquaticus*).

A técnica do PCR é composta por 25 a 40 ciclos, na qual cada ciclo é composto por três etapas; desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão das novas fitas de DNA.

Na reação de polimerização em cadeia (PCR) estas três etapas ocorrem repetidas vezes até que número suficiente de cópias do fragmento alvo da molécula de DNA seja produzido para posteriores manipulações.

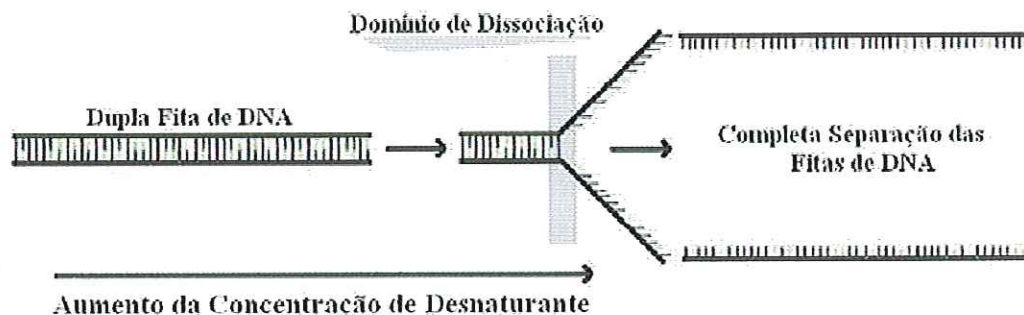
Segundo SILVA & WITWER (2000), os produtos de duas reações de PCR usando *primers* diferentes podem ser submetidos à eletroforese em gel de agarose e



então separados. Esta separação ocorre devido ao diferente comprimento dos fragmentos produzidos nas duas reações. Entretanto, não há nenhuma informação a respeito da seqüência do produto amplificado. Existem várias técnicas que podem detectar alterações nos produtos de PCR, tais como: eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE), cromatografia líquida de alta pressão de desnaturação (DHPLC).

### 3.6. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante

Na eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) os fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas com diferentes seqüências de pares de bases podem ser separados. Essa separação é baseada na mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA parcialmente dissociado, em gel de poliacrilamida contendo gradiente desnaturante de DNA (uréia e formamida) que aumenta linearmente. A dissociação acontece num “domínio de dissociação”, quando ocorre o alargamento dos pares de base devido ao aumento da concentração de desnaturante. Uma vez no domínio de dissociação, com a concentração mínima alcançada, ocorre a transição da forma helicoidal para a forma de um fragmento, parcialmente dissociado e, nesta fase, a migração termina (Figura 3).



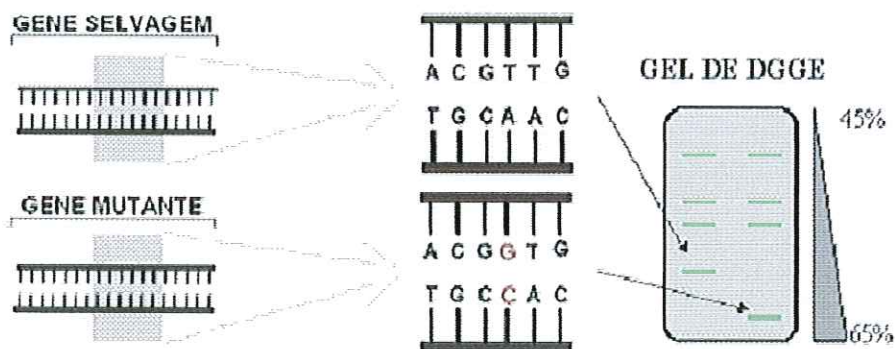
**Figura 3.** Dissociação da molécula de DNA no gel desnaturante do DGGE.  
Fonte: CATTONY (2001).

Esse gradiente de concentração no domínio de dissociação está relacionado com uma posição particular no gel. As variações de seqüências levam a diferentes domínios de dissociação com diferentes gradientes de concentração. Logo, seqüências variantes de fragmentos particulares irão parar de migrar em diferentes posições no gel, sendo assim, separados (MUYZER *et al.*, 1993).

Usando a abordagem anterior, 50% das seqüências podem ser detectadas em fragmentos de DNA com até 500 pares de base. Esta porcentagem pode aumentar em até 100% pela inserção de uma seqüência rica em "GC" no fragmento de DNA. As adições de GC clamp, nos fragmentos de DNA, aumentam a sensibilidade da técnica permitindo a detecção de uma única base nitrogenada no fragmento (MYERS *et al.*, 1985; MYERS *et al.*, 1987).

Bandas de posição idêntica em um perfil de DGGE não são necessariamente provenientes de uma mesma espécie (MUYZER *et al.*, 1993). Entretanto, por razões práticas, muitos autores assumem que cada banda representa uma única unidade taxonômica operacional (MUYZER *et al.*, 1994; CHINALIA, 2002). Por outro lado, COLE *et al.* (1994) e NÜBEL *et al.* (1996) criticam esta abordagem. Segundo os mesmos autores uma banda pode ser originada de diferentes espécies e uma espécie pode ser representada por diversas bandas (heterogeneidade do DNA). Este problema pode ser resolvido se a técnica do seqüenciamento for utilizada na identificação das bandas (CASAMAYOR *et al.*, 2000).

No entanto, nos estudos de variabilidade genética, a técnica do DGGE permite uma diferenciação entre as comunidades de uma amostra ou entre indivíduos de uma mesma espécie (MUYZER *et al.*, 1993) (Figura 4).



**Figura 4.** Diferentes seqüências de pares de bases podem ser separadas pela técnica do DGGE. Na figura o gel de DGGE apresenta gradiente de concentração desnatante de 45-65%. As setas pretas indicam as diferentes mobilidades eletroforéticas entre dois fragmentos de DNA que diferem entre si em apenas um par de bases na sua constituição. A fidelidade do método é perdida quando fragmentos de DNA com mais de 500 pares de base são analisados.

Fonte: CATTONY (2001).

A amplificação de fragmentos de DNA r 16S através da reação de polimerização em cadeia (PCR), combinada com a separação destes mesmos fragmentos através de



seus diferentes comportamentos de desnaturação, tornou-se ferramenta popular na Ecologia Microbiana, desde 1993 (MUYZER *et al.*, 1993). Entretanto, muitos trabalhos têm demonstrado que algumas combinações de *primers* utilizadas na reação de amplificação têm como produto final fragmentos de DNA em diferentes concentrações daquelas obtidas logo após a extração das amostras (competição pelo sítio da enzima na reação de polimerização). Ainda, segundo KRAWIEC & RILEY (1990) o número de diferentes genes para determinado RNAr em uma única espécie pode variar de acordo com a fisiologia. Organismos com baixa taxa de crescimento tem número de cópias de DNA, codificadas a partir do RNAr, menor do que a dos organismos que apresentam alta taxa de crescimento.

Tais observações têm criado dúvidas a respeito da fidelidade deste método, PCR-DGGE, e comum relutância em afirmar que mudanças no padrão de bandas do DGGE implicam na mudança da estrutura da comunidade bacteriana (BRÜGGEMANN *et al.*, 2000). Porém, ainda segundo BRÜGGEMANN *et al.* (2000), estas diferenças na concentração do produto final do PCR não são significantes a ponto de não se considerar os resultados obtidos pelo método. A escolha e a abordagem do método devem ser cuidadosamente estudadas para que a análise dos resultados não perca credibilidade.

Populações de bactérias redutoras de sulfato de coluna marinha estratificada foram investigadas por TESKE *et al.* (1996) através de abordagens moleculares e cultura-dependente em paralelo. Análises de géis de DGGE de fragmentos amplificados via PCR de RNAr e DNAr foram feitos para comparar a atividade e o predomínio das populações bacterianas, respectivamente. A hibridação dos padrões de DGGE com sondas para RNAr indicaram aumento da presença e da atividade das bactérias redutoras de sulfato dentro e abaixo da estratificação. Paralela a esta abordagem molecular, a estratégia envolvendo a técnica de contagem pelo número mais provável (NMP) foi usada. O NMP confirmou a distribuição das bactérias redutoras de sulfato na coluna d'água revelada pelas técnicas moleculares. *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* e linhagens relacionadas foram encontradas na zona aerada da estratificação. As bandas de DGGE obtidas nas diluições de NMP foram seqüenciadas e comparadas com as obtidas nas extrações dos ácidos nucléicos diretamente das amostras d'água. Os isolados do NMP foram afiliados com a sub-divisão  $\delta$  da *Proteobacteria* e relacionados com *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* e *Desulfobacter*. É conveniente lembrar que as bandas em

gel de DGGE das diluições de NMP, conceitualmente revelaram populações bacterianas selecionadas e não necessariamente predominantes na coluna d'água.

ROONEY-VARGA *et al.* (1999) estudaram a diversidade bacteriana em aquífero contaminado com petróleo através das técnicas PCR-DGGE, seqüenciamento e análise de lipídios. Apesar de não poderem comprovar a relação entre a oxidação anaeróbia do benzeno e a abundância de membros do gênero *Geobacter*, puderam relatar que estes foram os únicos microrganismos conhecidos que combinaram esta reação específica de oxidação e a redução do Fe (III).

CASAMAYOR *et al.* (2000) estudaram o conjunto de microrganismos de dois lagos sulfurosos próximos na Espanha. A comunidade microbiana presente nos dois lagos foram analisadas espaço-temporalmente por microscopia óptica, pela técnica PCR-DGGE e o seqüenciamento de fragmentos de DNAr 16S. Em primeiro momento foi comparada a abundância de diferentes morfologias em relação ao número de bandas no gel de DGGE. Em segundo momento, algumas bandas foram recortadas dos géis e seqüenciadas. Em um dos lagos foi observada a predominância de bactérias da divisão *Proteobacteria*, no outro a predominância de cianobactérias. A presença de seqüências similares a arqueas metanogênicas foi relatada nos dois lagos. As evidências obtidas com as populações identificáveis por microscopia indicaram que as bandas dominantes nos géis de DGGE correspondiam as populações predominantes no meio estudado. Ainda, apesar dos dados obtidos nos padrões de banda do DGGE terem sido limitados, permitiram o monitoramento das mudanças na comunidade confirmadas pela microscopia. As populações com menos de 1% de representatividade na comunidade não foram detectadas pelo DGGE.

A grande vantagem da técnica PCR-DGGE em relação a outras técnicas de *finger-printing* é a facilidade de se analisar mudanças através da simples avaliação do surgimento ou do desaparecimento de bandas como conseqüência de perturbação ambiental. Deste modo é possível haver o monitoramento *in situ* da diversidade das comunidades microbianas (ELSAS, 1998).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Na busca por um meio seletivo menos complexo e de menor custo para aplicação em ensaios contínuos, ensaios de enriquecimento em batelada, com meio Zinder (ZINDER *et al.*, 1984) e meio Beller (BELLER *et al.*, 1996), foram realizados previamente aos ensaios em RAHLF. Enquanto o meio Zinder é utilizado para o crescimento de microrganismos anaeróbios em geral, o meio Beller é utilizado para o crescimento de bactérias redutoras de sulfato. Os dois meios foram analisados, em ensaios em batelada, quanto ao seu potencial de oxidação das fontes de carbono adicionadas na presença de sulfato. Somente, após a escolha do meio nutritivo, os ensaios contínuos em RAHLF foram iniciados (Figura 5).

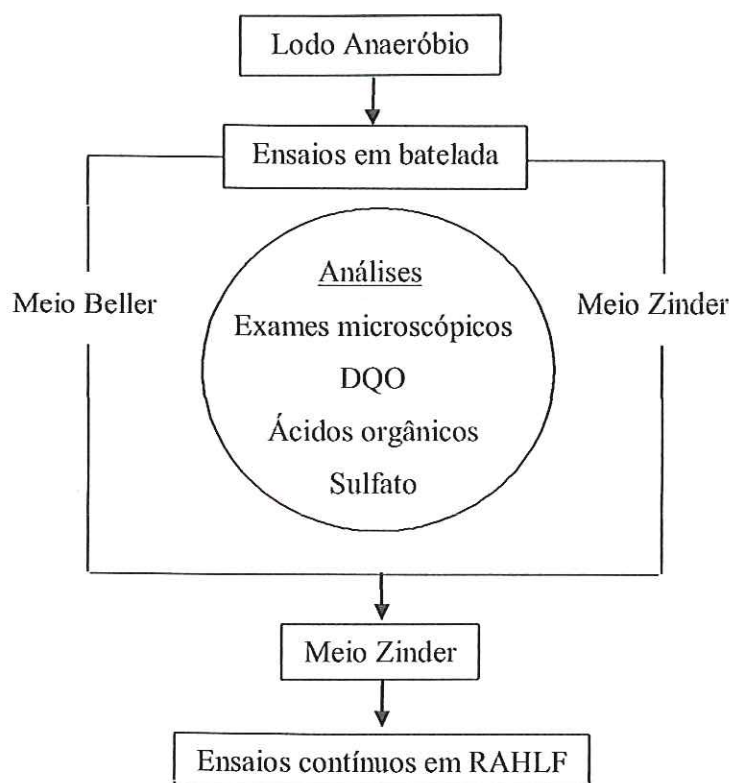


Figura 5. Diagrama das fases experimentais com a descrição dos parâmetros monitorados nos diferentes ensaios.



Os parâmetros usados no monitoramento dos diferentes ensaios em batelada estão descritos na Figura 5. As análises de DQO, sulfato, e ácidos voláteis, foram determinadas através de técnicas físico-químicas e cromatográficas. Amostras dos reatores foram observadas através de microscopia de contraste de fase, fluorescência e microscopia eletrônica de varredura.

Os parâmetros usados no monitoramento, do afluente e efluente, dos diferentes ensaios contínuos em RAHLF foram: conteúdo de matéria orgânica (expressa em DQO), sulfato, ácidos orgânicos voláteis (métodos volumétrico e cromatográfico), pH, sólidos suspensos voláteis (SSV), benzeno e tolueno (cromatografia gasosa), *finger-print* da comunidade microbiana dos biofilmes enriquecidos (PCR-DGGE). Amostras dos biofilmes dos reatores foram observadas através de microscopia de contraste de fase, fluorescência e microscopia eletrônica de varredura.

#### **4.1. Meios de cultivo**

O meio de cultivo Zinder (ZINDER *et al.*, 1984) foi preparado adicionando-se os sais minerais (Tabela 4) e solução de resazurina em 1,0L de água Milli-Q. Após a dissolução, o meio foi mantido sob atmosfera de nitrogênio (100%), durante 20 minutos. O gás foi introduzido nos reatores em batelada ou nos frascos de alimentação (no caso dos ensaios contínuos em RAHLF), através do sistema de distribuição simultânea de gases, passando por coluna catalítica capaz de reter traços de oxigênio, geralmente presentes nas linhas de condução e em alguns casos, na composição dos gases. Em seguida, os frascos foram fechados com tampa de butila e rosca de plástico. Os reatores em batelada e os frascos de alimentação foram esterilizados em autoclave a 120°C, a 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Após serem retirados da autoclave foram estocados a temperatura ambiente, na ausência de luz. A solução de resazurina 0,1%, indicadora do potencial de oxi-redução do meio de cultivo, foi armazenada em frasco âmbar a 4°C.

As soluções traços, de bicarbonato de sódio, de metais, de vitaminas e de sulfeto de sódio, foram manipuladas e adicionadas aos reatores em batelada e frascos de alimentação em câmara de fluxo laminar, sob condições de assepsia. As Tabelas 4, 5 e 6 descrevem as composições do meio e das soluções.

Devido à sensibilidade as altas temperaturas, as soluções de bicarbonato de sódio, redutora, e de vitaminas, foram esterilizadas a frio por filtração rápida em membrana de 0,22 µm de porosidade utilizando sistema Millipore, sob condições de

assepsia. O sistema de filtração, membrana, mangueiras, frascos e tampas, usados na preparação dessas soluções, sempre foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C e 1atm, por 20 minutos.

**Tabela 4.** Composição do meio de cultivo Zinder.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades (q.s.p. 1000 mL)</b>
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g
Solução de resazurina 0,1%	1,0 mL
Solução de bicarbonato de Sódio 10%	10,0 mL
Solução traço de metais	10,0 mL
Solução de vitaminas	10,0 mL
Solução redutora de sulfeto de sódio 5%	10,0 mL

Fonte: ZINDER *et al.* (1984).

A solução de vitaminas foi preparada pela dissolução dos seus componentes, na ordem apresentada na Tabela 5, em 1,0L de água Milli-Q previamente fervida e resfriada a 30°C, sob atmosfera de nitrogênio. A solução final foi filtrada em sistema MilliPore com membrana de poros de 0,22µm, como descrito acima, e armazenada em frascos sob condições de assepsia. Ao final os frascos foram armazenados no escuro a 4°C.

**Tabela 5.** Composição da solução de vitaminas para meio Zinder.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades (q.s.p. 1000 mL)</b>
Biotina	0,002 g
Ácido Fólico	0,002 g
Tiamina.HCl	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido Nicotínico	0,005 g
Pantotenato de Cálcio	0,005 g
Piridoxina.HCl	0,010 g
Vitamina B <sub>12</sub>	0,002 g
Ácido Lipóico	0,005 g

Fonte: TOUZEL & ALBAGNAC (1983).

A solução traço de metais foi preparada adicionando-se, primeiramente o ácido nítrilo acético em água Milli-Q e o pH final ajustado para 7,0 utilizando solução de

KOH 10N. Posteriormente, os outros componentes foram adicionados e dissolvidos, na solução, de acordo com a ordem apresentada na Tabela 6. A solução final foi armazenada em frascos apropriados e esterilizados em autoclave a 121°C e 1atm, por 20 minutos. Ao final os frascos foram armazenados no escuro a 4°C.

**Tabela 6.** Composição da solução traço de metais para meio Zinder.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades (q.s.p. 1000 mL)</b>
NTA	4,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,1 g
COCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,17 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,19 g
NiCl <sub>2</sub>	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,01 g

Fonte: ZINDER *et al.* (1984).

Para a manutenção do pH e redução do meio de cultivo foram utilizadas as soluções de bicarbonato de sódio 10% e redutora de sulfeto de sódio 5%, respectivamente. A solução de bicarbonato de sódio 10% foi preparada pela dissolução do respectivo sal em água Milli-Q previamente, fervida e resfriada a 50°C, sob atmosfera de nitrogênio (100%). Com o auxílio de uma pipeta invertida estéril, a solução permaneceu sob fluxo desse gás por 20 minutos. A solução foi esterilizada por filtração em membrana, como já descrito anteriormente, armazenada em frascos de 500 mL, sob fluxo de nitrogênio (100%) e em condições de assepsia, e finalmente armazenada a temperatura ambiente na ausência de luz.. A solução redutora de sulfeto de sódio 5% foi preparada nas mesmas condições descritas acima, porém a umidade do sulfeto de sódio foi retirada com o auxílio de papel filtro WHATMANN, antes da pesagem. Após a esterilização, os frascos de 500 mL foram envoltos com papel alumínio e armazenados a temperatura ambiente na ausência de luz.

O sulfato foi utilizado como acceptor final de elétrons para estimular o crescimento das BRS. As soluções estoque de sulfato de sódio e sulfato ferroso, em concentrações finais de 2M e 1M, respectivamente, foram preparadas pela dissolução dos respectivos sais em água Milli-Q. As soluções foram distribuídas em frascos de 500 mL, sob atmosfera de nitrogênio (100%), esterilizadas em autoclave a 121°C e 1atm, por 20 minutos e armazenadas a temperatura ambiente na ausência de luz.



O lactato de sódio foi utilizado como principal fonte de carbono nas fases de enriquecimento. A solução estoque foi preparada através de reação de neutralização entre as soluções de ácido láctico 4M e hidróxido de sódio 4M. O pH da solução final foi ajustado para 9,8 utilizando-se solução de hidróxido de sódio 4M. A solução foi armazenada em frascos de 500 mL, sob fluxo de nitrogênio (100%), e esterilizada em autoclave a 121°C a 1atm por 20 minutos e armazenada a temperatura ambiente na ausência de luz.

O meio de cultivo Beller (BELLER *et al.*, 1996) foi preparado adicionando-se os sais minerais (Tabela 7) e solução de resazurina em 1,0L de água Milli-Q. Após a preparação, o meio foi mantido sob atmosfera de nitrogênio (100%) durante 20 minutos. O gás foi introduzido nos reatores através do sistema de distribuição simultânea de gases, passando por coluna catalítica. Os reatores foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1atm, durante 20 minutos e estocados a temperatura ambiente, na ausência de luz. Após resfriamento os frascos, as soluções traços de metais, de vitaminas, de selenito-tungstato, de tiamina, de vitamina B<sub>12</sub>, de sulfato ferroso e de sulfeto de sódio foram manipuladas e adicionadas aos reatores em câmara de fluxo laminar, sob condições de assepsia. As Tabelas 7, 8 e 9 descrevem as composições do meio e das soluções.

**Tabela 7.** Composição do meio de cultura para meio Beller.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades (q.s.p. 1000 mL)</b>
NaHCO <sub>3</sub>	2,5 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1 g
KCl	0,097 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,49 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,53 g
NaCl	0,1 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,005 g
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,001 g
Solução de elementos traços	1,0 mL
Solução de vitaminas	1,0 mL
Solução de selenito-tungstato	1,0 mL
Solução de tiamina	1,0 mL
Solução vitamina B <sub>12</sub>	1,0 mL
Solução redutora de sulfeto de sódio	7,5 mL

Fonte: BELLER *et al.* (1996)

A solução de vitaminas para meio Beller foi preparada através da dissolução dos componentes na ordem apresentada na Tabela 8, em 1,0 L de água Milli-Q previamente fervida e resfriada a 30°C, sob fluxo de nitrogênio. A solução final foi filtrada em sistema Millipore com membrana de poros de 0,22 µm, como descrito anteriormente, e armazenada em frascos sob condições de assepsia. Ao final os frascos foram armazenados na ausência de luz a 4°C.

**Tabela 8.** Solução de vitaminas para meio Beller.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades (q.s.p. 1000 mL)</b>
Tampão fosfato de sódio (10 mM; pH 7,1)	100 mL
Ácido 4-aminobenzóico	4,0 mg
Biotina D(+)	1,0 mg
Ácido nicotínico	10,0 mg
Pantotenato de cálcio D(+)	5,0 mg
Piridoxina dihidroclorato	15,0 mg

Fonte: WIDDEL & BAK (1992).

A solução traço de metais para meio Beller foi preparada adicionando-se os componentes da Tabela 9 em água Milli-Q. A solução final foi armazenada em frascos de 500 mL, sob fluxo de nitrogênio (100%), e autoclavada a 121°C e 1 atm, por 20 minutos. Ao final os frascos foram armazenados na ausência de luz a 4°C.

**Tabela 9.** Composição dos elementos traços para meio Beller.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades (q.s.p. 500 mL)</b>
HCl (7,7M)	6,25 mL
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1050 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	15 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	50 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	95 mg
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	12 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	72 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	18 mg

Fonte: BALOWS *et al.* (1992).

A solução de selenito-tungstato foi preparada através da dissolução dos componentes da Tabela 10 em água Milli-Q. A solução final, distribuída em frascos de antibiótico sob atmosfera de nitrogênio (100%), foi autoclavada a 121°C e 1atm durante

20 minutos. Ao final os frascos foram armazenados a temperatura ambiente na ausência de luz.

**Tabela 10.** Solução de selenito-tungstato para meio Beller.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades (q.s.p. em 200 mL)</b>
NaOH	0,08 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0012 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0016 g

Fonte: BALOWS *et al.* (1992).

A solução de tiamina foi preparada através da dissolução dos componentes da Tabela 11 em água Milli-Q. A solução final foi filtrada em sistema Millipore com membrana de poros de 0,22µm, como descrito anteriormente, e armazenada em frascos, sob fluxo de nitrogênio (100%), e em condições de assepsia. Ao final os frascos foram armazenados na ausência de luz a temperatura ambiente.

**Tabela 11.** Solução de tiamina para meio Beller.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades</b>
Tampão fosfato de sódio (25mM; pH 3,4)	100 mL
Cloreto de tiamina dihidroloreto	10,0 mg

Fonte: BALOWS *et al.* (1992).

A solução de vitamina B<sub>12</sub> foi preparada através da dissolução de Cianocobalamina (Tabela 12) em água Milli-Q. A solução final foi filtrada em sistema Millipore com membrana de poros de 0,22µm, como descrito anteriormente, e armazenada em frascos, sob fluxo de nitrogênio (100%), e em condições de assepsia. Ao final os frascos foram armazenados na ausência de luz a 4°C.

**Tabela 12.** Solução de vitamina B<sub>12</sub> para meio Beller.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades</b>
Água Milli-Q	100 mL
Cianocobalamina	5,0 mg

Fonte: BALOWS *et al.* (1992).



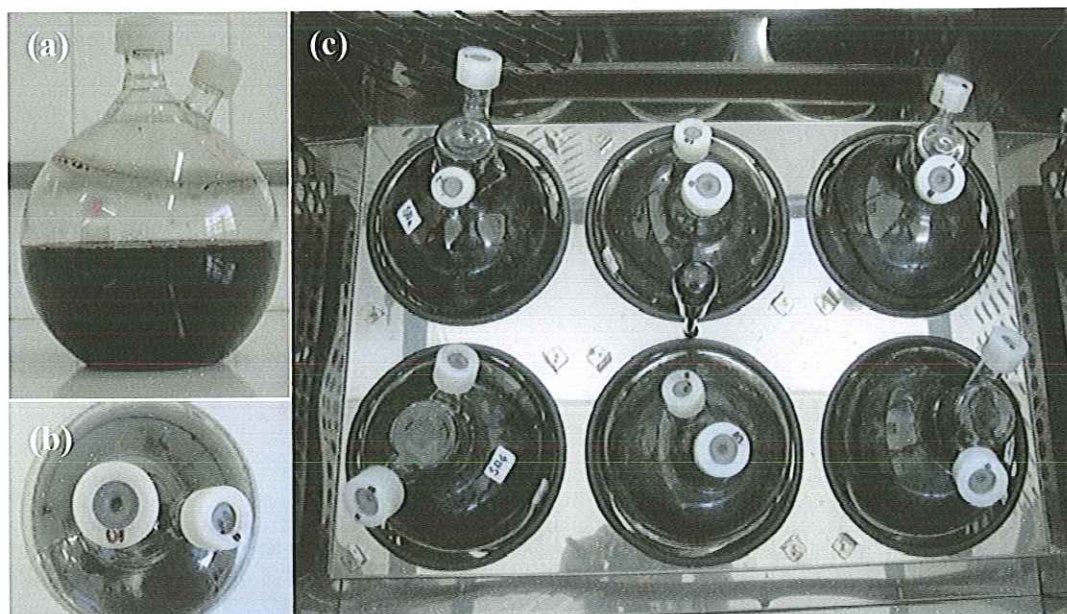
#### 4.2. Inóculo

Os reatores, tanto em batelada quanto os contínuos, foram inoculados com lodo proveniente de reator UASB (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) tratando águas residuárias provenientes de abatedouro de aves.

#### 4.3. Ensaio em reatores em batelada

Foram testados dois meios de cultivo distintos para a obtenção das condições mais adequadas para o crescimento de BRS e, conseqüentemente, remoção de sulfato; o meio basal Zinder de acordo com a descrição apresentada por ZINDER *et al.* (1984) e o meio específico para o crescimento de BRS conforme BELLER *et al.* (1996).

Foram utilizados seis reatores em batelada de 2,0 L (Figura 6) em ensaios realizados em triplicata (três reatores com meio Zinder e três com meio Beller). O volume de reação dos reatores foi de 1,0 L, sendo 100 mL destinados ao inóculo. O *headspace* (50%) foi preenchido com atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70/30%).



**Figura 6.** Reatores em batelada: (a) vista frontal, (b) vista superior e (c) vista superior dos reatores na estufa com agitação.

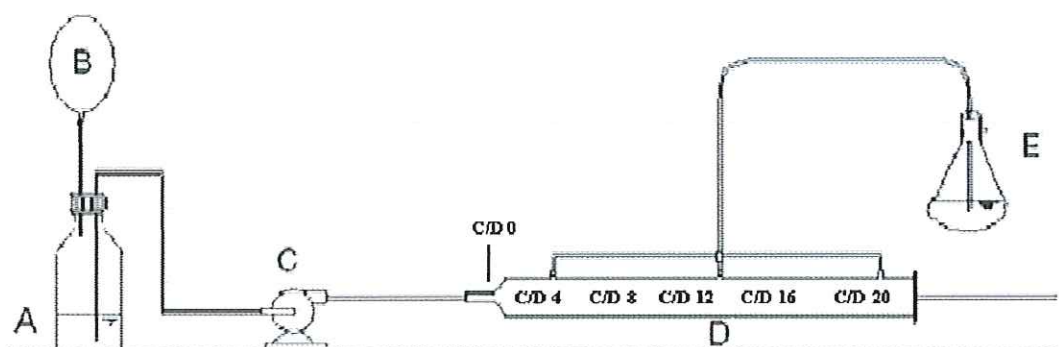
Após distribuição e homogeneização das soluções nos reatores, os mesmos foram submetidos a atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70/30%) durante 15 minutos, sob condições de assepsia. Em seguida, o lodo homogeneizado em liquidificador doméstico foi adicionado ao meio e, finalmente, os reatores foram

lacrados. Os reatores foram colocados sob agitação orbital contínua de 100 rpm e mantidos a temperatura de  $30 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$  (Figura 6).

As fontes de carbono usadas em ambos os meios foram; lactato de sódio e etanol nas concentrações de  $1800 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $460 \text{ mg.l}^{-1}$ , respectivamente. Nos ensaios em batelada o sulfato foi adicionado na forma do sal sulfato ferroso na concentração de  $960 \text{ mg.l}^{-1}$ , em ambos os meios. Nestes ensaios foi utilizada a relação  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 3:1.

#### 4.4. Ensaios contínuos em reator anaeróbio horizontal de leito fixo

O reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) foi construído em vidro de boro-silicato, com 100 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, contendo 2,0 L de volume total e 0,8 L de volume líquido (Figura 7). Foram utilizados dois RAHLF preenchidos com matrizes de espuma de poliuretano contendo lodo imobilizado proveniente de reator UASB aplicado no tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves. O lodo foi macerado em liquidificador com meio basal Zinder e colocado em contato com as espumas em Becker de 2,0 L (mesmo volume do reator), por período de aproximadamente 24 horas. Após este período de imobilização da biomassa, as espumas foram transferidas para o interior dos reatores (ZAIAT, 1996).



**Figura 7.** Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada: (A) reservatório de afluente, (B) bolsa de gás com  $\text{N}_2/\text{CO}_2$ , (C) bomba peristáltica, (D) reator, (E) saída do gás.

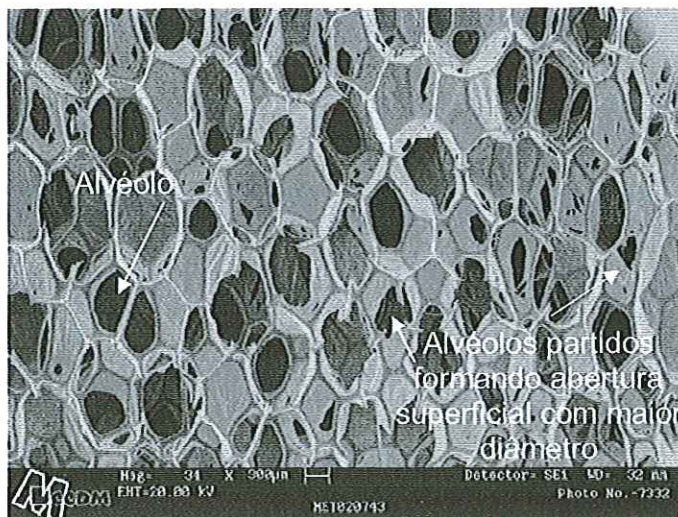
Fonte: DE NARDI (2002).

##### 4.4.1. Material suporte para crescimento microbiano

Foram usadas espumas de poliuretano (densidade aparente de  $23 \text{ Kg. m}^{-3}$ ) cortadas em cubos de 0,5 cm de aresta. A espuma usada era composta de diversos alvéolos partidos (aberturas superficiais) e de alvéolos propriamente ditos (Figura 8). Após a realização de 100 medidas o diâmetro equivalente médio da abertura superficial



da espuma de poliuretano foi de  $757 \pm 174 \mu\text{m}$  e o diâmetro dos alvéolos da espuma foi de  $543 \pm 154 \mu\text{m}$  (Certificado 02/003276 de 2 de julho de 2002 - CCDM).



**Figura 8.** Morfologia dos alvéolos. Alguns destes, que se encontram na superfície da espuma, se rompem e forma aberturas com maior diâmetro equivalente.

**Fonte:** CCDM – Universidade Federal de São Carlos.

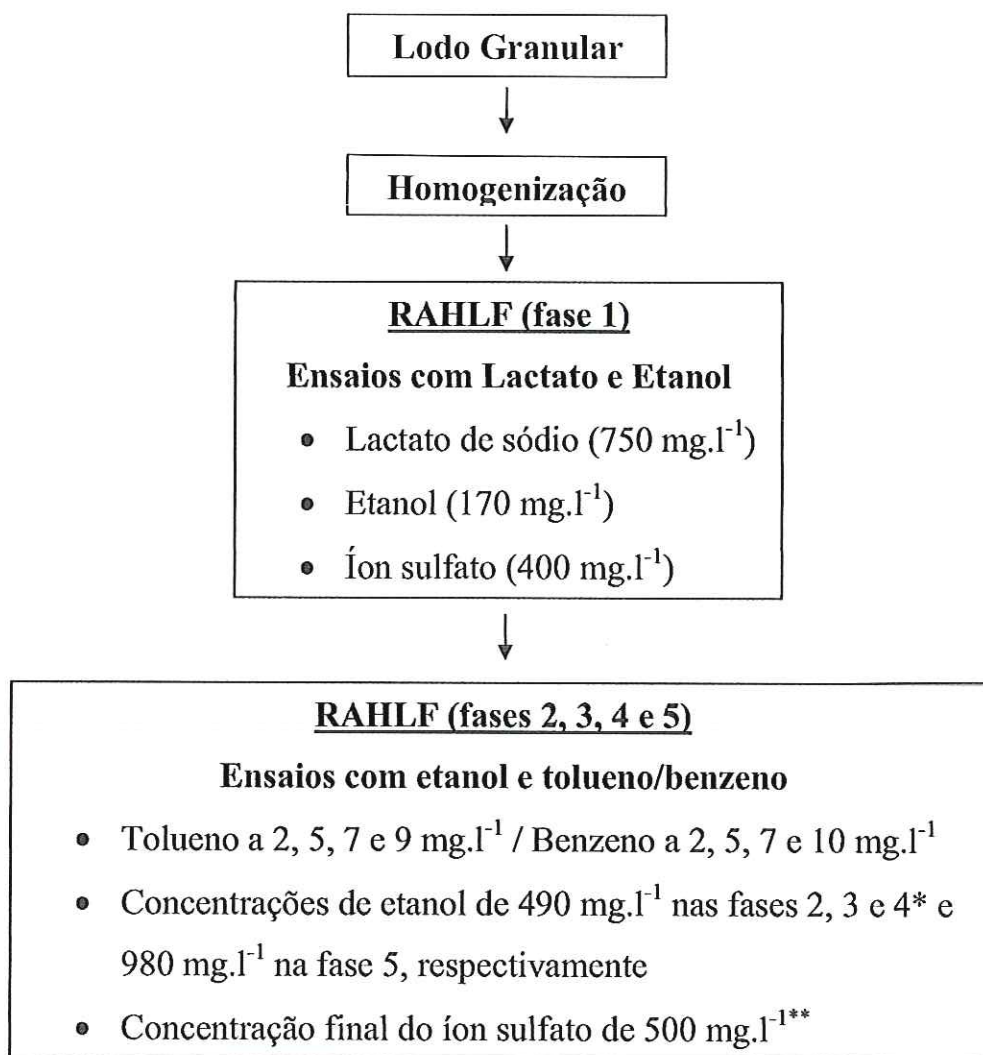
#### 4.4.2. Condições operacionais

A Figura 9 mostra o diagrama das fases 1, 2, 3, 4 e 5, onde estão descritas as composições do substrato sintético usadas em cada fase.

O reator foi mantido a temperatura controlada de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , com tempo de detenção hidráulica (TDH) de  $12 \pm 0,5$  h em todas as fases. Os reservatórios afluente ao reator, foram submetidos a atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70/30%) por 15 minutos, antes de serem conectados aos reatores, a fim de se manter as condições de anaerobiose do sistema. A bolsa de gás acoplada ao frasco de alimentação teve como função manter a atmosfera do frasco em condições de anaerobiose.

Após período inicial de enriquecimento do biofilme, um dos reatores foi usado para os ensaios com tolueno, enquanto o outro usado para os ensaios com benzeno. Como substrato para as bactérias, foi utilizado o meio basal Zinder *et al.* (1984). A solução de vitaminas utilizada foi a descrita por TOUZEL & ALBAGNAC (1983), acrescida de ácido 4-aminobenzóico (4 mg/L). Segundo WIDDEL & BAK (1992), este ácido é necessário ao melhor desenvolvimento de BRS. A princípio foi utilizada relação  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 2:1 nos meios de alimentação dos reatores, com o decorrer do experimento esta relação não foi mais respeitada.





\*Nos ensaios com benzeno, a concentração de etanol foi elevada para 980 mg.l<sup>-1</sup> na fase 4.

\*\*Todos os cálculos de concentração de sulfato foram relativos ao íon sulfato.

**Figura 9.** Diagrama das fases operacionais 1, 2, 3, 4 e 5 em RAHLF.

Na fase 1, de enriquecimento do biofilme, os reatores foram alimentados com lactato de sódio e etanol (99%), nas concentrações de 750 mg.l<sup>-1</sup> e 170 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. Nessa fase, foram adicionados sulfato ferroso e sulfato de sódio nas concentrações de 91 mg.l<sup>-1</sup> e 550 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. Após a adição de tolueno ou de benzeno, nos respectivos reatores, lactato de sódio não foi mais usado e as concentrações de etanol e de sulfato de sódio foram elevadas para 490 mg.l<sup>-1</sup> e 695 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. A concentração de sulfato ferroso não foi alterada em nenhuma fase dos experimentos. Sendo assim, o conteúdo total de íon sulfato no substrato afluente foi de 400 mg.l<sup>-1</sup> na fase 1 e de 500 mg.l<sup>-1</sup> nas fases subsequentes. Foi utilizada solução estoque de sulfato de sódio (2 M) e outra de sulfato ferroso (1 M), ambas preparadas sob condições de assepsia. A concentração final de sulfato foi definida

experimentalmente, após, a estabilização do sistema; ou seja, para concentrações de sulfato de sódio superiores a 500 mg.l<sup>-1</sup> no substrato afluente, sempre foram observadas concentrações residuais de sulfato no efluente. Desse modo, o conteúdo equivalente aos valores residuais foi, então, subtraído do meio nutritivo.

O etanol foi utilizado como substrato principal, nas fases 2, 3, 4 e 5, por sua capacidade de aumentar a solubilidade de tolueno e benzeno no meio e, conseqüentemente, aumentar a disponibilidade dos mesmos. Sendo assim, tolueno ou benzeno foi adicionado em volume calculado de etanol (99%) antes de ser misturado ao substrato sintético. Na fase de enriquecimento (fase 1), volume específico de etanol (99%) foi adicionado diretamente ao meio para a obtenção da concentração final de 170 mg.l<sup>-1</sup>.

Nas fases 2, 3 e 4, dos ensaios com tolueno, a concentração de etanol foi elevada de 170 para 490 mg.l<sup>-1</sup>. Já nos ensaios com benzeno a concentração final de 490 mg.l<sup>-1</sup> de etanol foi usada somente nas fases 2 e 3. Nas fases 4 e 5 para o benzeno e na fase 5 para o tolueno, houve a necessidade do aumento da concentração de etanol para 980 mg.l<sup>-1</sup> possibilitando, deste modo, a solubilização completa do composto aromático no meio.

O aumento nas concentrações de tolueno ou benzeno só ocorreu depois da estabilização do reator verificada através dos valores obtidos para conteúdo de matéria orgânica (expressa em DQO), conteúdo de sulfato, de sólidos suspensos voláteis (SSV), de ácidos e alcalinidade gerados (método volumétrico) na entrada e saída do reator. Depois de verificadas as estabilizações do reator, foram realizados perfis espaciais de amostragem (período de amostragem ao longo de todo o leito do reator). Nesta fase, foram realizadas análises do conteúdo de matéria orgânica, conteúdo de sulfato, sólidos suspensos voláteis, de ácidos e alcalinidade, ácidos orgânicos e compostos aromáticos por cromatografia gasosa. Somente, após estas análises as concentrações dos compostos aromáticos foram aumentadas configurando nova fase operacional.

#### **4.4.3. Amostragem**

As amostras estudadas foram retiradas do afluente, efluente e ao longo do reator. Os pontos de amostragem correspondem em relação C/D (comprimento/diâmetro) a 0, 4, 8, 12, 16 e 20, respectivamente. Nas análises de Biologia Molecular foi mencionado o ponto C/D 0 que se refere à interface entre o biofilme e a mangueira de alimentação do reator (Figura 7).

#### **4.5. Análises físico-químicas**

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), de sólidos suspensos voláteis (SSV) e de sulfato foram realizadas de acordo com métodos descritos no STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998). Somente as amostras usadas para as análises de DQO e sulfato foram filtradas em membranas com diâmetro de poro de 0,45 µm.

As análises de SSV da biomassa final foram realizadas com dez espumas de poliuretano retiradas do trecho inicial e final do leito de cada um dos reatores nas fases de enriquecimento e ao final das fases com 9 mg.l<sup>-1</sup> de tolueno, em um dos reatores, e 10 mg.l<sup>-1</sup> benzeno, no outro reator. A biomassa aderida foi extraída através de agitação manual em frascos de antibiótico com pérolas de vidro e água destilada (2 g de pérolas/10 ml de água). Os frascos foram agitados durante 20 minutos em ângulo de 45°. Posteriormente, a biomassa livre foi transferida para cubetas apropriadas para a análise de SSV.

As análises volumétricas de ácidos e alcalinidade seguiram os protocolos propostos por DILALLO & ALBERTSON (1961) e RIPLEY *et al* (1986), respectivamente.

#### **4.6. Análises cromatográficas**

A composição do biogás foi analisada na atmosfera dos reatores através de cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo Gow Mac, serie 150, com detector de condutividade térmica. Foi utilizada coluna Porapak Q, temperatura de injeção de 50°C, volume de injeção de 0,5 mL e fluxo do gás de arraste (hidrogênio) de 60 mL.min<sup>-1</sup>.

A determinação da concentração de etanol nas diferentes amostragens foi realizada a partir da técnica de enriquecimento pós *headspace*, e usado cromatógrafo gasoso HP 6890. As amostras foram retiradas do *headspace* dos frascos de antibiótico, contendo volumes conhecidos de amostras e padrões, após aquecimento a temperatura de ebulição da água durante 15 minutos. O volume das injeções foi de 300 µL.

Na determinação dos ácidos, láctico, acético e propiônico, nos ensaios em batelada, foi utilizado o sistema HPLC (Cromatógrafo líquido de alta pressão) Shimadzu com os seguintes módulos: detector de UV com arranjo de diodos (SP-M10A vp), bomba (LC-10AD vp), forno (CTO-10A vp), controlador (SCL-10A vp). A coluna usada para todas as determinações foi a AMINEX HPX-87H. Todas as amostras e



soluções padrões foram desgaseificadas, com hélio, acidificadas e diluídas em 10,0mL com solução de ácido sulfúrico 0,005M (solução eluente). As injeções foram de 400µL.

As análises de ácido acético e propiônico, das amostras obtidas dos ensaios contínuos, foram realizadas por cromatografia gasosa (GC-FID HP 6890, HP-1 coluna 100% bi-methylpolissiloxano) segundo MORAES *et al.*, 2000. As análises de tolueno e de benzeno, das amostras obtidas dos ensaios contínuos, foram realizadas por cromatografia gasosa (GC-FID HP 6890, HP-1 coluna 100% dimetilpolissiloxano) segundo DE NARDI *et al.*, 2002.

#### 4.7. Modelo cinético

Foi proposto modelo cinético a partir de reações paralelas em série de primeira e segunda ordem irreversíveis com dois produtos metabólicos intermediários para a remoção de benzeno e tolueno. As constantes cinéticas do processo descritas na Figura 10 foram estimadas através de otimização algorítmica baseada no método Runge-Kutta (MICROSOFT EXCEL 2000 - SOLVER).

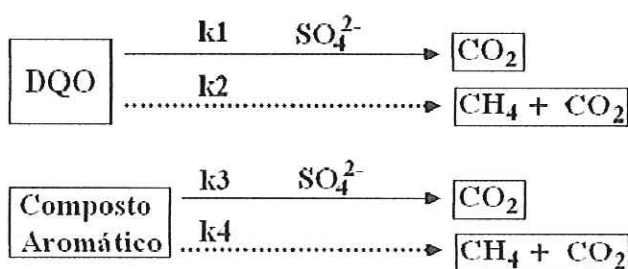


Figura 10. Diagrama do modelo cinético proposto.

O balanço de massa realizado para cada substrato e para os produtos intermediários, considerando o reator como perfeito *plug-flow* (DE NARDI *et al.*, 1999), resultaram no seguinte sistema de equações diferenciais não lineares:

Balanço de massa para DQO:

$$-\frac{v_s}{D} \cdot \frac{dC_{DQO}}{d(C/D)} = k_1 \cdot (C_{DQO} - C_{DQO_R}) \cdot C_{SO_4^{2-}} + k_2 \cdot (C_{DQO} - C_{DQO_R}) \quad (3)$$

Balanço de massa para Benzeno:

$$-\frac{v_s}{D} \frac{dC_{\text{benzeno}}}{d(C/D)} = k_3 \cdot C_{\text{benzeno}} \cdot C_{\text{SO}_4^{2-}} + k_4 \cdot C_{\text{benzeno}} \quad (4)$$

Balanço de massa para Tolueno:

$$-\frac{v_s}{D} \frac{dC_{\text{tolueno}}}{d(C/D)} = k_3 \cdot C_{\text{tolueno}} \cdot C_{\text{SO}_4^{2-}} + k_4 \cdot C_{\text{tolueno}} \quad (5)$$

Balanço de massa para sulfato:

$$-\frac{v_s}{D} \frac{dC_{\text{SO}_4^{2-}}}{d(C/D)} = [k_1 \cdot (C_{\text{DQO}} - C_{\text{DQO}_R}) + k_3 \cdot C_{\text{tolueno}}] \cdot C_{\text{SO}_4^{2-}} \quad (6)$$

As equações (3) a (6) estão relacionadas, respectivamente, a: (3) degradação de DQO, (4) remoção de benzeno, (5) remoção de tolueno, (6) consumo de sulfato. O significado de cada parâmetro é dado a seguir: D é o diâmetro do reator; C é o comprimento;  $v_s$  é a velocidade superficial;  $C_{\text{DQO}}$  é a concentração de matéria orgânica ( $\text{mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{l}^{-1}$ );  $C_{\text{benzeno}}$  é a concentração de benzeno ( $\text{mg}_{\text{benzeno}} \cdot \text{l}^{-1}$ );  $C_{\text{tolueno}}$  é a concentração de tolueno ( $\text{mg}_{\text{tolueno}} \cdot \text{l}^{-1}$ );  $C_{\text{SO}_4^{2-}}$  é a concentração de sulfato ( $\text{mg}_{\text{sulfato}} \cdot \text{l}^{-1}$ );  $C_{\text{DQO}_R}$  é a concentração de matéria orgânica residual ( $\text{mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{l}^{-1}$ );  $k_1$  e  $k_3$  ( $\text{l} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{sulfato} \cdot \text{h}^{-1}$ ) são os coeficientes cinéticos aparentes de segunda-ordem, e  $k_2$  e  $k_4$  ( $\text{h}^{-1}$ ) são os coeficientes cinéticos aparentes de primeira-ordem. A adsorção dos compostos aromáticos não foi considerada no modelo matemático devido ao fato de não terem sido consideradas etapa limitante nas taxas de remoção.

#### 4.8. Exames microscópicos

O exame microbiológico do lodo enriquecido e biofilme foi realizado em microscópio Leica DM LB, acoplado a câmara Leica DC 200 e software Image-Pro plus (versão 4.5.0.19).

As células crescidas na espuma de poliuretano foram observadas, também através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme método descrito por Nation (1983) e modificado por ARAUJO *et al.* (2000) para biofilmes microbianos.

Para a realização destas análises foram retiradas espumas do interior do reator, com o auxílio de pinça, em todos os pontos de amostragem, sempre após os perfis. Para

análise da diversidade morfológica foram observados, aproximadamente, 30 campos microscópicos por amostra.

#### 4.9. Análises de biologia molecular

No presente trabalho, a partir do DNA extraído da biomassa aderida as espumas de poliuretano, foram obtidos fragmentos de DNAr 16S, utilizando-se a técnica do PCR com *primers* homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S (Tabela 13). Os primers usados foram: 968F-GC e 1392R específicos para o Domínio *Bacteria*; GM5F-GC e 907R específicos para BRS, 1100F-GC e 1400R que amplificam o DNA 16S do Domínio *Archaea*. Como o inóculo utilizado no reator apresentava comunidades mistas de microrganismos, foram realizadas três abordagens de estudo: (1) Análise da comunidade bacteriana, (2) Análise da comunidade de BRS e (3) Análise da comunidade de arqueãs (Tabela 13).

As amplificações realizadas foram feitas com o uso de termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.).

**Tabela 13.** *Primers* usados nos experimentos com PCR.

<i>Primers</i> <sup>a</sup>	DNAr 16S alvo	Seqüência (5'→3')	Referência
968F-GC	Bacteria	GC-AACGCGAAGAACCCTTAC	NIELSEN <i>et al.</i> (1999)
1392R	Bacteria	ACGGGCGGTGTGTAC	
1100F-GC	Archaea	GC- AACCGTCGACAGTCAGGYAACGAGCGAG	KUDO <i>et al.</i> (1997)
1400R	Archaea	CGGCGAATTCGTGCAAGGAGCAGGGAC	
GM5F-GC	BRS	CCTACGGGAGGCAGCAG	NAKAGAWA <i>et al.</i> (2002)
907R	Universal	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	MUYZER <i>et al.</i> (1995)
GC.		CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGG	MUYZER <i>et al.</i> (1996)

<sup>a</sup> F, *forward primers*; R, *Reverse primers*; GC., seqüência rica em G+C anexada ao final 5' da molécula de DNA.

Para as amplificações específicas de fragmentos de DNAr 16S para o grupo das BRS, para *Bacteria* e para *Archaea*, foi utilizada mistura de reação (volume final de 50µl) descrita a seguir: 0,8µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl), 10µl de tampão da Taq



(1x) (já contendo  $MgCl_2$ ), 5,0 $\mu$ l de DMSO (5%), 0,8  $\mu$ l de dNTP's (0,2mM), 2 $\mu$ l de F968 (0,4 $\mu$ M), 2 $\mu$ l de R1392 (0,4 $\mu$ M), 2 $\mu$ l de 1100F (0,4 $\mu$ M) e 2 $\mu$ l de 1400R (0,4 $\mu$ M). A amplificação para BRS e *Bacteria* ocorreu seguida de 35 ciclos variando-se a temperatura entre 92°C (por 30 segundos), 57°C (por 1 minuto) e 72°C (por 45 segundos) respectivamente; 1 ciclo a temperatura de 72°C (por 5 minutos) e, finalmente, resfriamento à 4°C. A amplificação para *Archaea* ocorreu seguida de 30 ciclos variando-se a temperatura entre 94°C (por 30 segundos), 55°C (por 30 segundos) e 72°C (por 1 minuto e 30 segundos) respectivamente; 1 ciclo a temperatura de 72 °C (por 3 minutos) e finalmente resfriamento à 4°C.

O sistema de DGGE utilizado foi o “D Code<sup>TM</sup> - Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia) e, utilizado, exatamente, como descrito pelos fabricantes no manual de instruções. Os géis paralelos foram feitos variando-se a concentração de desnaturante de 30 a 70%. Os géis polimerizaram pela adição de 150  $\mu$ l de persulfato de amônio 10% e 14  $\mu$ l de TEMED (para concentração final de 0,09%). As eletroforeses ocorreram na voltagem constante de 50 V e temperatura de 60°C por 14 horas. As alíquotas de PCR adicionadas no gel foram de 24  $\mu$ l. Os géis foram corados com 10 ml de solução de coloração (TAE 1x contendo 1 $\mu$ g/ml de Brometo de Etídeo). Finalmente, os géis foram fotografados em câmara escura “Eagle Yey II” (Stratagene) e processados com o software “Eaglesight” (Stratagene - versão 3.22).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários meios de cultura vêm sendo usados para o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, porém, nenhum deles é ideal para todas as espécies. A anaerobiose e o potencial redox negativo, obtido através do uso de soluções redutoras, são dois pontos em comum entre todos os meios. Nutrientes complexos, como por exemplo, extratos de levedura e peptonas não são necessários para o crescimento das BRS Gram-positivas conhecidas. No entanto, nutrientes complexos podem estimular o crescimento de várias Gram-negativas (BALOWS *et al.*, 1992).

Dentro deste contexto, ZINDER *et al.* (1984) demonstraram com sucesso o uso de meios específicos para o isolamento da maioria das bactérias anaeróbias (VAZOLLER, 1997), enquanto que, BELLER *et al.* (1996) demonstraram com sucesso o uso de meios específicos para o crescimento de BRS. Neste estudo, foram avaliadas as duas condições nutricionais com as mesmas fontes de carbono, lactato de sódio e etanol, na presença de sulfato ferroso. Através de análises físico-químicas e exames microscópicos foram obtidos resultados relacionados com o enriquecimento do lodo, bem como, do crescimento de morfologias semelhantes às bactérias redutoras de sulfato nos reatores de batelada.

Apesar do lodo usado, como inóculo para todos os ensaios, ser predominantemente metanogênico, HIRASAWA *et al.* (2004), mostraram, nas análises de FISH (Hibridação de fluorescência *in situ*) que do total das células coradas com DAPI,  $45 \pm 3\%$  pertenciam ao Domínio *Bactéria* (sonda EUB 338). Ou seja, os autores evidenciaram que 45% das células presentes no lodo não utilizavam o metabolismo metanogênico. Sendo assim, o lodo, escolhido como inóculo neste trabalho, apresentou potencial metabólico para ser explorado.

O objetivo desta primeira etapa do trabalho foi avaliar a melhor condição nutricional, para o crescimento de populações de bactérias redutoras de sulfato a partir de lodo predominantemente metanogênico.

### 5.1. Ensaio de enriquecimento em batelada

O consumo da matéria orgânica expressa em DQO, sulfato e produção de metano nas duas condições nutricionais estão mostrados nas Figura 11 e 12. Nesta fase experimental todos os ensaios foram realizados em reatores em batelada.

A DQO inicial de aproximadamente 3000 mg.l<sup>-1</sup> reduziu para 200 mg.l<sup>-1</sup> nos reatores alimentados com meio Beller (eficiência de remoção de 93%), e 100 mg.l<sup>-1</sup> nos reatores alimentados com meio Zinder (eficiência de remoção próxima a 97%). Porém, nos reatores alimentados com meio Beller, o tempo para a estabilização da matéria orgânica coincidiu com o tempo de consumo total de sulfato (1000 mg.l<sup>-1</sup>). Nos reatores alimentados com meio Zinder a estabilização da matéria orgânica ocorreu 40 horas depois da estabilização do sulfato que não foi completamente consumido, restando 300 mg.l<sup>-1</sup> (consumo de 70% do sulfato). Estes dados sugeriram ligeiro favorecimento nutricional para as bactérias redutoras de sulfato nos reatores alimentados com meio Beller.

Nos presentes ensaios, onde foi usada relação  $DQO/SO_4^{2-} = 3$ , a porcentagem de metano, na atmosfera dos reatores, foi praticamente à mesma nas duas condições nutricionais, ou seja, de 35%. Porém, este valor foi alcançado com intervalo de tempo diferente, 100 horas nos reatores alimentados com meio Zinder e 120 horas nos reatores alimentados com meio Beller.

Fatibello (2001) enriqueceu lodo metanogênico, proveniente de reator UASB, em ensaios em batelada, com meio Zinder (relação  $DQO/SO_4^{2-} = 12$ ), acrescido, das fontes de carbono, acetato de sódio (1640 mg.l<sup>-1</sup>), propionato de sódio (1920 mg.l<sup>-1</sup>), glicose (180 mg.l<sup>-1</sup>), butirato de sódio (2000 mg.l<sup>-1</sup>), lactato de sódio (2240 mg.l<sup>-1</sup>) e metanol (320 mg.l<sup>-1</sup>) na presença de sulfato de sódio (1420 mg.l<sup>-1</sup>), e observou valores de metano próximos a 70% na atmosfera dos reatores após um período de 219 dias de operação. Silva (2004) enriqueceu lodo sulfetogênico, proveniente de RAHLF, em ensaios em batelada com, com meio Zinder (relação  $DQO/SO_4^{2-} = 13,8$ ), acrescido, das fontes de carbono acetato de sódio (2500 mg.l<sup>-1</sup>), lactato de sódio (2000 mg.l<sup>-1</sup>), propionato de sódio (1700 mg.l<sup>-1</sup>), butirato de sódio (2000 mg.l<sup>-1</sup>), formiato de sódio (2500 mg.l<sup>-1</sup>) e etanol (920 mg.l<sup>-1</sup>) na presença de sulfato de sódio (1000 mg.l<sup>-1</sup>), e observou valores de metano próximos a 35% na atmosfera dos reatores após um período de 400 horas. Comparando os dados obtidos por Fatibello (2001) e Silva (2004), onde as condições nutricionais foram semelhantes, inclusive quanto a relação  $DQO/SO_4^{2-}$ , provavelmente as diferenças no potencial metanogênico estivessem relacionadas com o



período de operação e com os diferentes inóculos. Finalmente, comparando as porcentagens de metano, obtidas pelos autores, acima citados, com as obtidas neste trabalho, conclui-se que, tanto, em meio Beller, quanto, em meio Zinder, o consórcio microbiano enriquecido não privilegiou o metabolismo metanogênico.

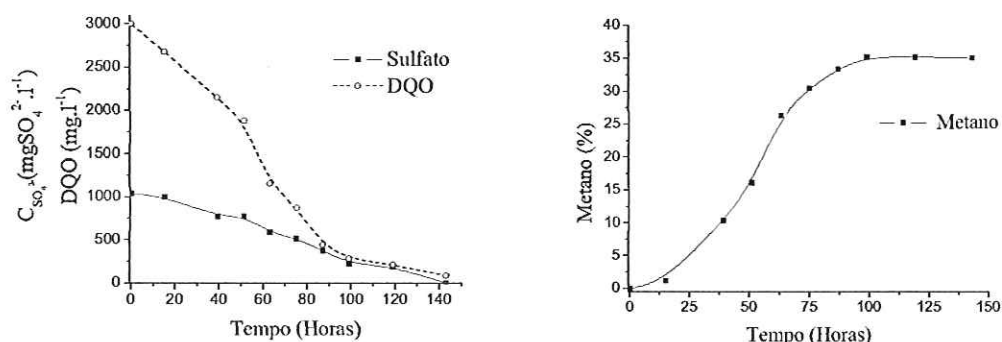


Figura 11. Variação temporal de matéria orgânica (expressa em DQO), sulfato e metano, nos reatores alimentados com meio Beller.

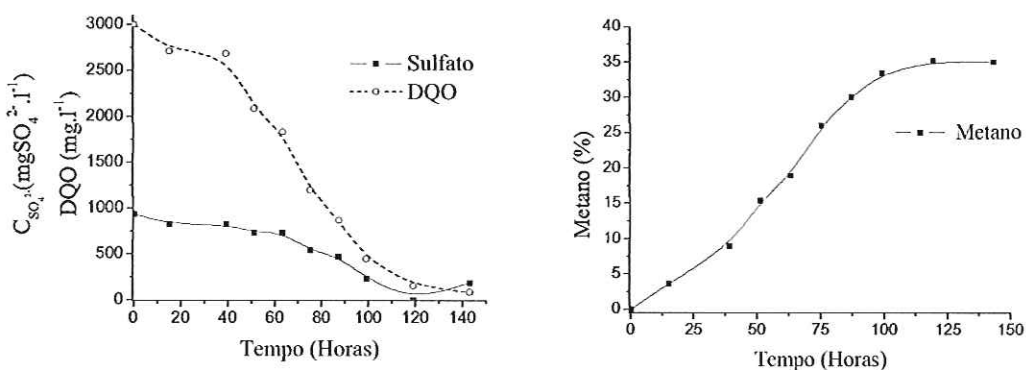


Figura 12. Variação temporal de matéria orgânica (expressa em DQO), sulfato e metano, nos reatores alimentados com meio Zinder.

O consumo dos substratos orgânicos, lactato e etanol estão apresentados nas Figuras 13 e 14. Esses resultados não mostraram diferenças significativas para as duas condições nutricionais estudadas. A diferença mais evidente foi em relação ao tempo de estabilização dos reatores. No meio Beller, o consumo e produção de ácidos orgânicos ocorreram em até 106 horas, coincidindo com a redução total do sulfato. Para o meio Zinder, essa estabilização orgânica ocorreu, após 120 horas, e não houve o consumo total de sulfato neste período.

Foi também observado, que somente nos reatores alimentados com meio Zinder, o etanol (460 mg.l<sup>-1</sup>) foi consumido preferencialmente ao ácido lático (1800 mg.l<sup>-1</sup>).

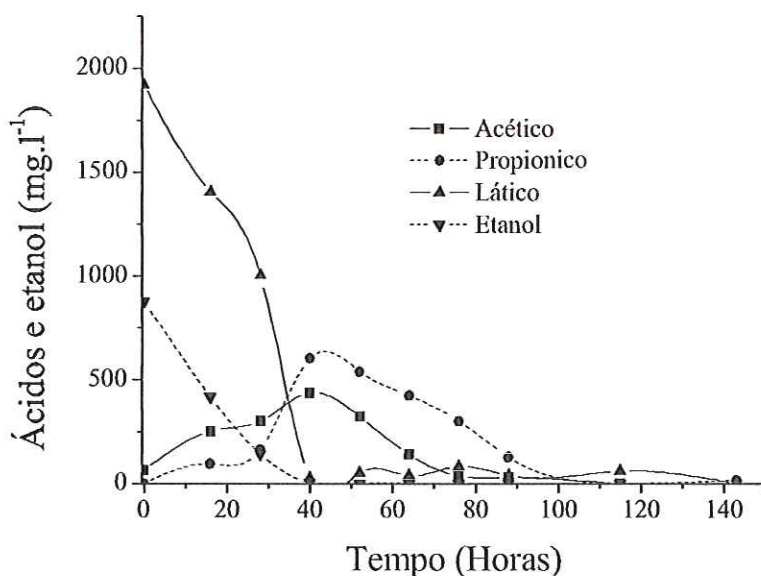


Figura 13. Variação temporal de ácido láctico, etanol, ácido acético e ácido propiônico, nos reatores em batelada alimentados com meio Beller.

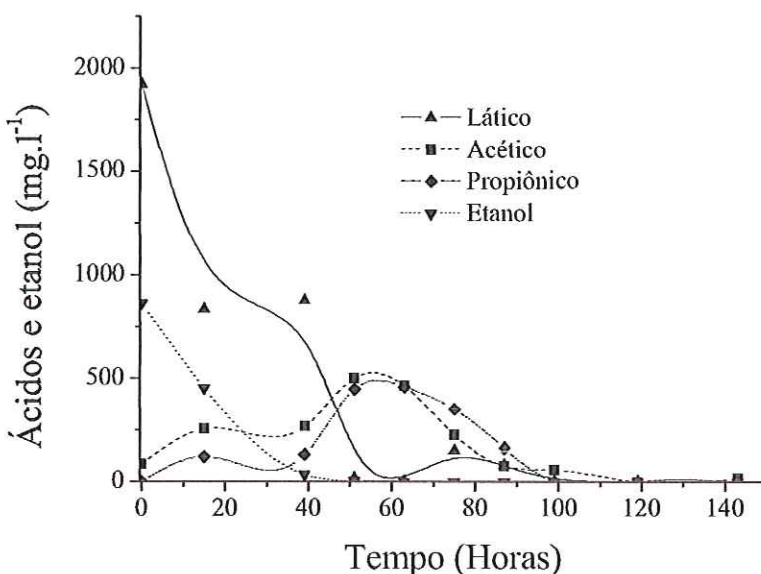


Figura 14. Variação temporal de ácido láctico, etanol, ácido acético e ácido propiônico, nos reatores em batelada alimentados com meio Zinder.

Segundo WIDDEL & HANSEN (1992) o lactato é o substrato clássico para o cultivo de bactérias redutoras de sulfato e utilizado pela maioria das espécies em cada gênero. Entretanto, algumas BRS tais como *Desulfoarculus baarsii*, a maioria das espécies do gênero *Desulfobacter* sp., e algumas espécies de *Desulfobacterium* sp., *Desulfonema* sp. e *Desulfotomaculum* sp. não podem usar o lactato.

Nas condições deste estudo, onde os reatores foram alimentados com etanol e lactato na presença de sulfato, era de se esperar a predominância de representantes semelhantes a *Desulfovibrio sp.* e *Desulfobulbus sp.*, que dentre todos os gêneros, de bactérias redutoras de sulfato, são os mais seletivamente favorecidos por estes substratos. A produção de acetato e propionato (Figura 13 e 14), nas duas condições nutricionais, indicou, provavelmente, a presença de *Desulfobulbus propionicus* ou de células aparentadas. Esse organismo tem o propionato como composto central de seu metabolismo energético (VAN ES *et al.*, 1984). O propionato pode ser formado por diferentes reações do metabolismo de *D. propionicus* partindo de lactato e etanol (Tabela 14) e, ainda, servir de substrato para a formação de acetato e vice-versa.

Células de *Desulfovibrio sp.* podem oxidar, incompletamente, lactato e etanol até acetato. Porém, a formação de acetato, por si só, não indica a presença de representantes de *Desulfovibrio sp.* visto que outras células podem fermentar lactato e etanol formando acetato.

As razões entre as concentrações de propionato/acetato produzidos, foram de 1,5:1 no meio Beller e de 1:1 no meio Zinder. Conclui-se, portanto, que nos reatores alimentados com meio Beller foram observadas, preferencialmente, as reações 4 e 5 da Tabela 14. Como estas reações não utilizam o sulfato como acceptor de elétrons, este deve estar sendo consumido pelas outras reações possíveis de *D. propionicus* (reações 2 e 3 da Tabela 14), por outras bactérias semelhantes a *Desulfobulbus sp.* ou, também, por representantes do gênero *Desulfovibrio sp.*. Nos reatores alimentados com meio Zinder, provavelmente, não houve pressão seletiva suficiente para deslocar a razão propionato/acetato para o propionato.

**Tabela 14.** Reações realizadas pelo metabolismo energético de *Desulfobulbus propionicus*.

Reação	$\Delta G^{0'}$
1. $\text{Propionato}^- + 3/4\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 3/4\text{HS}^- + 1/4\text{H}^+$	-37,9
2. $\text{Lactato}^- + 1/2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 1/2\text{HS}^- + 1/2\text{H}^+$	-80,2
3. $\text{Etanol} + 1/2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{acetato}^- + 1/2\text{HS}^- + 1/2\text{H}^- + \text{H}_2\text{O}$	-66,4
4. $\text{Lactato}^- \rightarrow 1/3\text{acetato}^- + 2/3\text{propionato}^- + 1/3\text{HCO}_3^- + 1/3\text{H}^+$	-54,9
5. $\text{Etanol} + 2/3\text{HCO}_3^- \rightarrow 1/3\text{acetato}^- + 2/3\text{propionato}^- + 1/3\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-41,4
6. $\text{Etanol} + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{propionato}^-$	-66,5
7. $\text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{propionato}^- + 3\text{H}_2\text{O}$	-76,1

Os valores de  $\Delta G^{0'}$  são expressos em Kilojoules por reação (pH 7,0).

Fonte: VAN ES *et al.* (1984).

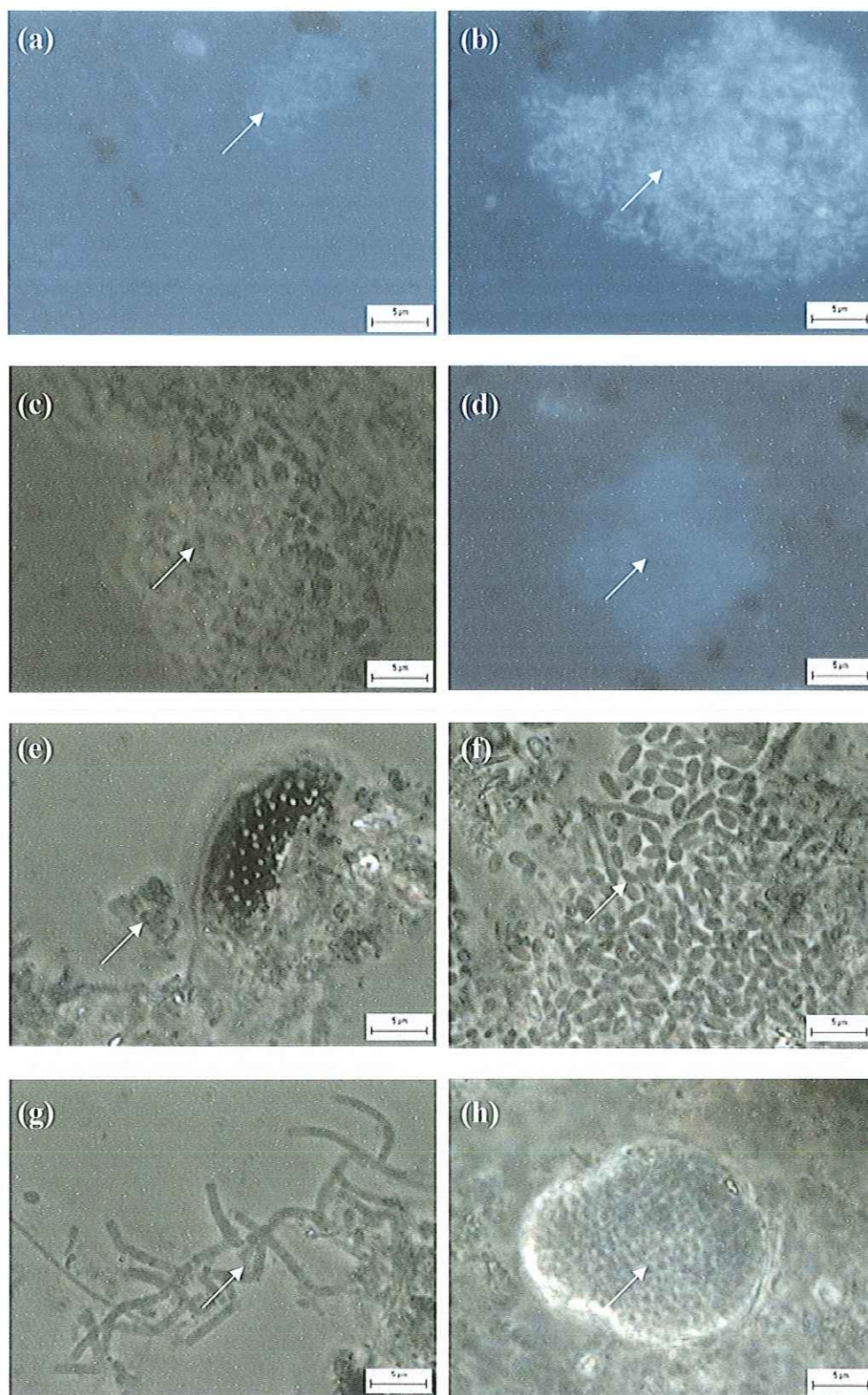


Notou-se que nas duas condições nutricionais, depois de esgotado o lactato, este volta a ser formado em pequenas concentrações (entre 50 e 100 mg.l<sup>-1</sup> nas duas condições nutricionais), o que poderia ser explicado, provavelmente, pelo metabolismo endógeno. Outra possibilidade poderia ser o erro na técnica cromatográfica. Porém, o comportamento metabólico foi idêntico em ambas condições nutricionais, bem como em todas as réplicas, tornando esta última hipótese pouco provável.

Nas duas condições nutricionais foram observadas morfologias semelhantes a bactérias e arqueas metanogênicas (Figuras 15 e 16). Foram visualizados poucos bacilos curvos e o predomínio de bacilos ovalados, filamentosos e cocos. Os bacilos ovalados sugeriram a semelhança com *Desulfobulbus sp.*. A baixa frequência de bacilos curvos sugeriu que não houve predomínio de *Desulfovibrio sp.* em nenhuma das duas condições nutricionais (Tabela 15).

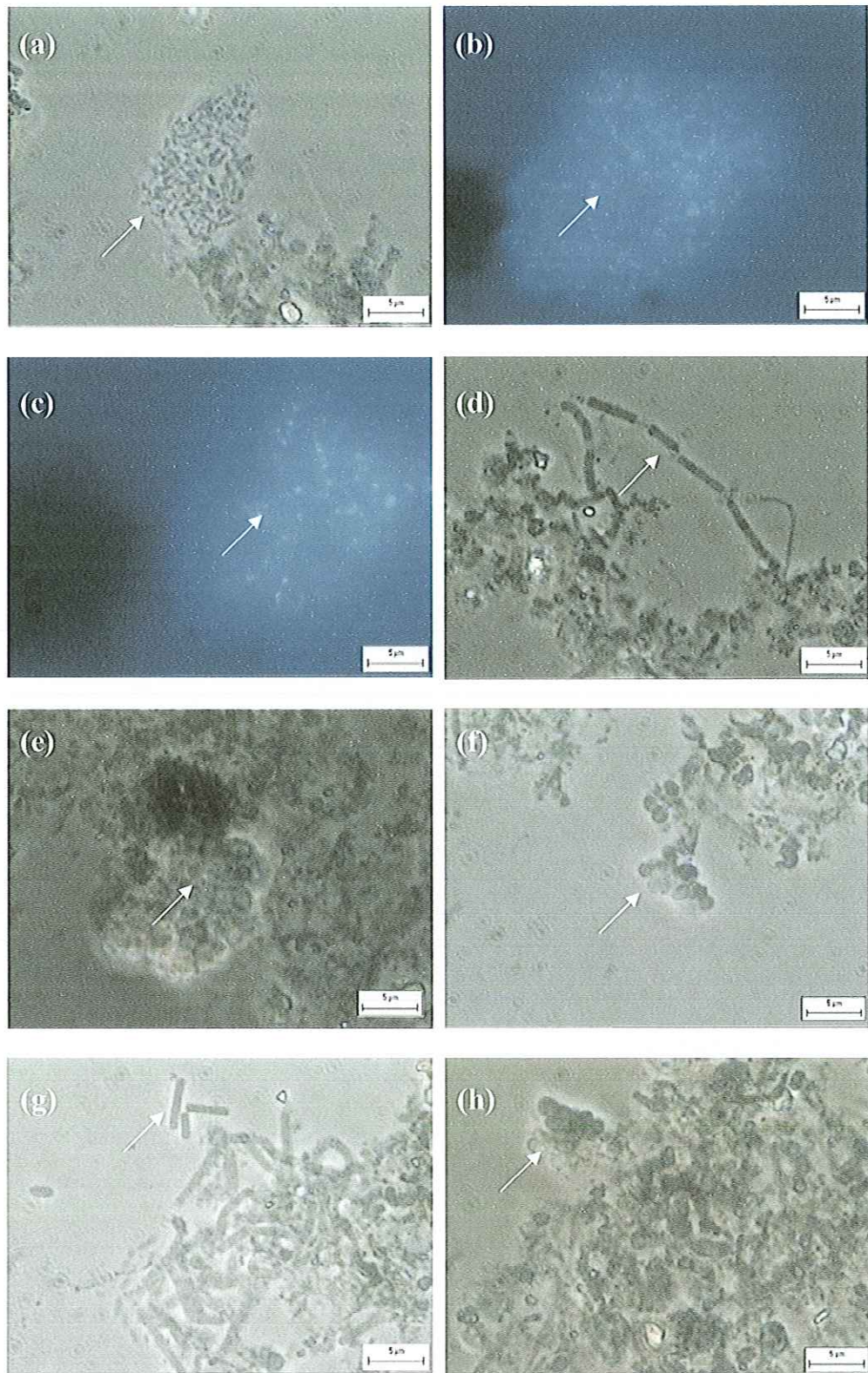
Em todos os ensaios foi detectado metano no biogás, sugerindo a presença de arqueas metanogênicas, as quais foram confirmadas, também, nos exames de microscopia óptica e fluorescência.

Provavelmente, os cocos fluorescentes estejam relacionados com o consumo de acetato e os bacilos fluorescentes com o consumo hidrogênio. Com relação a produção de propionato e a presença de bacilos ovalados, é provável que células semelhantes a *Desulfobulbus propionicus* estivessem presentes nas duas condições nutricionais, oxidando incompletamente, tanto, lactato, quanto, etanol, à acetato e propionato. Estas reações metabólicas de *D. propionicus* ocorreram com sutil vantagem competitiva no meio Beller.



**Figura 15.** Morfologias observadas em microscopia de contraste de fase e fluorescência de amostras dos reatores em batelada alimentados com meio Zinder: (a) e (b) bacilos fluorescentes, (c) e (d) *Methanosarcina* sp, (e) cocos, (f) bacilos ovalados, (g) *Methanosaeta* sp., (h) cisto.





**Figura 16.** Morfologias observadas em microscopia de contraste de fase e fluorescência de amostras dos reatores em batelada alimentados com meio Beller: (a) bacilos (b) e (c) bacilos e cocos fluorescentes, (d) bacilos retos, (e) sarcina, (f) cocos, (g) bacilos retos e filamentos, (h) cocos.



Tabela 15. Diversidade morfológica observada em amostras dos reatores em batelada.

<i>Morfologias</i>	<i>Condições</i>	
	Meio Zinder	Meio Beller
<b>ARQUÊAS METANOGÊNICAS</b>		
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	++++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++	+++
Bacilos fluorescentes	+++	++++
Cocos fluorescentes	+++	++
<b>BACTÉRIAS</b>		
Bacilos curvos	+	+
Bacilos delgados	+	+
Bacilos ovalados	++++	++++
Cocos	+++	+++
Filamentos	+	+

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

As análises realizadas permitiram concluir que, em ambos meios, ocorreu consumo de sulfato e crescimento de BRS. Os exames microscópicos, análises físico-químicas e cromatográficas mostraram resultados semelhantes com os dois meios estudados. No entanto, notou-se que o consumo total de sulfato ocorreu preferencialmente no meio Beller. Segundo WIDDEL & BAK (1992) o ácido 4-aminobenzóico, que está presente na solução de vitaminas para o meio Beller (Tabela 4), favorece o crescimento de BRS. A ausência deste nutriente no meio Zinder poderia ser a causa da sutil diferença entre os dois meios quanto ao consumo de sulfato. Embora, as condições de alimentação favoráveis as BRS tenham sido obtidas em ambos meios, optou-se por utilizar o meio Zinder, nos ensaios contínuos em RAHLF, devido, principalmente, a menor quantidade de sais, vitaminas e soluções específicas, aliadas ao menor custo e facilidade de preparação.

## 5.2. Ensaios contínuos com tolueno e benzeno

Os ensaios contínuos em RAHLF foram iniciados com alimentação baseada em meio Zinder acrescido das fontes de carbono lactato de sódio e etanol, e ácido 4-aminobenzóico na solução de vitaminas. Em primeiro momento não foi adicionado

tolueno ou benzeno, optou-se por alimentar os dois reatores por período de 15 dias, até a completa estabilização dos sistemas, a qual foi verificada através das análises físico-químicas. Após essa fase de enriquecimento (fase 1), foram iniciados ensaios com alimentações crescentes de tolueno, em um dos reatores, e de benzeno, no reator remanescente; ou seja, 2, 5, 7 e 9 mg.l<sup>-1</sup> de tolueno, e 2, 5, 7 e 10 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno (fases 2, 3, 4 e 5, respectivamente).

A concentração de matéria orgânica expressa como DQO, a carga orgânica volumétrica e a concentração de sulfato, no afluente e efluente dos reatores, em todas as fases com tolueno e benzeno, estão mostrados na Tabela 16 e 17, e nas Figuras 17, 18, 19 e 20.

**Tabela 16.** Carga orgânica volumétrica referente a DQO aplicada, removida e residual, nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.

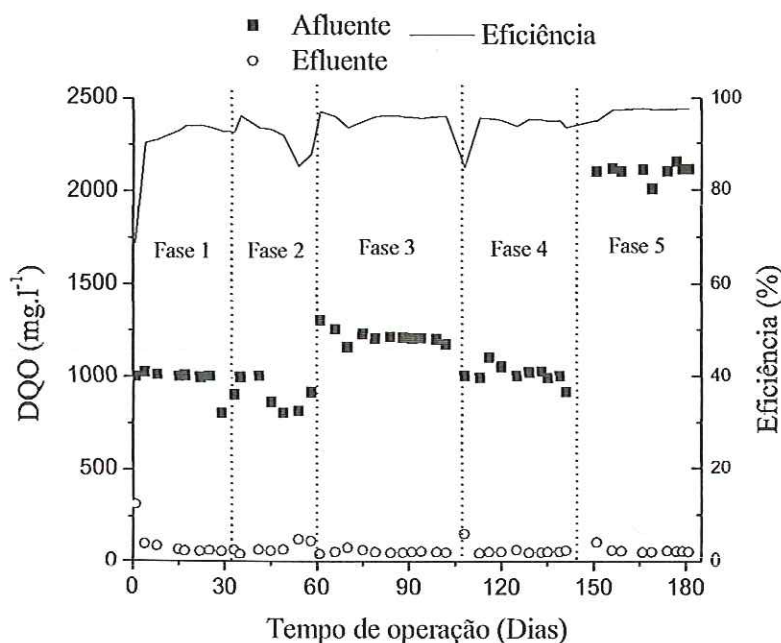
	Fase 1 (Enriq.)	Fase 2 (2 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 3 (5 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 4 (7 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 5 (9 mg.l <sup>-1</sup> )
COV <sub>DQO aplicada</sub> (mg/L.d)	2080	2100	2140	2030	4216
COV <sub>DQO removida</sub> (mg/L.d)	2040	2020	2042	1910	4116
COV <sub>DQO residual</sub> (mg/L.d)	40	80	98	120	100

**Tabela 17.** Carga orgânica volumétrica referente a DQO aplicada, removida e residual, nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.

	Fase 1 (Enriq.)	Fase 2 (2 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 3 (5 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 4 (7 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 5 (10 mg.l <sup>-1</sup> )
COV <sub>DQO aplicada</sub> (mg/L.d)	2000	2010	1940	4180	4300
COV <sub>DQO removida</sub> (mg/L.d)	1730	1850	1840	3940	4172
COV <sub>DQO residual</sub> (mg/L.d)	270	160	100	240	128

Na fase de enriquecimento (fase 1), do reator do ensaio com tolueno, a DQO inicial afluente foi de, aproximadamente, 1000 ± 8 mg.l<sup>-1</sup>, reduzindo para cerca de 100 ± 5 mg.l<sup>-1</sup> (eficiência de remoção próxima a 90%) no efluente. Período de 15 dias foi observado para estabilização da matéria orgânica, sendo que o maior consumo ocorreu, logo, no primeiro trecho do reator, correspondendo aos pontos de amostragem C/D 4 e C/D 8. No restante do reator, não houve alteração significativa na remoção da matéria orgânica (Figura 17).

Na fase 1, do reator do ensaio com benzeno, a DQO inicial afluente foi de  $1000 \pm 7 \text{ mg.l}^{-1}$ , decaindo para cerca de  $130 \pm 6 \text{ mg.l}^{-1}$  (eficiência de remoção de aproximadamente 87%) no efluente. Aqui, também, foram necessários 15 dias para que os valores de DQO se estabilizassem, sendo que o maior consumo da matéria orgânica, expressa em DQO, ocorreu logo no primeiro trecho do reator, correspondendo aos pontos de amostragem C/D 4 e C/D 8. No restante do reator, não houve alteração significativa da DQO (Figura 18). Nas fases de alimentação com benzeno a eficiência na remoção de matéria orgânica aumentou, sensivelmente, com exceção da fase 4 onde houve incremento na concentração de etanol de 460 para  $960 \text{ mg.l}^{-1}$ . Após a introdução de  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  benzeno na fase 2, a eficiência de remoção da matéria orgânica aumentou para 92%, ou seja,  $1000 \pm 4 \text{ mg.l}^{-1}$  foram reduzidos a  $80 \pm 3 \text{ mg.l}^{-1}$  no efluente. Esta eficiência se manteve inalterada na fase 3, diminuiu para 90% na fase 4 e melhorou até o valor de 97% na fase 5.



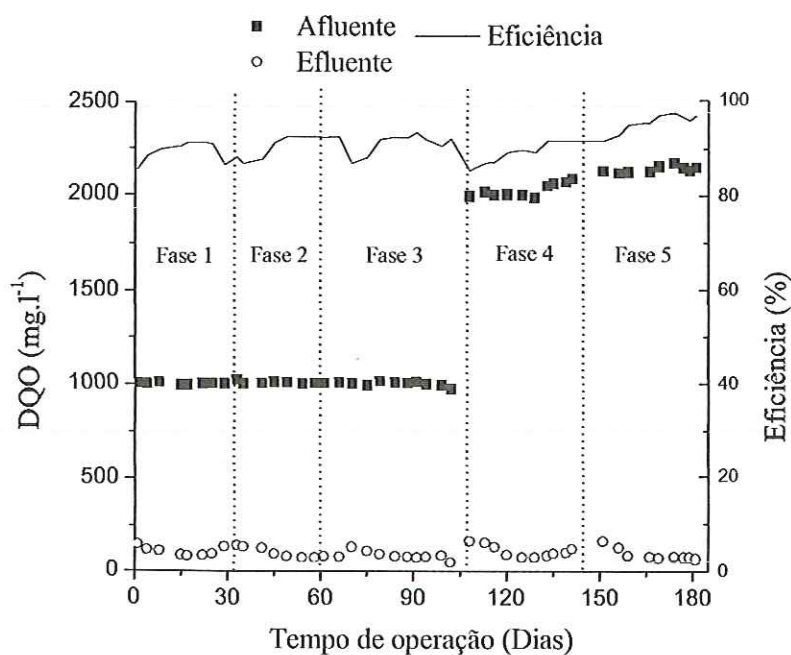
**Figura 17.** Variação temporal da matéria orgânica (expressa em DQO) nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.

O maior consumo de matéria orgânica, em todas as fases, nos dois reatores, ocorreu sempre no primeiro trecho do reator, correspondendo aos pontos de amostragem C/D 4 a 8. Nos demais pontos de amostragem ao longo dos reatores, constatou-se a presença de DQO residual, cujo valor, praticamente, não se alterou (Figuras 17 e 18).



Devido a abertura dos reatores para retirada das amostras, e sendo assim, devido a provável contaminação por oxigênio nos dois sistemas, observou-se diminuição da eficiência, tanto da remoção da matéria orgânica, quanto, na redução de sulfato, sempre nos períodos de amostragem (Figura 17 e 19).

Apesar da adição de tolueno e benzeno, ao longo do período de operação dos dois reatores, as eficiências na remoção de matéria orgânica e sulfato aumentaram sensivelmente (Figura 17, 18, 19 e 20). Este fato foi relacionado, provavelmente, ao tempo de adaptação dos biofilmes enriquecidos. Desta forma, foi observado que, após, a introdução de tolueno, em um reator, e de benzeno, no outro, a eficiência de remoção da matéria orgânica aumentou para 97%, ou seja, as concentrações de aromáticos estudadas não foram prejudiciais aos equilíbrios dos sistemas.



**Figura 18.** Variação temporal da DQO nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.

A remoção do sulfato, na fase de enriquecimento, dos dois reatores, apresentou o mesmo comportamento da remoção da matéria orgânica e sugeriu a presença de BRS (Figura 19 e 20). Alta eficiência de remoção, próxima a 100%, foi verificada no primeiro trecho dos reatores (C/D 4 a 8), logo após os primeiros 15 dias de operação.

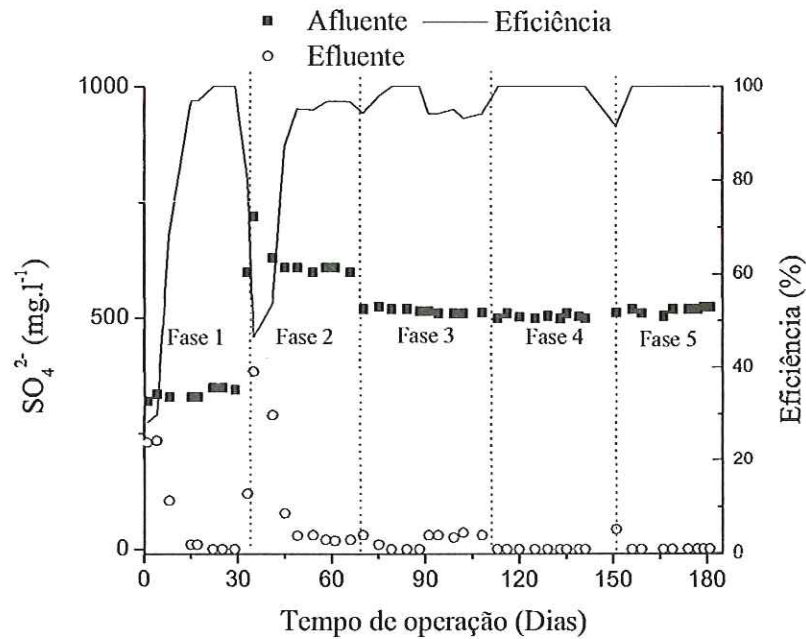


Figura 19. Variação temporal de sulfato nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.

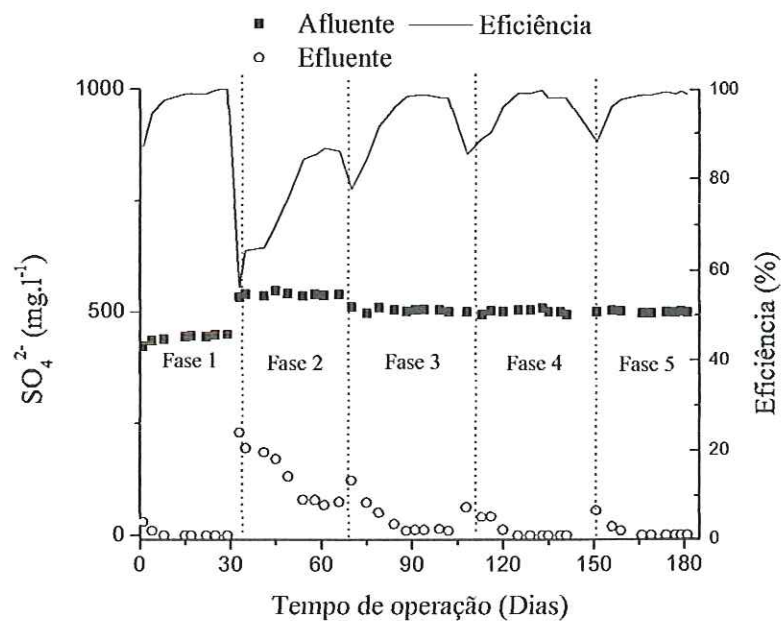
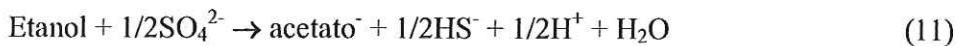
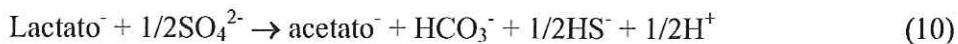
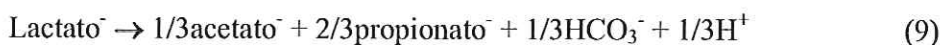


Figura 20. Variação temporal de sulfato nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.

A diminuição da eficiência na remoção de sulfato na fase 2, próxima a 70%, no ensaio com tolueno, e próxima a 86% , no ensaio com benzeno (Figura 19 e 20),

ocorreu devido ao aumento da concentração de sulfato não acompanhado pelo aumento da concentração de etanol. Sem o excedente de fonte de carbono, o sulfato não foi utilizado. Em valores absolutos, observou-se o consumo de  $480,0 \pm 3$  e de  $470 \pm 3 \text{ mg.l}^{-1}$  de sulfato, para os ensaios com tolueno e benzeno, respectivamente. Estes valores foram próximos aos  $490 \pm 4 \text{ mg.l}^{-1}$  consumidos nas outras fases. A relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> inicial de 2:1 não foi mais respeitada após a fase 1. Sendo assim, as concentrações de sulfato usadas, em ambos ensaios, foram sempre determinadas através da elevação dos valores de sulfato de sódio no substrato, como o observado na fase 2. Os valores da relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, usados nas diferentes fases, estiveram sempre entre 4 e 2.

O pH efluente próximo a 7,9 ( $\pm 0,1$ ), nos dois reatores, na fase de enriquecimento (Figuras 21 e 22), mostrou-se ligeiramente mais alcalino, em relação ao afluente de 7,6 ( $\pm 0,1$ ). Esta leve tendência de alcalinização foi comprovada, também, pelas análises volumétricas de alcalinidade (Figuras 23 e 24), correspondendo a  $40 \pm 8 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $164 \pm 5 \text{ mg.l}^{-1}$ , afluente-efluente respectivamente, para o ensaio com tolueno, e correspondendo a  $131 \pm 8 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $195 \pm 5 \text{ mg.l}^{-1}$ , afluente-efluente respectivamente, para o ensaio com benzeno. Esses valores foram relacionados com a produção de bases de sais de ácidos inorgânicos fracos (como, por exemplo, bicarbonato – equações 9, 10 e 12), de sais de ácidos voláteis (acetato e propionato na fase de enriquecimento – equações 9, 10, 11 e 12) e pela formação de íons OH<sup>-</sup> devido a hidrólise de água promovida pelos íons S<sup>2-</sup> e HS<sup>-</sup> como mostrado pelas equações (7) e (8).





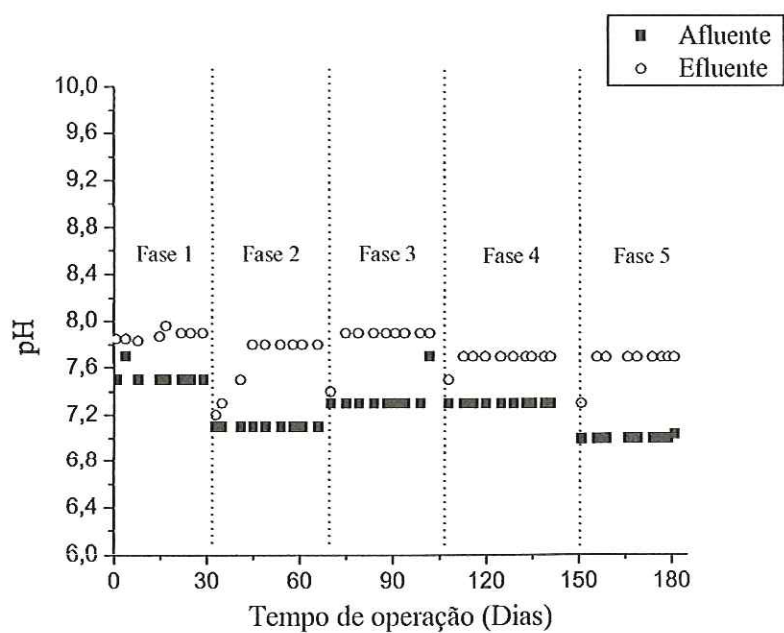


Figura 21. Variação temporal do pH nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.

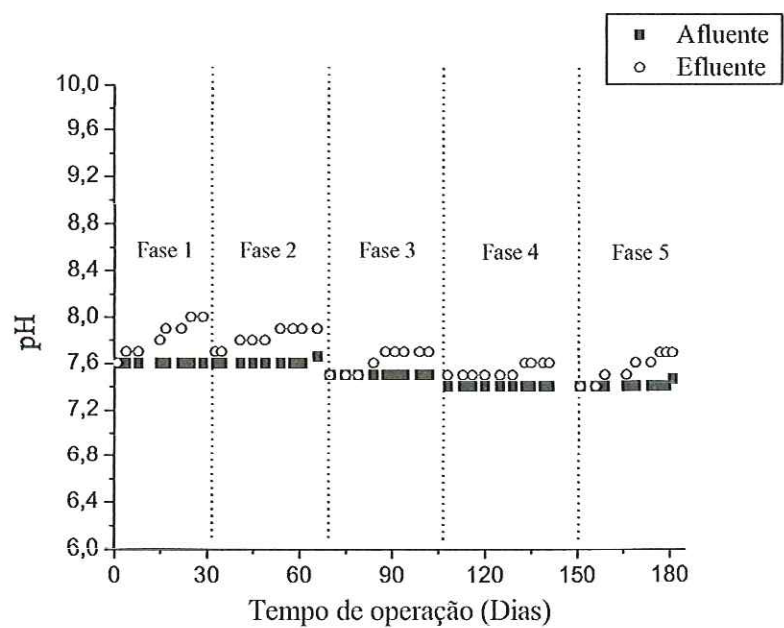


Figura 22. Variação temporal do pH nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.

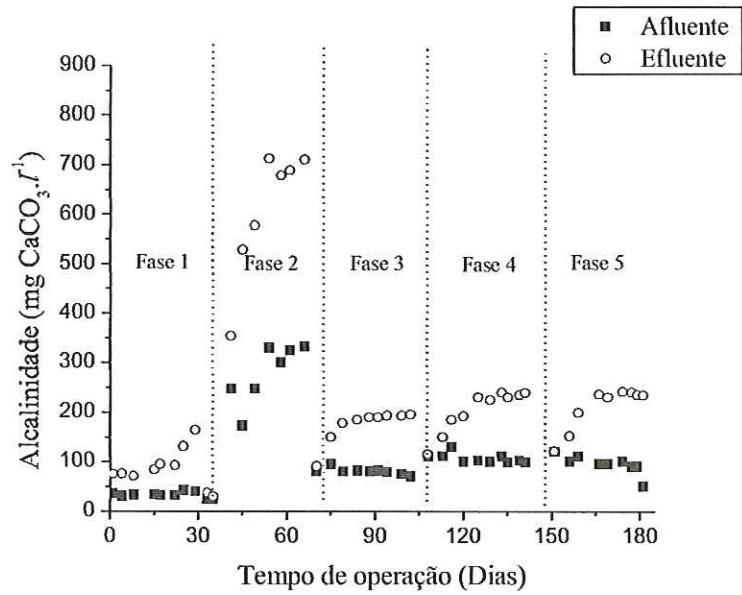


Figura 23. Variação temporal da geração de alcalinidade nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.

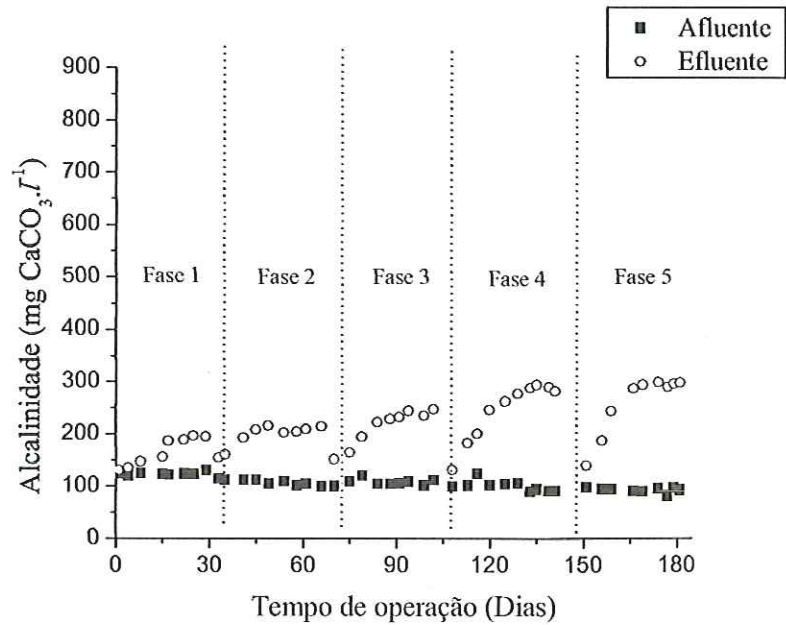


Figura 24. Variação temporal da geração de alcalinidade nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.

Esta capacidade de alcalinização dos reatores se mostrou eficiente em todas as fases operacionais com os compostos aromáticos. Mesmo com o pH aflente tendo seu valor diminuído progressivamente nas diferentes fases de alimentação, principalmente

na fase 5, na qual o pH afluente era em torno de 7,0 ( $\pm 0,1$ ), no ensaio com tolueno, e 7,4 ( $\pm 0,1$ ), no ensaio com benzeno, o pH efluente se manteve sempre estável e próximo ao valor de 7,8 ( $\pm 0,1$ ).

Depois da adição do tolueno e do benzeno, as concentrações de etanol adicionadas ao meio foram elevadas com a intenção de aumentar a solubilidade dos hidrocarbonetos aromáticos. O valor de 170 mg.l<sup>-1</sup>, na fase de enriquecimento, foi elevado para 460 mg.l<sup>-1</sup> nas fases 2, 3 e 4, no ensaio com tolueno, e nas fases 2 e 3, no ensaio com benzeno. Na fase 5, do ensaio com tolueno, e nas fases 4 e 5, do ensaio com benzeno, foi necessária concentração afluente de 960 mg.l<sup>-1</sup> de etanol. Estes aumentos na concentração de etanol, que é um ácido fraco, foram também responsáveis pela diminuição nos valores de pH afluente.

A análise volumétrica de ácidos (Figuras 25 e 26) apresentou valores contrastantes entre as diferentes fases de operação nos dois ensaios. Devido a grande diferença entre as concentrações de etanol no afluente, entre a fase 1 e as demais, iguais a 170 mg.l<sup>-1</sup> e 960 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente, o acúmulo de ácidos orgânicos gerado pela oxidação do etanol (equação 11) produzindo principalmente, ácido acético, foi maior na última condição. As fases 2, 3 e 4, para ensaio com tolueno, e fases 2 e 3, para ensaio com benzeno, apresentaram concentrações intermediárias de etanol e, portanto, valores intermediários de acúmulo de ácido. As diferenças entre os valores obtidos nas análises de DQO e de ácidos, nas amostras de efluente, refletem as limitações da abordagem proposta por DILALLO & ALBERTSON (1961). É possível que as concentrações residuais de S<sup>2-</sup> tenham afetado a análise. O S<sup>2-</sup> pode ter provocado acréscimo nos valores de ácidos devido a formação de Na<sub>2</sub>S, o que explicaria estas discrepâncias.



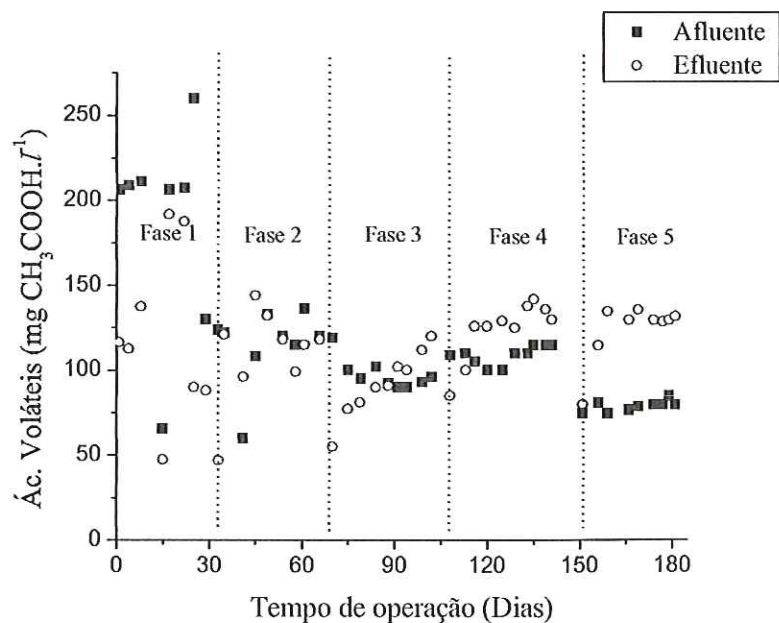


Figura 25. Variação temporal da geração de ácidos nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.

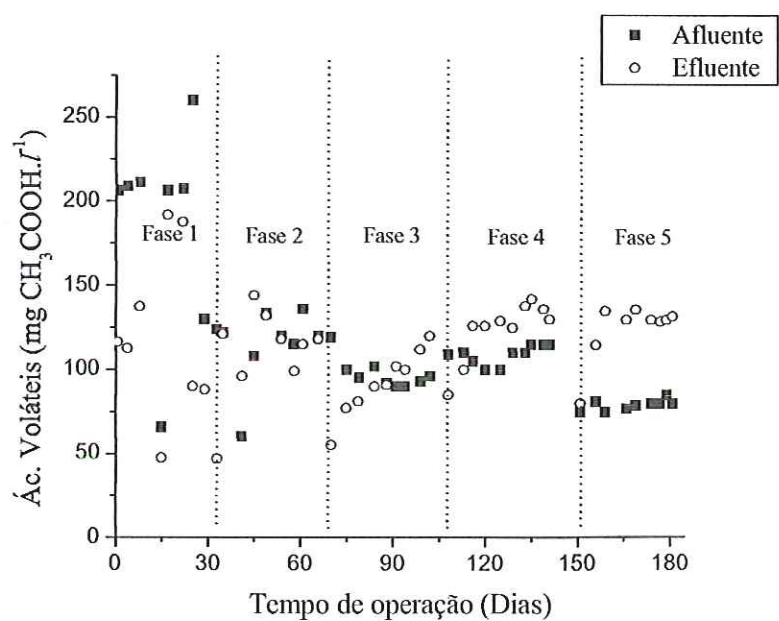


Figura 26. Variação temporal da geração de ácidos nas diferentes fases operacionais com benzeno.

Os valores de sólidos suspensos voláteis (SSV) encontrados nas espumas de poliuretano após a fixação da biomassa e antes do fim da operação dos dois reatores, estão mostrados nas Tabela 18 e 19. As medidas de SSV estão relacionadas com a

matéria orgânica aderida as espumas. Sendo assim, estão relacionadas diretamente com o crescimento da biomassa. No trecho inicial do reator do ensaio com tolueno (C/D 4) foi observado acúmulo de  $620,3473 \pm 11 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$  indicando crescimento de biomassa. No trecho inicial do reator do ensaio com benzeno (C/D 4) foi observado acúmulo de  $605,45 \pm 15 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$  indicando também crescimento de biomassa. Devido à ausência de fontes de carbono, no trecho final do leito dos reatores, não foi observado crescimento acentuado. Porém, este crescimento registrou acúmulo de SSV cinco e oito vezes maior, para o ensaio com tolueno e benzeno, respectivamente, do que o que foi registrado no início da operação dos dois reatores.

**Tabela 18.** Valores do SSV das espumas de poliuretano após a fixação de biomassa e ao final da operação do reator.

Condição	Posição das amostragens no reator	
	Trecho inicial (C/D 0 a 4)	Trecho final (C/D 16 a 20)
<b>Imobilização da biomassa</b>	$24,81 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$	$29,77 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$
<b>Final da operação do reator</b>	$620,34 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$	$147,14 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$

**Tabela 19.** Valores do SSV das espumas de poliuretano após a fixação de biomassa e ao final da operação do reator.

Condição	Posição das amostragens no reator	
	Trecho inicial (C/D 0 a 4)	Trecho inicial (C/D 16 a 20)
<b>Imobilização da biomassa</b>	$31,83 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$	$32,26 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$
<b>Final da operação do reator</b>	$605,45 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$	$248,14 \text{ mg}_{\text{SSV}} \cdot \text{g}_{\text{espuma}}^{-1}$

Os sólidos suspensos voláteis (SSV) no afluente (Figuras 27 e 28) apresentaram valores próximos a  $100,0 \pm 13 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , para ensaio com tolueno, e  $80 \pm 3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , para ensaio com benzeno, e no efluente iguais a  $30,0 \pm 4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , para ambos ensaios em todas as diferentes fases. Nos primeiros dias de operação da fase de enriquecimento, foi observada a elevação nos valores de SSV do efluente devido à provável perda de biomassa não aderida. Após a primeira semana, os valores de SSV efluente se estabilizaram em  $30,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Devido a quebra de estabilidade do sistema, nos períodos de amostragem e, também devido as adições de tolueno e benzeno, em concentrações crescentes, é provável que tenha ocorrido decomposição celular que teria então elevado a

concentração de SSV efluente para valores acima de  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  no início de cada nova fase. Os valores de SSV sempre se estabilizaram, após, período médio de uma semana.

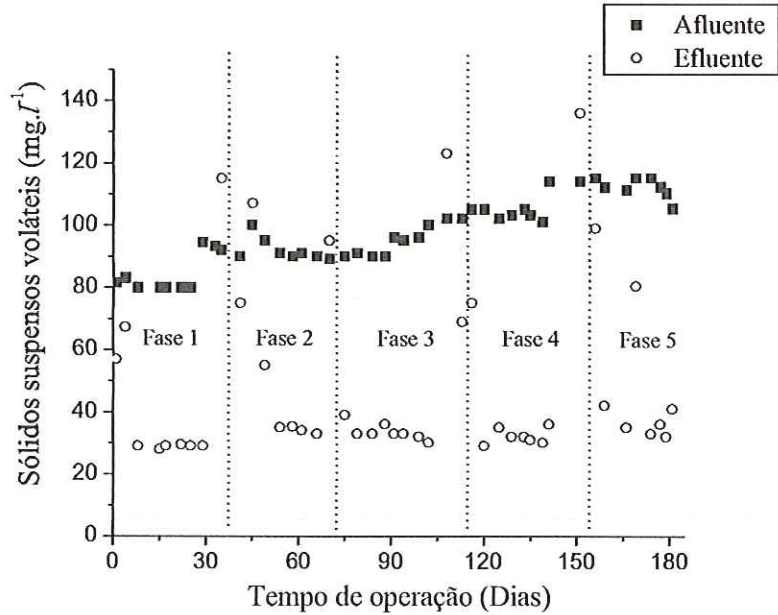


Figura 27. Variação temporal de sólidos suspensos voláteis nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.

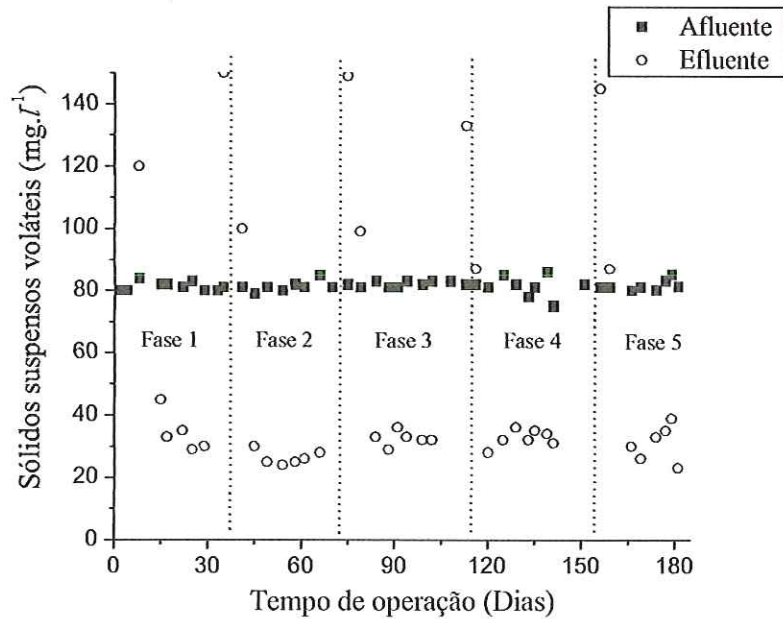


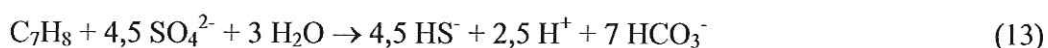
Figura 28. Variação temporal de sólidos suspensos voláteis nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.



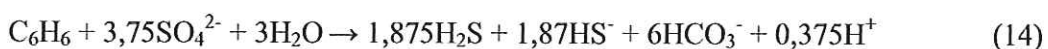
Metano foi detectado na atmosfera dos reatores em todos as fases, nos dois ensaios, evidenciando a presença de arqueas metanogênicas. A porcentagem de metano variou entre 10 e 55% em todo período de operação dos reatores.

Quanto ao tolueno e o benzeno, observou-se nos dois reatores que após o ponto de amostragem C/D 8, remanesceram apenas concentrações residuais de  $0,2 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  para o tolueno, e  $0,8 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  para o benzeno. Sendo assim, o consumo destes compostos apresentou o mesmo comportamento observado para as concentrações de sulfato e matéria orgânica.

CERVANTES *et al.* (2001) sugeriram a seguinte reação (13) para a oxidação de tolueno em condições sulfetogênicas.



BURLAND & EDWARDS (1999) sugeriram a seguinte reação (14) para a oxidação de benzeno em condições sulfetogênicas.



Considerando-se as equações 13 e 14, ou seja, que as células estivessem oxidando tolueno e benzeno através da redução de sulfato, em todas as diferentes concentrações, no total teriam sido consumidos de 23 a 190  $\text{mg.l}^{-1}$  de sulfato na oxidação do tolueno, e de 30 a 170  $\text{mg.l}^{-1}$  de sulfato na oxidação do benzeno. O restante do sulfato consumido, aproximadamente, 300  $\text{mg.l}^{-1}$ , teriam sido, usados na oxidação de toda a matéria orgânica (ácido acético e, principalmente, etanol) distribuída no leito dos reatores, como descrito nas equações (9), (10), (11) e (12). É interessante ressaltar que o único ácido orgânico detectado por cromatografia gasosa nas amostras de ambos ensaios, em todas as diferentes fases, ao longo de todo o leito dos reatores, foi o ácido acético, em concentrações que variaram de 50 a 300  $\text{mg.l}^{-1}$ . Somente na fase de enriquecimento foi detectado ácido propiônico, em baixas concentrações, provavelmente gerado pela quebra direta do ácido láctico adicionado ao meio nesta fase (equação 9). Porém, este ácido só foi detectado no primeiro ponto de amostragem dos reatores (C/D 4) demonstrando seu rápido consumo.

As Figuras 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e as Tabelas 20 e 21, apresentam os perfis espaciais obtidos para cada fase operacional e os resultados do modelo cinético proposto (reações irreversíveis paralelas em série com dois produtos intermediários). De acordo com o modelo, a análise dos valores de  $k_1$  e  $k_2$  revelaram que as taxas de consumo de matéria orgânica, pela sulfetogênese ou pelo metabolismo fermentativo, foram similares, quando, submetidas a concentrações de sulfato, próximas, a  $300 \text{ mg.l}^{-1}$ , desde que  $k_2$  seja igual a  $k_1$  multiplicado pela concentração de sulfato ( $C_{\text{SO}_4^{2-}}$ ), nesta condição.

Para concentrações de sulfato maiores do que  $300 \text{ mg.l}^{-1}$ , para o ensaio com tolueno, e maiores do que  $330 \text{ mg.l}^{-1}$ , para o ensaio com benzeno, a atividade sulfetogênica foi o processo metabólico predominante. Por outro lado, outros processos metabólicos, que não a redução do sulfato, foram responsáveis pela remoção da matéria orgânica, quando, as concentrações de sulfato eram inferiores a  $300$  e  $330 \text{ mg.l}^{-1}$ , nos ensaios com tolueno e benzeno, respectivamente. Deste modo, os dados cinéticos sugeriram que o metabolismo variou ao longo do reator, acompanhando o decréscimo na concentração de sulfato. Esta conclusão corrobora com observações microscópicas de morfologias semelhantes a arqueas metanogênicas como sendo mais frequentes no trecho final do leito dos reatores.

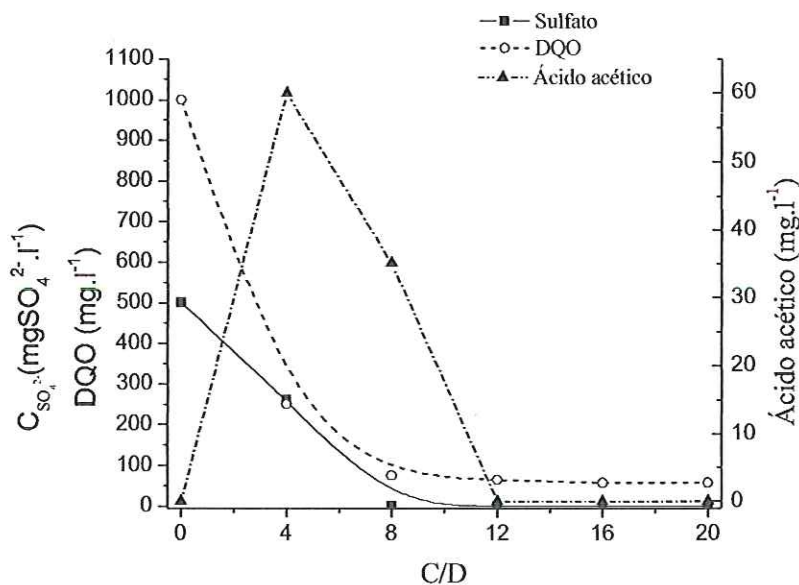


Figura 29. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e ácido acético na fase de enriquecimento (fase 1) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.

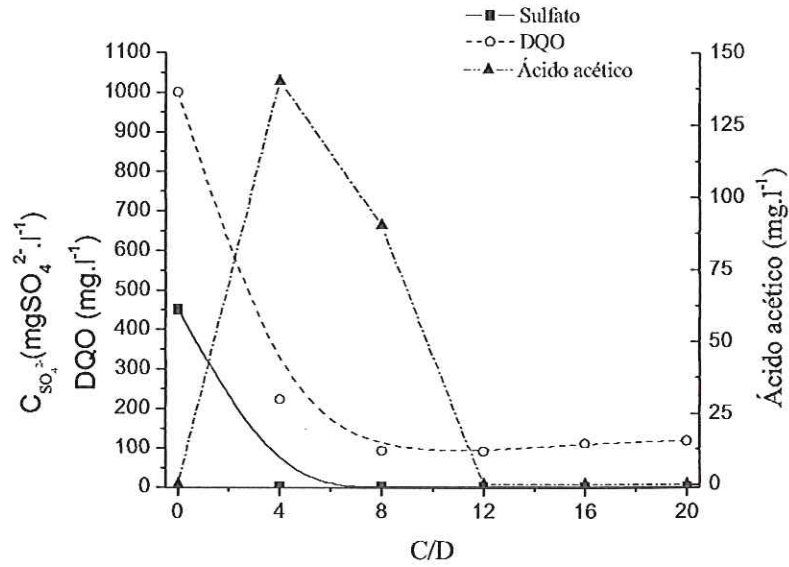


Figura 30. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e ácido acético na fase de enriquecimento (fase I) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno.

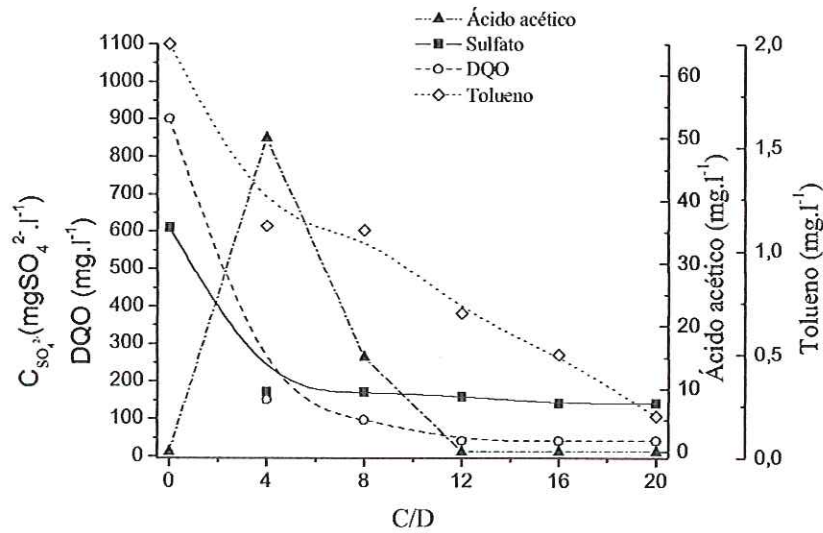


Figura 31. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e tolueno na fase 2 (2,0 mg·l<sup>-1</sup> de tolueno) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.



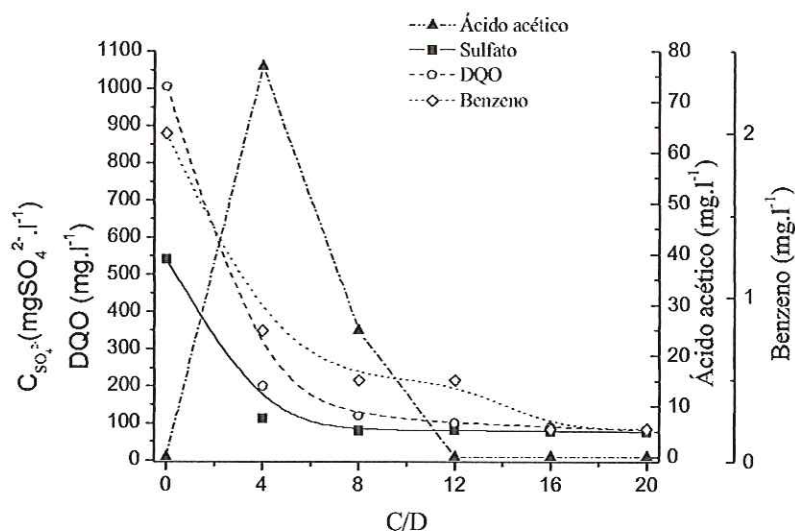


Figura 32. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e benzeno na fase 2 (2,0 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno.

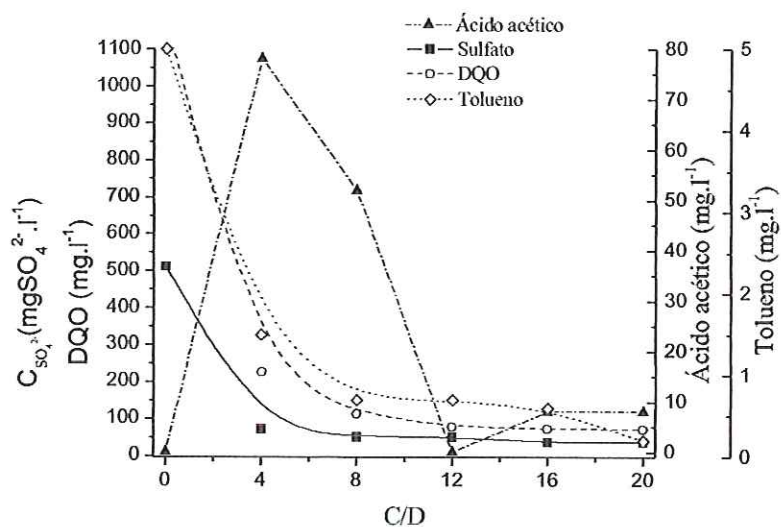


Figura 33. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e tolueno na fase 3 (5,0 mg.l<sup>-1</sup> de tolueno) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.

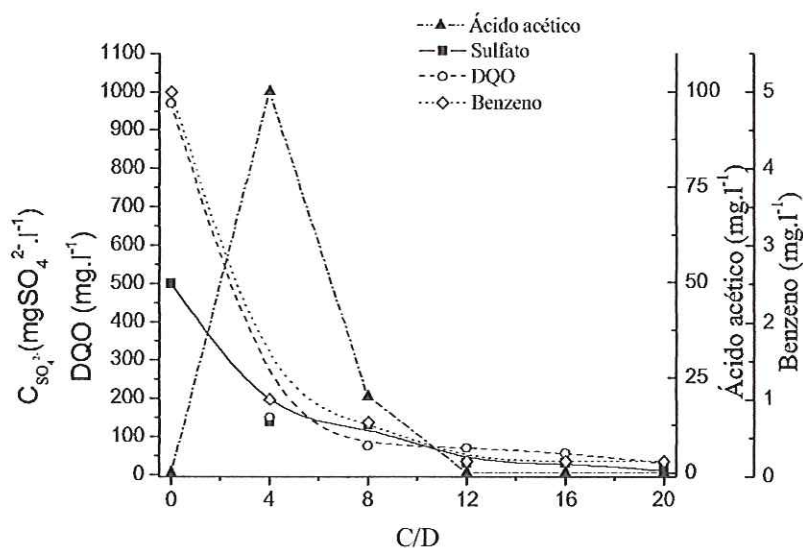


Figura 34. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e benzeno na fase 3 (5,0 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno.

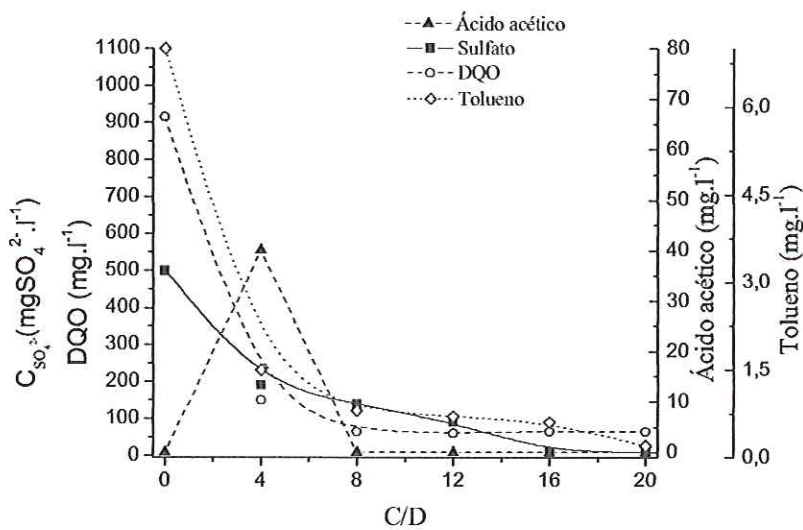


Figura 35. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e tolueno na fase 4 (7,0 mg.l<sup>-1</sup> de tolueno) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.

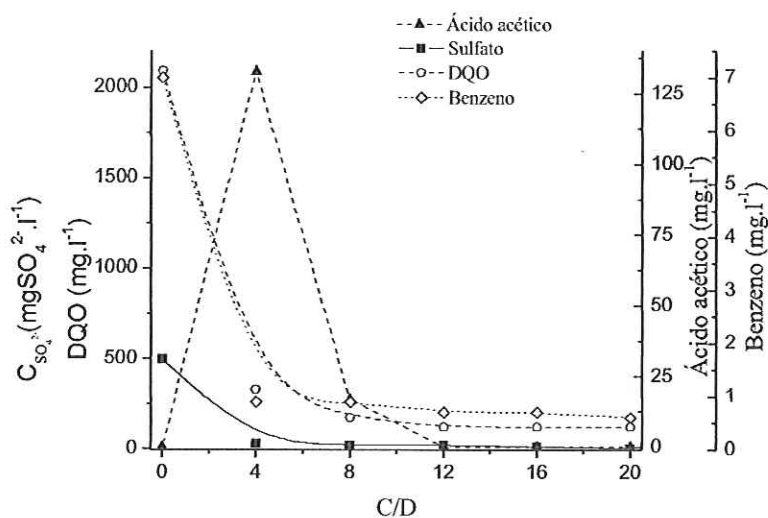


Figura 36. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e benzeno na fase 4 (7,0 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno.

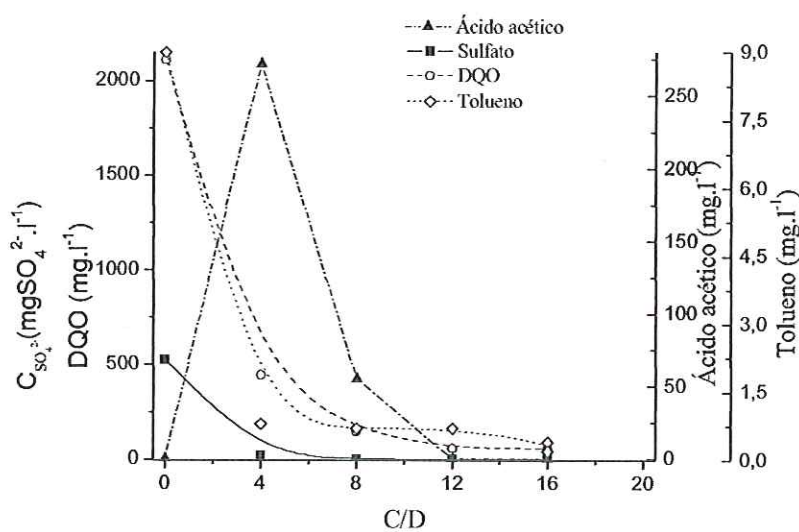
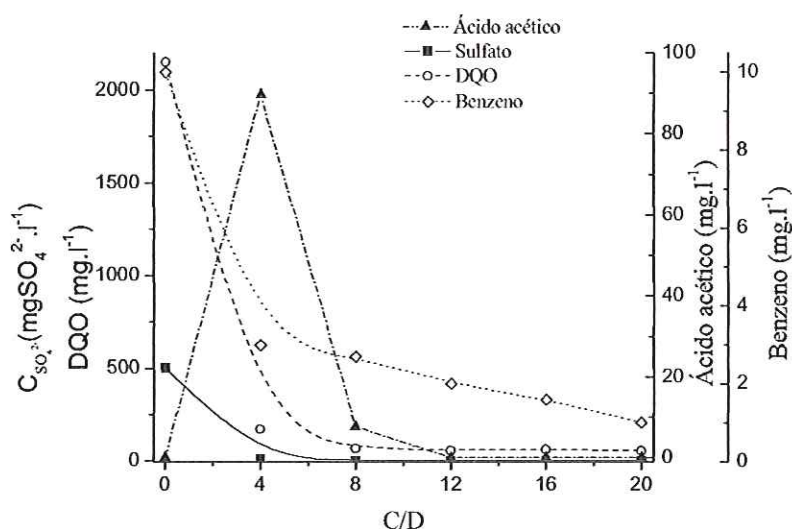


Figura 37. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e tolueno na fase 5 (9,0 mg.l<sup>-1</sup> de tolueno) de operação do RAHLF do ensaio com tolueno.





**Figura 38.** Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO), ácido acético e benzeno na fase 5 (10,0 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno) de operação do RAHLF do ensaio com benzeno.

**Tabela 20.** Parâmetros cinéticos aparentes do processo do ensaio com tolueno.

Concentração de Tolueno afluyente (mg.l <sup>-1</sup> )	Parâmetros cinéticos aparentes					Coeficiente de Correlação R <sup>2</sup>
	K <sub>1</sub> (l.mg <sup>-1</sup> sulfato.h <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	k <sub>3</sub> (l.mg <sup>-1</sup> sulfato.h <sup>-1</sup> )	k <sub>4</sub> (h <sup>-1</sup> )	C <sub>DQO_R</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	
2	0,003	0,8	0,001	0	51	0,995
5	0,004	1,0	0,006	0	71	0,998
7	0,003	1,0	0,004	0	52	0,965
9	0,003	1,1	0,020	0	51	0,997

A remoção, quase que total, de tolueno e benzeno foi observada sempre antes do ponto de amostragem C/D 8 em todas as fases operacionais em ambos ensaios. Como os valores de k<sub>4</sub> foram nulos em todas as fases, é provável que a aromaticidade tenha sido consumida, principalmente, por atividade sulfetogênica com taxa máxima de 0,06 mg<sub>tolueno</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>SSV</sub>.d<sup>-1</sup> e 0,07 mg<sub>benzeno</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>SSV</sub>.d<sup>-1</sup>, para os ensaios com tolueno e benzeno, respectivamente. Estes valores foram calculados a partir da equação (5) para concentração de 9 e 10 mg.l<sup>-1</sup>, de tolueno e benzeno, respectivamente, para concentração de sulfato de 500 mg.l<sup>-1</sup>, para k<sub>3</sub> de 0,02 e 0,021 l.mg<sup>-1</sup> sulfato.h<sup>-1</sup>, para os

ensaios com tolueno e benzeno, respectivamente (Tabelas 20 e 21), e para concentração de SSV de 37,9 e 43,9 g.l<sup>-1</sup>, para os ensaios com tolueno e benzeno, respectivamente, baseado nos dados obtidos em C/D 4 (Tabelas 18 e 19).

**Tabela 21.** Parâmetros cinéticos aparentes do processo do ensaio com benzeno.

Concentração de Benzeno afluyente (mg.l <sup>-1</sup> )	Parâmetros cinéticos aparentes					Coefficiente de Correlação
	k <sub>1</sub> (l.mg <sup>-1</sup> sulfato.h <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	K <sub>3</sub> (l.mg <sup>-1</sup> sulfato.h <sup>-1</sup> )	k <sub>4</sub> (h <sup>-1</sup> )	C <sub>COD_R</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
2	0,004	0,95	0,003	0	95	0,999
5	0,004	1,03	0,005	0	56	0,982
7	0,003	1,53	0,013	0	126	0,994
10	0,006	2,11	0,021	0	57	0,995

De NARDI *et al.* (2002) mediram a capacidade do RAHLF em adsorver tolueno e benzeno. Os autores relataram valor de adsorção de 35,2 (± 0.72) µmol de tolueno por grama de espuma de poliuretano e 16,9 (± 0.81) µmol de tolueno por grama de biofilme. Para o benzeno os mesmos autores relataram uma adsorção de 12,81 (± 1,21) µmol por grama de biofilme. Adotando-se os valores obtidos por De NARDI *et al.* (2002), no presente trabalho, e considerando os dois reatores como filtros perfeitos, a capacidade total de adsorção de tolueno e benzeno, teria sido de aproximadamente 460 e 300 mg, respectivamente, em todo biofilme. Durante todo o período experimental foram introduzidos 1466,64 mg de tolueno, em um dos reatores e 1612,53 mg de benzeno no reator remanescente. Portanto, apesar da adsorção estar presente, a biodegradação foi, provavelmente, o principal fenômeno relacionado com a remoção da aromaticidade.

Exames de microscopia óptica e eletrônica de varredura do biofilme em ambos ensaios (Figuras 39, 40, 41 e 42), da fase 1 e das fases subseqüentes, mostraram morfologias semelhantes ao longo de todo o leito (Tabelas 22 e 23). Foram visualizados filamentos, bacilos, bacilos ovalados, bacilos delgados, bacilos curvos, cocos, sarcinas fluorescentes, cocos fluorescentes, e morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp.. As detecções de metano, na atmosfera do reator, além da presença das células fluorescentes confirmaram a presença de arquêas metanogênicas.

Tabela 22. Diversidade biológica do biofilme nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com tolueno.

<i>Morfologias</i>	<i>Condições</i>				
	Fase 1 (Enriq.)	Fase 2 (2,0 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 3 (5,0 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 4 (7,0 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 5 (9,0 mg.l <sup>-1</sup> )
<i>Arqueas Metanogênicas</i>					
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	+++	++	++	++
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	+++	+++	+++	++++
Bacilos fluorescentes	+++	+++	+	++	++
Cocos fluorescentes	+++	++	++	++	++
<i>Bactérias</i>					
Bacilos curvos	++	+	++	++	++
Bacilos delgados	+++	+++	+++	+++	+++
Bacilos ovalados	++++	+++	++	+++	++++
Cocos	++	+++	++	+	+
Filamentos	++	+++	+++	+++	+++

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

Tabela 23. Diversidade morfológica do biofilme nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno.

<i>Morfologias</i>	<i>Condições</i>				
	Fase 1 (Enriq.)	Fase 2 (2,0 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 3 (5,0 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 4 (7,0 mg.l <sup>-1</sup> )	Fase 5 (10,0 mg.l <sup>-1</sup> )
<i>Arquêas Metanogênicas</i>					
<i>Methanosarcina</i> sp.	++	++	++	++	++
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	+++	+++	+++	++++
Bacilos fluorescentes	++	++	+	++	++
Cocos fluorescentes	+++	++	++	++	++
<i>Bactérias</i>					
Bacilos curvos	++++	+++	+++	+++	+++
Bacilos delgados	+++	+++	+++	+++	+++
Bacilos ovalados	++++	++	++	+++	++++
Cocos	++	++	++	+	+
Filamentos	++	+++	+++	+++	+++

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



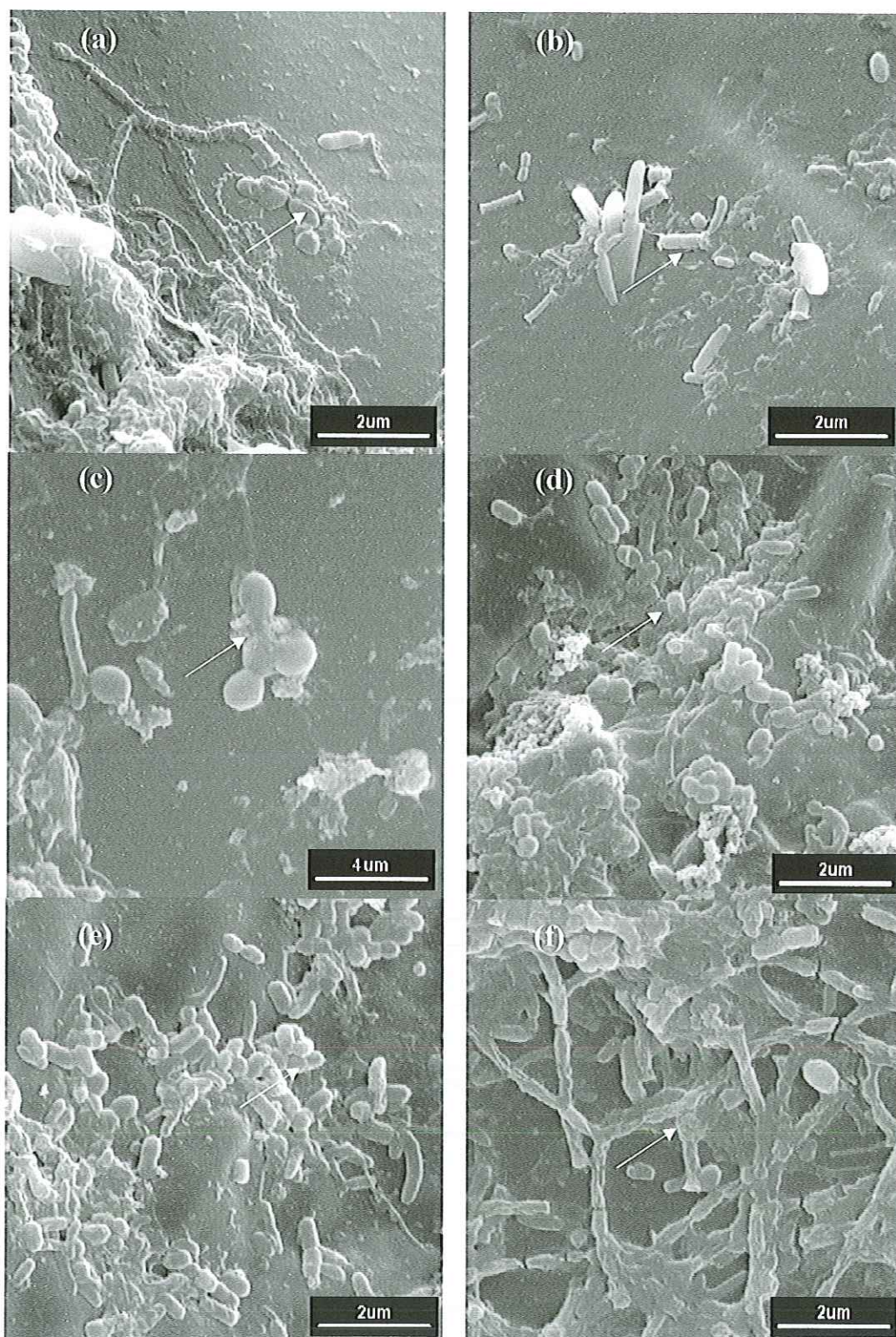


Figura 39. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF na fase 4 (com  $7,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de tolueno): (a) bacilos ovalados, (b) bacilos e morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp., (c) cocos, (d) bacilos ovalados e cocos, (e) bacilos ovalados e bacilos curvos, (f) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp..



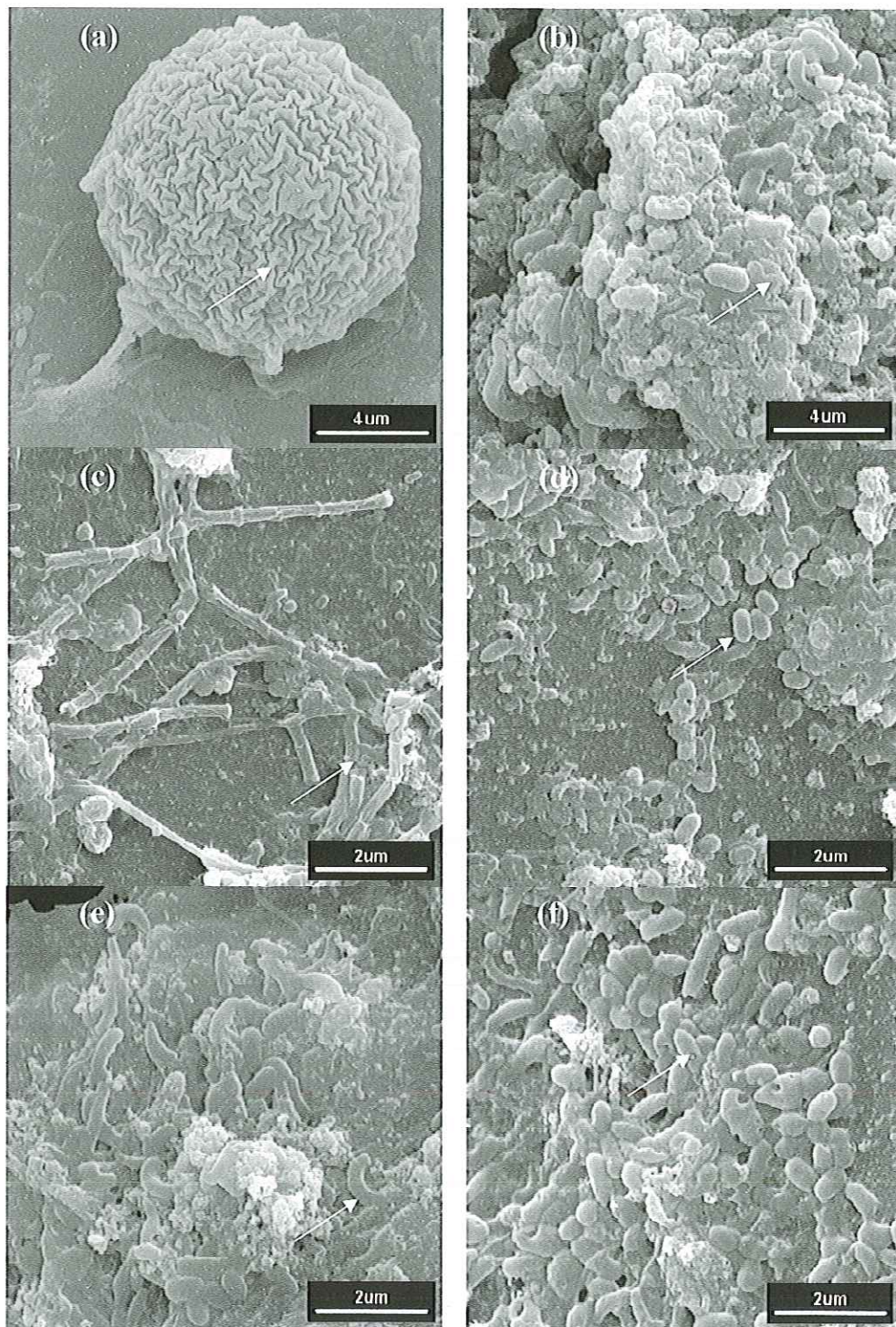
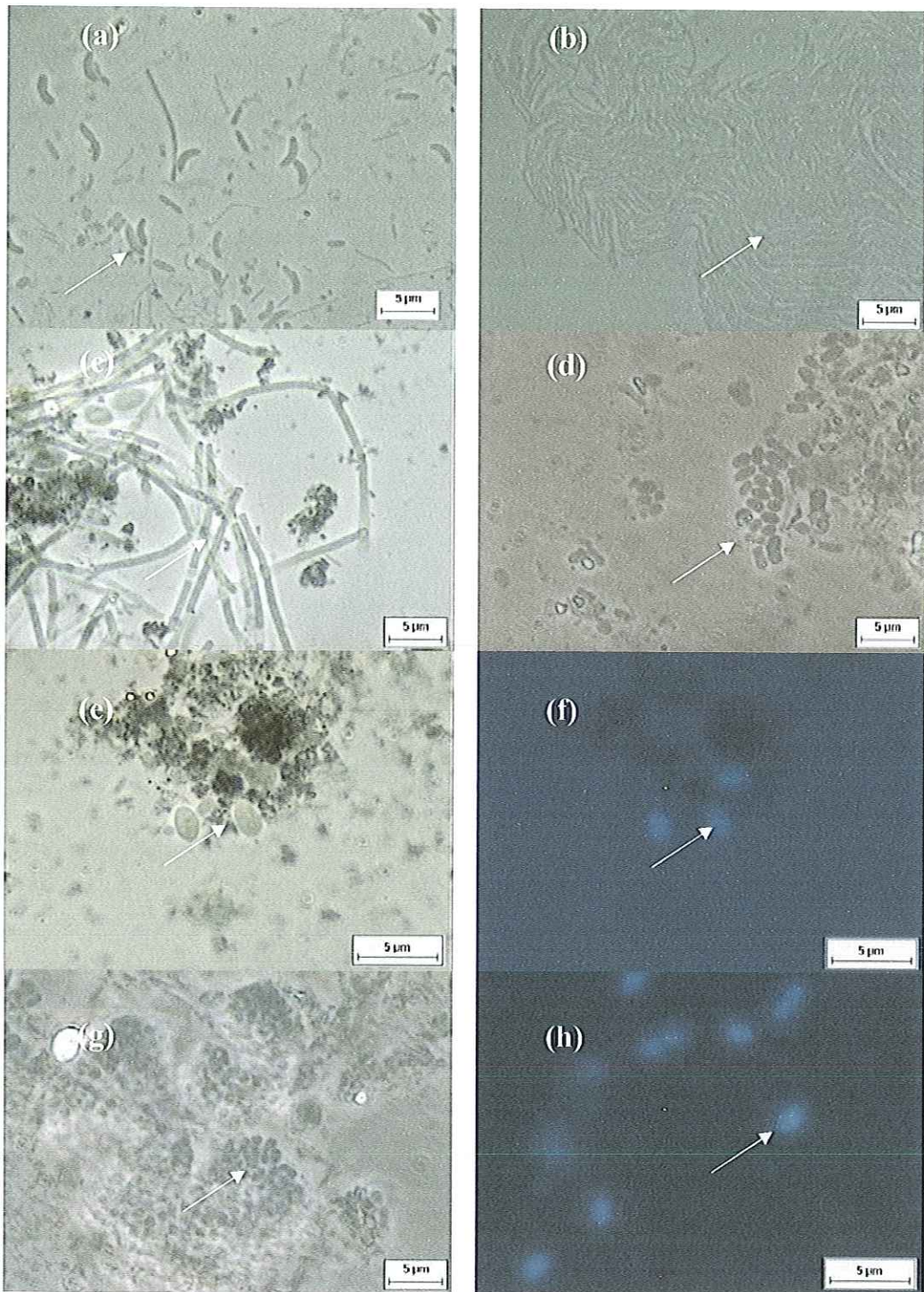


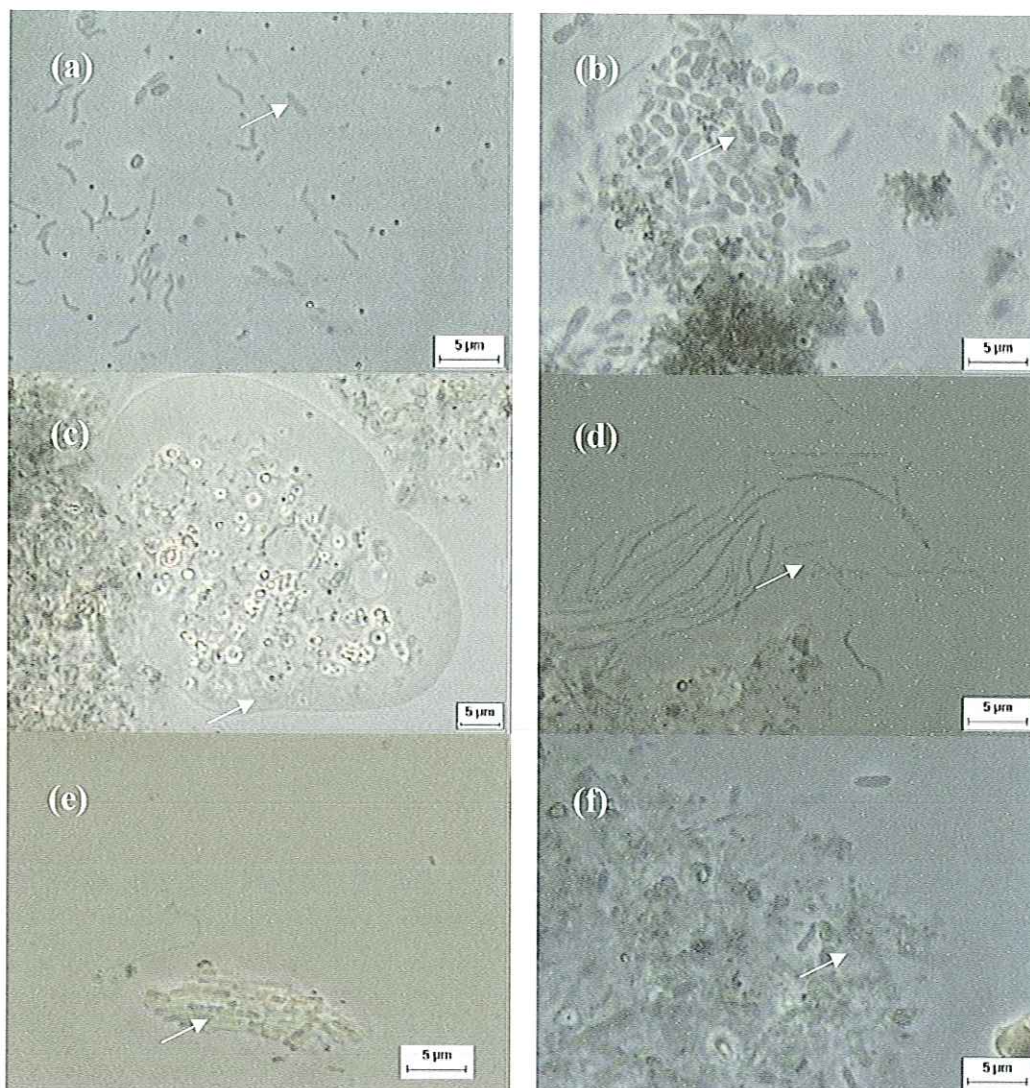
Figura 40. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF na fase 4 (com  $7,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de benzeno): (a) protozoário, (b) bacilos ovalados e bacilos curvos, (c) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp., (d) bacilos ovalados, (e) bacilos curvos, (f) bacilos.





**Figura 41.** Microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência de amostras do biofilme durante a operação do RAHLF na fase 3 (com  $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de tolueno): (a) bacilos curvos, (b) bacilos delgados, (c) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp., (d) bacilos ovalados, (e) e (f) bacilos ovalados fluorescentes, (g) cocos, (h) bacilos ovalados fluorescentes.





**Figura 42.** Microscopia óptica de contraste de fase de amostra do biofilme do RAHLF na fase 3 (com  $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de benzeno): (a) bacilos curvos; (b) bacilos ovalados, (c) ameba, (d) filamentos, (e) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp., (f) cocos e bacilos curvos.

As análises de DGGE para o Domínio *Bactéria*, no reator alimentado com tolueno, mostraram a predominância, no início do reator, C/D 0 e 4, de uma única população bacteriana na fase 1 (Figura 43). As setas indicam as populações predominantes em cada amostra. Nesta fase, como os principais substratos foram o lactato de sódio e etanol, o perfil da comunidade microbiana do reator se alterou sensivelmente logo após a substituição de lactato por tolueno (fase 2) e, ainda, também, pelo incremento de etanol. O surgimento de uma nova banda no ponto C/D 0 e de duas novas, no ponto C/D 4, sugeriram incremento na diversidade da comunidade neste trecho do biofilme.



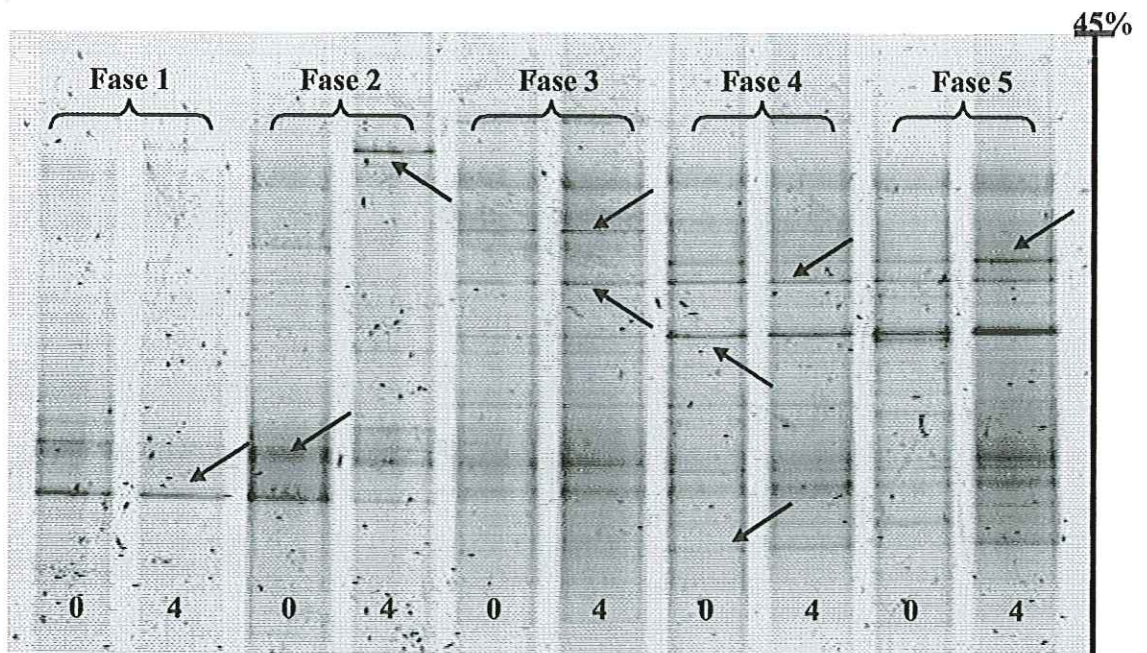


Figura 43. Gel de DGGE (gradiente de 45-55%) com amostras de DNA 55% amplificadas com set de *primers* específico para Domínio *Bacteria* dos pontos C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais.

Na fase 3, algumas bandas da fase 2 desapareceram e deram lugar a duas novas bandas tanto no ponto de amostragem de interface, quanto, no ponto C/D 4. Na fase 4 foram visualizadas quatro bandas, sendo que, uma delas foi igual a uma das bandas encontradas na fase 3. No último ensaio, fase 5, foram visualizadas as mesmas quatro bandas do ensaio anterior, porém com intensidade maior.

Vários trabalhos demonstram que a cinética de amplificação do PCR pode não ter a mesma precisão na proporção de moléculas de DNA da amostra inicial. Portanto, a interpretação das mudanças na estrutura da comunidade microbiana analisada no perfil de DGGE é duvidosa (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996; POLZ & CAVANAUGH, 1998). Por outro lado, BRUGGEMAN *et al.* (2000) investigaram o problema e confirmaram a natureza semi-quantitativa da técnica proposta por MUYZER *et al.* (1993). Sendo assim, a forma como as bandas se separaram nos diferentes ensaios sugeriram aumento da competitividade, dentro da comunidade microbiana do reator, depois da adição de tolueno. Aparentemente, esta competição favoreceu quatro populações distintas que se destacaram na fase 4 e, na fase 5, estas mesmas bandas elevaram sua representatividade genética o que pode ser visualizado pelo aumento da intensidade das bandas no gel. É bem provável que estas populações, selecionadas pelas

altas concentrações de etanol e tolueno, estivessem relacionadas com a degradação desses compostos.

Apesar das amostras do ponto final do reator (C/D 20) apresentarem, somente, concentração residual de tolueno, também foi observado variação no perfil populacional das amostras (Figura 44). Na fase 1 e 2 foram observadas quatro bandas no gel. Na fase 3 foram observadas oito bandas e nas últimas duas fases foram visualizadas sete. Sendo assim, é provável que o aumento da concentração do tolueno tenha provocado aumento na diversidade da biomassa no leito do reator, das três populações predominantes teriam surgido mais quatro.

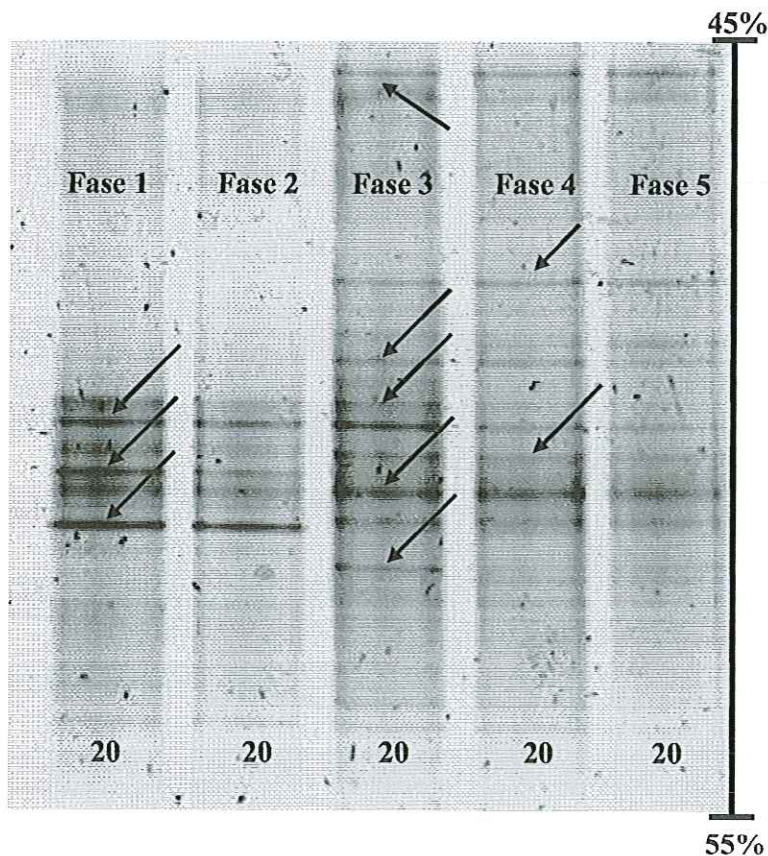
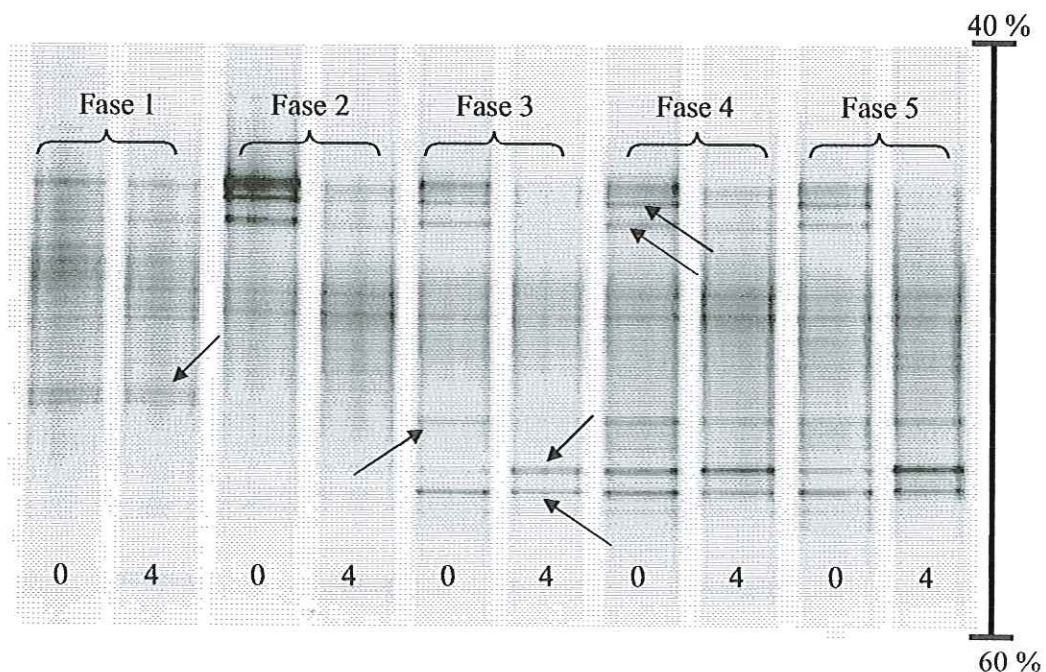


Figura 44. Gel de DGGE (gradiente de 45-55%) com set de primers específico para Domínio *Bacteria* no ponto de amostragem C/D 20 em todas as fases operacionais do RAHLF com tolueno.

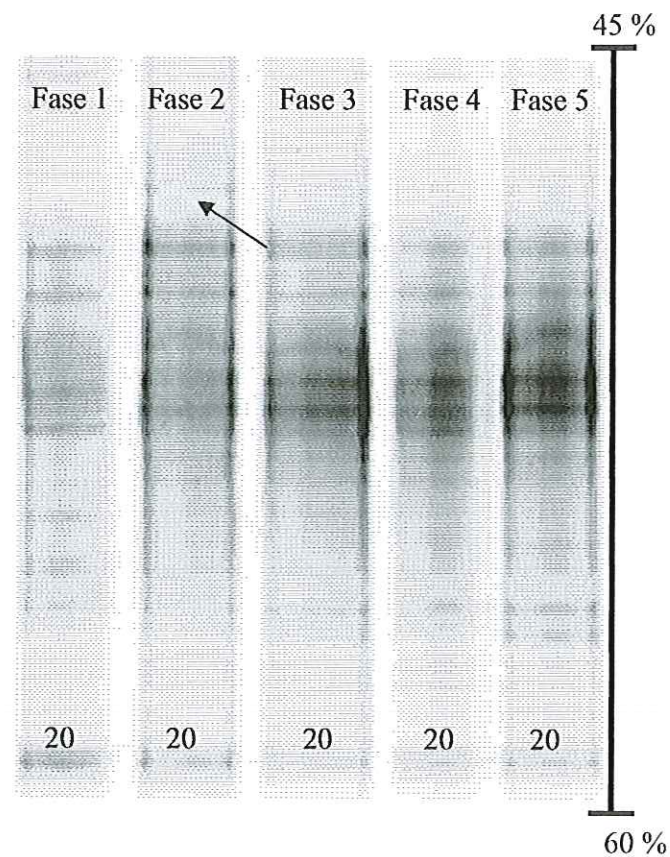
As análises de DGGE para o Domínio *Bactéria*, no reator alimentado com benzeno, revelaram que a diversidade, de populações de bactérias, foi pequena particularmente nos primeiros pontos de amostragem. Os perfis mostraram a predominância no início do reator, C/D 0 e 4, de pelo menos duas população bacterianas na fase 1 (Figura 45). As setas indicam as populações predominantes em cada amostra.



Diferentes fontes de carbono como lactato, etanol e benzeno produziram perfis distintos, mas, de qualquer modo, foi observada a mesma tendência de divisão de comunidades na primeira porção do reator horizontal (Figura 45). As adições de benzeno nas fases 2 e 3 mostraram perfil de DGGE similar, com poucas populações dominantes, provavelmente, quatro ou menos espécies (Figura 45). Nas fases 3, 4 e 5 foram visualizadas as mesmas duas bandas no ponto de amostragem C/D 4, porém, com intensidade crescente em relação a concentração crescente de benzeno no reator. Sendo assim, os *finger-print* gerados nos diferentes ensaios sugeriram aumento da competitividade na comunidade microbiana do reator depois da adição de benzeno. Aparentemente, esta competição favoreceu pelo menos duas populações distintas que se destacaram na fase 3, 4 e 5, sugerindo que estas novas populações estiveram relacionadas com a degradação de benzeno. Provavelmente, estas populações selecionadas tenham elevado sua representatividade genética no biofilme, o que pode ser visualizado pelo aumento da intensidade das bandas no gel. No trecho final do reator (Figura 46) os perfis mostraram pequena ou, até mesmo, nenhuma alteração significativa no padrão de bandas. Sendo assim, as concentrações residuais de benzeno não exerceram pressão seletiva representativa a ponto de modificar a composição de populações bacterianas no final do leito do reator, em nenhuma das fases operacionais.



**Figura 45.** Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de *primers* específico para Domínio *Bacteria* dos pontos C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.



**Figura 46.** Gel de DGGE (gradiente de 45-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de *primers* específico para Domínio *Bacteria* no ponto de amostragem C/D 20 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.

A abordagem com *primers* específicos para BRS no ensaio com tolueno (Figuras 47 e 48) mostrou a mesma tendência observada com os *primers* de *Bacteria*, mas, com perfil mais uniforme. Pelo menos duas populações foram selecionadas depois da adição de tolueno ao meio nas fases 2, 3 e 4, sendo que uma delas desapareceu na fase 5, sugerindo faixa de tolerância a presença do tolueno (Figura 47). As populações de BRS, também, foram, preferencialmente, selecionadas nas fases 4 e 5 no trecho inicial do leito do reator. No trecho final (Figura 48) do leito, provavelmente em função das concentrações residuais de tolueno e de DQO, não foram observadas mudanças significativas no perfil populacional em relação as diferentes fases de operação do reator. Sendo assim, apesar das discretas diferenças de bandas nos perfis, é provável que populações de BRS, também, estejam relacionadas com a degradação do tolueno.



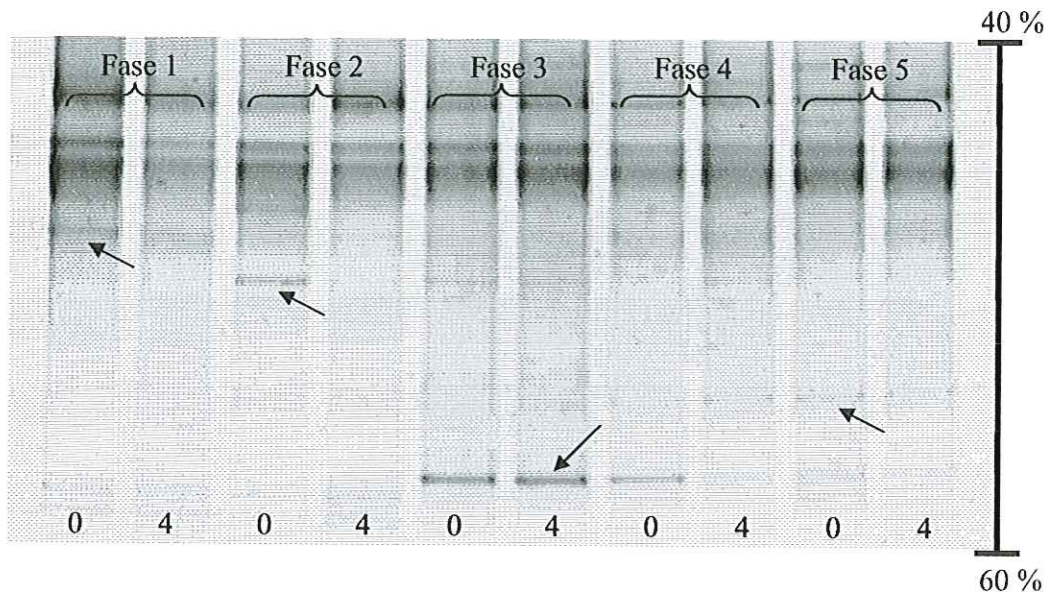


Figura 47. Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com *primers* específico para BRS dos pontos C/D 0 e 4 em todas as fases operacionais do RAHLF com tolueno.

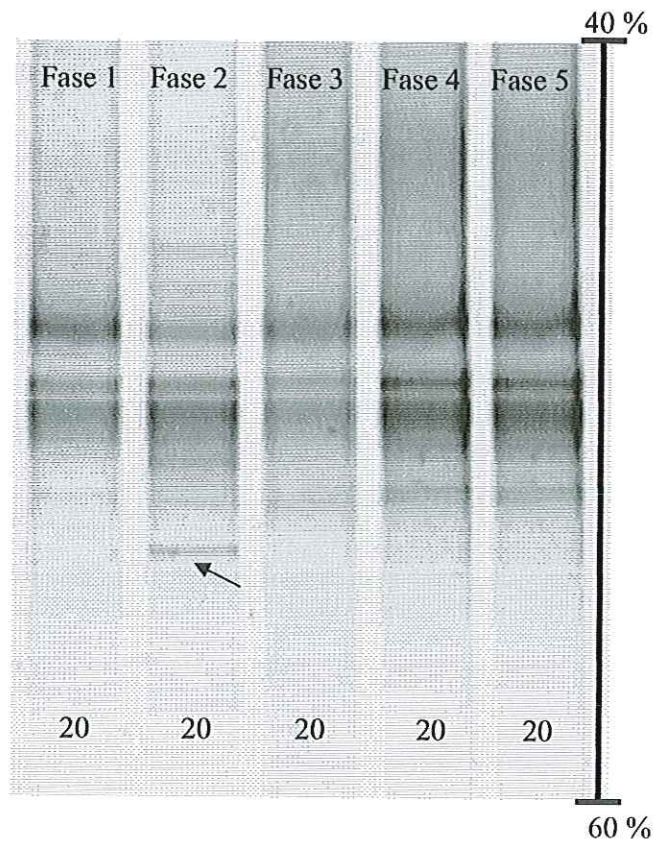
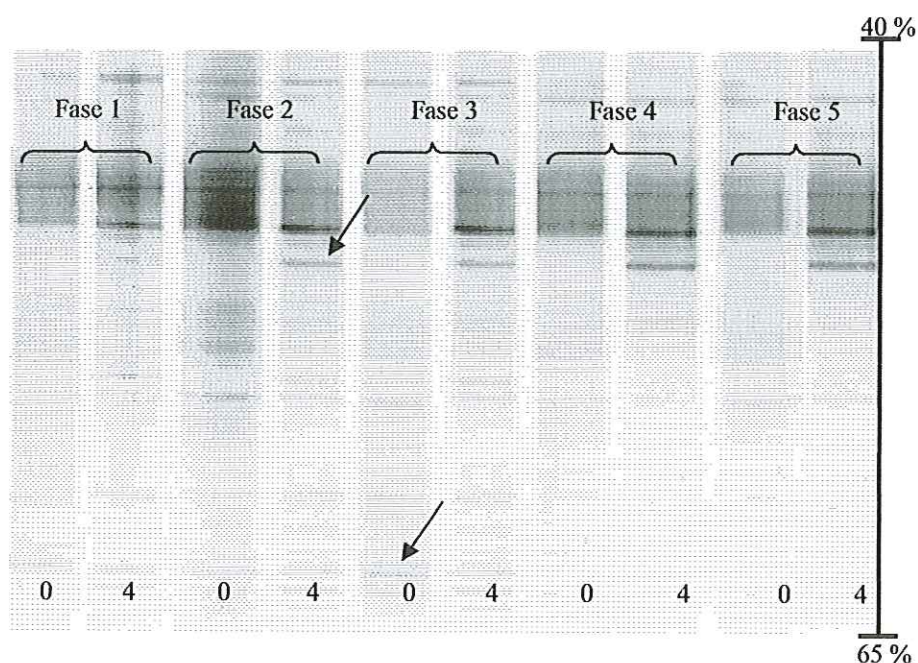


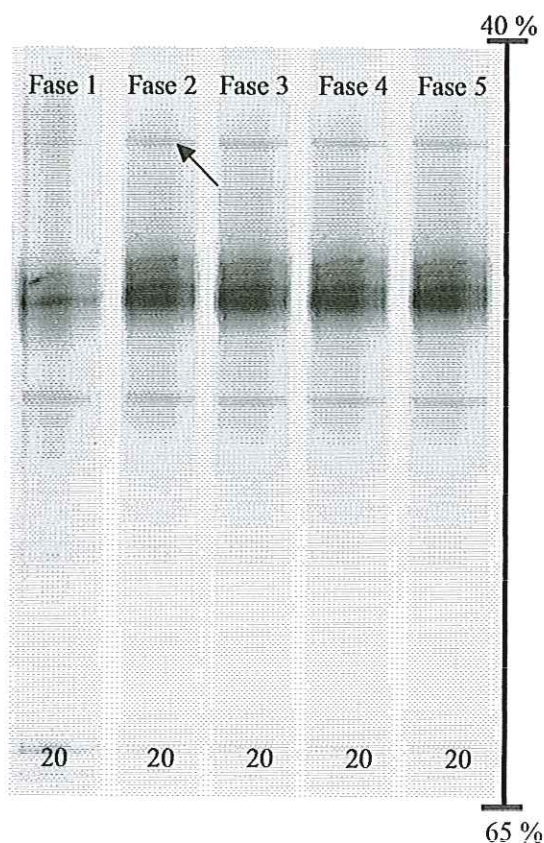
Figura 48. Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de primers específico para BRS no ponto de amostragem C/D 20 em todas as fases operacionais do RAHLF com tolueno.



A abordagem com *primers* específicos para BRS no ensaio com benzeno (Figuras 49 e 50) mostrou a mesma tendência observada com os *primers* utilizados para Domínio *Bacteria*, ou seja, perfil uniforme. As populações de BRS foram, preferencialmente, selecionadas nas fases 4 e 5, onde as poucas mudanças, pelo menos de duas novas populações, foram mais facilmente observadas nos pontos de amostragem C/D 0 e 4. No gel com as amostras para C/D 20 (Figura 50), o perfil, praticamente, nada mudou. Portanto, apesar de apresentarem mudanças sutis no perfil de bandas, algumas populações de BRS foram favorecidas a partir da introdução de benzeno no meio de cultura e, sendo assim, é provável que a degradação do benzeno possa, também, estar relacionada com este grupo de microrganismos.



**Figura 49.** Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de *primers* específico para BRS dos pontos de amostragem C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.

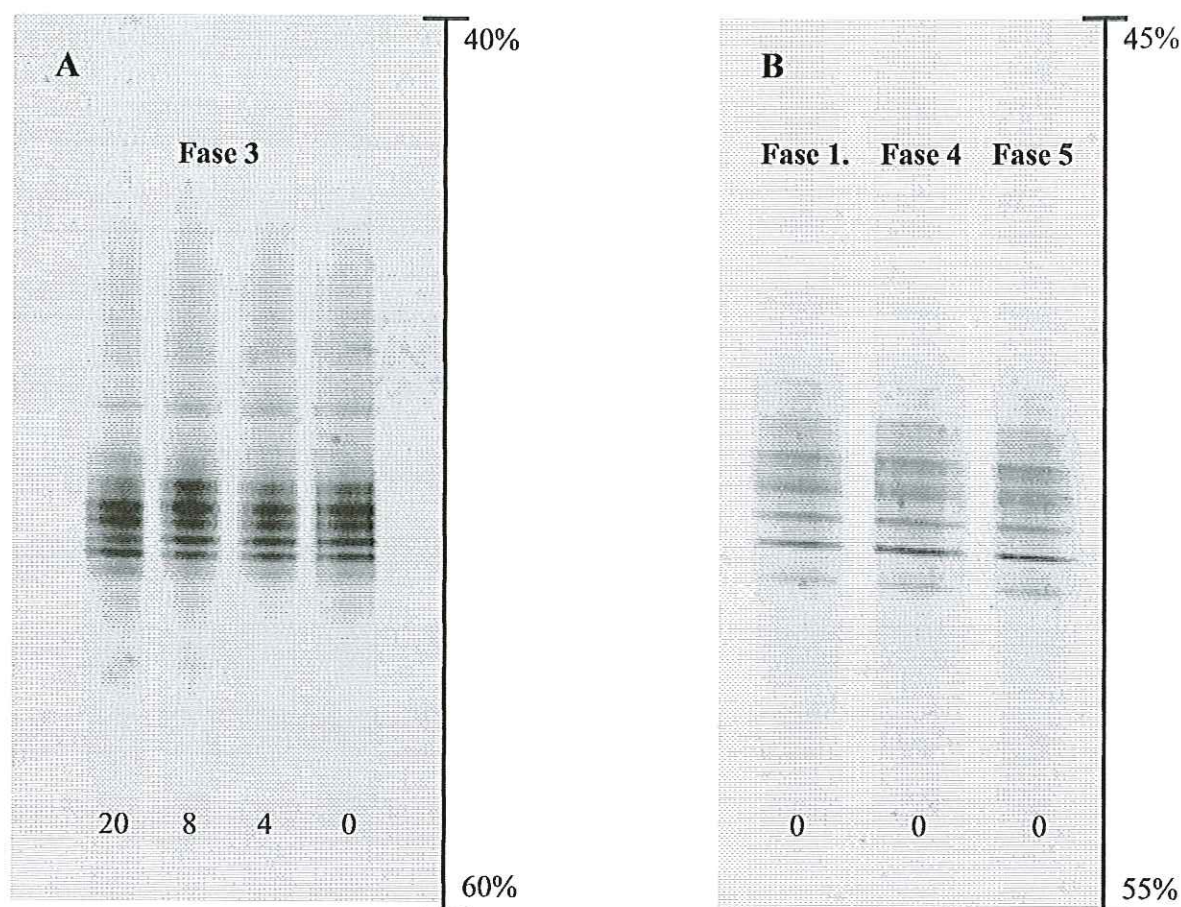


**Figura 50.** Gel de DGGE (gradiente de 40-65%) com amostras de DNA amplificadas com set de *primers* específico para BRS do ponto de amostragem C/D 20 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.

Apesar da observação de morfologias semelhantes a arqueas metanogênicas, através de microscopia de fluorescência, as concentrações de DNA amplificadas para este grupo foram bem menores do que as obtidas com set de *primers* específico para o Domínio *Bacteria*. Para a separação em gel de DGGE estas amostras foram reamplificadas.

As análises de DGGE para o Domínio *Archaea*, no ensaio com tolueno, não evidenciaram diferenças no perfil populacional, nem entre, os diferentes pontos de amostragens do reator, nem entre, os diferentes ensaios nutricionais, como ilustrado, pela Figura 51, que expõe os perfis da comunidade de arqueas nas fases 1, 3, 4 e 5. Portanto, a manutenção do mesmo perfil de comunidade em todas as fases, sugeriu que as arqueas não sofreram pressão seletiva e, desta forma, provavelmente não tiveram relação com a degradação de tolueno.





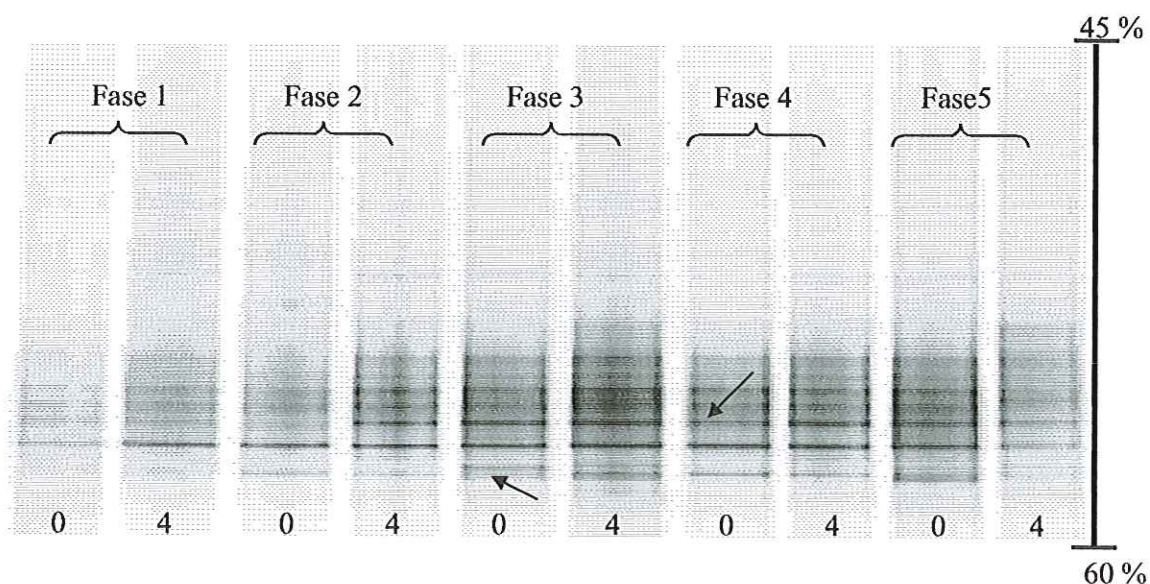
**Figura 51.** Géis de DGGE (A, gradiente de 40-60% – B, gradiente de 45-55%,) com amostras de DNA amplificadas com set de *primers* específico para Domínio *Archaea* dos diferentes pontos de amostragem do RAHLF alimentado com tolueno: (A) amostras de C/D 0, 4, 8 e 20 na fase 3 (com 7,0 mg.l<sup>-1</sup> de tolueno) e (B) amostras de C/D 0 nas fases 1, 4 e 5.

Os perfis de DGGE com *primers* específicos para *Archaea*, no ensaio com benzeno, mostraram que este grupo variou geneticamente, nos diferentes tratamentos e ao longo do reator (Figuras 52 e 53). Apesar da observação de morfologias semelhantes a arqueas, através de microscopia óptica e fluorescência, as concentrações de DNA amplificadas para este grupo foram bem menores do que as obtidas com set de *primers* específico para o Domínio *Bacteria*. É importante relatar que, do mesmo modo que nos ensaios com tolueno, devido às pequenas concentrações de DNA nos produtos de PCR com *primers* específicos para *Archaea*, estas amostras foram reamplificadas, em segunda reação de PCR, antes da sua aplicação em gel de DGGE. As análises de DGGE para o Domínio *Archaea* evidenciaram diferenças no perfil populacional entre os diferentes pontos de amostragens do reator e inclusive nos diferentes ensaios nutricionais, como ilustrado pelas Figuras 52 e 53, que expõe os perfis da comunidade

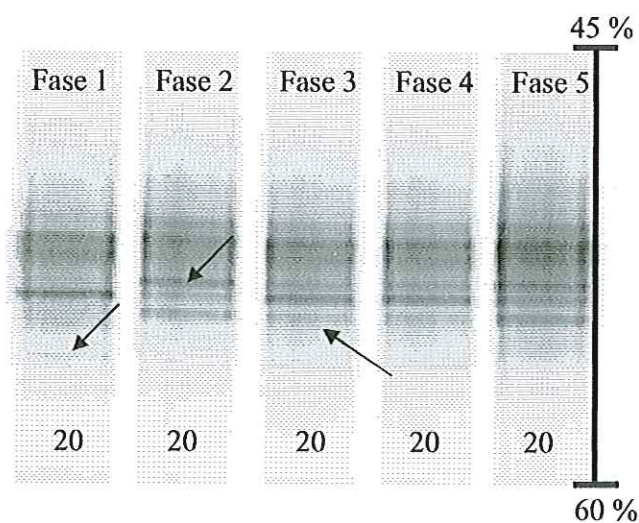


nas fases 1, 2, 3, 4 e 5. Pelo menos duas novas populações foram selecionadas ao ponto de já serem visualizadas no gel a partir da fase 2.

Portanto, a variação no perfil das comunidades, em todas as fases, mesmo que sutis, sugeriram que as arqueas sofreram pressão seletiva e, desta forma, poderiam apresentar relação com a degradação de benzeno. Como os processos metanogênicos representam o mecanismo final de degradação da matéria orgânica no ambiente, é pouco provável que as arqueas estejam diretamente ligadas a quebra de anéis aromáticos. Provavelmente, a participação das arqueas deve estar relacionada com a utilização de produtos intermediários, derivados da degradação de etanol e benzeno, no consórcio microbiano.



**Figura 52.** Gel de DGGE (gradiente de 45-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de *primers* específico para Domínio *Archaea* dos pontos de amostragem C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.



**Figura 53.** Gel de DGGE (gradiente de 45-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de *primers* específico para Domínio *Archaea* do ponto de amostragem C/D 20 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno.

Finalmente, pode-se dizer que o RAHLF foi eficiente na remoção de etanol, tolueno e benzeno, na presença de sulfato. A adição de tolueno e benzeno não interferiu no metabolismo oxidativo do reator, que manteve estabilidade em todas as diferentes fases operacionais. As análises de microscopia, óptica e eletrônica de varredura, sugeriram que, tanto, na fase de enriquecimento, com etanol e lactato, quanto, nas fases subseqüentes, com etanol e aromaticidade, populações de bacilos ovalados e morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp.* foram favorecidas. Ainda, como ácido acético foi o único ácido orgânico detectado, pelas análises cromatográficas, provavelmente, as BRS não oxidadoras de acetato (oxidadoras incompletas), como, por exemplo, *Desulfobulbus propionicus* (bacilos ovalados) (Tabela 1), estiveram presentes de forma significativa no biofilme enriquecido. As análises com gel de DGGE sugeriram que a seletividade, tanto, do tolueno, quanto, do benzeno, adicionados ao meio de cultura, tenham favorecido o crescimento de populações que não eram as predominantes na biomassa enriquecida. Sugeriram, também, provável relação de populações de BRS e de forma geral do Domínio *Bacteria* com a remoção da aromaticidade.

### 5.3. Ensaios complementares

Devido à baixa solubilidade, tanto, do tolueno, quanto, do benzeno, nos meios salinos utilizados neste trabalho, e na tentativa de tratar altas concentrações, foram

realizados ensaios complementares. Nestes ensaios foram usados meios saturados de tolueno e benzeno.

Os dois reatores tiveram seus leitos removidos e foram re-inoculados com biomassa fixada em novas espumas de poliuretano. Os reatores passaram por período de enriquecimento semelhante aos anteriores, com lacto e etanol como principais fontes de carbono. Após este período, o lactato foi retirado do meio e, foram adicionadas concentrações de até 80 mg.l<sup>-1</sup> de tolueno em um dos reatores e 80 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno no outro reator. Porém, devido a baixa solubilidade desses compostos, as concentrações máximas medidas através das análises cromatográficas foram de 10 mg.l<sup>-1</sup>, para o tolueno, e 15 mg.l<sup>-1</sup> para o benzeno.

A DQO afluyente nos ensaios complementares com tolueno e benzeno foi de 2300 mg.l<sup>-1</sup> em ambos os ensaios. Período próximo a 15 dias foi observado para que os valores de DQO se estabilizassem, sendo que o maior consumo da matéria orgânica, expressa em DQO, ocorreu logo no primeiro trecho do reator, correspondendo aos pontos de amostragem C/D 4 e C/D 8. No restante do reator, não houve alteração significativa da DQO (Figura 54 e 55).

Nas fases de alimentação com tolueno e benzeno a eficiência na remoção de matéria orgânica aumentou sensivelmente, porém, é provável que este aumento na eficiência esteja, mais, relacionado com o tempo de operação do reator do que com a adição de compostos aromáticos. Devido à abertura do reator para retirada das amostras, e sendo assim, devido a contaminação por oxigênio no sistema, observou-se ligeira diminuição na eficiência, tanto, da remoção da matéria orgânica, quanto, na de sulfato nos períodos de amostragem (Figura 56 e 57).



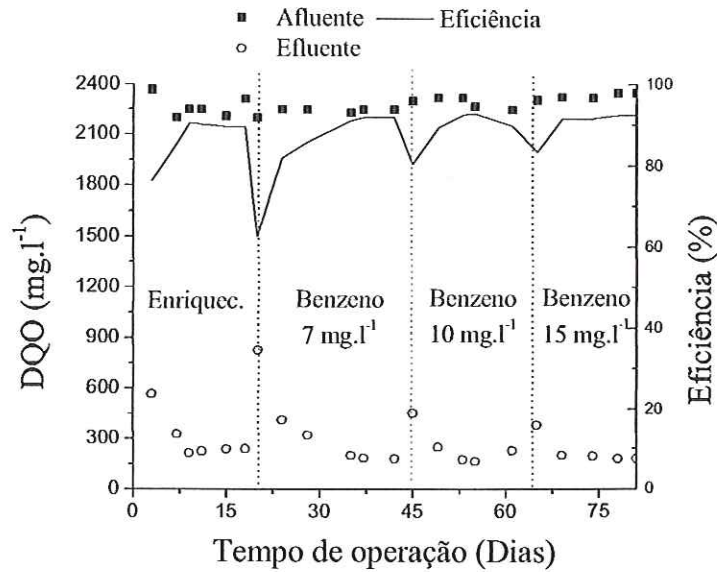


Figura 54. Variação temporal da matéria orgânica (expressa em DQO), nas diferentes fases operacionais do RAHLF no ensaio complementar com benzeno.

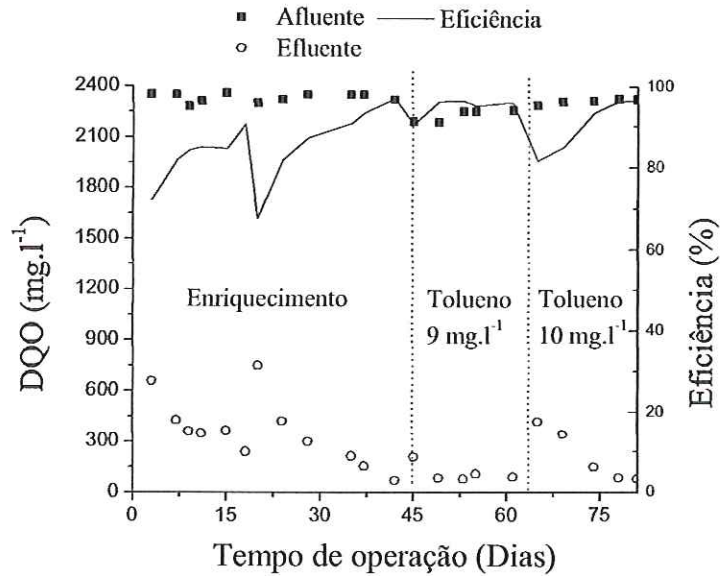


Figura 55. Variação temporal da matéria orgânica (expressa em DQO) nas diferentes fases operacionais do RAHLF no ensaio complementar com tolueno.

Diferente dos ensaios apresentados no item 5.2, a concentração de sulfato foi elevada acompanhando o aumento da DQO. Porém, apesar da demanda por aceptor final de elétron ter sido solucionada, a maior eficiência na remoção de sulfato (1300 mg.l<sup>-1</sup>), observada, foi de, aproximadamente, 90%, contra 98% registrado nos ensaios

anteriores. Nestes ensaios complementares a variação de sulfato, ao longo do leito do reator, apresentou a mesma tendência de variação da matéria orgânica, ou seja, quase todo o sulfato foi consumido, principalmente, até os pontos de amostragem C/D 4 e 8.

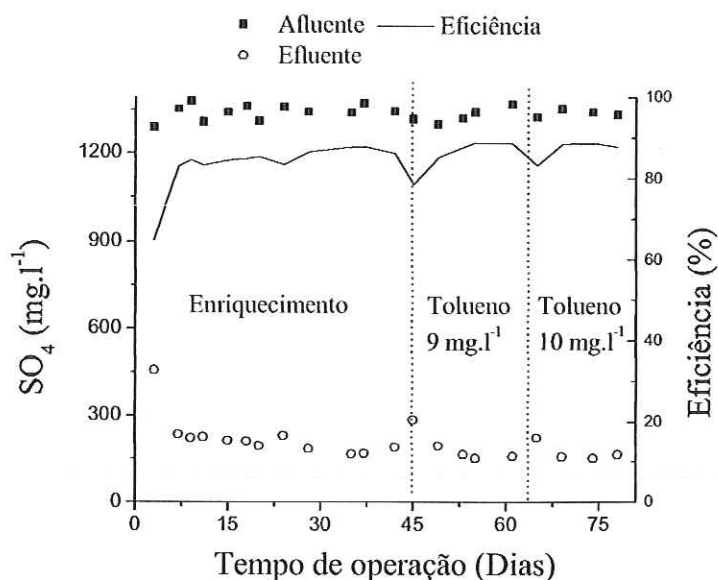


Figura 56. Variação temporal do sulfato nas diferentes fases operacionais do RAHLF no ensaio complementar com tolueno.

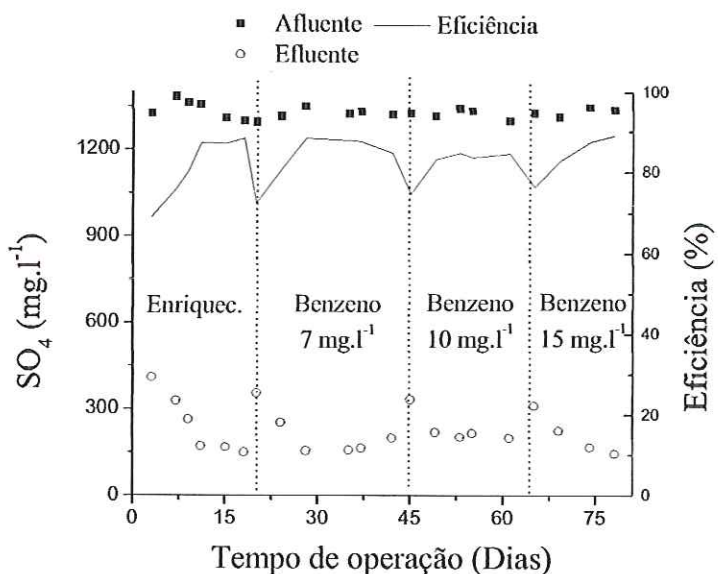


Figura 57. Variação temporal do sulfato nas diferentes fases operacionais do RAHLF no ensaio complementar com benzeno.

As Figuras 58, 59, 60, 61, 62 e a Tabela 24 apresentam os perfis espaciais obtidos nos ensaios complementares e os resultados do modelo cinético proposto (reações paralelas em série irreversíveis com dois produtos intermediários). De acordo com o modelo, a análise dos valores de  $k_1$  e  $k_2$  revelaram que as taxas de consumo de matéria orgânica, pela sulfetogênese ou pelo metabolismo fermentativo, foram similares, quando, submetidas a concentrações de sulfato próximas a  $436 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $586 \text{ mg.l}^{-1}$  nos ensaios com tolueno e benzeno, respectivamente, desde que  $k_2$  seja igual a  $k_1$  multiplicado pela concentração de sulfato ( $C_{\text{SO}_4^{2-}}$ ), nesta condição. Para concentrações de sulfato maiores do que estes valores a atividade sulfetogênica foi o processo metabólico predominante. Por outro lado, outros processos metabólicos, que não a redução do sulfato, foram responsáveis pela remoção da matéria orgânica quando as concentrações de sulfato foram inferiores a estes valores. Deste modo, os dados cinéticos sugerem que o metabolismo variou ao longo do reator, acompanhando o decréscimo na concentração de sulfato.

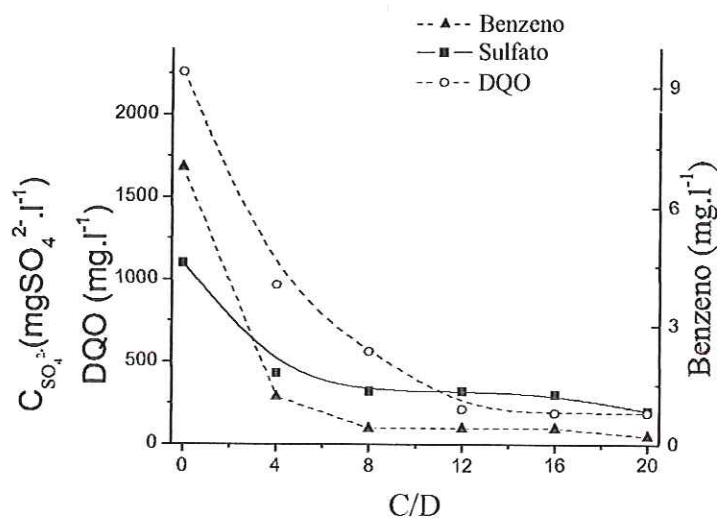


Figura 58. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e benzeno ( $7 \text{ mg.l}^{-1}$ ) no ensaio complementar.



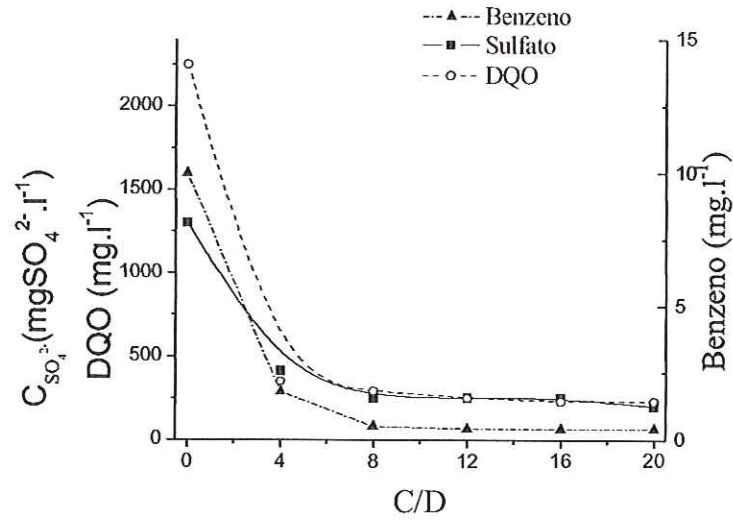


Figura 59. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e benzeno (10 mg.l<sup>-1</sup>) no ensaio complementar.

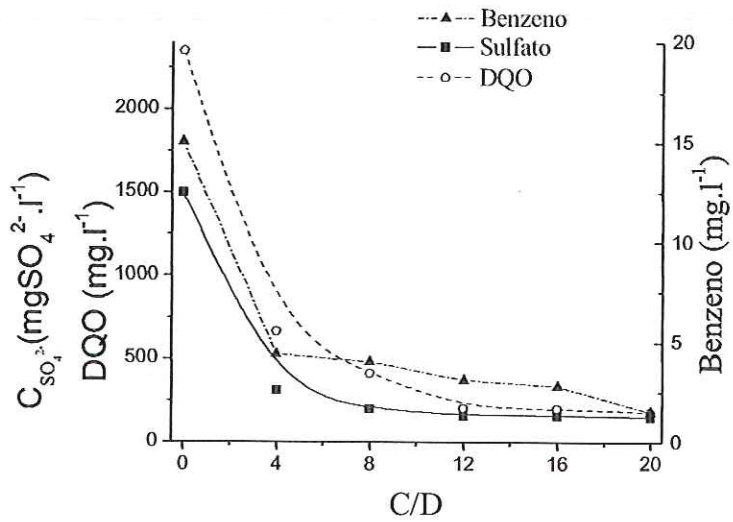


Figura 60. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e benzeno (15 mg.l<sup>-1</sup>) no ensaio complementar.

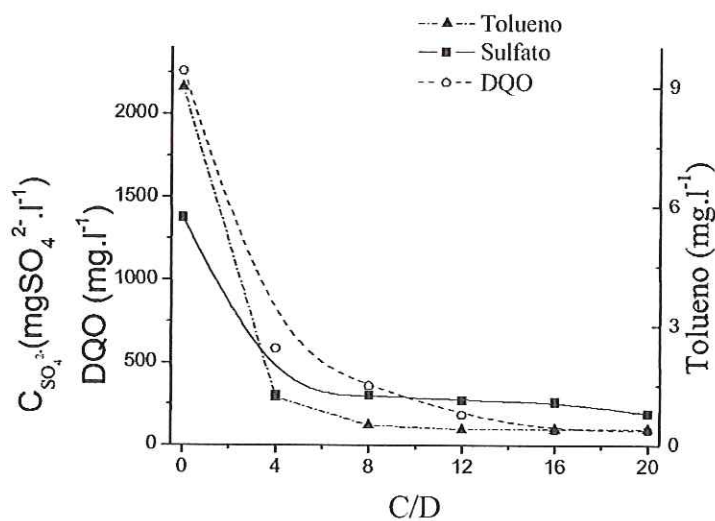


Figura 61. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e tolueno (9 mg.l<sup>-1</sup>) no ensaio complementar.

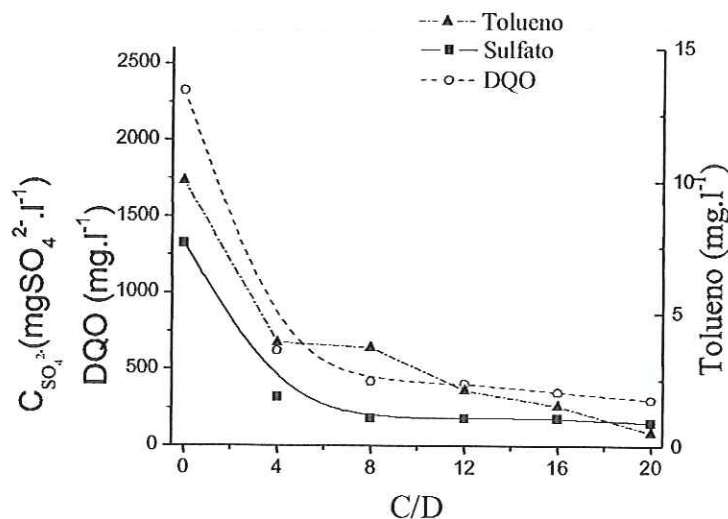


Figura 62. Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e tolueno (10 mg.l<sup>-1</sup>) no ensaio complementar.

A remoção, quase que total, de tolueno e benzeno foi observada sempre antes do ponto de amostragem C/D 8 em todos os ensaios complementares. Como os valores de  $k_4$  foram nulos em todas as fases, é provável que, tanto, tolueno, quanto, benzeno foram consumidos, principalmente, por atividade sulfetogênica com taxa máxima de 0,07 mg<sub>tolueno</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>SSV</sub>.d<sup>-1</sup> e, 0,14 mg<sub>benzeno</sub>.mg<sup>-1</sup><sub>SSV</sub>.d<sup>-1</sup>. Este valor foi calculado da equação (4) para concentração de tolueno e, benzeno de 10 mg.l<sup>-1</sup> e 15 mg.l<sup>-1</sup>, concentração de sulfato de 1325 mg.l<sup>-1</sup> e 1340 mg.l<sup>-1</sup>, para  $k_3$  de 0,002 l.mg<sup>-1</sup> sulfato.h<sup>-1</sup> (Tabela 24) e

para concentração de SSV de 31,4 g.l<sup>-1</sup> e 33,5 g.l<sup>-1</sup>, nos ensaios com tolueno e benzeno, respectivamente.

**Tabela 24.** Parâmetros cinéticos aparentes do processo.

Ensaio Complementares (mg.l <sup>-1</sup> )	Parâmetros cinéticos aparentes					Coeficiente de Correlação R <sup>2</sup>
	k <sub>1</sub> (l.mg <sup>-1</sup> sulfato.h <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	k <sub>3</sub> (l.mg <sup>-1</sup> sulfato.h <sup>-1</sup> )	k <sub>4</sub> (h <sup>-1</sup> )	C <sub>COD_R</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	
9 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno	0,002	0,9	0,006	0	90	0,983
10 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno	0,002	0,92	0,007	0	300	0,979
7 mg.l <sup>-1</sup> de benzeno	0,003	1,85	0,006	0	190	0,986
10 mg.l <sup>-1</sup> de benzeno	0,003	1,9	0,007	0	230	0,994
15 mg.l <sup>-1</sup> de tolueno	0,003	1,9	0,01	0	180	0,991

Portanto, através da análise dos dados obtidos nos ensaios complementares, pode-se verificar que o aumento da concentração de sulfato, de 500 para aproximadamente 1300 mg.l<sup>-1</sup>, não interferiu significativamente nem no desempenho dos reatores nem na cinética de degradação dos compostos aromáticos. Ainda, ficou claro que a baixa solubilidade, tanto do tolueno quanto do benzeno, foi o fator limitante para o tratamento na medida em que os biofilmes adaptados se mostraram capazes de remover quase que totalmente a aromaticidade biodisponível.



## 6. CONCLUSÕES

- Os ensaios preliminares com reatores em batelada alimentados com meio Beller e meio Zinder, evidenciaram boas condições de crescimento microbiano sob condições sulfetogênicas. De modo que, a escolha do meio Zinder, para os ensaios no RAHLF, foi baseada na menor complexidade do processo de confecção do meio, bem como, no custo inferior do mesmo.
- O RAHLF e as condições adotadas neste experimento foram favoráveis em promover o crescimento microbiano e reduzir sulfato, sob a influência de diferentes concentrações de etanol, tolueno e benzeno. As diferentes concentrações de aromáticos usadas não se mostraram nocivas ao potencial oxidativo do biofilme enriquecido nos reatores. Por outro lado, os perfis de DGGE mostraram que a comunidade de *Bacteria*, *Archaea* (somente nos ensaios com benzeno) e BRS mudaram sobre a pressão seletiva causada pela adição de etanol e dos compostos aromáticos, e que esta pressão variou ao longo do leito dos reatores horizontais. Entretanto, os perfis de DGGE mostraram que as populações de *Bacteria* apresentaram maior diversidade em função das concentrações de etanol, tolueno e benzeno, usadas.
- As arqueas metanogênicas acetoclásticas presentes nos consórcios microbianos, enriquecidos nos diferentes ensaios, foram favorecidas, pelo predomínio de bactérias redutoras de sulfato, oxidadoras incompletas, nos biofilmes, devido à oxidação parcial do etanol a ácido acético.
- Apesar das condições ótimas para crescimento de BRS, a completa redução do íon sulfato só foi observada quando a relação  $DQO/SO_4^{2-}$  não foi inferior a 2.
- Modelo cinético de primeira e segunda ordem foram combinados de modo a explicar, satisfatoriamente, as diferentes fases no metabolismo anaeróbio dos

reatores. Segundo este modelo a degradação do tolueno e benzeno foram alcançadas em condições sulfetogênicas, enquanto que, o etanol foi oxidado, tanto, através da redução do sulfato, quanto, através de processos fermentativos e metanogênicos.

- Remoção de etanol, tolueno e benzeno, na presença de sulfato em RAHLF, foi satisfatória em todas as diferentes concentrações dos mesmos. A adição dos compostos aromáticos não interferiu no metabolismo oxidativo dos reatores, que mantiveram a estabilidade em todas as fases experimentais. As análises dos géis de DGGE sugeriram participação de populações de *Bacteria* e de BRS para a degradação de tolueno e de populações de *Bacteria* e de BRS para a degradação de benzeno.
- A aplicação do RALF em escala laboratorial é viável a biorremediação de águas contaminadas com etanol, tolueno e benzeno, uma vez que a construção deste reator é simples. O reator pode ser construído em estágios como descrito por ZAIAT *et al.* (2000). Estes autores desenvolveram RAHLF em escala piloto, através de um modelo matemático mecanístico, para o tratamento de esgoto doméstico. A construção do RAHLF em estágios pode levar ao desenvolvimento de unidade compactas que podem ser facilmente transportadas e instaladas em qualquer sítio contaminado.
- As concentrações residuais de tolueno e benzeno no efluente dos reatores não atenderam aos critérios requeridos pela Resolução CONAMA nº 020/86 (0,002 e 0,005 mg.l<sup>-1</sup> para tolueno e benzeno, respectivamente), sendo assim, outro sistema de tratamento deverá ser acoplado para a remoção das concentrações residuais destes aromáticos, caso o RAHLF, operado em condições sulfetogênicas, seja adotado para o tratamento *in situ* de águas contaminadas.

## **7. RECOMENDAÇÕES**

- Estudos da aplicação do RAHLF, operado sob condições sulfetogênicas, no tratamento de outros compostos aromáticos.
- Estudos da aplicação do RAHLF, operado sob condições sulfetogênicas, no tratamento *in situ* de sítios contaminados com etanol e compostos aromáticos.
- Estudos de sistemas que possam ser usados para o pós tratamento das concentrações residuais de aromáticos do RAHLF, operado sob condições sulfetogênicas.
- Estudos que possibilitem melhor conhecimento da estrutura dos consórcios microbianos, enriquecidos em RAHLF sob condições sulfetogênicas, que possam degradar compostos aromáticos.
- Estudos em RAHLF que utilizem compostos orgânicos aromáticos marcados radiativamente, de modo a permitir a comprovação da biodegradação.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C.; JURGENS, G.; DE MARCO, P.; SAANO, A.; BORDALO, A.A. *Crenarchaeota and Euryarchaeota in temperate estuarine sediments*. Journal of Applied Microbiology 90, 713-718, 2001.
- ALM, E. W. & STAHL, D. A.. *Extraction of microbial DNA from aquatic sediments*. Molecular Microbial Ecology Manual (1.1.5): 1-29, 1996.
- ALM, E.W.; OERTHER, D.; LARSEN, N.; STAHL, D.A.; RASKIN, L. *The oligonucleotide probe database*. Applied And Environmental Microbiology, 62: 3557-3559, 1996.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; KARL-HEINZ, S. *Phylogenetic Identification And In Situ Detection of Individual Microbial Cells Without Cultivation*. Microbiological Reviews, 59: 143-169, 1995.
- AMANN, R.I.; STROMLEY, J.; DEVEREUX, R.; KEY, R.; STAHL, D.A. *Molecular and Microscopic Identification of Sulfate-Reducing bacteria in Multispecies Biofilms*. Applied and Environmental Microbiology 58: 614-623, 1992.
- ARAUJO, J.C.; MORTARA, R.; CAMPOS, J.R.; VAZZOLLER, R.F. *The Use Of Fluorescence In Situ Hybridization To Evaluate Microbial Composition Of The Anaerobic Sludge And Biofilms In Wastewater Treatment Systems*. In: VI Oficina E Seminário Latino Americano De Digestão Anaeróbia, Recife. Editora Universitária da UFPE. V.I: 285-291, 2000.
- BALBA, M.T., AL-AWADHI, N., AL-DAHER, R. *Bioremediation Of Oil-Contaminated Soil: Microbiological Methods For Feasibility Assessment And Field Evaluation*. Journal Of Microbiological Methods 32: 155-164, 1998.
- BERNARDER R. *Chromosome replication, nucleoid segregation and cell division in Archaea*. Trends in Microbiology 8, 278-283, 2000.
- BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. *The Prokaryotes*. 2ª edição, volume 1. Springer-Verlag New York Inc., 1992.
- BATTERSBY, N. S. *Sulphate - Reducing Bacteria*. In: Methods in aquatic bacteriology. Ed. AUSTIN, B. John Wiley & Sons Ltd., p. 269-299, 1988.
- BBD. *Biocatalysis/Biodegradation Database*. The University of Minnesota. <http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>, 08/02/2002.

- BELLER, H.R.; SPORMANN, A.M.; SHARMA, P.K.; COLE, J.R.; REINHARD, M. *Isolation And Characterization Of A Novel Toluene-Degrading, Sulfate Reducing Bacterium*. Applied And Environmental Microbiology 62: 1188-1196, 1996.
- BENEFIELD, C.D.; RANDALL, C.W. *Biological process design for wastewater treatment*. Prentice Hall Englewood Cliffs. 526p., 1980.
- BOLAÑOS, R.M.L.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Phenol Degradation In Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Biomass (HAIB) Reactor Under Mesophilic Conditions*. In: VI Oficina E Seminário Latino Americano De Digestão Anaeróbia, Recife. Editora Universitária da UFPE. V.I: 263-269, 2000.
- BOLAÑOS, R.M.L. *Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas*. São Carlos. 118p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2001.
- BOOPATHY, R.; KULPA, C.F.; MANNING, J. *Anaerobic Biodegradation Of Explosives And Related Compounds By Sulfate-Reducing And Methanogenic Bacteria: A Review*. Bioresource Technology 63: 81-89, 1998.
- BOOPATHY, R. *Review Paper - Factors Limiting Bioremediation Technologies*. Bioresource Technology 74: 63-67, 2000.
- BRÜGGEMANN, J.; STEPHEN, J.R.; CHANG, Y.J.; MACNAUGHTON, S.J.; KOWALCHUK, G.A.; KLINE, E.; WHITE, D.C. *Competitive PCR-DGGE Analysis Of Bacterial Mixtures An Internal Standard And An Appraisal Of Template Enumeration Accuracy*. Journal of Microbiological Methods 40: p. 111-123, 2000.
- BURLAND, S.M. & EDWARDS, E.A. *Anaerobic Benzene Biodegradation Linked to Nitrate Reduction*. Applied and Environmental Microbiology, 65 (2): 529-533
- CABRAL, A.K.A. *Caracterização hidrodinâmica de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1995.
- CALLADO, N. H. *Estudo da toxicidade do sulfato em reator anaeróbio de manta de lodo (UASB)*. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1992.
- CASAMAYOR, E.O.; SCHÄFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MUYZER, G. *Identification of and Spatio-Temporal Differences Between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*. Applied and Environmental Microbiology 66: 499-508, 2000.



- CATTONY, E. B. M. *Avaliação da diversidade microbiana e das características físico-químicas de solo submetido ao cultivo de cana-de-açúcar*. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos – USP. São Carlos - 80 p., 2001.
- CERVANTES, F.J.; DIJKSMA, W.; DUONG-DAC, T.; IVANOVA, A.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. *Anaerobic Mineralization of Toluene by Enriched Sediments with Quinones and Humus as Terminal Electron Acceptors*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4471-4478, 2001.
- CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. *Biofilms*. 1º ed. New York: John Wiley & Sons INC., 1990.
- CHINALIA, F.A. *Biological and Chemical Monitoring of the Transformation of Recalcitrant Organic Compounds in River Sediment*. Aberdeen. Tese (doutorado) – University of Aberdeen, 2002.
- CHOI, E. & RIM, J.M. *Competition and Inhibition of Sulphate reducers and Methane Producers in Anaerobic Treatment*. *Water Science Technology* 23: 1259-1264, 1991.
- COATES, J. D.; ANDERSON, R. T.; LOVLEY, D.L. *Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1099-1101, 1996.
- COATES, J. D. & ANDERSON, R.T. *Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments*. *Tibtech* 18: 408-412, 2000.
- COATES, J. D.; CHAKRABORTY, R.; MCINERNEY, M. J. *Anaerobic benzene biodegradation—a new era*. *Research in Microbiology* 153: 621–628, 2002.
- CORSEUIL, H. X. & ALVAREZ, P. J. J. *Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol*. *Water Science Technology* 34: 311-318, 1996.
- CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S.; DOS SANTOS, R. C. F.; ALVAREZ, P. J. J. *The influence of gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation*. *Water Research* 32 (7): 2065-2072, 1997.
- CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S.; SANTOS, R. C. F.; ALVAREZ, P. J. J. *The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation*. *Water Research* 32: 2065-2072, 1998.
- CORSEUIL, H.X.; FERNANDES, M. *Efeito Do Etanol No Aumento Da Solubilidade De Compostos Aromáticos Presentes Na Gasolina Brasileira*. *Engenharia Sanitária E Ambiental*, 4: 71-75, 1999.



- CORSEUIL, H. X.; KAIPPER, B. I.; FERNANDES, M. *Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol*. Water Research 38 (6): 1449-56, 2004.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. *Microbiol Biofilms*. Annu. Rev. Microbiol., 47: 711-745, 1995.
- CUNNINGHAM, J. A.; HOPKINS, G. D.; LEBRON, C. A.; REINHARD, M. *Enhanced anaerobic bioremediation of groundwater contaminated by fuel hydrocarbons at Seal Beach, California*. Biodegradation 11: 159-170, 2000.
- DA SILVA, M. L. B.; RUIZ-AGUILAR, G. M. L.; ALVAREZ, P. J. J. *Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate*. Biodegradation 16: 105-114, 2005.
- DAMIANOVIC, M.H.R.Z. *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 176p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997.
- DE NARDI, I. R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors*. Bioprocess Engineering 21: 469-476, 1999.
- DE NARDI, I.R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Degradação de BTEX em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo Na presença de diferentes aceptores de elétrons*. In: VI Oficina E Seminário Latino Americano De Digestão Anaeróbia, Recife, 2000. Editora Universitária da UFPE. V.II: 151-154.
- DE NARDI, I.R.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Anaerobic Degradation Of BTEX in A Packed-bed Reactor*. Submetido para apresentação oral no Congresso Internacional de Digestão Anaeróbia, Antuerpia, Belgica, 2001.
- DE NARDI, I.R. *Degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 165p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002.
- DE NARDI, I.R.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Anaerobic Degradation of BTEX in a Packed-Bed reactor*. Water Science and Technology 45: 175-180, 2002.
- DE NARDI, I. R.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; RIBEIRO, R.; BOLAÑOS, M. L.; OLIVEIRA, S. V. W. B.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Potential Use of an Anaerobic Fixed-Bed Reactor for Hazardous Organic Compounds Degradation*. Proceedings. of the Anaerobic Digestion, Montreal 4: 2350-2353, 2004.

- DE NARDI, I. R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Anaerobic Packed-Bed Reactor for Bioremediation of Gasoline-Contaminated Aquifers*. *Process Biochemistry* 40: 587-592, 2005.
- DILALLO, R. & ALBERTSON, O. E. 1961. *Volatile acids by direct trititation*. *Journal of Water Pollution C. Fed.* 33: 356-365.
- DOMINGUES, M.R. *Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e de leito fixo, sob condições termofílicas*. Dissertação de mestrado, EESC-USP. 164p., 2001.
- EDGCOMB, V.P.; McDONALD, J.H.; DEVEREUX, R.; SMITH, D. *Estimation of Bacterial Cell Numbers in Humic Acid-Rich Salt Marsh Sediments with Probes Directed to 16S Ribosomal DNA*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1516-1523, 1999.
- EDWARDS, E.A.; WILLS, L.E.; REINHARD, M.; GRBIC-GALIC, D. *Anaerobic Degradation of Toluene and Xylene by Aquifer Microorganisms Under Sulfate-Reducing Conditions*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (3): 794-800, 1992.
- EDWARDS, E.A.; EDWARDS, A.M.; GRBIC-GALIC, D. *A Method for detection of Aromatic Metabolites at Very Low Concentrations: Application to Detection of Metabolites of Anaerobic Toluene Degradation*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (1): 323-327, 1994.
- ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F., ROSADO, A.S., SMALLA, K. *Microbiological And Molecular Biological Methods For Monitoring Microbial Inoculants And Their Effects In The Soil Environment*. *Journal of Microbiological Methods* 32: 133-154, 1998.
- FATIBELLO, S. H. S. A. *Avaliação da atividade microbiana anaeróbia de sedimentos lacustres e de lodos de um biodigestor anaeróbio termofílico na degradação de tricloretileno (TCE)*. São Carlos. 225p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2001.
- FELSKE, A.; ENGELN, B.; NÜBEL, U.; BACKHAUS, H. *Direct Ribosome Isolation From Soil To Extract Bacterial Rrna For Community Analysis*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, X: 4162-7. 1996.
- FERNÁNDEZ, A.; HUANG, S.; SESTON, S.; XING, J.; HICKEY, R.; CRIDDLE, C.; TIEDJE, J. *How Stable Is Stable? Function Versus Community Composition*. *Applied And Environmental Microbiology* 65: 3697-3704, 1999.
- FERRI, M.J.; MUYZER, G.; WARD, D.M. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles Of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting A Hot Spring Microbial Mat Community*. *Applied And Environmental Microbiology*, 62: 340-346, 1996.



- FICKER, M.; KRASTEL, K.; ORLICKY, S. EDWARDS, E. *Molecular Characterization of a Toluene-Degrading Methanogenic Consortium*. Applied and Environmental Microbiology, 65 (12): 5576-5585, 1999.
- FLAHERTY, V.; COLLERAN, E. *Effect of Sulphate Addition on Volatile Fatty Acid and Ethanol Degradation in an Anaerobic Hybrid Reactor: II: Microbial Interactions and Toxic Effects*. Bioresearch Technology, 68: 109-120, 1999.
- 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 12 235-239, 1995.
- FORTERRE, P.; BROCHIER, C.; PHILIPPE, H. *Evolution of Archaea*. Theoretical Population Biology, 61: 409-422, 2002.
- FRANZMANN, P. D.; ROBERTSON, W. J.; ZAPPIA, L. R.; DAVIS, G. B. The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface. Biodegradation 13:65-78, 2002.
- GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; GLOVER, L.A. *Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: application of the community DNA hybridisation technique*. Microbial Ecology 31: 269-280, 1996.
- GRIFFITHS, B.S.; DIAZ-RAVINA, M.; RITZ, K.; MCNICOL, J.W.; EBBLEWHITE, N.; BÅÅTH, E. *Community DNA hybridisation and %C-F-C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils*. FEMS Microbiology-Ecology 24: 103-112, 1997.
- GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. *Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition*. Applied and Environmental Microbiology 66: 5488-5491, 2000.
- GUIOT, S.R.; PAUSS, A.; COSTERTON, J.W. *A Structured Model of The Anaerobic Granule Consortium*. Water Sci. Technol., 25: 1-10, 1991.
- HARWOOD, C.S.; BURCHHARDT, G.; HERRMANN, G.F. *Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds via the Benzoil-CoA Pathway*. FEMS Microbiology Reviews 22: 439-458, 1999.
- HIRASAWA, J. S.; SILVA, A. J.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; VARESCHE, M. B. A. *Evaluation of sulfidogenic biofilm microbial consortia by fluorescence in situ hybridization*. Proceedings. of Anaerobic Digestion, Montreal 4: 1903-1906, 2004.
- HEIDER, J.; SPORMANN, A.M.; BELLER, H.R.; WIDDEL, F. *Anaerobic Bacterial Metabolism of Hydrocarbons*. FEMS Microbiology Reviews 22: 459-473, 1999.



- ISA, Z.; GRUSENMEYER, S.; VERSTRAETE, W. *Sulphate Reduction Relative to Methane Production in High-Rate Anaerobic Digestion: Technical Aspects*. Applied Environmental Microbiology, 51:572-579, 1986.
- KANE, M.D.; POULSEN, L.K.; STAHL D.A. *Monitoring The Enrichment And Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria By Using Oligonucleotide Hybridization Probes Designed From Environmentally Derived 16SrRNA Sequences*. Applied And Environmental Microbiology 59:682-686, 1993.
- KARNER, M.B.; DELONG, E.F.; KARL, D.M. *Archaeal Dominance in the Mesopelagic Zone of the Pacific Ocean*. Nature, 409,507-510, 2001.
- KING, R. C.; STANSFIELD, W. D. *A Dictionary of genetics*. Oxford University Press, 1997.
- KOIZUMI, Y.; KELLY, J.J.; NAKAGAWA, T; URAKAWA, H.; EL-FANTROUSSI, S.; AL-MUZAINI, S.; FUKUI, M.; URUSHIGAWA, Y.; STAHL, D.A. (2002). *Parallel Characterization of Anaerobic Toluene – and Ethilbenzene – Degrading Microbial Consortia by PCR – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, RNA-DNA Membrane Hybridization, and DNA Microarray Technology*. Applied and Environmental Microbiology 68: 3215-3225.
- KOLMERT, A.; WIKSTRÖM, P.; HALLBERG, K.B. *A Fast And Simple Turbidimetric Method For The Determination Of Sulfate In Sulfate-Reducing Bacterial Cultures*. Journal Of Microbiological Methods 41: 179-184, 2000.
- KORDA, A.; SANTAS, P.; TENENTE, A.; SANTAS, R. *Petroleum Hydrocarbon Bioremediation: Sampling And Analytical Techniques, In Situ Treatments And Commercial Microorganisms Currently Used*. Applied Microbial Biotechnology 48: 677-686, 1997.
- KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP, J.W. *Analysis Of Ammonia-Oxidizing Bacteria Of The  $\beta$  Subdivision Of The Class Proteobacter In Coastal Sand By Denaturing Gradient Gel Electrophoresis And Sequencing Of Pcr-Amplified 16s Ribosomal And Fragments*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 1489-1497, 1997.
- KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. *Methanogen Flora of Paddy Soils in Japan*. FEMS Microbiology Ecology 22: 39-48, 1997.
- LAMOTTA, E.J. *Kinetics Of Growth And Substrate Uptake In A Biological Film System*. Appl. Envirom. Microbiol., 31: 286-293, 1976.
- LENS, P. N. L.; VISSER, A.; JANSEN, A. J. H.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. *Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 28 (1): 41-88, 1998.



- LEU, J.; McGOVERN-TRAA, C.P.; PORTER, A.J.R.; HAMILTON, W.A. *Identification and Phylogenetic Analysis of Thermophilic Sulfate-reducing Bacteria in Oil Field Samples by 16S rDNA Gene Cloning and Sequencing*. *Anaerobe Environmental Microbiology* 4: 165-174, 1998.
- LI, Y. Y.; LAM, S.; FRANGI, H. H. P. *Interaction between methanogenic, sulfate-reducing and syntrophic bacteria in the anaerobic degradation of benzoate*. *Water Research* 30 (7): 155-156, 1996.
- LIMA, C.A.A. *Tratamento de esgoto sanitário em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) – escala piloto*. São Carlos. 165p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2001.
- LOVLEY, D.R.; GIOVANNONI, S.J.; WHITE, D.C.; CHAMPINE, J.E.; PHILLIPS, E.J.P.; GORBY, Y.A.; GOODWIN, S. *Geobacter metallireducens gen. Nov. sp. nov., a Microorganism Capable of Coupling the complete oxidation of Organic compounds to the Reduction of Iron and Other Metals*. *Archives of Microbiology*, 159: 336-344, 1993.
- LUDWIG, W.; KIRCHHOLF, G.; KLUGBAVER, N.; WEIZENEGGER, M.; BETZL, D.; EHRMANN, M.; HERTEL, C.; JILG, S.; TATZEL, R.; ZITZELSBERGER, H.; LIEBL, S.; HOCHBERGER, M.; SHAH, J.; LANE, D.; WALLNÖFER, P.; SCHEIFER, K.H. *Complete 23S ribosomal RNA sequences of Gram-positive bacteria with a low DNA G+C content*. *Systematic Applied Microbiology* 15: 487-501, 1992.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock Biology Of Microorganisms*. Prentice Hall, Inc., 2004.
- MANOHAR, S.; KAREGOUDAR, T.B. *Degradation Of Naphthalene By Cells Of Pseudomonas sp. Strain NGK 1 Immobilized In Alginate, Agar And Polyacrylamide*. *Applied Microbial Biotechnology* 49: 785-792, 1997.
- MARIANNE LANGE & BIRGITTE K. AHRING. *A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea*. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 553-571, 2001.
- MARTEINSSON, V. T.; KRISTJÁNSSON, J. K.; KRISTMANNSDÓTTIR, H.; DAHLKVIST, M.; SÆMUNDSSON, K.; HANNINGTON, M.; PÉTURSDÓTTIR, S. K.; GEPTINER, A.; STOFFERS, P. *Discovery and Description of Giant Submarine Smectite Cones on the Seafloor in Eyjafjordur, Northern Iceland, and a Novel Thermal Microbial Habitat*. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2), 827-833, 2001.
- MARTINEZ-MURCIA, A.J.; ACINAS, S.G.; RODRIGUEZ-VALERA, F. *Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments*. *FEMS Microbiology-Ecology* 17: 247-256, 1995.



- MIZUNO, O.; LI, Y. Y.; NOIKE, T. *Effects of sulfate concentration and sludge retention time on the interaction between methane production and sulfate reduction for butyrate*. Water Science and Technology 30 (8): 45-54, 1994.
- MYERS, R.M.; FICHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. *Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis*. Nucleic Acid Research, 13: 3131-3145, 1985.
- MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L.S. *Detection and localisation of single based changes by denaturing gradient gel electrophoresis*. Methods in Enzymology 155: 501-527, 1987.
- MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *A gas chromatographic determination approach for total volatile acids in effluents of anaerobic reactors treating liquid and solid wastes (Determinação de ácidos voláteis totais por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos)*. Proceedings of the VI Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion 2: 235-238, 2000.
- MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. *Profiling of Complex Microbial Populations By Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding For 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology, 59: 695-700, 1993.
- MUYZER, G.; TESKE, A.; WIRSEN, C. O.; JANNASCH, H. W. *Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments*. Archives of Microbiology, 164: 165-72, 1995
- MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Of Pcr-Amplified 16s rDNA – A New Molecular Approach To Analyze The Genetic Diversity Of Mixed Microbial Communities*. Molecular Microbial Ecology Manual 3.4.4.: p. 1-23, 1996.
- MUYZER, G. & SMALLA, K. *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. Anton Leeuw Int J G 73 (1): 127-141, 1998.
- NAKAGAWA, T.; SATO, S.; YAMAMOTO, Y.; FUKUI, M. *Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulphate-reducing consortium*. Water Research 36: 2813-2823, 2002.
- NATION, J. L. *A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy*. Stain Technology 58: 347-351, 1983.
- NIELSEN, T. A.; LIU, W-T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D. A. *Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor*. Applied Environmental Microbiology 65: 1251-1258, 1999.



- OLIVEIRA, S.V.W.B. *Avaliação da degradação e toxicidade de formaldeído em reator anaeróbio horizontal de leito fixo*. São Carlos. 95p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2001.
- ORPHAN, V.J.; HINRICHS, K.U.; USSLER III, W.; PAULL, TAYLOR, L.T.; SYLVA, S.P.; HAYES, J.M.; DELONG, E.F. *Comparative Analysis of Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments*. Applied and Environmental Microbiology 67: 1922-1934, 2001.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H. *Desulforhabdus amnigenus gen. nov. sp.nov., a Sulphate Reducer Isolated from Anaerobic Sludge*. Arch Microbiology, 164: 119-124, 1995.
- PFENNIG, N.; WIDDEL, F.; TRÚPER, H.G. *The Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria*. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÚPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (Eds.), *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, Heidelberg, vol. 1, p. 926-940, 1981.
- POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. *Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR*. Applied and Environmental Microbiology 64: 3724-3730, 1998.
- POSTGATE, J.R. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Dissimilatory Sulphate Or Sulfur Reducing Bacteria. Genus Desulfovibrio*. Williams & Wilkins, U.S.A., 1984.
- RABUS, R.; NORDHAUS, R.; LUDWIG, W.; WIDDEL, F. *Complete Oxidation of Toluene under Strictly Anoxic Conditions by a New Sulfate-Reducing Bacterium*. Applied and Environmental Microbiology 59: 1444-1451, 1993.
- RABUS, R.; WIDDEL, F. *Anaerobic Degradation Of Ethylbenzene And Other Aromatic Hydrocarbons By New Denitrifying Bacteria*. Arch. Microbiol, 163: 96-103, 1995a.
- RABUS, R.; WIDDEL, F. *Conversion Studies With Substrate Analogues Of Toluene In A Sulphate-Reducing Bacterium, Strain Tol2*. Arch. Microbiol, 164: 448-451, 1995b.
- RAVENSCHLAG, K.; SAHM, K.; KNOBBLAUCH, C.; JORGENSEN, B.B.; AMANN, R. *Community Structure, Cellular rRNA Content, and Activity of Sulfate-Reducing Bacteria in Marine Arctic sediments*. Applied and Environmental Microbiology 66: 3592-3602, 2000.
- REYSENBACH, A.; GIVER, L. J.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. *Differential Amplification of rRNA Genes by Polymerase Chain Reaction*. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3417-3418, 1992.
- RITTMAN, B.E.; McCARTY, P.L. *A Model of Steady State Biofilm Kinetic*. Biotechnol. Bioeng., 22: 2343-2357, 1980.

- REUTER, P.; RABUS, R.; WILKES, H.; AECKERSBERG, F.; RAINEY, F.A.; JANNASCH, H.W.; WIDDEL, F. *Anaerobic Oxidation Of Hydrocarbons In Crude Oil By New Types Of Sulphate-Reducing Bacteria*. *Nature*, 372: 455-458, 1994.
- RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. *Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes*. *Journal of Water Pollution C. Fed.* 58 (5): 406-465, 1986.
- ROONEY-VARGA, J.N.; ANDERSON, R.T.; FRAGA, J.L.; RINGELBERG, D.; LOVLEY, D.R. *Microbial Communities Associated with Anaerobic Benzene Degradation in a Petroleum-Contaminated Aquifer*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3056-3063, 1999.
- SANTEGOEDS, C.M.; DAMGAARD, L.R.; HESSELINK, G.; ZOPFI, J.; LENS, P.; MUYZER, G.; BEER, D. *Distribution of Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria in Anaerobic Aggregates Determined by Microsensor and Molecular Analyses*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4618-4629, 1999.
- SARTI, A.; VIEIRA L.G.T.; FORESTI E., ZAIAT, M. *Influence of the Liquid-Phase Mass Transfer on the Performance of a Packed-Bed Bioreactor for Wastewater Treatment*. *Bioresourse Technology*, 78 (3): 231-238, 2001.
- SANTEGOEDS, C.M.; FERDELMAN, T.G.; MUZER, G.; BEER, D. *Structural and Functional Dynamics of Sulfate-Reducing Populations in Bacterial Biofilms*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3731-3739, 1998.
- SCHÄFER, G.; ENGELHARD, M.; MÜLLER, V. *Bioenergetics of the Archaea*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 570-620, 1999.
- SCHAUDER, R. & KROGER, A. *Bacterial Sulphur Respiration*. *Arch. Microb.*, 159: 491-497, 1993.
- SCHRAMM, A.; SANTEGOEDS, C.M.; NIELSEN, .K.; PLOUG, H.; WAGNER, M.; PRIBYL, M.; WANNER, J.; AMANN, R.; BEER, D. *On The Occurrence of Anoxic Microniches, Denitrification, and Sulfate Reduction in Aerated Activated Sludge*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4189-4196, 1999.
- SILVA, A. J.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. *Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor*. *Process Biochemistry* 37: 927-935, 2002.
- SILVA, D.; WITWER, C.T. *Monitoring Hybridization During Polymerase Chain Reaction*. *Journal of Chromatography B*. 741: 3-13, 2000.
- SILVA, S. P. *Isolamento e caracterização de bactéria redutora de sulfato: Ênfase na remoção de benzoato*. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos/USP. São Carlos, 97p., 2004.



- SMALLA, K.; Van OVERBEEK, L.S.; Van ELSAS, J.D. *Prevalence of nptII in kanamycin resistant bacteria from different environments*. Fems Microbial Ecology, 13: 47-58, 1993.
- SMITH, D.R.; DOUCETTE-STAMM, L.A.; DELOUGHERY, C.; LEE, H.; DUBOIS, J.; ALDREDGE, T.; BASHIRZADEH, R.; BLAKELY, D.; COOK, R.; GILBERT, K.; HARRISON, D.; ANG, L.H.; KEAGLE, P.; LUMM, W.; POTHIER, B.; QIU, D.; SPADAFORA, R.; VICAIRE, R.; WANG, Y.; WIERZBOWSKI, J.; GIBSON, R.; JIWANI, N.; CARUSO, A.; BUSH, D.; SAFER, H.; PATWELL, D.; PRABHAKAR, S.; MCDUGALL, S.; SHIMER, G.; GOYAL, A.; PIETROKOVSKI, S.; CHURCH, G.M.; DANIELS, C.J.; MAO, J.; RICE, P.; LLING, J.N.; REEVE, J.N. *Complete Genome Sequence of Methanobacterium thermoautotrophicum ΔH: Functional Analysis and Comparative Genomics*. Journal of Bacteriology 179 (22), 7135-7155, 1997.
- SPEECE, R. E. *Anaerobic Biotechnology for industrial wastewater*. Archae Press, 1996.
- STAMS, A.J.M.; HANSEN, T.A.; SKYRING, G.W. *Utilization Of Amino Acids As Energy Substrates By Two Marine Desulfovibrio Strains*. FEMS Microbiol. Ecol., 31: 11-15, 1985.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTE WATER. 19<sup>th</sup> edition. American Public Health Association/ American Water Association/ Water Environment Federation, Washington, DC, USA, 1995.
- SUZUKI, M.T.; GIOVANNONI, S. J. *Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR*. Applied and Environmental Microbiology 62: 625-630, 1996.
- SZEWZYK, U. & PFENNING, N. *Complete Oxidation of Catechol by the Strictly Anaerobic Sulfate-Reducing Desulfobacterium catecholicum sp. nov.* Archives of Microbiology, 147: 163-168, 1987.
- TAKAI, K. & SAKO, Y. *A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments*. FEMS Microbiology Ecology 28, 177-188, 1999.
- TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. *Molecular Identification Of Bacteria From A Coculture By Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Of 16s Ribosomal DNA Fragments As A Tool For Isolation In Pure Cultures*. Applied and Environmental Microbiology, 62: 4210-4215, 1996.
- TESKE, A.; WAWER, C.; MUYZER, G.; RAMSING, N.B. *Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as Evaluated by Most-Probable-Number Counts and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Fragments*. Applied and Environmental Microbiology 62: 1405-1415, 1996.



- TSAI, Y.; OLSON, B. H. *Rapid Method for direct Extraction of DNA from soil and Sediments*. Applied and Environmental Microbiology, (57): 1070-1074, 1991.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DANE, F.L. *High diversity in DNA of soil bacterial*. Applied and Environmental Microbiology 56: 782-787, 1990.
- TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G. *Isolation and characterization of Methanococcus mazei strain MC3*. FEMS Microbiology Letters, 16: 241-245, 1983.
- VALLERO, M.V.G. *Sulfate Reducing Processes at Extreme Salinity and Temperature*. Wageningen. 214p. Tese (doutorado), Wageningen Universiteit, 2003.
- VAN ES, F.B.; LAAMBROEK, H.J.; VELDKAMP, H. Aspects of Microbial Metabolism and Ecology. Cap. 1: Microbial Ecology – An Overview. Published for the Society for General Microbiology by Academic Press, 1984.
- VARESCHE, M.B.A.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. *Microbial Colonization of Polyuretane Foam Matrices in Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) Reactor*. Applied Microbiology and Biotechnology, 48 (4): 534-538, 1997.
- VAZOLLER, R.F. *Avaliação Do Ecosistema Microbiano De Um Biodigestor Anaeróbio De Fluxo Ascendente E Manta De Lodo, Operado Com Vinhaça Sob Condições Termofílicas*. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos/USP. São Carlos, 259p, 1995.
- VAZOLLER, R.F. *Microbiologia e Saneamento Ambiental*. Base de Dados Tropical, [www.bdt.org.br](http://www.bdt.org.br), 23/10/2000.
- VAZOLLER, R.F. & VARESCHE, M.B.A. Uso Ampliado da Digestão Anaeróbia - Ambientes Extremos (halofílicos, psicofílicos, termofílicos), Biorremediação, Compostos Recalcitrantes e Sulfetos. Mesa Redonda II In: VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, Recife, 2000.
- VIEIRA, L.G.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; HOKKA, C.O. *Estimation of intrinsic Kinetic parameters in immobilized cell systems for anaerobic wastewater treatment*. Biotechnology Techniques 10: 635-638, 1996.
- VISSER, A.; GAO, Y.; LETTINGA, G. *Effects of Short Term Temperature Increases on the Mesophilic Breakdown of Sulphate-Containing Synthetic Wastewater*. Water Research, 27: 541-556, 1993.
- VOORDOUW, G.; NIVIERE, V.; FERRIS, F.G.; FEDORAK, P.M.; WESTLAKE, D.W.S. *Distribution Of Hydrogenase Genes in Desulfovibrio ssp. And Their Use in Identification of Species from the Oil Field Environment*. Applied and Environmental Microbiology 56: 3748-3754, 1990.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. *Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: Concepção e avaliação preliminar de desempenho*. Revista Brasileira de Engenharia Química 11(2): 33-42, 1994.

- ZAIAT, M. *Desenvolvimento do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias*. Tese de Doutorado, EESC-USP. 156p., 1996.
- ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; CABRAL, A.K.A.; DE NARDI, I.R.; VELA, F.J.; FORESTI, E. *Rational basis for designing horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor for wastewater treatment*. Brazilian Journal of Chemical Engineering 14(1): 01-08, 1997.
- ZAIAT, M.; PASSIG, F.H.; FORESTI, E. *A mathematical model and criteria for designing horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactors for wastewater treatment*. Bioresource Technology 71: 235-243, 2000.
- ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. *Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester. Methanotherix sp. As an important acetoclastic methanogen*. Applied And Environmental Microbiology 47: 796-807, 1984.
- ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. *DNA Recovery from soils of diverse composition*. Applied and Environmental Microbiology 62: 316-322, 1996.
- YODA, M.; KITAGAWA, M.; MIYAJI, Y. *Long Term Competition Between Sulphate-Reducing and Methane -Producing Bacteria in a Anaerobic Biofilm*. Water Research, 21:1547-1556, 1987.
- WARD, D. M.; BATESON, M. M.; WELLER, R.; RUFF-ROBERTS, A. L. *Ribosomal RNA Analysis of microorganisms as they occur in nature*. Advances in Microbial Ecology, Vol. 12, edited by K. C. Marshall. Plenum Press, New York, 1992.
- WATANABE, K.; WATANABE, K.; KODAMA, Y.; SYUTSUBO, K.; HARAYAMA, S. *Molecular Characterization of Populations in Petroleum-Contaminated Groundwater Discharge from Underground Crude Oil Storage Cavities*. Applied and Environmental Microbiology 66: 4803-4809, 2000.
- WATNICK, P. & KOLTER, R. *Biofilm, City of Microbes*. Journal Of Bacteriology, 182:2675-2679, 2000.
- WIDDEL, F. & BAK, F. *Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria*. Capítulo 183, The prokaryotes – Second Edition. Springer-Verlag New York Inc., 1992.
- WIDDEL, F. & PFENNIG, N. *Studies on Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria that Decompose Fatty Acids. I. Isolation of New Sulfate-Reducing Bacteria Enriched With Acetate From Saline Environments. Description of Desulfobacter postgatei gen. Arch. Microbiol., 129: 395-400, 1981.*
- WIDDEL, F. & PFENNIG, N. *Dissimilatory sulfate or sulfur reducing bacteria*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Ed. Krieg, N. R.; Holt, J. G. vol.1, 2001.

WIDDEL, F. & RABUS, R. *Anaerobic Biodegradation of Saturated and Aromatic Hydrocarbons*. *Environmental Biotechnology*, 12: 259-276, 2001.

WIDDEL, F. *Microbiology And Ecology of Sulphate Reducing Bacteria*. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed. Zehnder, A.J.B.; John Wiley & Sons, p.469-585, 1988.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. *Nucleic Acid Research*, 18: 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, R.; BURT, T.; BRIGHTY, G. In: Acremam, M. (ed). *River Water Quality. The hydrology of the UK: a study of change*. London, Routledge. pp134-149, 2000.

WILLIAMSON, K.; McCARTY, P.L. *A Model of Substrate Utilization by Bacterial Biofilms, of Natural System*. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 48: 9-24, 1976.



# *Anexos*

## Ensaio com Tolueno

DQO (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	1000	312
4	1025	100
8	1010	90
15	1000	70
17	1005	61
22	995	60
25	1000	64
29	800	58
33	900	67
35	995	40
41	1000	65
45	860	60
49	800	65
54	810	120
58	912	111
61	1300	40
66	1250	53
70	1155	75
75	1225	63
79	1200	51
84	1210	48
88	1205	50
91	1200	52
94	1203	55
99	1198	51
102	1170	49
108	1000	150
113	990	45
116	1100	51
120	1050	52
125	1000	62
129	1020	48
133	1025	50
135	990	51
139	1000	52
141	915	60
151	2100	103
156	2115	60
159	2100	55
166	2110	48
169	2005	50
174	2100	55
177	2150	51
179	2110	51
181	2108	50

SO4 (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	320	230
4	335	235
8	330	105
15	330	10
17	330	10
22	350	0
25	350	0
29	345	0
33	600	120
35	720	385
41	630	290
45	610	77
49	610	29
54	600	30
58	610	20
61	610	18
66	600	20
70	520	30
75	525	10
79	520	0
84	520	0
88	515	0
91	515	30
94	510	30
99	510	25
102	510	35
108	512	30
113	500	0
116	510	0
120	503	0
125	500	0
129	505	0
133	499	0
135	510	0
139	504	0
141	500	0
151	512	43
156	520	0
159	511	0
166	505	0
169	520	0
174	520	0
177	520	0
179	525	0
181	525	0

## Ensaio com Tolueno

Alcalinidade (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	36	75,2
4	30,8	75,85
8	32,9	70,9
15	33,3	83,9
17	32,6	94,9
22	32,4	92,5
25	42	131
29	40	164
33	23,4	37
35	23,4	29,6
41	247	354
45	173	528
49	247	577
54	330	712
58	300	678
61	325	688
66	333	710
70	80	91
75	95	150
79	80	178
84	82	185
88	81	190
91	82	190
94	79	193
99	75	193
102	70	195
108	110	115
113	111	150
116	130	185
120	100	192
125	102	230
129	100	225
133	110	240
135	99	230
139	102	235
141	99	239
151	120	121
156	100	152
159	110	199
166	95	236
169	95	230
174	100	241
177	90	240
179	90	235
181	50	234

Ácidos (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	206,3	116,3
4	208,7	112,5
8	211	137,4
15	65,5	47,36
17	206,3	191,8
22	207,2	187,6
25	260	90
29	130	88
33	123,8	46,9
35	122	121
41	60	96
45	108	144
49	133	132
54	120	118
58	115	99
61	136	115
66	120	118
70	119	55
75	100	77
79	95	81
84	102	90
88	92	91
91	90	102
94	90	100
99	93	112
102	96	120
108	109	85
113	110	100
116	105	126
120	100	126
125	100	129
129	110	125
133	110	138
135	115	142
139	115	136
141	115	130
151	75	80
156	81	115
159	75	135
166	77	130
169	79	136
174	80	130
177	80	129
179	85	130
181	80	132



## Ensaio com Tolueno

SSV (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	81,4	57
4	83	67,35
8	80	29
15	80	28
17	80	29
22	80	29,5
25	80	29
29	94,4	29
33	93,3	178,3
35	92	115
41	90	75
45	100	107
49	95	55
54	91	35
58	90	35,3
61	91	34
66	90	33
70	89	95
75	90	39
79	91	33
84	90	33
88	90	36
91	96	33
94	95	33
99	96	32
102	100	30
108	102	123
113	102	69
116	105	75
120	105	29
125	102	35
129	103	32
133	105	32
135	103	31
139	101	30
141	114	36
151	114	136
156	115	99
159	112	42
166	111	35
169	115	80
174	115	33
177	112	36
179	110	32
181	105	41

pH (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	7,5	7,85
4	7,7	7,85
8	7,5	7,83
15	7,5	7,87
17	7,5	7,96
22	7,5	7,9
25	7,5	7,9
29	7,5	7,9
33	7,1	7,2
35	7,1	7,3
41	7,1	7,5
45	7,1	7,8
49	7,1	7,8
54	7,1	7,8
58	7,1	7,8
61	7,1	7,8
66	7,1	7,8
70	7,3	7,4
75	7,3	7,9
79	7,3	7,9
84	7,3	7,9
88	7,3	7,9
91	7,3	7,9
94	7,3	7,9
99	7,3	7,9
102	7,7	7,9
108	7,3	7,5
113	7,3	7,7
116	7,3	7,7
120	7,3	7,7
125	7,3	7,7
129	7,3	7,7
133	7,3	7,7
135	7,3	7,7
139	7,3	7,7
141	7,3	7,7
151	7	7,3
156	7	7,7
159	7	7,7
166	7	7,7
169	7	7,7
174	7	7,7
177	7	7,7
179	7	7,7
181	7,03	7,7

## Perfil da fase 1 - Tolueno

C/D	SO4	SSV
0	500	80
4	260	34,8
8	0	55,5
12	0	38,5
16	0	37,8

C/D	Ácidos	Alcalinidade parcial	Alcalinidade Bicarbonato
0	130	28	40
4			
8			
12			
16			

C/D	DQO (B)	DQO (F)
0	1040	1000
4	350	250
8	180	75
12	180	65
16	140	57
20	120	57

C/D	pH	CH4
0	7,5	11
4	7,85	11
8	7,8	11
12	7,75	11
16	7,7	11
20	7,92	11

C/D	Etanol	Ac. Láctico	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Fórmico	Ác. Isobutírico
0	170mg/L	750mg/L	0	0	0	0	0
4			60	12	0	0	0
8			35	0	0	0	0
12			0	0	0	0	0
16			0	0	0	0	0
20			0	0	0	0	0

Perfil da fase 2 - Tolueno

C/D	SO4	SSV
0	610	110
4	170	
8	170	
12	160	
16	140	
20	140	35

C/D	Tolueno	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	2,97	33	24	120
4	1,12			
8	1,1			
12	0,7			
16	0,5			
20	0,2	151	130	118

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	900	1000
4	150	890
8	96	450
12	40	175
16	40	213
20	40	130

C/D	pH	CH4
0	7,1	41%
4		41%
8		41%
12		41%
16		41%
20	7.8	41%

C/D	Etanol	Ac. Láctico	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
0	480	0	0	0	0	0
4	0	0	50	0	0	0
8	0	0	15	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0



Perfil da fase 3 - Tolueno

C/D	SO4	SSV
0	510	100
4	70	
8	50	
12	50	
16	35	
20	35	30

C/D	Tolueno	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	5	70	58	96
4	1,5			
8	0,7			
12	0,7			
16	0,6			
20	0,2	195	151	120

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	1170	1270
4	225	281
8	112	173
12	77	110
16	72	110
20	49	100

C/D	pH	CH4
0	7,7	41%
4		41%
8		41%
12		41%
16		41%
20	7,9	41%

C/D	Etanol	Ac. Lático	Ác. Acético	Ac. Propiônico	Ac. Isovalérico	Ac. Isobutírico
0	480	0	0	0	0	0
4	0	0	78	0	0	0
8	0	0	52	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
16	0	0	8	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Perfil da fase 4 - Tolueno

C/D	SO4	SSV
0	500	114
4	190	
8	140	
12	90	
16	10	
20	0	36

C/D	Tolueno	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	7,2	99	79	115
4	1,5			
8	0,8			
12	0,7			
16	0,6			
20	0,2	239	179	130

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	915	920
4	150	251
8	65	209
12	60	104
16	65	104
20	60	81

C/D	PH	CH4
0	7,3	50%
4		50%
8		50%
12		50%
16		50%
20	7,7	50%

C/D	Etanol	Ac. Lático	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
0	480	0	0	0	0	0
4	0	0	40	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Perfil da fase 5 - Tolueno

C/D	SO4	SSV
0	525	105
4	20	
8	0	
12	0	
16	0	
20	0	41

C/D	Tolueno	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	9,3	50	35	80
4	0,8			
8	0,7			
12	0,7			
16	0,4			
20	0,2	234	185	132

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	2108	2400
4	445	592
8	147	226
12	58	142
16	58	108
20	50	115

C/D	CH4	pH
0	36%	7,03
4	36%	
8	36%	
12	36%	
16	36%	
20	36%	7,7

C/D	Etanol	Ac. Lático	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
0	960	0	0	0	0	0
4	0	0	272	0	0	0
8	0	0	55	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0



## Ensaio com benzeno

DQO (Dias)	Entrada	Saída	Eficiência
0	0	0	0
1	1005	150	85,5
4	1002	120	88,2
8	1010	115	89,5
15	995	92	90,3
17	995	85	91
22	1000	89	91,1
25	1002	95	90,7
29	1000	135	86,5
33	1020	140	88
35	1000	133	86,7
41	1003	126	87,7
45	1008	96	91,2
49	1005	81	92,4
54	999	75	92,4
58	1002	76	92,6
61	1004	82	92,2
66	1005	80	92,5
70	1000	132	86,8
75	990	110	88
79	1012	94	91,8
84	1006	82	92,4
88	1003	80	92,3
91	1009	75	93,4
94	997	78	91,9
99	991	86	90,5
102	970	50	92
108	1996	162	85,30233
113	2019	153	86,7907
116	2003	131	87,06977
120	2005	89	89,11628
125	2003	76	89,62791
129	1990	75	89,06977
133	2052	84	91,53488
135	2063	95	91,53488
139	2071	100	91,67442
141	2090	120	91,62791
151	2130	159	91,67442
156	2120	125	92,7907
159	2125	82	95,02326
166	2129	75	95,53488
169	2155	70	96,97674
174	2174	75	97,62791
177	2149	71	96,65116
179	2133	71	95,90698
181	2150	64	97,02326

SO4 (Dias)	Entrada	Saída	Eficiência
0	0	0	0
1	423	30	87,3333
4	436	10	94,66666
8	439	0	97,55555
15	445	0	98,88888
17	446	0	99,11111
22	445	0	98,88888
25	449	0	99,77777
29	450	0	100
33	533	230	56,11111
35	541	195	64,07407
41	536	186	64,814481
45	548	171	69,814481
49	542	132	75,925593
54	536	80	84,444444
58	541	79	85,555555
61	537	68	86,851851
66	540	75	86,111111
70	512	123	77,8
75	498	74	84,8
79	510	51	91,8
84	505	25	96
88	502	10	98,4
91	505	12	98,6
94	506	12	98,8
99	505	14	98,2
102	500	10	98
108	500	63	85,686274
113	495	41	89,019607
116	503	42	90,392156
120	502	12	96,078431
125	505	0	99,019607
129	505	0	99,019607
133	509	0	99,803921
135	500	0	98,039215
139	501	0	98,235294
141	495	0	98,019801
151	502	56	88,316831
156	505	19	96,237623
159	504	10	97,821782
166	499	0	98,811881
169	499	0	98,811881
174	502	0	99,405940
177	500	0	99,009900
179	503	0	99,603960
181	500	0	99,009900

## Ensaio com benzeno

Alcalinidade (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	123	131
4	120	135
8	125	147
15	123	156
17	122	187
22	124	189
25	123	197
29	131	195
33	115	155
35	112	161
41	113	193
45	112	209
49	105	216
54	110	203
58	102	205
61	105	210
66	100	215
70	101	152
75	110	165
79	121	195
84	105	223
88	105	229
91	106	233
94	109	245
99	102	236
102	112	248
108	100	132
113	102	183
116	125	201
120	103	247
125	105	263
129	106	278
133	91	289
135	95	295
139	92	291
141	92	283
151	99	141
156	96	189
159	96	246
166	93	289
169	92	296
174	98	301
177	84	292
179	99	298
181	95	300

Ácidos (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	202	157
4	201	143
8	197	132
15	212	112
17	215	110
22	213	115
25	202	118
29	207	113
33	123	65
35	115	83
41	112	88
45	119	97
49	110	112
54	109	123
58	110	131
61	111	125
66	103	123
70	123	61
75	125	79
79	126	102
84	129	115
88	127	129
91	122	130
94	122	129
99	125	123
102	128	130
108	125	62
113	119	72
116	118	96
120	116	132
125	123	129
129	124	130
133	123	131
135	125	132
139	129	130
141	138	128
151	118	59
156	129	78
159	123	99
166	125	112
169	123	120
174	124	125
177	128	123
179	125	125
181	123	98

## Ensaio com benzeno

SSV (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	80	160
4	80	159
8	84	120
15	82	45
17	82	33
22	81	35
25	83	29
29	80	30
33	80	166
35	81	150
41	81	100
45	79	30
49	81	25
54	80	24
58	82	25
61	81	26
66	85	28
70	81	162
75	82	149
79	81	99
84	83	33
88	81	29
91	81	36
94	83	33
99	82	32
102	83	32
108	83	166
113	82	133
116	82	87
120	81	28
125	85	32
129	82	36
133	78	32
135	81	35
139	86	34
141	75	31
151	82	164
156	81	145
159	81	87
166	80	30
169	81	26
174	80	33
177	83	35
179	85	39
181	81	23

pH (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
1	7,6	7,6
4	7,6	7,7
8	7,6	7,7
15	7,6	7,8
17	7,6	7,9
22	7,6	7,9
25	7,6	8
29	7,6	8
33	7,6	7,7
35	7,6	7,7
41	7,6	7,8
45	7,6	7,8
49	7,6	7,8
54	7,6	7,9
58	7,6	7,9
61	7,6	7,9
66	7,66	7,9
70	7,5	7,5
75	7,5	7,5
79	7,5	7,5
84	7,5	7,6
88	7,5	7,7
91	7,5	7,7
94	7,5	7,7
99	7,5	7,7
102	7,5	7,7
108	7,4	7,5
113	7,4	7,5
116	7,4	7,5
120	7,4	7,5
125	7,4	7,5
129	7,4	7,5
133	7,4	7,6
135	7,4	7,6
139	7,4	7,6
141	7,4	7,6
151	7,4	7,4
156	7,4	7,4
159	7,4	7,5
166	7,4	7,5
169	7,4	7,6
174	7,4	7,6
177	7,4	7,7
179	7,4	7,7
181	7,46	7,7



Perfil da fase 1 – Benzeno

L/D	SO4	SSV
0	450	120
4	0	
8	0	
12	0	
16	0	
20	0	36

L/D	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	131	87	207
4			
8			
12			
16			
20	195	139	113

L/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	1000	1000
4	222	300
8	92	280
12	90	175
16	111	187
20	135	161

L/D	CH4	pH
0	57%	7,5
4	57%	
8	57%	
12	57%	
16	57%	
20	57%	8

L/D	Etanol	Ac. Lático	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Fórmico	Ác. Isobutírico
0	170	790	0	0	0	0	0
4	0	0	140	15	0	0	0
8	0	0	90	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0

Perfil da fase 2 – Benzeno

C/D	SO4	SSV
0	540	85
4	112	
8	80	
12	81	
16	77	
20	75	28

C/D	Benzeno	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	2	100	54	103
4	0,8			
8	0,5			
12	0,5			
16	0,2			
20	0,2	215	170	123

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	1005	1300
4	200	400
8	120	250
12	100	200
16	90	190
20	80	250

C/D	CH4	pH
0	50%	7,6
4	50%	
8	50%	
12	50%	
16	50%	
20	50%	7,9

C/D	Etanol	Ac. Lático	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
0	480	0	0	0	0	0
4	0	0	77	0	0	0
8	0	0	25	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Perfil da fase 3 – Benzeno

C/D	SO4	SSV
0	500	83
4	140	
8	130	
12	30	
16	30	
20	10	32

C/D	Benzeno	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	5	112	95	128
4	1			
8	0,7			
12	0,2			
16	0,2			
20	0,2	248	175	130

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	970	915
4	150	200
8	75	135
12	70	90
16	56	90
20	30	55

C/D	CH4	pH
0	50%	7,4
4	50%	
8	50%	
12	50%	
16	50%	
20	50%	7,7

C/D	Etanol	Ac. Lático	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
0	480	0	0	0	0	0
4	0	0	100	0	0	0
8	0	0	12	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0



Perfil da fase 4 – Benzeno

C/D	SO4	SSV
0	495	75
4	30	
8	20	
12	20	
16	10	
20	0	31

C/D	Benzeno	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	7	92	75	138
4	0,9			
8	0,9			
12	0,7			
16	0,7			
20	0,6	283	223	128

C/D	DQO	
	(Filtrada)	DQO (Bruta)
0	2090	2190
4	328	234
8	173	102
12	120	65
16	120	86
20	121	79

C/D	CH4	pH
0	45%	7,4
2	45%	
4	45%	
8	45%	
12	45%	
16	45%	7,6

C/D	Etanol	Ac. Lático	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
0	480	0	0	0	0	0
4	0	0	132,7	0	0	0
8	0	0	16,8	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Perfil da fase 5 – Benzeno

C/D	SO4	SSV
0	500	81
4	10	
8	0	
12	0	
16	0	
20	0	23

C/D	Benzeno	Alcalinidade Bicarbonato	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	10	95	75	123
4	3			
8	2,7			
12	2			
16	1,6			
20	1	300	234	98

C/D	DQO	
	(Filtrada)	(Bruta)
0	2150	2504
4	171	309
8	66	151
12	55	122
16	61	90
20	65	97

C/D	CH4	pH
0	51%	7,46
4	51%	
8	51%	
12	51%	
16	51%	
20	51%	7,72

C/D	Etanol	Ac. Lático	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
0	960	0	0	0	0	0
4	0	0	89,7	0	0	0
8	0	0	7,55	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

## Ensaio complementares - Benzeno

DQO (Dias)	Entrada	Saída	Eficiência
0	0	0	0
3	2370	565	76,16034
7	2200	326	85,18182
9	2250	215	90,44444
11	2250	224	90,04444
15	2210	236	89,32127
<b>18</b>	<b>2314</b>	<b>240</b>	89,62835
20	2200	825	62,5
24	2250	410	81,77778
28	2250	320	85,77778
35	2230	200	91,03139
37	2250	185	91,77778
<b>42</b>	<b>2250</b>	<b>180</b>	92
45	2300	452	80,34783
49	2320	250	89,22414
53	2320	175	92,4569
55	2270	165	92,73128
<b>61</b>	<b>2250</b>	<b>230</b>	89,77778
65	2310	385	83,33333
69	2325	200	91,39785
74	2320	195	91,59483
78	2350	180	92,34043
<b>81</b>	<b>2350</b>	<b>180</b>	92,34043

SO4 (Dias)	Entrada	Saída	Eficiência
0	0	0	0
3	1326	410	69,07994
7	1385	329	76,24549
9	1364	264	80,64516
11	1357	171	87,39867
15	1311	167	87,26163
<b>18</b>	<b>1300</b>	<b>150</b>	<b>88,46154</b>
20	1296	356	72,53086
24	1316	253	80,77508
28	1351	155	88,52702
35	1325	158	88,07547
37	1333	164	87,69692
<b>42</b>	<b>1322</b>	<b>200</b>	84,87141
45	1327	334	74,83044
49	1318	220	83,30804
53	1342	203	84,87332
55	1335	217	83,74532
<b>61</b>	<b>1300</b>	<b>200</b>	84,61538
65	1328	312	76,50602
69	1312	226	82,77439
74	1348	167	87,61128
78	1339	145	89,17102
<b>81</b>	<b>1355</b>	<b>150</b>	88,92989



## Ensaaios complementares - Benzeno

Alcalinida de (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
3	58	122
7	49	185
9	45	214
11	55	268
15	51	311
<b>18</b>	<b>60</b>	<b>370</b>
20	60	98
24	55	195
28	57	220
35	61	369
37	66	378
<b>42</b>	<b>58</b>	<b>377</b>
45	65	110
49	70	350
53	58	436
55	67	458
<b>61</b>	<b>60</b>	<b>450</b>
65	72	223
69	75	378
74	68	498
78	59	495
<b>81</b>	<b>69</b>	<b>493</b>

Ácidos (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
3	133	169
7	138	211
9	134	218
11	133	214
15	126	216
<b>18</b>	<b>125</b>	<b>215</b>
20	135	198
24	145	235
28	134	226
35	141	234
37	135	231
<b>42</b>	<b>155</b>	<b>220</b>
45	125	97
49	133	189
53	136	202
55	135	210
<b>61</b>	<b>150</b>	<b>210</b>
65	132	115
69	124	156
74	116	178
78	119	169
<b>81</b>	<b>110</b>	<b>180</b>

## Ensaaios complementares - Benzeno

SSV (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
3	95	51
7	80	29
9	83	33
11	79	34
15	81	36
<b>18</b>	<b>78</b>	<b>35</b>
20	81	36
24	84	48
28	78	26
35	83	35
37	80	30
<b>42</b>	<b>80</b>	<b>30</b>
45	81	36
49	81	34
53	79	29
55	81	25
<b>61</b>	<b>89</b>	<b>24</b>
65	82	90
69	81	26
74	85	26
78	81	29
<b>81</b>	<b>85</b>	<b>37</b>

pH (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
3	7,4	8,5
7	7,5	8,5
9	7,5	8,5
11	7,6	8,5
15	7,5	8,5
<b>18</b>	<b>7,3</b>	<b>8,56</b>
20	7,5	8,7
24	7,6	8,7
28	7,6	8,8
35	7,4	8,7
37	7,5	8,7
<b>42</b>	<b>7,6</b>	<b>8,7</b>
45	7,6	8,7
49	7,5	8,8
53	7,6	8,7
55	7,5	8,7
<b>61</b>	<b>7,4</b>	<b>8,7</b>
65	7,4	8,7
69	7,4	8,7
74	7,6	8,7
78	7,5	8,8
<b>81</b>	<b>7,4</b>	<b>8,8</b>

**Ensaio complementar com 20mg/L de Benzeno**

C/D	SO4	SSV
0	1100	85
4	430	
8	320	
12	320	
16	300	
20	200	37

C/D	Benzeno	Alcalinidade parcial	Ácidos
0	9	58	155
4	1,2		
8	0,4		
12	0,4		
16	0,4		
20	0,2	377	220

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	2260	2300
4	966	1100
8	560	580
12	212	250
16	190	230
20	190	230

C/D	CH4	pH
0	40%	7,6
4	40%	
8	40%	
12	40%	
16	40%	
20	40%	8,7



**Ensaio complementar com 40mg/L de Benzeno**

C/D	SO4	SSV	
0	1300		75
4	410		
8	250		
12	250		
16	250		
20	200		29

C/D	Benzeno	Alcalinidade e parcial	Ácidos	
0	10		60	150
4	1,8			
8	0,5			
12	0,4			
16	0,4			
20	0,4	450		210

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)	
0	2250	2345	
4	350	421	
8	290	405	
12	250	386	
16	230	350	
20	230	350	

C/D	CH4	pH	
0	45%		7,4
4	45%		
8	45%		
12	45%		
16	45%		
20	45%		8,7

**Ensaio complementar com 80mg/L de Benzeno**

C/D	SO4	SSV	
0	1500		82
4	310		
8	200		
12	160		
16	160		
20	150		29

C/D	Benzeno	Alcalinidade e parcial	Ácidos	
0	15	69		110
4	4,4			
8	4			
12	3,1			
16	2,8			
20	1,5	493		180

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)	
0	2350	2500	
4	664	710	
8	410	490	
12	205	250	
16	200	250	
20	180	250	

C/D	CH4	pH	
0	43%	7.4	
4	43%		
8	43%		
12	43%		
16	43%		
20	43%	8,8	

## Ensaio complementares - Tolueno

DQO (Dias)	Entrada	Saída	Eficiência
0	0	0	0
3	2351	658	72,01191
7	2350	426	81,87234
9	2280	361	84,16667
11	2310	348	84,93506
15	2360	364	84,57627
18	2578	241	90,65167
20	2300	750	67,3913
24	2320	420	81,89655
28	2350	300	87,23404
35	2350	215	90,85106
37	2350	155	93,40426
<b>42</b>	<b>2320</b>	<b>70</b>	<b>96,98276</b>
45	2190	210	90,41096
49	2185	85	96,10984
53	2250	80	96,44444
55	2250	110	95,11111
<b>61</b>	<b>2260</b>	<b>90</b>	<b>96,0177</b>
65	2287	420	81,63533
69	2310	345	85,06494
74	2315	150	93,52052
78	2330	85	96,35193
<b>81</b>	<b>2325</b>	<b>80</b>	<b>96,55914</b>

SO4 (Dias)	Entrada	Saída	Eficiência
0	0	0	0
3	1290	456	64,65116
7	1356	235	82,66962
9	1386	221	84,05483
11	1310	225	82,82443
15	1345	213	84,16357
18	1368	210	84,64912
20	1315	195	85,1711
24	1367	230	83,17484
28	1348	185	86,27596
35	1346	166	87,66716
37	1379	169	87,74474
<b>42</b>	<b>1351</b>	<b>190</b>	<b>85,93634</b>
45	1324	285	78,47432
49	1305	195	85,05747
53	1326	165	87,55656
55	1347	152	88,71566
<b>61</b>	<b>1375</b>	<b>158</b>	<b>88,50909</b>
65	1330	224	83,15789
69	1359	157	88,44739
74	1348	152	88,72404
78	1341	163	87,84489
<b>81</b>	<b>1325</b>	<b>150</b>	<b>88,67925</b>



**Ensaio complementares - Tolueno**

Alcalinidade (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
3	73	91
7	61	156
9	65	232
11	67	245
15	59	236
18	66	246
20	59	87
24	58	110
28	58	223
35	65	298
37	59	289
<b>42</b>	<b>62</b>	<b>297</b>
45	64	295
49	61	265
53	66	289
55	58	297
<b>61</b>	<b>62</b>	<b>290</b>
65	55	310
69	62	497
74	68	487
78	64	490
<b>81</b>	<b>72</b>	<b>489</b>

Ácidos (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
3	111	102
7	115	169
9	116	201
11	111	214
15	114	210
18	116	212
20	136	198
24	115	222
28	152	235
35	125	234
37	121	223
<b>42</b>	<b>128</b>	<b>256</b>
45	136	224
49	125	218
53	127	259
55	129	249
<b>61</b>	<b>144</b>	<b>242</b>
65	121	115
69	124	132
74	115	157
78	117	175
<b>81</b>	<b>114</b>	<b>162</b>

## Ensaaios complementares - Tolueno

SSV (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
3	74	79
7	81	61
9	76	58
11	85	32
15	84	33
18	81	41
20	82	45
24	82	33
28	81	35
35	83	29
37	80	30
<b>42</b>	<b>80</b>	<b>30</b>
45	81	32
49	81	40
53	79	30
55	81	25
<b>61</b>	<b>80</b>	<b>24</b>
65	82	90
69	81	26
74	85	28
78	81	30
<b>81</b>	<b>82</b>	<b>31</b>

pH (Dias)	Entrada	Saída
0	0	0
3	7,6	8,5
7	7,6	8,5
9	7,5	8,5
11	7,5	8,6
15	7,5	8,6
18	7,4	8,6
20	7,6	8,6
24	7,6	8,6
28	7,6	8,6
35	7,6	8,6
37	7,6	8,6
<b>42</b>	<b>7,6</b>	<b>8,6</b>
45	7,6	8,6
49	7,6	8,6
53	7,6	8,6
55	7,6	8,6
<b>61</b>	<b>7,6</b>	<b>8,6</b>
65	7,6	8,6
69	7,6	8,6
74	7,6	8,6
78	7,6	8,6
<b>81</b>	<b>7,53</b>	<b>8,85</b>

## Ensaio complementar com 40 mg/L de Tolueno

C/D	SO4	SSV	
0	1375	82	
4	300		
8	300		
12	270		
16	260		
20	190	31	

C/D	Tolueno	Alcalinidade e parcial	Ácidos	
0	9	62	144	
4	1,2			
8	0,5			
12	0,4			
16	0,4			
20	0,4	290	242	

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)	
0	2260	2350	
4	584	620	
8	358	410	
12	182	215	
16	90	132	
20	90	120	

C/D	CH4	pH	
0	32%	7,6	
4	32%		
8	32%		
12	32%		
16	32%		
20	32%	8,6	



## Ensaio complementar com 80 mg/L de Tolueno

C/D	SO4	SSV
0	1325	84
4	320	
8	180	
12	180	
16	180	
20	150	30

C/D	Tolueno	Alcalinidade e parcial	Ácidos
0	10	72	114
4	3,9		
8	3,7		
12	2,1		
16	1,5		
20	0,5	489	162

C/D	DQO (Filtrada)	DQO (Bruta)
0	2325	2420
4	622	650
8	422	430
12	408	425
16	350	396
20	300	330

C/D	CH4	pH
0	35%	7,53
4	35%	
8	35%	
12	35%	
16	35%	
20	35%	8.85