

TIAGO PALLADINO DELFORNO

**Caracterização microbiana e remoção do
alquilbenzeno linear sulfonado em reator
EGSB**

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Engenharia Hidráulica e
Saneamento

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

Versão Corrigida
Abril
2011

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

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

D351c Delforno, Tiago Palladino
Caracterização microbiana e remoção do alquilbenzeno
linear sulfonado em reator EGSB / Tiago Palladino
Delforno ; orientadora Maria Bernadete Varesche. -- São
Carlos, 2011.

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

1. Surfactantes. 2. Degradação anaeróbia. 3. Gene RNAr
16S. 4. Técnica dos tubos múltiplos. 5. Biomassa
granulada. 6. Bactérias redutoras de ferro. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

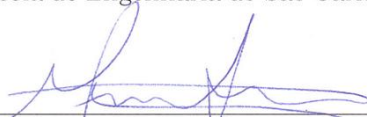
Candidato(a): Bacharel **TIAGO PALLADINO DELFORNO.**

Dissertação defendida e julgada em 18.03.2011 perante a Comissão Julgadora:



Aprovado

Prof.^ª. Dr.^ª. **MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE SILVA -
(Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)



APROVADO

Prof. Dr. **MARCELO LOUREIRO GARCIA**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho"/UNESP/campus de Rio Claro)

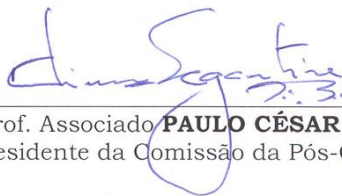


APROVADO

Dr.^ª. **FLAVIA TALARICO SAIA**
(Pós-Doc/bolsa FAPESP)



Prof. Titular **EDSON CEZAR WENDLAND**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Hidráulica e Saneamento.



Prof. Associado **PAULO CÉSAR LIMA SEGANTINE**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

*Aos meus pais Mauro e Rosa
Minhas irmãs Juliana e Mariana
Pelo amor e carinho
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora das Graças.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Bernadete Varesche pelo apoio constante durante a realização desse trabalho, confiança e ensinamento profissional e pessoal.

Ao Professor Dr. Marcelo Zaiat e Dra. Isabel Sakamoto pelas valiosas sugestões na qualificação.

Aos amigos de turma e laboratório: Mariana Carosia, Daniel Fontes, Rafael Brito, Fabiana e Guilherme. Obrigado pelos momentos de descontração.

Ao doutorando e amigo Dagoberto Okada pela colaboração direta em todo o projeto e pela paciência em ensinar passo a passo a rotina no laboratório principalmente envolvendo a operação do reator.

À doutoranda e amiga Carolina Zampol pela ajuda nas questões envolvendo microbiologia e microscopia. Muito Obrigado.

À amiga Dr. Isabel Sakamoto pelos ensinamentos de Biologia Molecular.

À graduanda em Engenharia Ambiental, Juliana Polizel, pela ajuda constante.

A todos os freqüentadores/ex-freqüentadores assíduos do Campus II e amigos de laboratório: Theo, Bruna, Gustavo, Guilherme, Jorge, Fabrício, Juliana, Lívia, Felipe, Mara, Regiane Correa, Regiane, Janja, Sandra, Flavia, Betão, Dú, Djalma, Tiago, Drica, Pilar e Júlia. Sou muito grato a todos vocês que de certa forma contribuíram para a realização desse trabalho, seja com sugestões, na rotina do laboratório ou em momentos de descontração (no boliche, karaokê, no almoço de domingo, jogando CS, na piscina ou jogando vôlei). Muito obrigado.

À Priscila Camiloti, pela paciência e carinho, minha admiração.

Ao técnico em informática Fernando pela ajuda na instalação dos *softwares* de bioinformática.

Ao Tiago Martins pelas sugestões envolvidas nas análises de Biologia Molecular.

Aos amigos de graduação Samantha Christina, Hugo Pereira e Aline Ramalho.

À Escola de Engenharia de São Carlos (USP), SHS, CNPQ e FAPESP pelo apoio.

Obrigado.

“Os Professores abrem a porta, mas você precisa entrar sozinho”

Provérbio Chinês.

RESUMO

DELFORNO, T. P. **Caracterização Microbiana e Remoção do Alquilbenzeno Linear Sulfonado em Reator EGSB**. 2011. 102F. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de remoção do surfactante aniônico alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reator anaeróbio de leito granular expandido - EGSB (1,5 litros) com recirculação e alimentação com meio mineral. Além de caracterizar filogeneticamente a diversidade de bactérias na presença do surfactante. O sistema foi operado em condição mesofílica em 4 etapas: (I), (II) e (IV) com TDH de 32 horas, e (III) com TDH de 26 horas. Em todas as etapas a DQO foi em média de 609 ± 137 mg/L e $14 \pm 1,71$ mg/L de LAS afluente. As maiores remoções de LAS foram verificada nas etapas II e IV, com valores de $73,6 \pm 5,6\%$ e $63,6 \pm 6,17\%$, respectivamente de. Na etapa III essa remoção foi de $47,8 \pm 6,2\%$. Por meio do balanço de massa constatou-se que $56,6\%$ do total de LAS adicionado foram removidos compreendendo $48,4\%$ por biodegradação e $8,2\%$ por adsorção. A remoção de matéria orgânica não foi afetada com a adição do LAS e nem pela exposição prolongada a esse surfactante. Entretanto, a estrutura do grânulo foi comprometida quando da adição do surfactante, observado pelo aumento da concentração de sólidos totais efluente de $0,049$ g/L na etapa I (sem LAS), $0,128$ g/L na etapa II, $0,064$ g/L na etapa III e $0,038$ g/L na etapa IV, quando da adição de $14 \pm 1,71$ mg LAS/L. Além disso, foi notada diminuição do diâmetro médio dos grânulos no decorrer da operação do reator de $0,36$ cm nas etapas I e III para $0,34$ cm na etapa IV. Por meio da técnica de tubos múltiplos (NMP) foi constatado aumento das bactérias anaeróbias totais e diminuição das arqueias metanogênicas, em função do tempo de operação do reator. As bactérias redutoras de ferro representaram 8% da biomassa anaeróbia na etapa IV. Por meio do sequenciamento da região 16S do RNAr para o domínio *Bacteria* da biomassa da extremidade superior do reator e da biomassa do leito, foi verificado semelhança com os seguintes filos Proteobacteria, Firmicutes e Synergistetes. Notou-se diferença significativa entre as bibliotecas de clones para essas duas amostras.

Palavras-chave: Surfactantes, degradação anaeróbia, gene RNAr 16S, técnica dos tubos múltiplos, biomassa granulada, bactérias redutoras de ferro

ABSTRACT

DELFORNO, T. P. **Microbial Characterization and Removal of Linear Alkylbenzene Sulfonate in EGSB reactor.** 2011. 102F. Dissertation (Master) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

This study aimed to evaluate the efficiency of removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in expanded bed reactor (1.5 liters) using granular sludge (EGSB) with recirculation and feed with mineral medium modified. The system was operated at mesophilic condition in four stages: (I) (II) and (IV) with HRT of 32 hours, and (III) with HRT of 26 hours. At all stages the COD averaged 609 ± 137 mg/L and 14 ± 1.71 mg/L LAS influent. The higher removals of LAS were found in stages II and IV, respectively, $73.6 \pm 5.6\%$ and $63.6 \pm 6.17\%$. In stage III this removal was $47.8 \pm 6.2\%$. Through mass balance was found that 56.6% of total LAS added were removed by biodegradation comprising 48.4% and 8.2% by adsorption. The organic matter removal was not affected by the addition of LAS and not by prolonged exposure to this surfactant. However, the granule structure was compromised after the addition of surfactant, the observed increase in effluent total solids concentration of 0.049 g/L in stage I (no LAS), 0.128 g/L in stage II, 0.064 g/L in stage III and 0.038 g/L in stage IV when adding 14 ± 1.71 mg/L. Furthermore, it was noticed significant decrease in mean diameter of the granules during the operation of the reactor of 0.36 cm in stages I and III to 0.34 cm in stage IV. Through the multiple tube method (MPN) was found to increase the total anaerobic bacteria and methanogenic archaea decreased depending on the time of reactor operation. Iron-reducing bacteria accounted for 8% of anaerobic bacteria total in step IV. By sequencing the 16S rRNA for the domain Bacteria biomass from the upper end of the reactor and the biomass of the bed, was found similar to the following phyla Proteobacteria, Firmicutes and Synergistetes. Significant difference was noted between the clone libraries for these two samples.

Keywords: Surfactants, anaerobic degradation, 16S rRNA gene, multiple tubes technique, granulated biomass, iron-reducing bacteria

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1: Estrutura do alquilbenzeno linear sulfonado	5
Figura 3.2: Rota de degradação anaeróbia	10
Figura 3.3: Estrutura do grânulo do UASB	13
Figura 3.4: Estrutura do grânulo para EGSB	13
Figura 4.1: Fluxograma Experimental Geral.....	15
Figura 4.2: Detalhes do reator EGSB. (A) esquema do reator,	16
Figura 4.3: Esquema do monitoramento da expansão do leito do reator EGSB	22
Figura 4.4: Esquema da diluição seriada utilizando água de diluição e	27
Figura 4.5: Seqüência de passos até o seqüenciamento das amostras do reator.....	29
Figura 5.1: Variação temporal da matéria orgânica.....	36
Figura 5.2: Variação temporal da concentração de LAS afluente, efluente e remoção..	38
Figura 5.3: Relação carga de LAS removida por carga de LAS aplicada.....	39
Figura 5.4: Relação TDH e remoção de LAS.....	41
Figura 5.5: Variação temporal do sulfato.....	45
Figura 5.6: Variação temporal do sulfeto.....	46
Figura 5.7: Granulometria das Etapas I, II e IV.	48
Figura 5.8: Variação temporal da remoção de LAS e s ácidos voláteis efluente	51
Figura 5.9: Ensaio de anaerobiose do reator. (A) imagem do reator inteiro, (B) região superior do reator, (C) bomba de recirculação (cabeçote) e (D).....	53
Figura 5.10: (A) Cromatograma típico de uma extração de LAS. (B) Cromatograma de LAS afluente.....	55
Figura 5.11: Destino do LAS.....	58
Figura 5.12: Proporção da adsorção do LAS no reator EGSB	58
Figura 5.13: Microscopia de contraste de fase das amostras do reator: (a) bacilos, (b) filamentos septados, (c) bacilos curvos, (d) sarcinas, (e) sarcinas e bacilos e (f) cistos.	61
Figura 5.14: Microscopia de fluorescência das amostras do reator. (a) bacilos fluorescentes e morfologia semelhante a <i>Methanosarciana</i> sp. (b) e (c) bacilos fluorescentes.	62
Figura 5.15: Análise quantitativa das populações microbianas.....	65
Figura 5.16: Microscopia de Contraste de Fase do NMP. (a) Sarcinas, (b) e (c) bacilos curvos e (d) bacilos, diplococos e espirilo.	67

Figura 5.17: Porcentagem dos clones da região do copo e leito relacionados as diferentes famílias com base nos dados RDP <i>classifier</i> ,	72
Figura 5.18: Curva de rarefação dos clones da região do copo do reator	78
Figura 5.19: Curva de rarefação dos clones do leito do reator.	79
Figura 5.20: Árvore filogenética dos clones relacionados ao filo Firmicutes. A barra de escala informa a distância filogenética e <i>Methanosarcina</i> sp. foi escolhida como <i>outgroup</i>	81
Figura 5.21: Árvore filogenética dos clones relacionados ao filo Proteobacteria. A barra de escala informa a distância filogenética e <i>Methanosaeta</i> sp. foi escolhida como <i>outgroup</i>	82
Figura 5.22: Árvore filogenética dos clones relacionados ao filo Synergistetes e Verrucomicrobia. A barra de escala informa a distância filogenética e <i>Methanosarcina</i> sp. foi escolhida como <i>outgroup</i>	83
Figura 5.23: Árvore filogenética dos clones relacionados ao filo OP10, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi e Bacteroidetes. A barra de escala informa a distância filogenética e <i>Methanosarcina</i> sp. foi escolhida como <i>outgroup</i>	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Parâmetros de Operação do reator EGSB nas diferentes etapas	17
Tabela 4.2: Parâmetros estabelecidos em cada etapa de operação	18
Tabela 4.3: Meio Mineral Modificado*	19
Tabela 4.4: Solução de Vitaminas	20
Tabela 4.5: Análises de monitoramento do reator EGSB	21
Tabela 4.6: Quantificação de microrganismos nas diferentes etapas	24
Tabela 4.7: Soluções para água de diluição	25
Tabela 4.8: Formas de detecção para as diferentes populações microbianas.....	27
Tabela 4.9: <i>Primers</i> para amplificação da região 16S do domínio <i>Bacteria</i>	30
Tabela 4.10: Programação do termociclador para os <i>primers</i> do domínio <i>Bacteria</i>	30
Tabela 4.11: Soluções para amplificação usando <i>primers</i> 27F e 1100R	30
Tabela 4.12: Componentes do Meio Luria-Bertani (LB).....	31
Tabela 4.13: Componentes do meio LB para crescimento da <i>E.coli</i> transformada.....	32
Tabela 4.14: <i>Primers</i> específicos para amplificação do DNA plasmidial	32
Tabela 4.15: Programação do termociclador para amplificação do DNA plasmidial	32
Tabela 4.16: Soluções para reação de seqüenciamento usando <i>primer</i> 27F	33
Tabela 4.17: Programação do termociclador para reação de seqüenciamento	33
Tabela 4.18: Programas utilizados para analisar as seqüências de DNA.....	34
Tabela 5.1: Síntese dos resultados de DQO	36
Tabela 5.2: Síntese dos resultados de LAS no reator EGSB.....	38
Tabela 5.3: Comparação dos resultados obtidos com a literatura	42
Tabela 5.4: Valores médios de pH, alcalinidade, sulfato e sulfeto.....	43
Tabela 5.5: Resultados de sólidos do reator EGSB	46
Tabela 5.6: Distribuição do diâmetro dos grânulos nas diferentes etapas	48
Tabela 5.7: Média de ácidos voláteis totais efluente nas etapas de operação do reator .	49
Tabela 5.8: Valores da extração de LAS no leito e SST efluente	54
Tabela 5.9: Balanço de massa LAS afluente/efluente e porcentagem de remoção	56
Tabela 5.10: Balanço Global de LAS	57
Tabela 5.11: Caracterização morfológica da biomassa do leito e copo nas diferentes etapas de operação do reator EGSB.....	59
Tabela 5.12: NMP das amostras do leito e copo do reator EGSB.....	63
Tabela 5.13: Proporção dos filamentos encontrados em cada amostra*	68

Tabela 5.14: Proporção de classes do filo Proteobacteria em cada amostra*	69
Tabela 5.15: Proporção dos filos encontrados em alguns trabalhos sobre remoção de LAS em diferentes configurações de reatores	70
Tabela 5.16: Números de UTOs e clones considerando distância evolutiva de 0,03. (C) clones do COPO e (L) clones do LEITO	80

LISTA DE SIGLAS

- ABS** - alquilbenzeno sulfonado
- ASBR** – reator operado em bateladas sequências (*anaerobic sequencing batch reactor*)
- BRF** – Bactérias Redutoras de Ferro
- BRS** - Bactérias Redutoras de Sulfato
- CG** - Cromatografia Gasosa
- COV** - Carga Orgânica Volumétrica
- DGGE** - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
- DNA** - Ácido Dessoxiribonucléico
- DQO** - Demanda Química de Oxigênio
- EGSB** – leito de manta de lodo granulado expandido (*expanded granular sludge bed*)
- ETE** - Estação de Tratamento de Esgoto
- HLPC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- LAS** - Alquilbenzeno Linear Sulfonado (*Linear Alkylbenzene Sulfonate*)
- LPB** – Laboratório de Processos Biológicos
- NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*
- NMP** - Número Mais Provável
- PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase
- pH** - potencial hidrogeniônico
- RAHLF** - Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
- RALF** – reator anaeróbio de leito fluidificado
- RDP** – *Ribosomal database project*
- RNA** - Ácido Ribonucléico
- SIP** – Stable Isotope Probe
- SDS** - Dodecil Sulfato de Sódio
- SPC** - Sulfofenil Carboxilato (*sulfofenil carboxilate*)
- ST** - Sólidos Totais
- STV** - Sólidos Totais Voláteis
- TDH** - Tempo de Detenção Hidráulica
- UASB** - Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)
- UTO** – unidade taxonômica operacional

LISTA DE SÍMBOLOS

[LAS] = concentração de LAS afluente/efluente (mg/L)

A = média da concentração de LAS extraído no SST efluente (mg/gST)

B = sólidos totais efluente na etapa IV (g/L)

LAS_{ads. gran.} = massa de LAS adsorvido nos grânulos do leito do reator EGSB

LAS_{ads. SST efl.} = massa de LAS adsorvido nos grânulos do leito do reator EGSB

LAS degradado = massa de LAS removida por processos biológicos

LAS removido = massa de LAS removida por processos biológicos e físicos

LAS_{ads} = massa de LAS adsorvido (neste caso: SST efluente e biomassa do leito)

LAS_{afI} = massa de LAS afluente

LAS_{efI} = massa de LAS efluente

Massa LAS_(AfI/EfI) = massa de LAS acumulada no afluente/efluente

Q = vazão afluente/efluente (L/h)

T = tempo de operação do reator (h)

V = volume do reator (L)

V_{ef} = volume total do efluente durante todo o período de operação do reator (L)

α = média da concentração de LAS extraído dos grânulos no leito do reator (mg/gST)

β = sólidos totais do reator na etapa IV (g/L)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE SIGLAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	x
SUMÁRIO.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Principal.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Alquilbenzeno Linear Sulfonado.....	4
3.2 Benefícios dos surfactantes	5
3.3 Efeitos Negativos.....	6
3.4 Mecanismos de Remoção.....	7
3.5 Reator EGSB	10
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Descrição do Reator.....	16
4.2 Etapas de Operação.....	17
4.3 Inóculo	18
4.4 Alimentação.....	18
4.5 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas	20
4.6 Monitoramento da Expansão do Leito	21
4.7 Avaliação do Potencial Redox do Reator.....	22
4.8 Amostragem	23
4.9 Granulometria.....	23
4.10 Extração de LAS Adsorvido	23
4.11 Exames Microscópicos.....	24
4.12 Análise Quantitativa da Diversidade Microbiana	24
4.12.1 Água de diluição.....	25
4.12.2 Meios de Cultura para o NMP.....	26

4.12.3	Inoculação	26
4.12.4	Leitura do NMP	27
4.13	Análise Qualitativa da Diversidade Microbiana	28
4.13.1	Acondicionamento das amostras	29
4.13.2	Extração do DNA	29
4.13.3	Caracterização do domínio <i>Bacteria</i>	30
4.13.4	Clonagem, Amplificação do DNA plasmidial e Sequenciamento	31
4.13.5	Análise das Seqüências de DNA	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Remoção de Matéria Orgânica	35
5.2	Remoção de LAS	37
5.3	Alcalinidade, pH, Sulfato e Sulfeto	42
5.4	Granulometria e Sólidos Totais	46
5.5	Ácidos Voláteis Totais	49
5.6	Anaerobiose do reator EGSB	51
5.7	Balço de Massa de LAS	54
5.7.1	Balço de Massa Afluente e Efluente	56
5.7.2	Balço de Massa nos Grânulos do leito do reator	56
5.7.3	Balço de Massa do SST efluente	57
5.7.4	Balço de Massa Global.....	57
5.8	Microscopia de Contraste de Fase e Fluorescência	59
5.9	Análises Quantitativas.....	63
5.10	Análise Qualitativa.....	68
6	CONCLUSÃO	85
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9	APÊNDICES	96

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são compostos orgânicos que possuem comportamento anfifílico. A parte hidrofóbica geralmente é composta de cadeias alquílicas ou alquilfenílicas, contendo de 10 a 18 átomos de carbono e a região hidrofílica é constituída por grupos iônicos ou não-iônicos ligados à cadeia carbônica. Tais propriedades são à base para uma gama de aplicações importantes, por exemplo, na formulação de agroquímicos, fármacos e produtos de consumo (xampus, condicionadores), no combate a vazamento de petróleo e, ainda, em outros usos específicos (PENTEADO *et al.*, 2006)

O principal tensoativo aniônico sintético surgiu na década de 40, o alquilbenzeno sulfonado (ABS), a partir de precursores derivados do petróleo (benzeno e tetrâmero de propileno). Devido a sua alta recalcitrância e baixo potencial de biodegradação o ABS foi substituído por alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) por ser considerado biodegradável.

Em virtude da participação majoritária do LAS dentre os tensoativos aniônicos nas formulações de detergentes de uso doméstico e industrial, e do elevado consumo mundial, tem sido alvo de interesse de pesquisadores, principalmente, envolvendo sua degradação e conseqüentemente remoção de água residuária, tanto industrial como doméstica. Uma vez que apresenta relevante impacto ao meio ambiente e sobre os organismos vivos.

Em vista da recalcitrância do LAS em condições anaeróbias, diversos estudos foram realizados no Laboratório de Processos Biológicos – LPB (Escola de Engenharia de São Carlos/USP), empregando as seguintes configurações de reatores: horizontal de leito fixo com biomassa imobilizada (DUARTE *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009), batelada seqüencial (DUARTE *et al.*, 2010) e leito fluidificado (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010b).

Dentre esses reatores, o de leito fluidificado usando areia como material suporte foi o que apresentou melhor eficiência de remoção (acima de 90%) (Oliveira *et al.*, 2010). Todavia, o custo de bombeamento para fluidificação de um leito de areia torna esse reator menos atraente para aplicação em escala real. O reator de leito de lodo expandido (*Expanded Granular Sludge Bed – EGSB*) utiliza lodo granulado, cuja expansão exige menor vazão de bombeamento quando comparado com o leito de areia. Suas características são similares ao reator de leito fluidificado, isto é, regime de mistura completa, alta relação comprimento-diâmetro e adequado para diluir água residuária quando aplicada a recirculação efluente (SEGHEZZO *et al.*, 1998)

Portanto, outra possibilidade de degradação e remoção de LAS é a utilização de reator anaeróbio EGSB. Tal configuração corresponde a um reator UASB (*upflow anaerobic*

sludge blanket) modificado. Todavia, o EGSB apresenta recirculação que resulta na diluição do afluente e alta velocidade ascensional, o que permite maior transferência de massa. Tais condições podem contribuir para remoção de compostos recalcitrantes, como o LAS. Dessa forma, a motivação dessa pesquisa foi avaliar a remoção do LAS nesse reator e caracterizar filogeneticamente as bactérias presentes na biomassa granulada na presença do surfactante.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Principal*

O objetivo principal desse trabalho foi analisar a eficiência de remoção do surfactante aniônico, linear alquilbenzeno sulfonado (LAS), no reator EGSB, e caracterizar filogeneticamente a diversidade de bactérias na presença desse surfactante.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Avaliar a eficiência de remoção da matéria orgânica;
- Avaliar a produção de ácidos orgânicos voláteis;
- Caracterizar a dinâmica morfológica do lodo granulado;
- Determinar o tamanho dos grânulos em função da operação do reator;
- Avaliar quantitativamente a população de bactérias anaeróbias totais, bactérias redutoras de ferro e arqueias metanogênicas em cada etapa de operação do reator EGSB;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As vantagens físico-químicas dos surfactantes aniônicos, em especial o LAS, resultam na sua larga produção industrial e, conseqüentemente, implicações em todo o mundo. Por trás dos benefícios atribuídos ao arranjo dessa molécula encontra-se uma série de problemas de ordem toxicológica que resultam em danos ambientais. Todavia, a interação entre esse surfactante e moléculas biológicas não está totalmente elucidado. Sabe-se que podem ligar-se às proteínas modificando suas estruturas e atividades, acarretando disfunção do sistema como um todo. Dessa forma, faz-se necessário aprofundar o conhecimento sobre a remoção do LAS do esgoto sanitário e água residuária, além de fornecer subsídios para compreender sua relação com meio biológico. A remoção por processos anaeróbios é viável, entretanto, ainda são necessários mais estudos com a finalidade de avaliar outras possibilidades de reatores anaeróbios, como por exemplo, o EGSB.

3.1 Alquilbenzeno Linear Sulfonado

Surfactantes constituem uma importante classe de produtos industriais químicos amplamente utilizados em quase todos os setores da indústria moderna. São compostos orgânicos que possuem comportamento anfifílico. Cerca de 54% do total de surfactantes produzidos foram aplicados no uso doméstico, contra apenas, 32% destinados ao uso industrial (BANAT *et al.*, 2000).

Devido às excelentes propriedades e custo relativamente baixo, LAS é o surfactante aniônico mais amplamente utilizado em todo o mundo (GARCIA *et al.*, 2005), presente em água residuária industrial e esgoto doméstico. Comercialmente, o LAS é vendido como uma mistura de homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares variando de C₁₀ a C₁₆ com predominância de C₁₀ a C₁₃.

A presença de LAS em água residuária é devido às atividades domésticas (1 a 22mg/L) e pode variar, em função do seu uso em processos industriais (SCOTT & JONES, 2000). Estruturalmente é constituído de uma cadeia alquílica, com diferentes números de átomos de carbono (de 10 a 14), enquanto a outra parte, hidrofílica corresponde ao anel aromático sulfonado. O grupo sulfonado pode estar ligado a qualquer átomo de carbono com exceção aos carbonos terminais da cadeia alquílica (Figura 3.1).

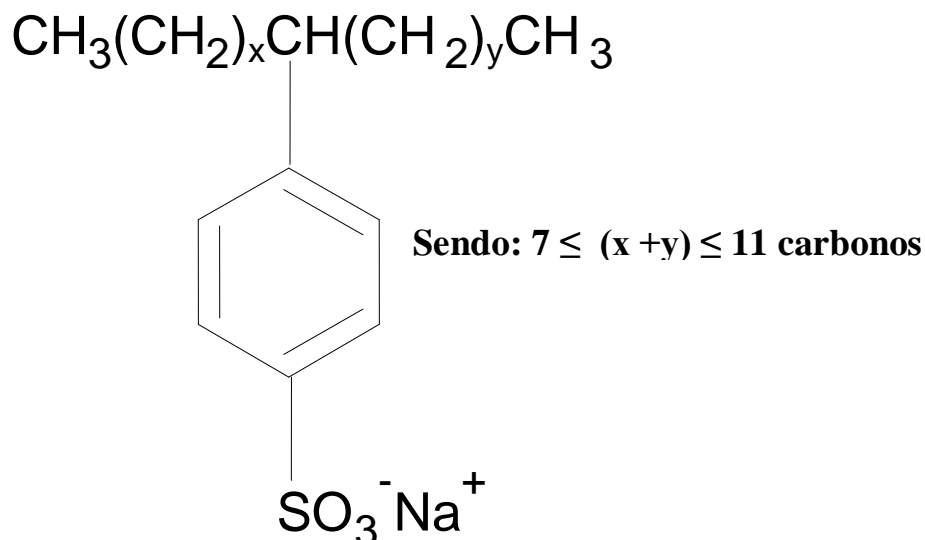


Figura 3.1: Estrutura do alquilbenzeno linear sulfonado

Fonte: JENSEN *et al.* (1999)

3.2 Benefícios dos surfactantes

Surfactantes são compostos anfipáticos, que possuem uma região hidrofílica e uma hidrofóbica. Essas regiões permitem a interação com outras moléculas, tais como, proteínas, celulose e com mistura de compostos polares e apolares. Como conseqüências ocorrem diminuição da energia de interação entre as fases heterogêneas em muitos processos tecnológicos e sistemas biológicos, como por exemplo, óleo-água, poliestireno-água e interface ar-água (YING, 2006).

Segundo Gould *et al.*, (2000) surfactantes aniônicos podem influenciar consideravelmente a eficiência de um medicamento quando presente em formulações farmacêuticas, pela ligação direta com a droga; além disso, influencia o processos de adsorção entre compartimentos hidrofóbicos e hidrofílicos nos órgãos do organismo.

A plasticidade da molécula de surfactantes aniônicos permite a interação com superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas que podem formar micelas que facilitam a solubilização de ampla gama de poluentes ambientais. Segundo Iglesias-Jimenez *et al.*, (1997), tensoativos aniônicos podem promover a remoção dos pesticidas do solo com formação de compostos ricos em carbono. Essa possibilidade está relacionada com a concentração do surfactante e hidrofobicidade do pesticida. Singh *et al.*, (2000) analisaram o pesticida Carbofuran e verificaram que surfactantes aniônicos e catiônicos podem influenciar diferentemente na sua eficácia de remoção.

A mobilidade de poluentes orgânicos e inorgânicos entre vários sistemas pode ser influenciada pela presença de surfactantes aniônicos. Huang *et al.*, (1997) observaram dessorção de partículas de chumbo do solo com a adição de surfactantes. Assim como, redução de cádmio livre pela complexação com um biosurfactante aniônico produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (TAN *et al.*, 1994). Muramoto *et al.*, (1989) observaram diminuição da absorção de elementos, tais como, cádmio, níquel, alumínio, cálcio e manganês na raiz do aguapé (*Eichhornia crassipes*) na presença de surfactantes aniônicos.

Rajput *et al.*, (1994), observaram que surfactantes catiônicos (Emcol CC9 e Emcol CC-36) apresentaram menor eficácia na remoção de compostos orgânicos recalcitrantes, tais como, 1,2,4-triclorobenzeno, anilino, fenol e 2,4 diclorofenol do solo, em relação aos outros surfactantes como Witconol (não iônico) e Emphos (aniônicos).

Park & Jaffe, (1993), afirmaram que o surfactante aniônico (Emcol CNP-60) não apenas facilitam a dissolução e remoção de diversos poluentes ambientais, mas, podem aumentar a adsorção sob determinadas condições. Por exemplo, aumentaram a adsorção do tetracloreto, naftaleno e fenantreno na superfície de óxido de alumínio resultando num controle mais eficaz da remoção de poluentes da água.

3.3 Efeitos Negativos

Muitos esforços têm sido dedicados na compreensão dos efeitos adversos dos surfactantes aniônicos sobre o meio ambiente, em especial o LAS. A toxicidade dos surfactantes está relacionada com o tipo de grupamento polar e com o comprimento da cadeia alquila apolar. Cadeias alquílicas maiores podem causar efeitos mais severos provocando destruição da membrana celular e desnaturação de proteínas. No caso específico da molécula de LAS, a localização do anel aromático mais próximo da extremidade da cadeia alquílica potencializa essa toxicidade.

Segundo Venhuis & Mehrvar (2004) 40 a 60mg/L de LAS podem interferir na reprodução e crescimento de invertebrados do solo e apresentar efeitos agudos ao plâncton de água doce, além de bactérias e crustáceos. Segundo esses mesmos autores concentração média de 530mg LAS/Kg de massa seca a 16.000mg LAS/Kg de massa seca em lodo de esgoto, em curto prazo, desencadeou inibição da atividade biológica no solo. Tal constatação abre precedente em relação à disposição de lodo de estação de tratamento em áreas agricultáveis.

Outros impactos atribuídos ao LAS são os seguintes: formação de espuma e conseqüente inibição dos processos de autodepuração dos cursos d'água e disseminação de impurezas,

danificação das membranas celulares e desnaturação de proteínas. Para organismos aquáticos, a toxicidade aguda de LAS varia entre 1,7mg/L a 270 mg/L, sendo *Daphnia magna* a mais sensível (VERGE & MORENO, 2000).

Plantas expostas ao LAS apresentaram as membranas das células radiculares destruídas, alterações na permeabilidade e nos processos fisiológicos e fotossintéticos. Concentrações entre 5 a 10 mg LAS/Kg não geraram problemas na germinação e crescimento de plantas hidropônicas ou em outros meios de cultivo. No entanto, para valores mais elevados, entre 10 a 40 mg LAS/Kg, foram observados efeitos tóxicos (MIEURE *et al.*, 1990).

Não apenas as bactérias, plantas aquáticas e invertebrados são sensíveis aos surfactantes aniônicos, mas alguns vertebrados apresentam sintomas típicos de toxicidade. Buhl & Hamilton (2000) verificaram que o LAS (5,0mg/L) foi aproximadamente cinco vezes mais tóxico do que o SDS (24,9 mg/L) em trutas juvenis da espécie *Oncorhynchus mykiss*.

3.4 Mecanismos de Remoção

Segundo HERA (*Human and Environmental Risk Assessment*, 2010), a remoção de LAS pode ocorrer pela combinação de três processos: precipitação, biodegradação e adsorção. A principal forma de remoção é a degradação microbiana, geralmente em torno de 80 % (PAINTER & ZABEL, 1989); precipitação e adsorção em sólidos suspensos podem representar de 30 a 70% (BERNA *et al.*, 1989).

Segundo Painter & Zabel (1989) a degradação microbiana por processos aeróbios, em especial por lodos ativados podem remover mais de 95% de surfactantes aniônicos concentrados no esgoto sanitário (1 a 21 mg/L). Trehy *et al.* (1996) obtiveram remoção de 99,5% de LAS em quatro sistemas de lodos ativados usados no tratamento de esgoto sanitário.

Segundo Shörberl (1989) a rota de degradação do LAS sob condição aeróbia, consiste nos seguintes passos: (1) conversão oxidativa de um ou dois grupos metila da cadeia alquílica a um grupo carboxila (ω -/ β - oxidação); (2) oxidação da cadeia alquílica (β -oxidação); (3) oxidação do anel aromático; (4) quebra da ligação C-S, liberando sulfato (dessulfonação).

A degradação microbiana por processos anaeróbios têm sido estudada a partir de 2.000, utilizando em especial reatores UASB (ALMENDARIZ *et al.*, 2001; MOGENSEN *et al.*, 2003; SANZ *et al.*, 2003; LOBNER *et al.*, 2005), reator contínuo de mistura completa (CSTR) (MOGENSEN *et al.*, 2003), reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)

(OLIVEIRA *et al.*, 2009; DUARTE *et al.*, 2008), reator de leito fluidificado (RALF) (OLIVEIRA *et al.* 2010) e reator operado em bateladas seqüenciais (DUARTE *et al.*, 2010).

Em relação ao reator UASB, Sanz *et al.* (2003) usaram carga de LAS afluyente de 4-5mgLAS/L e tempo de detenção hidráulica de 24 horas com inóculo proveniente de reator UASB de indústria de açúcar de beterraba. Na primeira etapa, os autores alimentaram o reator com substratos facilmente degradáveis, tais como, acetato, propionato, butirato, lactato, metanol, etanol e sacarose mais LAS comercial (4-5mgLAS/L), por três meses. Nessa fase, a remoção média foi de 64%. A segunda etapa a remoção média foi de 85% e consistiu apenas da alimentação com LAS comercial (4-5mgLAS/L), sem co-substratos.

Lobner *et al.*, (2005) avaliaram a remoção de 10mg LAS/L em reator UASB (200mL) com TDH de 48 horas sob diferentes temperaturas (55°C e 32°C). Os autores obtiveram remoção de 40-80%, para as duas condições de temperatura testadas. Além disso, verificaram também que a melhor remoção de LAS foi obtida quando da presença de baixas concentrações de ácidos voláteis (< 20mg/L de ácido acético).

DUARTE *et al.*, 2010, avaliaram a remoção de LAS em reator RAHFL inoculado com lodo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de esgoto de dejetos de suinocultura. O reator foi operado com tempo de detenção hidráulica de 12 horas contendo espuma de poliuretano como material suporte e alimentação com substrato sintético e duas concentrações de LAS (7mg/L e 14mg/L). Por meio do balanço de massa, os autores constataram remoção de 34% ao final de 314 dias de operação. Análises de DGGE com recorte de bandas possibilitaram evidenciar bactérias pertencentes ao grupo das BRS, as quais estão relacionadas com a remoção do LAS (DENGER & COOK, 1997). Além disso, a identificação filogenética por meio do sequenciamento da região 16S do RNAr indicou bactérias semelhantes ao filo Firmicutes e classe Clostridia, cujos microrganismos também são relacionados com a degradação de LAS (DENGER & COOK, 1997).

OLIVEIRA *et al.*, 2010 avaliaram a remoção de LAS em reator de leito fluidificado (volume total de 353mL) com diferentes materiais suportes (carvão ativado, argila expandida, pérolas de vidro e areia), sob condição mesofílica e TDH de 18 horas. Os reatores foram alimentados com substrato sintético e inoculados com lodo granulado proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Os autores observaram diferença na remoção do LAS em função dos diferentes materiais suportes. A areia foi o material suporte que possibilitou maior remoção; ou seja, de 99% para concentração afluyente média de 18,8mg LAS/L. A análise filogenética permitiu evidenciar bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes, filo Proteobacteria, filo Actinobacteria entre

outros. Tais resultados, abriram precedente para utilização de reator de alta taxa na remoção de compostos tóxicos, tais como, LAS.

DUARTE *et al.* (2010), verificaram a remoção de LAS, sob condição mesofílica, em reator anaeróbio em bateladas sequências (5L) contendo biomassa granulada proveniente de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura. O reator foi operado com ciclos de 24 horas a 50rpm e alimentado com substrato sintético, contendo os seguintes compostos: extrato de levedura, amido e sacarose com fontes de carbono facilmente biodegradáveis, e 22 mg LAS/L. Na ausência de co-substratos foi obtida a maior remoção de LAS; ou seja, de 53%. Na presença de co-substratos esse valor foi de 24 a 37%. Os autores notaram alteração na remoção de matéria orgânica em função da adição do LAS, de 74% (etapa sem LAS) para 44% quando da adição do surfactante. Análises de DGGE para o domínio *Bacteria* e *Archaea* revelaram diferenças durante as etapas de operação, principalmente quando da adição do surfactante, quanto na etapa sem co-substratos e digestão do lodo. A análise filogenética indicou bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes, Proteobacteria, Verrumicrobia, entre outros.

Em relação a degradação anaeróbia do LAS, algumas constatações foram verificadas, por exemplo, por MOGENSEN *et al.*, (2003) que detectaram ácido benzeno sulfônico e benzaldeído sob essa condição. Benzeno e tolueno foram encontrados em efluente de reator anaeróbio alimentado com LAS (Duarte *et al.*, 2010).

Lara-Martin *et al.*, (2010) observaram a rota de degradação do LAS utilizando sedimento marinho anóxico como inóculo para testes em batelada usando frasco de 300mL. Para tanto, foram criados microcosmos com o sedimento coletado no litoral de Cádiz, na Espanha, com N₂ e CO₂ no *headspace* (80:20, proporção volume), concentração de LAS (10, 20 e 50 ppm) e rezasurina com indicado de ambiente anóxico. Segundo os autores ocorreu remoção de 79% em 165 dias de operação. Inicialmente, ocorreu adição de fumarato a molécula de LAS, biotransformação em ácido sulfofenil carboxílico (SPC) e sucessivas reações de β -oxidação (Figura 3.2).

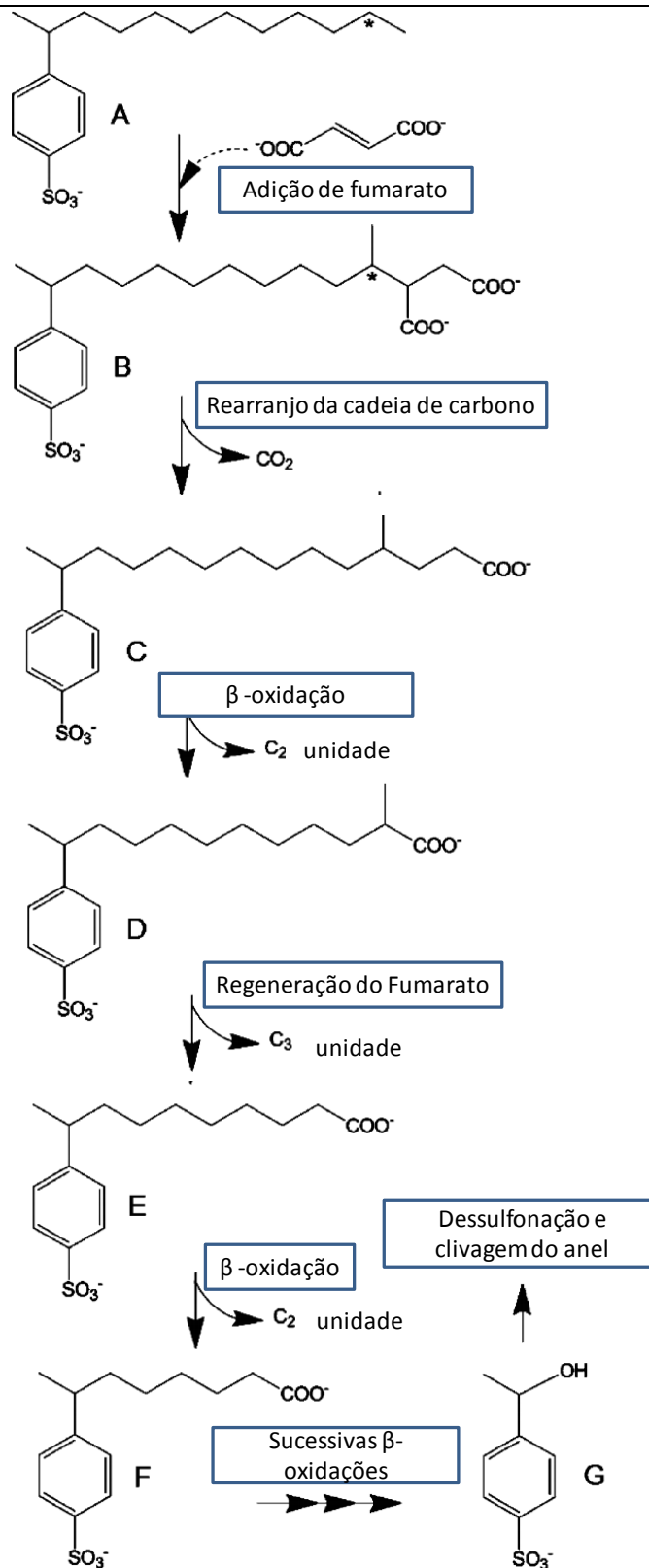


Figura 3.2: Rota de degradação anaeróbia

Fonte: Lara-Martin *et al.*, (2010)

O reator EGSB (*Expanded Granular Sludge Bed*), leito de manta de lodo granulado expandido (KATO *et al.*, 1994), foi concebido com alternativa aos reatores anaeróbios

consagrados, tais como, o reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (LETTINGA *et al.*, 1980). Suas características são similares à do reator UASB, porém, com relação altura/diâmetro maior, ou seja, da ordem de 20, onde são aplicadas velocidades ascensionais acima de 2,5 m/h, podendo chegar até 10 m/h (KATO *et al.*, 1994). Tais características evitam fluxos preferenciais, curtos-circuitos hidráulicos e zonas mortas.

Velocidades ascensionais elevadas são necessárias para promover a expansão ou fluidificação da partícula; seja um material suporte específico (areia) ou lodo granuloso. Na prática, é considerado um reator de leito expandido quando ocorre expansão da ordem de 10% a 20% do leito estático inicial. Acima desses valores é considerado reator de leito fluidificado (CAMPOS, 1999).

A diluição do afluente promovida pela aplicação de recirculação do efluente em reator de leito fluidificado e leito de manta granulada expandida permite o tratamento de compostos tóxicos. Poluentes solúveis são eficientemente tratados nesse reator, entretanto, os sólidos suspensos não são removidos substancialmente devido à alta velocidade ascensional (V_a) (SEGHEZZO *et al.*, 1998). Alguns fatores contribuem para a eficiência de reator de leito expandido/fluidificado, tais como:

- 1) Máximo contato entre o líquido e meio suporte;
- 2) São evitados problemas de canais preferenciais, empacotamento e retenção de gás, comumente encontrados em leito fixo;
- 3) Melhor estabilidade e eficiência de remoção de DQO, quando comparado com o reator anaeróbio de manta de lodo (UASB);
- 4) Pode ser operado para ampla faixa de concentração de matéria orgânica;
- 5) Menor requisito de área;
- 6) Diluição do afluente quando aplicada recirculação, por conseguinte, em caso de remoção de compostos tóxicos permitindo a sua diluição.

O reator EGSB apresenta grande potencialidade quando aplicado no tratamento de esgoto sanitário predominantemente solúvel de baixa e alta concentração, simples ou complexo.

Kato *et al.*, 1994, avaliaram a remoção de até 100 a 200mg DQO/L em reator EGSB sob condição mesofílica. Os autores obtiveram remoção de matéria orgânica superior a 80%. Trata-se de contribuição importante para entender o comportamento do reator EGSB sob baixa concentração de matéria orgânica.

Nuñez e Martinez (1999) analisaram o desempenho do reator EGSB para tratar água residuária de abatedouro de aves sob condição mesofílica. A carga orgânica total afluente foi

de 15 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, TDH de 5 horas e inóculo proveniente do tratamento de efluente de fábrica de cerveja. Os autores obtiveram remoção de 67% de DQO e, aproximadamente, 90% dos sólidos suspensos totais. Esses resultados indicam que o reator EGSB apresenta eficiência significativa quando aplicado altas cargas orgânicas.

Costa *et al.*, (2007) estudaram o comportamento do reator EGSB exposto a dois choques tóxicos utilizando detergente comercial. Os autores utilizaram reator ESGB de 1,15 L de volume útil, temperatura de 37°C, 1500mg/L de DQO afluente (etanol) e detergente comercial composto de glicol éter (1-10%), surfactante aniônico (1-10%), aditivos de *performance* (1-10%) e corantes (<1%). O detergente comercial apresentou DQO de 98g/L, dessa forma, o choque tóxico foi realizado com: (I) 150 mgDQO/L de detergente comercial durante 56 h e (II) 300 mgDQO/L de detergente comercial durante 222 h. Os resultados obtidos foram os seguintes: a remoção de DQO permaneceu inalterada no primeiro choque tóxico, todavia, ocorreu redução de 75% para 17% na remoção de DQO no segundo choque tóxico. A atividade metanogênica específica no primeiro choque foi estimulada durante as primeiras 8h, diminuindo após esse período e recuperada 5 dias, após o choque tóxico. Todavia, no choque tóxico II a atividade metanogênica foi imediatamente reduzida durante todo o período de exposição.

Deve-se considerar também em relação ao reator EGSB a importância da biomassa granulada. A estrutura e evolução dinâmica estão diretamente relacionadas com as populações microbianas presentes nos grânulos. As distintas populações microbianas são resultado direto de características, tais como, comportamento hidráulico do reator, fontes de alimentação e presença de material suporte.

MacLeod *et al.* (1900) estudaram a estrutura do grânulo a partir da biomassa de reator UASB alimentado com sacarose (4,4g/L) e extrato de levedura (44g/L), correspondendo a 1,3 gDQO/gSSV.d. De acordo com os autores três camadas distintas foram estabelecidas, a mais interna corresponde as arqueias metanogênicas, as quais podem agir como centros de nucleação, seguido por bactérias anaeróbias que utilizam e produzem H₂ e, por último, na região mais externa bactérias filamentosas, além de cocos e bacilos (

Figura 3.3).

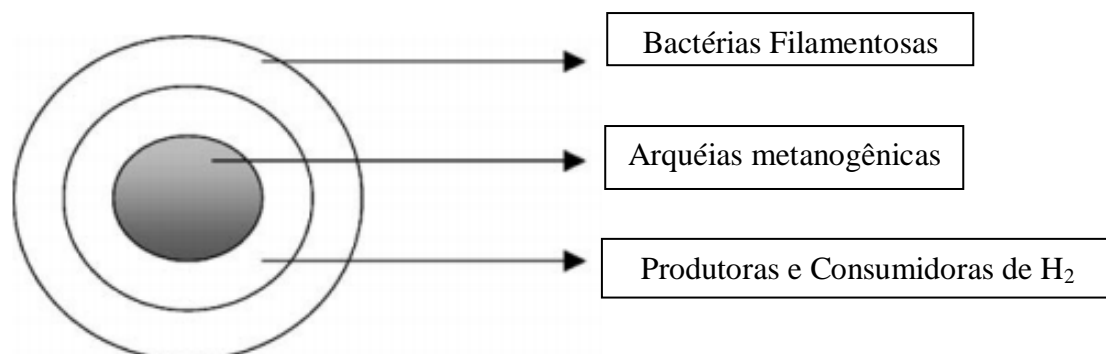


Figura 3.3: Estrutura do grânulo do UASB

Fonte: MacLeod et al. (1990)

Ganzaloez-Gil *et al.* (2001), analisaram a estrutura granulada de reator EGSB utilizado no tratamento de água residuária de processamento de batata e açúcar, com TDH de 2 horas, condição mesofílica, carga orgânica volumétrica de 20KgDQO/m³.d e eficiência de remoção de 70-75%. Esses autores propuseram a conformação granulada representada na Figura 3.4.

Diferentemente de MacLeod *et al.* (1990), Ganzaloez-Gil *et al.* (2001) não notaram camadas contínuas de grupos microbianos com metabolismos específicos, mas, um mosaico de agrupamentos microbianos com a mesma predisposição metabólica, como por exemplo grupos de *Methanosarcina*.

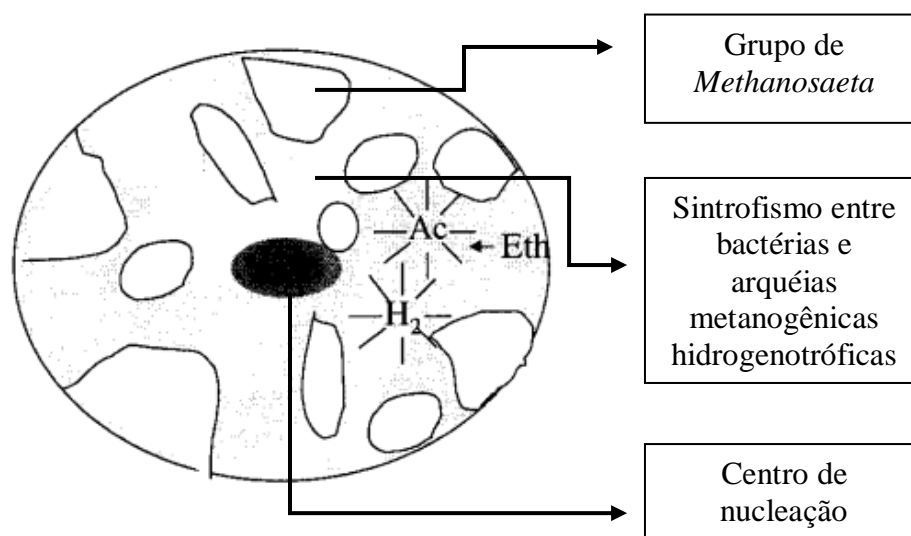


Figura 3.4: Estrutura do grânulo para EGSB

Fonte: Gonzalez-Gil *et al.*, (2001)

Embora, ocorra distinção entre a composição microbiana e sua disposição nos grânulos é indiscutível as vantagens atribuídas a granulação. Segundo McHugh *et al.* (2003), tais vantagens são as seguintes: **(a)** melhora a eficiência de proliferação microbiana, **(b)** acessa recursos e nichos que não poderiam ser utilizados por células isoladas, **(c)** gradiente interno de processos físico-químicos, **(d)** defesa coletiva, provavelmente, em relação a compostos tóxicos, **(e)** otimização da sobrevivência das populações microbianas, uma vez que, há diferentes tipos celulares, e **(f)** geração de efluente com baixa quantidade de sólidos em suspensão. Portanto, o confinamento das bactérias anaeróbias e arqueias metanogênicas na biomassa granulada auxilia na proteção e tolerância à compostos tóxicos e, em outros casos, adaptação a compostos inibitórios (RAZO-FLORES *et al.*, 1996).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho teve por finalidade analisar a eficiência de remoção do alquilbenzeno linear sulfonado em reator EGSB utilizando lodo granulado obtido de tratamento de efluente de abatedouro de aves. Na Figura 4.1 encontra-se delineado o fluxograma geral que detalha as etapas experimentais e análises realizadas durante a execução do trabalho.

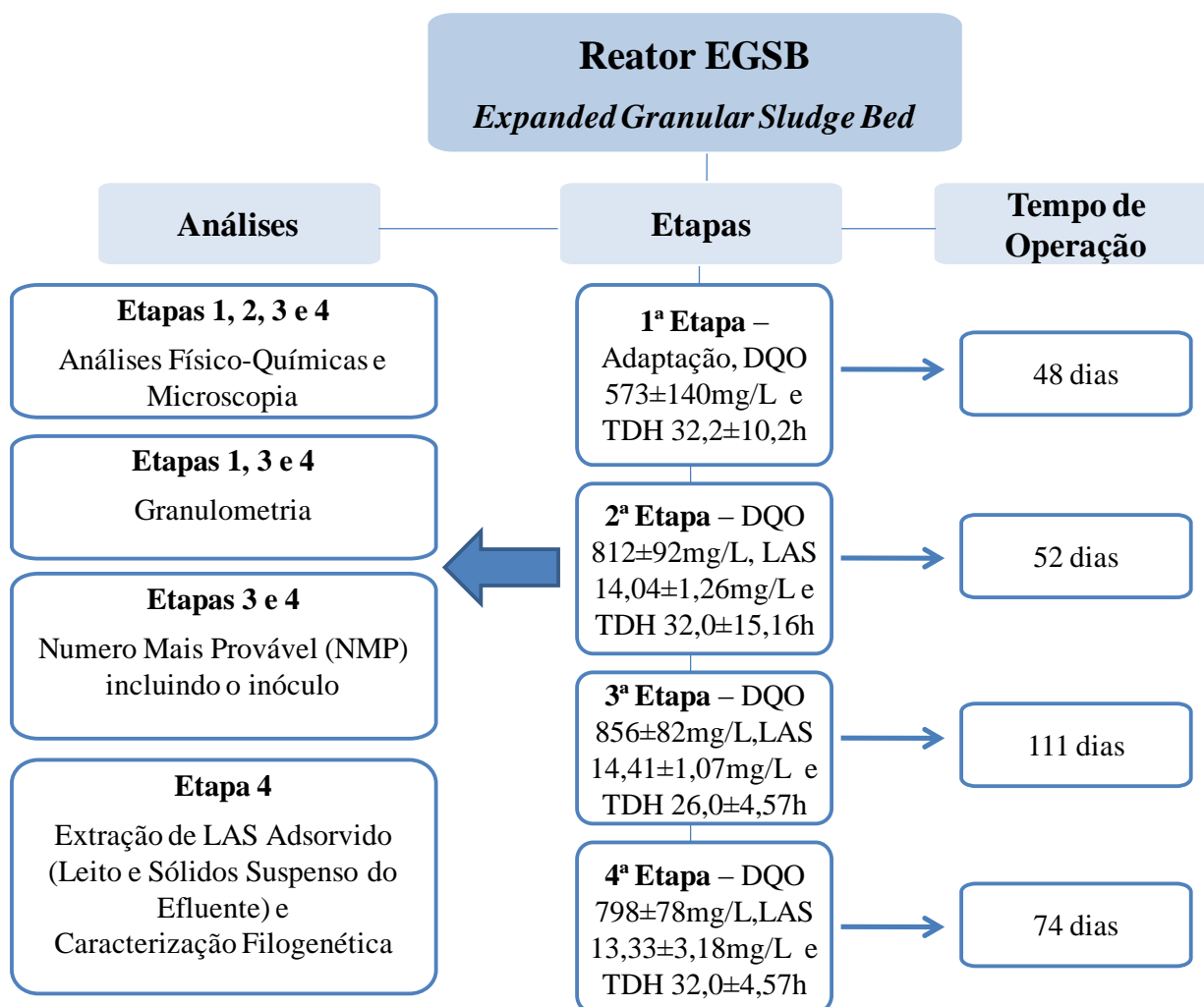


Figura 4.1: Fluxograma Experimental Geral

Conforme pôde ser observado na Figura 4.1, algumas análises não foram realizadas. Por exemplo, a análise granulométrica da Etapa 2 não foi realizada devido a dificuldade de retirada dos grânulos nessa etapa. A quantificação microbiana pela técnica dos tubos múltiplos (NMP) não foi realizada nas Etapa I e II.

4.1 Descrição do Reator

O reator foi confeccionado em acrílico, com volume útil de 1,5 L, com um dispositivo na extremidade superior para garantir a separação entre as fases sólida, líquida e gasosa, e um distribuidor de vazão na sua base. Ao longo do leito do reator foram instalados seis pontos de amostragem e um na região do copo (separador de fase). A Figura 4.2 detalha as características do reator EGSB. Durante a operação o reator foi mantido em condição mesofílica, a 30°C, em câmara climatizada.

Com o intuito de garantir a anaerobiose do sistema dois procedimentos foram adotados: primeiro, a utilização de um selo hídrico e segundo, a utilização de um sifão na saída do sistema o que evitou a entrada de oxigênio pela mangueira do efluente.

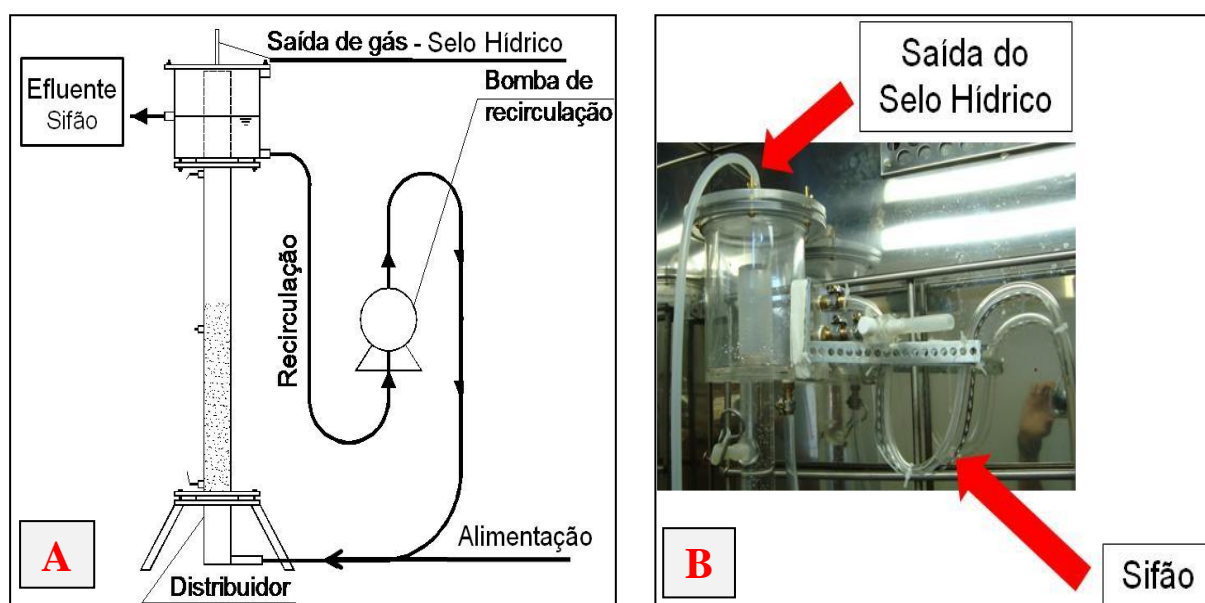


Figura 4.2: Detalhes do reator EGSB. (A) esquema do reator, (B) detalhe do selo hídrico e sifão

A opção por utilizar lodo granulado sem material suporte foi devido às menores vazões de recirculação necessárias para expansão do leito. Na Tabela 4.1 estão apresentados os parâmetros de operação intrínsecos do reator. Para cada etapa de operação foi imposto TDH específico que resultou numa vazão de alimentação média. A vazão de recirculação foi fixa durante todo o período de operação do reator de 5L/h. Isso resultou em uma diluição acentuada da alimentação e, conseqüentemente, da concentração de LAS. A recirculação promove a diluição de compostos tóxicos como o LAS, além de aumentar a transferência de

massa. Segundo Seghezzeo *et al.* (1998), a diluição do afluente promovido pela recirculação do efluente pode favorecer a remoção e degradação de compostos tóxicos.

Tabela 4.1: Parâmetros de Operação do reator EGSB nas diferentes etapas

Etapa	TDH*	Volume do Reator	Vazão Recirculação	Vazão Alimentação*	Fator Diluição
-	(h)	(L)	L/h	L/h	-
I	32	1,5	5	0,039	128
II	32			0,047	106
III	26			0,058	86
IV	32			0,047	106

* Média dos valores obtidos

Dessa forma, na etapa de adaptação (I) a diluição do afluente foi de 128 vezes para vazão média de alimentação de 0,039 L/h. Na etapa II e IV a vazão de alimentação foi similar; ou seja, de 0,047 L/h com diluição de 106 vezes. Na etapa III, com TDH de 26 horas, a vazão de alimentação foi maior (0,058 L/h) e diluição de 86 vezes.

4.2 Etapas de Operação

O reator EGSB foi operado por 285 dias, os quais foram divididos em quatro etapas, em função do TDH. A Etapa I foi realizada para adaptação da biomassa às características hidráulicas do reator e alimentação. Para tanto, foi realizado período de adaptação de 48 dias no qual não houve adição de LAS. Ultrapassado esse período, iniciaram-se as etapas onde o LAS foi adicionado na alimentação.

Nas etapas II e IV o reator foi operado de modo semelhante. A iniciativa de realizar a etapa IV semelhante à etapa II foi devido aos resultados de remoção de LAS. O TDH influencia diretamente na carga de LAS aplicada; ou seja, valor maior de TDH resulta em carga de LAS menor, enquanto, valor menor resulta em carga de LAS maior. Dessa forma, ao realizar a etapa IV semelhante à etapa II teve por objetivo analisar o comportamento do reator depois de uma carga de LAS mais elevada (etapa III), com a finalidade de avaliar se a remoção de LAS seria igual ou menor em relação aquela observada na etapa II.

Na Tabela 4.2 estão detalhados os parâmetros específicos de cada etapa.

Tabela 4.2: Parâmetros estabelecidos em cada etapa de operação

Etapa	Alimentação	Duração (dias)	TDH (h)
I	meio mineral modificado, solução de vitaminas, bicarbonato de sódio e co-substratos	48	32,2±10,2
II	meio mineral modificado, solução de vitaminas, bicarbonato de sódio, co-substratos e adição de 14,04±1,26mg/L de LAS	52	32,0±15,16
III	meio mineral modificado, solução de vitaminas, bicarbonato de sódio, co-substratos e adição de 14,41±1,07mg/L de LAS	111	26,0±4,57
IV	meio mineral modificado, solução de vitaminas, bicarbonato de sódio, co-substratos e adição de 13,33±3,18mg/L de LAS	72	32,0±4,57

4.3 Inóculo

O inóculo foi proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dakar S/A, Tietê/SP). Para a inoculação, o lodo granulado foi lavado com água destilada para a retirada de impurezas advindas do sistema de tratamento de abatedouro de aves. Logo em seguida, foi adicionado 300 mL de lodo granulado com concentração de sólidos totais (g/L) de 9,13, sólidos totais fixos (g/L) 1,39 e sólidos totais voláteis (g/L) de 7,74, de acordo com a metodologia descrita em *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA *et al.*, 2005).

4.4 Alimentação

O reator foi alimentado com os seguintes co-substratos facilmente degradáveis: etanol (0,27mL/L) e metanol (0,34mL/L) perfazendo DQO teórica de aproximada de 800 mg/L, meio mineral modificado (ANGELIDAKI *et al.*, 1990), descrito na Tabela 4.3, solução de vitaminas (Tabela 4.4) (TOUZEL & ALBAGNAC, 1983) e LAS obtido da Aldrich (CAS 25155-30-0) com 99,9% de pureza.

Tabela 4.3: Meio Mineral Modificado*

Solução A ■		Solução B ●		Solução C ▲	
Componentes	Concentração (mg/L)	Componentes (cont.)	Concentração (mg/L)		
■ NH ₄ Cl	1.000	▲ MnCl ₂ .4H ₂ O	0,05		
■ NaCl	100	▲ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,05		
▲ MgCl ₂ .6H ₂ O	25	▲ AlCl ₃	0,05		
▲ CaCl ₂ .2H ₂ O	50	▲ CoCl ₂ .6H ₂ O	0,05		
● K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	400	▲ NiCl ₂ .6H ₂ O	0,092		
▲ FeCl ₂ .4H ₂ O	2	▲ EDTA	0,5		
▲ H ₃ BO ₃	0,05	▲ HCl concentrado	1 mL/L		
▲ ZnCl ₂	0,05	▲ Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,1		
▲ CuCl ₂ .2H ₂ O	0,038				

*Modificação da concentração de MgCl₂
 Fonte: Angelidaki *et al.*, 1990

Os componentes do meio mineral modificado foram divididos em três grupos em relação às características químicas principalmente de solubilidade. Para tanto, periodicamente era preparado uma solução estoque A contendo apenas NH₄Cl, NaCl, MgCl₂.6H₂O e CaCl₂.2H₂O 100 vezes mais concentrada. A solução B foi preparada com K₂HPO₄ 500 vezes mais concentrada. A Solução C foi preparada 1.000 vezes mais concentrada contendo os demais reagentes do meio mineral modificado. Esse procedimento foi adotado para facilitar a alimentação do reator e aumentar a confiabilidade na pesagem dos reagentes. Todas as soluções eram mantidas em frascos âmbar de 1L fechados e mantidas ao abrigo da luz.

Para a solução de vitaminas foi preparado solução estoque 200 vezes mais concentrada. Essa solução foi esterilizada por filtração em sistema Millipore em membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm, durante 20 minutos. Logo em seguida, procedeu-se a distribuição da solução em frascos de antibióticos (25 mL). Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração. A cada alimentação era utilizado um frasco de antibiótico (25 mL) para um volume total de 5,5L de alimentação.

Tabela 4.4: Solução de Vitaminas

Componentes	Concentração (g/L)*
Biotina	0,002
Ácido fólico	0,002
Tiamina	0,005
Riboflavina	0,005
Ácido Nicotínico	0,005
Pantotenato de cálcio	0,005
Piridoxina	0,01
Vitamina B12	0,0001
Ácido Lipóico	0,005
Ácido p-aminobenzóico	0,005

*q.s.p 1000 mL de água destilada anaeróbia
 Fonte: Touzel e Albagnac, 1983.

O bicarbonato de sódio era estocado em pequenos frascos com a massa exata para o volume final de alimentação em temperatura ambiente.

A solução estoque de LAS (1g/L) foi preparada cuidadosamente evitando a formação de espuma. Essa solução foi armazenada em frasco de vidro e mantida sob refrigeração. Para volume total de alimentação de 5,5L foi adicionado 82,5 mL de solução estoque de LAS.

O procedimento para preparação da alimentação consistiu:

- a) Limpeza do frasco de Duran®;
- b) Preenchimento parcial do frasco com água da rede pública de abastecimento;
- c) Adição das Soluções A, B e C, respectivamente. Entre cada adição o frasco foi agitado para homogeneização dos componentes do meio mineral.
- d) Adição da Solução de vitaminas;
- e) Adição de Bicarbonato de Sódio Comercial;
- f) Completava-se o volume para próximo de 5,5L;
- g) Adição do LAS;
- h) Agitação moderada do frasco de alimentação;
- i) Calibração do volume final.

4.5 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas

Amostras do afluente e efluente foram analisadas seguindo as frequências e parâmetros apresentados na Tabela 4.5. Análises de demanda química de oxigênio (DQO),

pH (potencial hidrogeniônico), sólidos totais voláteis, sulfato e sulfeto foram realizadas de acordo com APHA (2005). A determinação da alcalinidade foi realizada de acordo com a metodologia de Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley (1986).

Os ácidos voláteis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Lazaro *et al.* (2008). Tal metodologia permite a determinação dos seguintes ácidos: Capróico, Valérico, Isovalérico, Butírico, Isobutírico, Propiônico, Acético, Fórmico, Láctico, Succínico, Málico e Cítrico.

As análises para a determinação da concentração de LAS foram realizadas segundo metodologia desenvolvida por Duarte *et al.* (2006) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 4.5: Análises de monitoramento do reator EGSB

	Método	Frequência das análises	Referência
Ácidos voláteis (mg/L)	Cromatográfico	2X semana	Lazaro <i>et al.</i> (2008)
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	Titulométrico	2X semana	Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley <i>et al.</i> (1986)
DQO bruta e filtrada(mg/L)	Espectrofotométrico	2X semana	APHA (2005)
LAS (mg/L)	Cromatográfico HPLC	2X semana	Duarte <i>et al.</i> (2006)
pH (unidade)	Potenciométrico	2X semana	APHA (2005)
Sólidos Totais Voláteis	Gravimétrico	1X semana	APHA (2005)
Sulfato (mg/L)	Turbidimétrico	1X semana	APHA (2005)
Sulfeto (mg/L)	Espectrofotométrico	1X semana	APHA (2005)
Vazão (mL/h)	Volumétrico	diariamente	-
Potencial Redox (mV)	Potenciométrico	1x semana	-
Expansão do Leito	-	2x semana	-

4.6 Monitoramento da Expansão do Leito

O monitoramento da expansão do leito foi realizado utilizando uma régua para a medição da sua altura. Inicialmente, foi medida a altura do leito com a bomba de recirculação desligada (H_0) e logo em seguida era medido a altura do leito com a bomba de

recirculação ligada (H_1). De acordo com Campos (1999), adotou-se que a altura da expansão do leito não ultrapassasse 30% da altura inicial (Figura 4.3

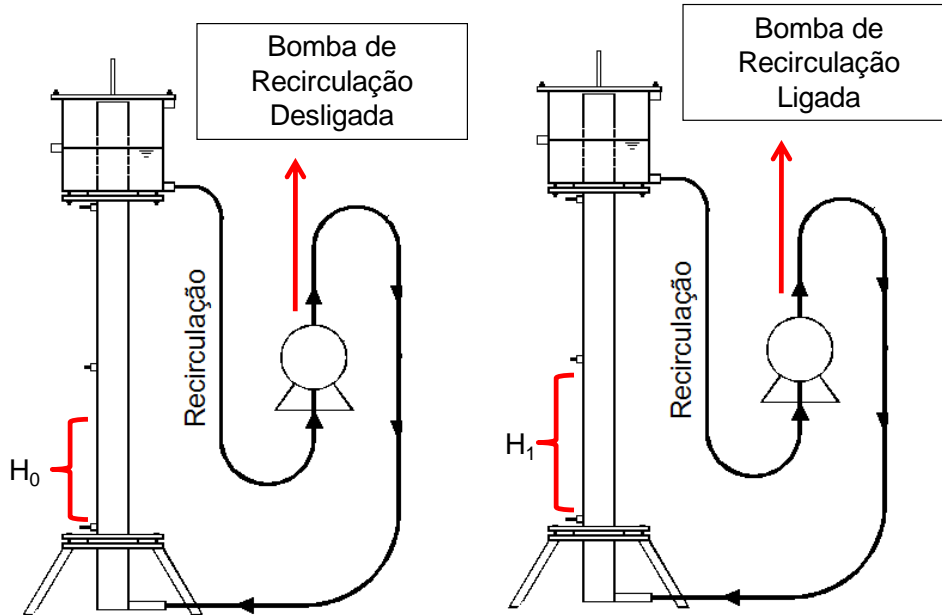


Figura 4.3: Esquema do monitoramento da expansão do leito do reator EGSB

Para o cálculo da altura de expansão foi usada a equação descrita a seguir:

$$\% \text{ Expansão} = \left(\frac{H_1}{H_0} \times 100 \right) - 100 \quad (4.1)$$

$$10 \leq \% \text{ Expansão} \leq 30$$

4.7 Avaliação do Potencial Redox do Reator

No 190º dia de operação foi avaliado o potencial redox do reator EGSB. O método consiste na diferenciação colorimétrica do corante resazurina de acordo com o potencial redox do meio. Coloração azul indica que o meio está aeróbio, enquanto, a ausência de cor (incolor) é indicativa de que o meio está anaeróbio. A cor rosa é característica de potencial redox entre 200 e -200 mV, condição facultativa.

O experimento consistiu na adição de 1 mL/L de resazurina (0,1%) na mangueira de alimentação do reator. Durante aproximadamente 1 hora de experimento foi observado a

coloração do meio e a retirada de fotos das mangueiras, bombas (alimentação e recirculação) e do leito do reator para documentação.

4.8 Amostragem

Para as análises descritas nos itens (4.10, 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14) a amostragem foi realizada como descrito abaixo.

Conforme o item 4.1, o reator EGSB possuía 6 pontos de amostragem ao longo do leito e 1 na região do copo. Dessa forma, para as análises da região do leito, era coletada uma amostra composta que consistia na retirada de seis porções de 5 mL de cada ponto de amostragem. Essas amostras eram transferidas para frascos apropriados e homogeneizadas para formar amostra única. Para as análises da região do copo a amostra era retirada do ponto de amostragem presente nessa região, em geral 10 mL.

Todavia, para algumas análises, como extração de LAS adsorvido, foram retiradas amostras compostas do reator inteiro, incluindo os pontos de amostragem do leito e copo.

4.9 Granulometria

A granulometria do lodo granulado foi realizada ao final das etapas I, III e IV, utilizando o *software* Image-Pro Plus 4.5 para o tratamento das imagens, contagem e medição do diâmetro médio dos grânulos, segundo a metodologia adaptada de Alphenaar *et al.* (1993).

Para tanto foi retirada amostra composta ao final de cada etapa através dos pontos de amostragem do próprio reator (item 4.9). Os grânulos foram distribuídos sobre uma placa de *Petri* tomando cuidado com o espaçamento entre eles, evitando deixá-los muito próximos. Previamente, a captura da imagem foi colocada uma régua graduada junto à placa de *Petri* que serviu de referência para o *software*. Os dados foram exportados para a *Microsoft Office Excel 2007* para tratamento estatístico e elaboração do histograma com intervalo de classe de 0,5 mm.

4.10 Extração de LAS Adsorvido

A extração de LAS adsorvido foi realizada apenas ao final da operação do reator EGSB, segundo a metodologia modificada de Duarte (2006). Devido às características adsorptivas do LAS e com o objetivo de fechar o balanço de massa desse surfactante, foi realizado a extração de LAS adsorvido na biomassa do leito e nos sólidos suspensos do efluente ambos em duplicata.

As amostras do reator foram retiradas a partir dos pontos de amostragem do próprio reator. Enquanto, as amostras de SST efluente foram retiradas acondicionado 5 L do efluente em um frasco de Duran® seguido de filtragem em peneira de 7,5 µm e posterior secagem de acordo com o protocolo de Duarte (2006).

4.11 Exames Microscópicos

Os exames microscópicos de contraste de fase e fluorescência foram realizados em microscópio Olympus BX60 com câmera acoplada para captura de imagem e *software Image-Pro Plus 4.5* nas Etapas I, II, III e IV. Para tanto, foi retirado uma amostra composta ao final de cada etapa.

A amostra foi acondicionada em frasco de antibiótico de 30 mL contendo pérolas de vidro. O frasco foi fechado com tampa de butila e lacrado com lacre de alumínio. Logo em seguida, procedeu-se a homogeneização da amostra para total ruptura dos grânulos. Parte da homogeneização foi manual (20 minutos) e parte (5 minutos) no vórtex.

Pequena quantidade da amostra foi adicionada a uma lâmina previamente limpa com detergente e álcool. Sob a gota foi colocada uma lamínula, também, previamente lavada. Cumprido todo esse procedimento a amostra foi observada no microscópio.

4.12 Análise Quantitativa da Diversidade Microbiana

Para estimar a população de microrganismos (bactérias anaeróbias totais, bactérias redutores de ferro e arqueias metanogênicas) presente no reator EGSB foi utilizado à técnica de tubos múltiplos por meio do Número Mais Provável. O conceito é bastante antigo, idealizado por McCrady (1915), entretanto foi adaptado por Sakamoto (1996) para quantificação da microbiota anaeróbia. O método consiste em diluições seriadas para contagem indireta da densidade de microrganismos em um líquido. Na Tabela 4.6 estão detalhadas as fases e quais populações de microrganismos foram analisadas.

Tabela 4.6: Quantificação de microrganismos nas diferentes etapas

Etapa	População de Microrganismos
III e IV	Bactérias Anaeróbias Totais
IV	Bactérias Redutoras de Ferro
III e IV	Arqueias Metanogênicas

O procedimento consistiu na inoculação dos microrganismos provenientes do reator, em meio de cultura (ANGELIDAKI *et al.*, 1990), descrito na Tabela 4.3, solução de

vitaminas (Tabela 4.4) (TOUZEL & ALBAGNAC, 1983) e LAS. O procedimento de retirada de amostras da região do leito e copo está detalhado no item 4.9.

Portanto, para quantificação das bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas foi utilizado como meio de cultura para o NMP o mesmo meio utilizado na alimentação do reator.

Todavia, para quantificação das bactérias redutoras de ferro foi utilizando, além dos mesmos reagentes da alimentação, EDTA férrico sal sódico, segundo metodologia adaptada de Gould *et al.* (2002).

Os procedimentos detalhados a seguir foram os mesmos para a quantificação de todas as populações, sendo apenas diferente a metodologia de detecção e o meio de incubação. A metodologia do NMP foi dividida em duas partes. Primeira, diluição seriada da amostra em água de diluição e segunda, inoculação em meio de cultura específico.

4.12.1 Água de diluição

Para a preparação da água de diluição foram necessárias duas soluções descritas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Soluções para água de diluição

Solução para Água de Diluição	Reagente	Volume*
1	K ₂ HPO ₄ (0,2 M)	1 mL
2	KH ₂ PO ₄ (0,2 M)	0,25 mL

*q.s.p 250mL de água destilada anaeróbia

Primeiramente, foi preparada a água anaeróbia. Para tanto, 300 mL de água destilada foi transferida para erlenmeyer e submetida ao aquecimento até entrar em ebulição. A seguir, essa água foi resfriada, durante 20 minutos, sob atmosfera de N₂ (100%), acoplando-se uma mangueira e pipeta ao sistema de distribuição de gás. Logo em seguida, essa água anaeróbia foi utilizada para preparar a solução de diluição. Dessa forma, as soluções 1 e 2 foram adicionadas em frasco apropriado e o volume finalizado com essa água anaeróbia, como descrito na Tabela 4.7.

A seguir, iniciou-se a distribuição da água de diluição nos frascos. Exatamente 9,0 mL dessa água foram transferidos para frascos de antibióticos (30 mL) com o auxílio de um pipetador automático. Após a transferência os frascos foram submetidos à atmosfera de N₂

(100%) por 1 minuto, tampados e lacrados. Todo esse material foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm durante 20 minutos.

4.12.2 Meios de Cultura para o NMP

A água utilizada para a preparação dos meios de cultura foi preparada seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, uma vez que, faz-se necessário utilizar água anaeróbia.

O meio de cultura para o NMP consistiu nos mesmos reagentes e concentrações utilizados na alimentação do reator, referente a etapa em que foi retirada a amostra, acrescentado EDTA férrico sal sódico (1,84g/L) apenas no meio do NMP das bactérias redutoras de ferro. O procedimento para a preparação do meio de cultura foi o mesmo em todos os casos.

O meio foi esterilizado por filtração em membrana (0,22µm) através de sistema Millipore previamente esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm, durante 20 minutos. Após a filtração, o meio foi submetido à atmosfera de N₂ (100%) durante 20 minutos e, posteriormente, a atmosfera de N₂/CO₂ (70/30%), por mais 20 minutos. A seguir foram transferidos 8,9 mL desse meio para frascos de antibiótico de 30 mL, previamente esterilizados. Os frascos foram fechados com tampa de butila e lacre de alumínio. Em todos os frascos de contagem, anteriormente a inoculação foi adicionado 0,1 mL de solução redutora de sulfeto de sódio (5%) (Sakamoto, 1996).

4.12.3 Inoculação

Volume conhecido de lodo granulado (10 mL) foi desmanchado com auxílio de cadinho e almofariz (Sakamoto, 2010 – protocolo FINEP). Posteriormente, essa amostra foi transferida para frasco de antibiótico com tampa de butila acrescido de 5 g de pérolas de vidro previamente esterilizada em autoclave. O frasco com o lodo granulado mais as pérolas de vidro foi agitado manualmente em ângulo de 45°, durante 20 minutos para completa desagregação celular (VAZOLLER, 1995).

A seguir foi realizada a diluição seriada da amostra. Para tanto, foi transferido 1 mL da amostra em 9 mL de água diluição preparado previamente. A partir dessa diluição, mais 1 mL foi retirado e transferido para outro frasco de diluição contendo 9 mL, e assim sucessivamente, até a diluição 10⁻²⁰ (Figura 4.4). A transferência de amostra foi realizada com seringa estéril de 1 mL.

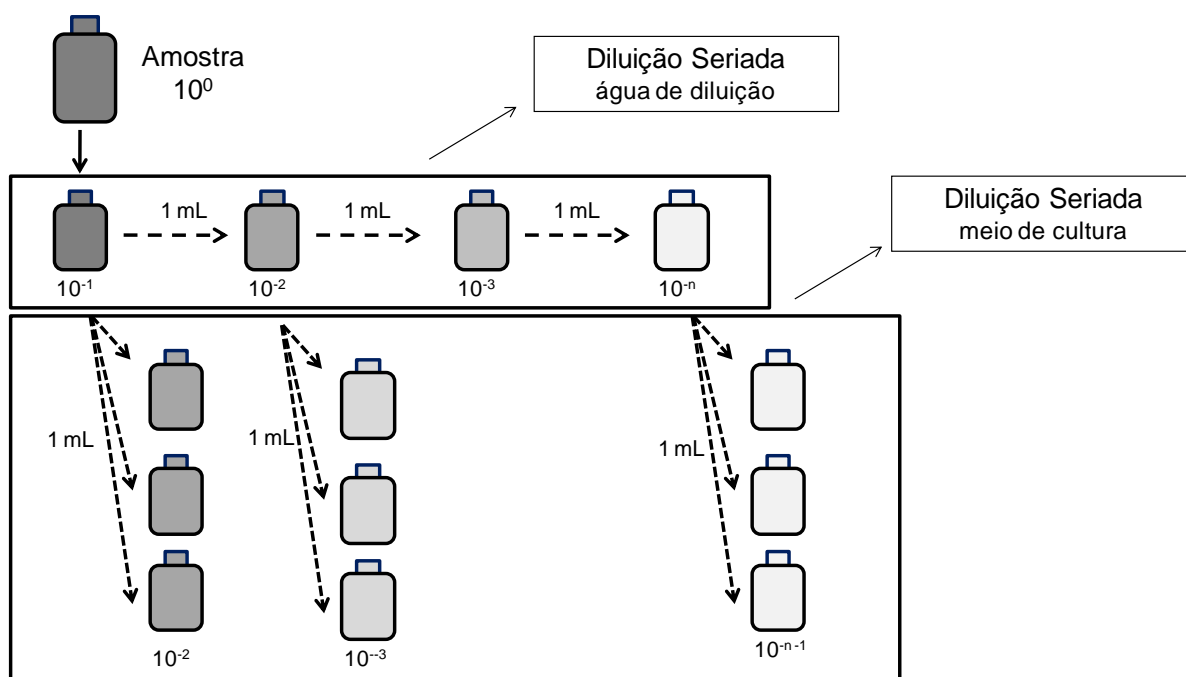


Figura 4.4: Esquema da diluição seriada utilizando água de diluição e inoculação em meio de cultura

A partir da diluição seriada com água de diluição foi realizada a inoculação em meio de cultura como detalhado anteriormente. Dessa forma, 1 mL de amostra do frasco de diluição foi inoculado em 9,0 mL de meio de cultura específico para cada população de microrganismos (Figura 4.4). A etapa de inoculação foi realizada em triplicata. Os frascos de contagem (NMP) foram incubados a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias.

4.12.4 Leitura do NMP

A leitura do NMP foi realizada conforme descrito na Tabela 4.8. As bactérias anaeróbias totais foram detectadas pela turvação do meio nas diferentes diluições. As arqueias metanogênicas foram quantificadas pela detecção de metano em cada frasco de contagem, por meio de análise de cromatografia gasosa. As bactérias redutoras de ferro pela presença de Fe II no meio a partir da reação com ferrozina (Gould *et al.*, 2002).

Tabela 4.8: Formas de detecção para as diferentes populações microbianas

População Microbiana	Deteção
Bactérias Anaeróbias Totais	Turvação do Meio
Arquéias Metanogênicas	Presença de Metano
Bactérias Redutoras de Ferro	Reação com Ferrozina 0,1% p/v (coloração rosada)

Os resultados positivos e negativos dos grupos microbianos em cada diluição serviram de base para estimar o número mais provável com base na tabela padrão de probabilidade (APHA, 2005). Após a consulta a tabela foi utilizada a fórmula abaixo para calcular NMP/100mL e, por conseguinte, NMP/gSTV.

$$\text{NMP (tabela APHA)} \times \frac{10}{10^y} = \text{NMP (células/100mL)} \quad (4.2)$$

Sendo:

y = menor diluição da série de combinações selecionadas

4.13 Análise Qualitativa da Diversidade Microbiana

Para análise filogenética da diversidade microbiana do reator EGSB foi utilizado o seqüenciamento do RNAr 16S. Segundo a literatura apenas microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* estão relacionados à remoção do LAS. Dessa forma foi utilizado apenas *primers* específicos para esse Domínio. Na Figura 4.5 estão detalhadas as etapas necessárias até o seqüenciamento das amostras.

As amostras foram retiradas de dois locais do reator, leito e copo, em duplicata. A amostra do leito do reator foi obtida de forma composta, para tanto, 5 mL foram retirados de cada ponto de amostragem distribuído ao longo do leito do reator (6 pontos no total). Em seguida, a amostra foi homogeneizada e armazenada. Na amostra da extremidade superior do reator (copo) foram retirados 30 mL com auxílio de uma seringa. Para tanto, a região superior do reator foi aberta para facilitar a coleta da biomassa depositada nessa região. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e armazenada. Em cada situação seguiu-se os procedimentos sintetizados na Figura 4.5.

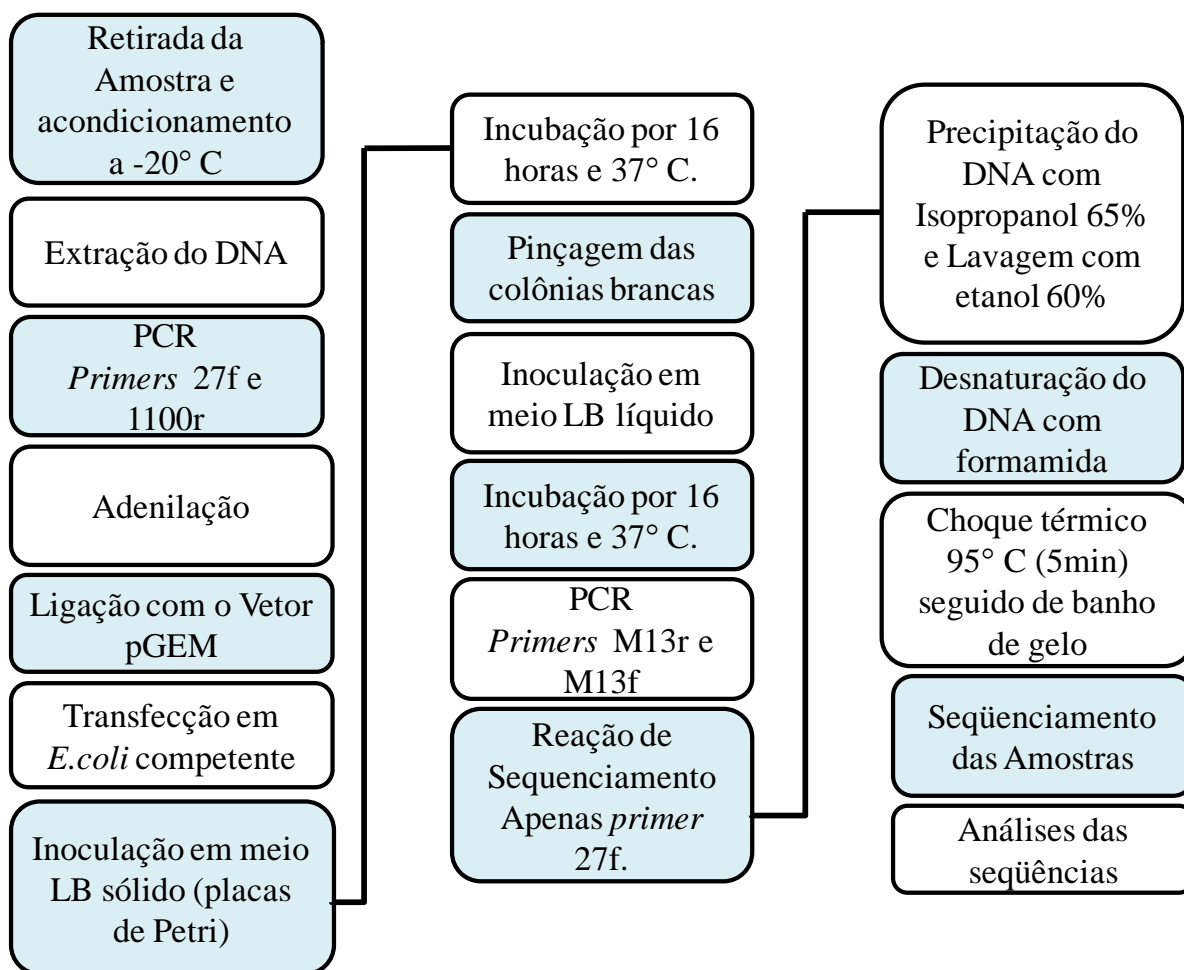


Figura 4.5: Seqüência de passos até o seqüenciamento das amostras do reator

4.13.1 Acondicionamento das amostras

O acondicionamento das amostras foi realizado da seguinte forma:

- As amostras do copo e do leito foram colocadas em tubo *Falcon* de 15 mL estéril,
- Centrifugou-se as amostras a 6.000 rpm por 10 minutos a temperatura de 4°C,
- Adicionou-se 5 mL de tampão fosfato (PBS) para lavagem do material,
- Descartou-se o sobrenadante,
- Repetiu-se o procedimento “c” e “d” por mais uma vez,
- As amostras foram armazenadas a – 20°C.

4.13.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído usando fenol/clorofórmio segundo metodologia descrita em Griffiths *et al.*, (2000) com alguns modificações em virtude do material biológico em questão.

4.13.3 Caracterização do domínio *Bacteria*

Para caracterização apenas do domínio *Bacteria* foram utilizados *primers* específicos descritos por Lane, (1991), 27F-1100R (Tabela 4.9) nas condições apresentadas na Tabela 4.10.

Tabela 4.9: *Primers* para amplificação da região 16S do domínio *Bacteria*

<i>Primers</i>	Seqüências (5' → 3')
27F	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
1100R	5'-AGG GTT GCG CTC GTT G-3'

Lane, 1991

Tabela 4.10: Programação do termociclador para os *primers* do domínio *Bacteria*

N° de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Resfriamento
30	94 °C	94 °C	55 °C	72°C	4 °C
	5 min	45 s	45 s	105 s	∞

Na Tabela 4.11 estão detalhados os reagentes e concentrações utilizadas para reação em cadeia da polimerase (PCR).

Tabela 4.11: Soluções para amplificação usando *primers* 27F e 1100R

Reagentes	Concentração	Quantidade para 1 amostra (µL)
H ₂ O ultrapura	-	3,0
Tampão PCR Invitrogen®	10X	5,0
MgCl ₂	50mM	1,5
dNTP (cada base nitrogenada)	2mM	5,0
<i>Primer</i> 27F	100pmol/µL	0,5
<i>Primer</i> 1100R	100pmol/µL	0,5
<i>Taq</i> DNA Polimerase Invitrogen®	5U/µL	0,5
Amostra	100ng	2,0

Previamente a clonagem, procedeu-se à purificação do produto de PCR utilizando o *Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* e as especificações detalhadas no manual.

4.13.4 Clonagem, Amplificação do DNA plasmidial e Sequenciamento

A clonagem em células competentes de *E.coli*, foi realizada utilizando os produtos de PCR purificados e 50ng do vetor plasmidial *pGEM Easy Vector System I*. Primeiramente, procedeu-se a adenilação dos fragmentos, utilizando 3µL do produto de PCR purificado, 1 µL de tampão PCR (10X) com MgCl₂, 1 µL de dATP (5mM), 1 µL de *Taq* DNA polimerase e 4,0 µL de água ultra purificada estéril. A incubação foi a 70°C por 30 minutos.

Para a reação de ligação do DNA ao vetor *pGEM* foram utilizados 5,0 µL de 2x *Rapid Ligation Buffer*, 1µL de *Vector pGEM-T easy* (50ng), 2 µL de produto de PCR adenilado e 1 µL de *T4 DNA ligase* (3 *weiss units*/µL). Misturaram-se os reagentes cuidadosamente e incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente (23 a 25°C). Logo em seguida, incubou-se por 16 horas a 4°C.

Para a transformação da *E.coli*, foram utilizados 3 µL do produto de ligação. Estes foram cuidadosamente homogeneizados com *E. coli* competente que estava em banho de gelo. Logo em seguida, foram transferidos para banho maria a 42°C por 50 segundos, sem agitação. Novamente, transferidas para banho de gelo por 2 minutos. Adicionou-se 200 µL meio Luria-Bertani (LB) (Tabela 4.12) à temperatura ambiente e incubou-se por 90 minutos a 37°C com agitação de 150rpm.

Tabela 4.12: Componentes do Meio Luria-Bertani (LB)

Componentes	Concetração (g/L)
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
Cloreto de Sódio	5
Ágar	15

Decorrido esse período, 150 µL do material transformado foram transferidos para uma placa de *Petri* contendo aproximadamente 25 mL de LB sólido, previamente preparado, e incubado a 37°C por 24 horas. Além do meio LB sólido, outros reagentes foram adicionados (Tabela 4.3).

Tabela 4.13: Componentes do meio LB para crescimento da *E.coli* transformada

Componentes	Concentração (mg/L)	Volume (q.s.p 50mL de LB)
Xgal	40	64µL
IPTG	23	80µL
Ampicilina	50	30µL

Após 24 horas as placas foram retiradas da estufa e colocadas na geladeira a 4°C por 1 hora para intensificação da cor das colônias azuis. Com o auxílio de uma ponteira apenas as colônias brancas foram pinçadas e transferidas para meio LB líquido (5 mL) contendo 3 µL de ampicilina (50mg/L) e incubadas por 16 horas a 37°C em câmara de germinação com agitação de 150 rpm.

Ultrapassada às 16 horas de incubação, os tubos que apresentaram turvação do meio foram selecionados para etapa seguinte. Essa etapa consistiu na transferência para tubo apropriado de parte do meio turvo. Esse material foi centrifugado a 10.000 rpm à 4°C.

A etapa de extração do DNA plasmidial não foi realizada. Ao invés disso, foi utilizado o par de *primers* descrito por Chun et al. (1995), detalhado na Tabela 4.14 para amplificação do DNA plasmidial.

Tabela 4.14: *Primers* específicos para amplificação do DNA plasmidial

<i>Primers</i>	Seqüências (5' → 3')
M13F	5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'
M13R	5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3'

Chun, 1995

Os componentes dessa PCR estão descritos na Tabela 4.11 nas condições apresentadas na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Programação do termociclador para amplificação do DNA plasmidial

N° de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Resfriamento
30	94 °C 3 min	94 °C 20 s	60 °C 20 s	72°C 1,5 min	4 °C ∞

A amplificação do DNA plasmidial foi verificada por eletroforese em gel de agarose. Apenas as amostras que apresentaram bandas por volta de 800bp foram selecionadas para etapa seguinte.

A etapa seguinte consistiu na purificação desse produto de PCR (M13f e M13r) com o *Kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* visando o seqüenciamento das amostras. Para tanto, foi utilizado Big Dye Terminator (Applied Biosystem®) com nucleotídeos marcados. Os reagentes da reação de seqüenciamento e volume estão mostrados na Tabela 4.16, nas condições do termociclador apresentadas na Tabela 4.17.

Tabela 4.16: Soluções para reação de seqüenciamento usando *primer 27F*

Componetes	Volume (µL)
Big Dye	1
Save \$	1
<i>Primer 27F</i> 10p/mol	3
Amostra (produto de PCR M13) purificado	2
Água ultra purificada	3

Tabela 4.17: Programação do termociclador para reação de seqüenciamento

N° de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Resfriamento
35	94 °C 2 min	94 °C 15 s	50 °C 15 s	60°C 2 min	4 °C ∞

Com o objetivo de retirar o excesso de moléculas fluorescentes foi realizado a precipitação do DNA com isopropanol 65%. Dessa forma, foram adicionados 40 µL de isopropanol 65% nos tubos eppendorff onde seriam realizadas as reações de seqüenciamento. Logo em seguida, centrifugou-os por 30 minutos a 20°C a 14.000 rpm. Ultrapassado os 30 minutos, o excesso de isopropanol foi retirado pela inversão do tubo seguido da adição de 200 µL de etanol 60%. Novamente, centrifugou-se nas mesmas condições anteriores, porém por apenas 5 minutos. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente (23°C a 25°C) por 16 horas até a evaporação total do etanol.

Aos *pellets* foram adicionados 15 µL de formamida seguido de choque térmico (94°C por 5 minutos e 4°C por tempo indefinido). A leitura das seqüências de nucleotídeos foi realizada em analisador automático de DNA modelo ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®).

4.13.5 Análise das Seqüências de DNA

Para as análises das seqüências de DNA foram utilizados os programas detalhado na Tabela 4.18.

As seqüências foram inspecionadas utilizando o programa SeqMan para o polimento e retirada de regiões com baixa qualidade de sinal. Concomitantemente, foi construído um banco de dados com essas seqüências analisadas no formato FASTA.

Esse banco de dados foi confrontado com o banco de dados do RDP-project (Ribossomal Database Project) utilizando o RDP-*classifier* para comparar cada seqüência e RDP *Library compare* para comparar bibliotecas de RNAr 16S.

Logo em seguida, as amostras foram alinhadas utilizando o programa ClustalW 2.0. Esse procedimento é necessário para utilizar as demais ferramentas. O alinhamento ocorreu juntando os clones da região do copo e os clones da região do leito. Esse arquivo foi inserido no programa Phylip DNAdist (algoritmo de Kimura) para elaboração da matriz de distancia evolutiva que é requisito para utilização do programa DOTUR.

Inserida a matriz de distancia evolutiva no programa DOTUR foi possível estabelecer as UTOs e elaborar a curva de rarefação com diferentes distâncias evolutivas. A árvore filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA método *Neighbor-Joining*, e *bootstrap* de 100 amostragens.

Tabela 4.18: Programas utilizados para analisar as seqüências de DNA

Programa	Função	Onde localizar
Seqman	Polimento das seqüências de DNA com retirada das extremidades em função da qualidade do seqüenciamento	http://www.dnastar.com/t-sub-products-lasergene-seqmanpro.aspx
RDP <i>classifier</i> e RDP <i>Library Compare</i>	Classificação inicial das seqüências e Comparação das bibliotecas, respectivamente	http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp e http://rdp.cme.msu.edu/comparison/compare.jsp
ClustalW 2.0	Alinhamento das seqüências de DNA	http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=dnadist
Phylip DNAdist	Construção da matriz de distancia evolutiva	http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=dnadist
DOTUR	Definição das UTOs e Curva de Rarefação observando varias distancias evolutivas	http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur/downloads.html
MEGA	Elaboração da árvore filogenética	http://www.megasoftware.net/

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Remoção de Matéria Orgânica

Os co-substratos utilizados nesse trabalho foram metanol e etanol. Ambos são compostos facilmente degradáveis pela comunidade microbiana presente no reator. A utilização de metanol teve por finalidade favorecer o crescimento preferencial de arqueias metanogênicas, especificamente *Methanosarcina* (JETTEN *et al.*, 1991). Tais microrganismos usam preferencialmente os seguintes substratos para a metanogênese: hidrogênio, dióxido de carbono, metanol, metilaminas e acetato (GUJER & ZEHNDER, 1983).

Arqueias metanogênicas, semelhantes a *Methanosaeta*, também, fazem parte da comunidade microbiana de grânulos de reatores UASB e EGSB. Tais arqueias metanogênicas apresentam maior afinidade para o acetato ($K_s=0.46$ mM) em relação a *Methanosarcina* ($K_s=3-5$ mM), todavia, a *Methanosaeta* cresce mais lentamente que *Methanosarcina* (GUJER & ZEHNDER, 1983). Huser *et al.*, (1982) relataram que *Methanosarcina barkeri* e *Methanosarcina mazei* têm tempos de duplicação de aproximadamente 24 horas, enquanto, *Methanosaeta* pode duplicar a sua população em 3,5 e até 9 dias.

Desse modo, essas arqueias metanogênicas acetoclásticas contribuem significativamente na utilização do ácido acético, evitando assim, seu acúmulo, o qual interfere na remoção do LAS, uma vez que está relacionado com a estabilidade do reator, de acordo, com os dados obtidos por Lobner *et al.*(2005).

Além disso, segundo Abboud *et al.* (2007), co-substratos são necessários para os microrganismos responsáveis pela degradação do LAS permanecerem com atividade enzimática estável. Portanto, a utilização de metanol e etanol é apropriada durante o primeiro contato das as bactérias com o LAS (Schörberl, 1985).

Na Tabela 5.1 e Figura 5.1 estão sintetizados os valores médios de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção no reator EGSB.

Tabela 5.1: Síntese dos resultados de DQO

Parâmetro	Etapas			
	I	II	III	IV
DQO				
Afluente (mg/L)	573±140	812±92	856±82	798±78
Efluente (mg/L)	11±12	30±25	30±17	45±25
Remoção (%)	97,6±2,9	96,3±3,4	96,7±1,8	94,2±3,8
Carga Orgânica Aplicada (kgDQO/d)	0,8±0,08	0,8±0,12	0,6±0,03	0,8±0,03
TDH (h)	32,2±10,2	32,0±15,1	26,0±4,5	32,0±4,5
Duração (dias)	48	52	111	74

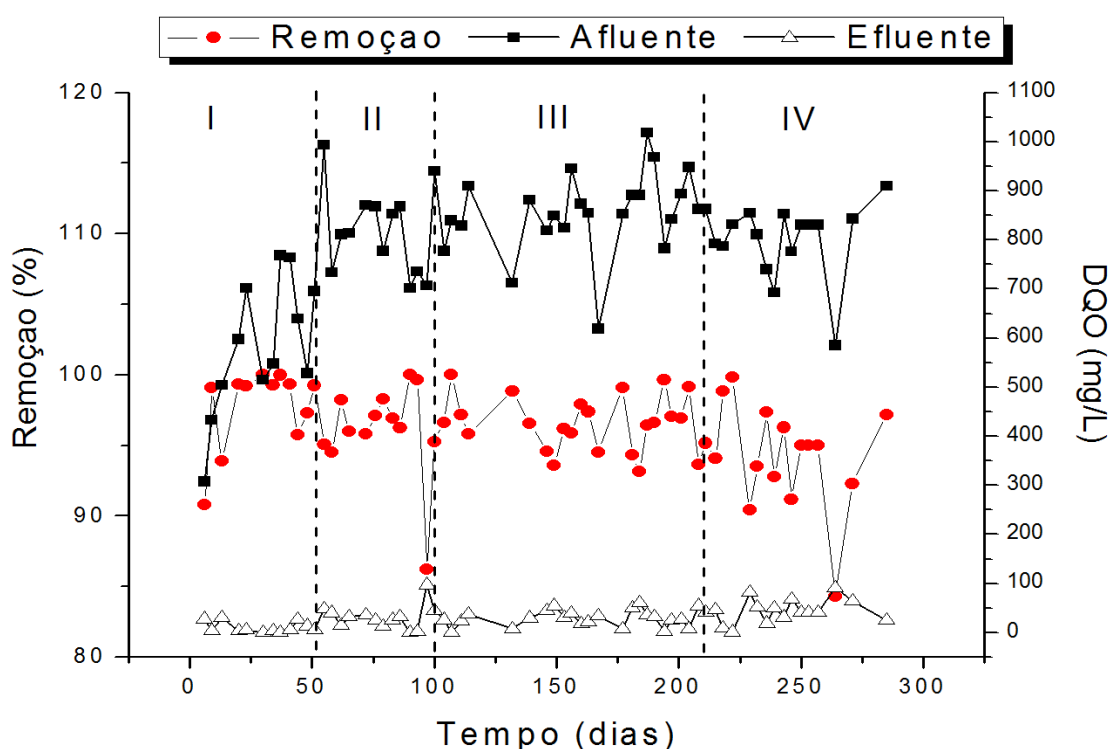


Figura 5.1: Variação temporal da matéria orgânica

Na Etapa I, com duração de 48 dias e TDH de $32,2\pm 10,2$ horas foi obtida DQO média afluente de 573 ± 140 mg/L, com eficiência média de remoção de $97,6\pm 2,9$ %. Com exceção do primeiro dia, em que a remoção foi de 90%, em todos os demais dias obteve-se valor superior a 95%. Isso demonstrou rápida adaptação da biomassa às condições hidráulicas do reator e a composição dos substratos orgânicos.

Na Etapa II, com duração de 52 dias e TDH de $32,0\pm 15,1$ horas adicionou-se LAS à alimentação na concentração de $14,04\pm 1,26$ mg/L. A DQO média afluente foi de 812 ± 92

mg/L com eficiência de remoção de $96,3\pm 3,4\%$. Nessa etapa, verificou-se que mesmo com a adição de LAS, a remoção de DQO não foi alterada, apresentando valores próximos aos da Etapa I.

Segundo, Garcia *et al.* (2006), a concentração e a distribuição dos homólogos da molécula de LAS apresentam relação direta com a toxicidade desse surfactante. Segundo esses autores, 14 mg/L de LAS, na fase líquida foi considerado tóxico para os microrganismos anaeróbios, uma vez que reduziu em 50% a produção de biogás.

Entretanto, assim como nesse trabalho, outros autores não tiveram a remoção de DQO afetada com a adição de LAS (DUARTE *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010a). Um dos motivos que pode explicar tal fato é que Garcia *et al.* (2006) realizaram os testes em reator de batelada (250 mL), com proporção gás/líquido de 3:7, enquanto, nos demais trabalhos citados os reatores foram operados em fluxo contínuo.

O maior tempo de contato da biomassa com o LAS pode prejudicar a atividade bacteriana (MOSCHE & MEYER, 2002). Além disso, reatores de alta taxa, tais como, EGSB, suportam altas cargas orgânicas; ou seja, maiores que $15 \text{ kgDQO/m}^3\text{.d}$. Todavia, a carga orgânica volumétrica desse trabalho foi de aproximadamente $0,8 \text{ kgDQO/m}^3\text{.d}$. Portanto, uma carga orgânica volumétrica baixa comparada a potencialidade que esse reator pode suportar.

Na Etapa III, com duração de 111 dias e TDH $26,0\pm 4,5$ horas, a concentração de matéria orgânica afluenta foi de $856\pm 82 \text{ mg/L}$, com eficiência média de remoção de $96,7\pm 1,84\%$. Os valores de DQO efluente foram de $30\pm 17 \text{ mg/L}$.

Na Etapa IV com duração de 74 dias e TDH $32,0\pm 4,5$ horas, a DQO afluenta foi de $798\pm 78 \text{ mg/L}$. Dentre todas as etapas, essa foi a que apresentou maior DQO efluente $45\pm 25 \text{ mg/L}$, resultando em eficiência de remoção de $94,2\pm 3,83 \%$. Diante desses resultados evidenciou-se tendência na redução da remoção de matéria orgânica, uma vez que nas outras etapas os valores médios de remoção foram acima de 96%. Após 162 dias de operação, com 14 mg/L de LAS afluenta é compreensível que a biomassa tenha sido prejudicada em virtude do longo tempo de exposição ao surfactante. Todavia, esse valor de remoção de matéria orgânica foi satisfatório, quando comparado com outras configurações de reatores anaeróbios usados na remoção de LAS.

5.2 Remoção de LAS

Na Tabela 4.2 estão resumidos os resultados obtidos com relação à concentração de LAS afluenta, efluente, carga de LAS aplicada, remoção específica e eficiência de remoção

no reator EGSB. A remoção de LAS pode ser analisada de duas formas: a partir da razão entre carga de LAS removida por carga de LAS aplicada e pela diferença entre a concentração afluyente e efluente.

Na Figura 5.2 e Figura 5.3 encontram-se delineadas a variação temporal do LAS e variação temporal da relação carga de LAS removida por carga de LAS aplicada, respectivamente.

Tabela 5.2: Síntese dos resultados de LAS no reator EGSB

LAS	Etapas			
	I	II	III	IV
Afluente (mg/L)	-	14,04±1,2	14,41±1,0	13,33±3,2
Efluente (mg/L)	-	3,96±1,1	7,51±1,0	4,88±1,5
Remoção (%)	-	73,6±5,6	47,8±6,2	63,6±6,17
Carga Específica (mg.gVS ⁻¹ .d ⁻¹)	-	1,63±0,48	2,61±0,54	1,45±0,54
Remoção Específica (mg.gVS ⁻¹ .d ⁻¹)	-	1,22±0,42	0,9±0,22	0,97±0,14
Remoção Específica/Carga Específica	-	0,75	0,34	0,67
TDH (h)	32,2±10,2	32,0±15,16	26,0±4,57	32,0±4,57
Duração (dias)	48	52	111	74

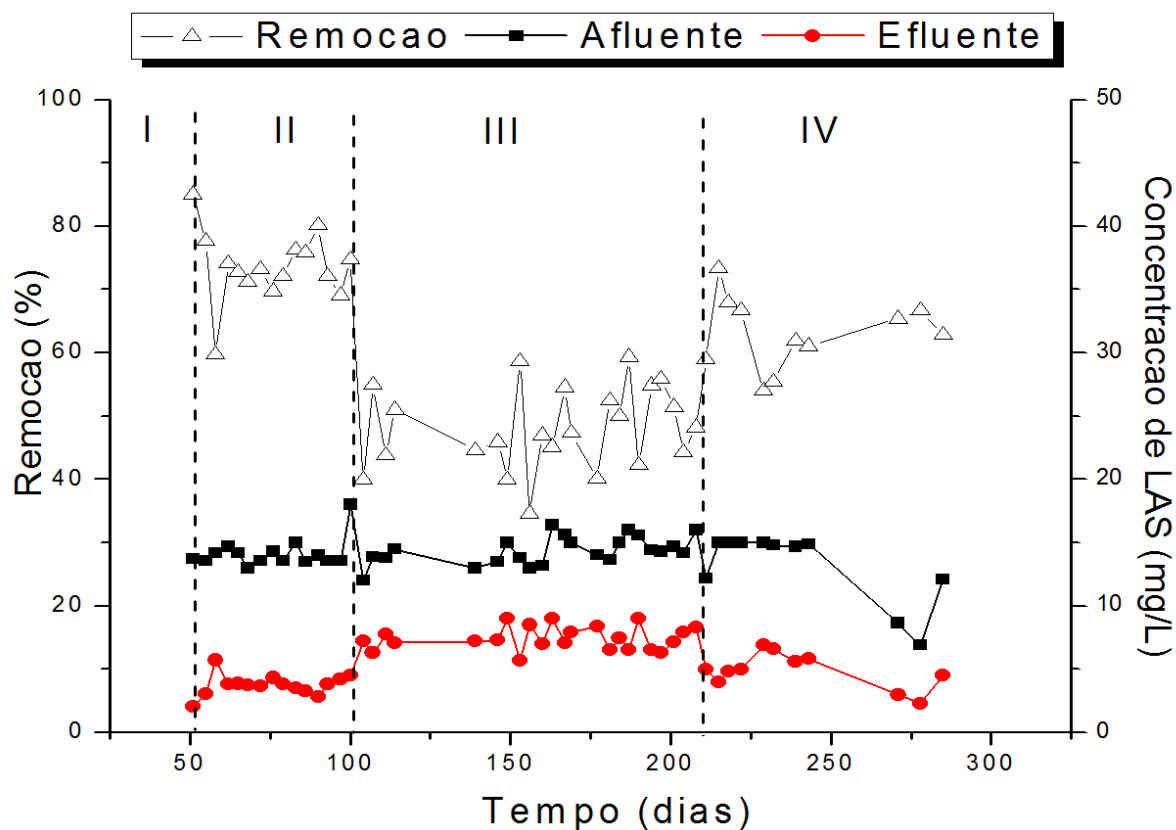


Figura 5.2: Variação temporal da concentração de LAS afluente, efluente e remoção.

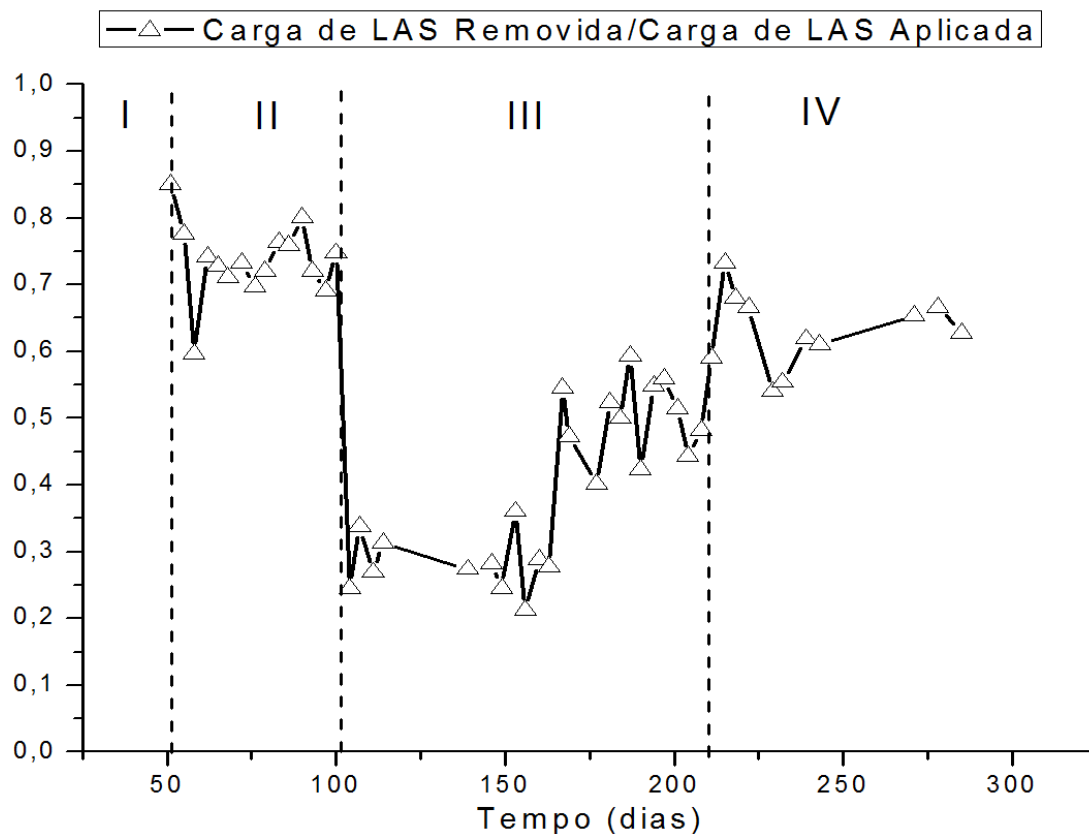


Figura 5.3: Relação carga de LAS removida por carga de LAS aplicada

As pequenas variações de LAS afluente durante a operação do reator EGSB estão relacionadas a precisão do método de determinação e a possíveis erros de amostragem, uma vez que, a coleta da amostra era realizada no frasco de alimentação contendo 5,5L. Contudo os desvios obtidos em cada parâmetro das etapas foram baixos.

A adição de LAS, ocorreu a partir da Etapa II, com concentração inicial de $14,04 \pm 1,2 \text{ mg/L}$, não sendo de forma gradual, o que afetou negativamente a biomassa presente no reator. Tal fato, pode ser observado analisando os resultados de granulometria, sólidos (item 5.4) e NMP (item 5.9).

A remoção de surfactante de água residuária, em especial do LAS, pode ocorrer da seguinte forma: precipitação, adsorção e degradação biológica. Portanto, a palavra remoção de LAS está ligada a todos os processos acima citados, todavia, quando usamos a palavra degradação de LAS estamos nos referindo exclusivamente a processos biológicos.

A molécula de LAS apresenta características adsorptivas acentuadas. Quanto maior a cadeia alquílica maior será o caráter hidrofóbico da molécula. Dessa forma, a concentração na fase líquida desse surfactante diminui significativamente com o aumento da cadeia alquílica

(Garcia *et al.*,2005). Os homólogos da molécula de LAS que apresentam maior hidrofobicidade tendem a sofrer maior adsorção.

No 51° dia de operação ficou evidente essa adsorção do LAS na biomassa granulada, ou seja, no primeiro dia de adição do LAS na alimentação. Nesse dia, a eficiência de remoção de LAS foi de 85%, 11%; ou seja, acima da média de remoção nessa etapa. No 55° dia de operação a remoção foi de 77%; ou seja, mais próximo a média (73,6±5,6%) observada durante essa etapa. Provavelmente, o período de saturação da adsorção à biomassa granulada foi de cinco dias.

A Etapa II (TDH 32,0±15,16 horas) foi caracterizada por remoção de LAS de 73,6±5,6%, com valor efluente de 3,96±1,1mg/L. O desvio padrão obtido para LAS afluente e efluente foram baixos indicando reduzida oscilação na remoção do surfactante. A remoção específica média dessa etapa foi de 1,22±0,42 mg.gVS⁻¹.d⁻¹ para carga específica de 1,63±0,48 mg.gVS⁻¹.d⁻¹.

A Etapa III foi caracterizada pela diminuição do TDH para 26,0±4,57 horas. Desse modo, a carga específica de LAS passou de 1,63±0,48 mg.gVS⁻¹.d⁻¹ para 2,61±0,54 mg.gVS⁻¹.d⁻¹, portanto, variação de aproximadamente 62%. Para maior carga de LAS aplicada por biomassa, à remoção de LAS diminuiu para 47,8±6,2 %, para concentração média efluente de 7,51±1,0 mg/L. Dessa forma, a mudança no TDH e, conseqüentemente, na carga específica de LAS resultou em variação acentuada da remoção do surfactante.

A Etapa III teve duração de 111 dias, a maior entre todas as etapas impostas ao reator EGSB. Esse prolongado tempo de operação teve por objetivo analisar a possível recuperação da eficiência de remoção do reator para TDH menor. Todavia, os resultados de remoção do surfactante, nessa etapa, não chegaram a atingir 60%.

A Etapa IV foi caracterizada pela retomada das condições impostas na Etapa II. Dessa forma, o TDH de operação foi de 32,0±4,57 horas e 13,33±3,18 mg/L de LAS afluente. A carga específica de LAS nesse período foi de 1,38±0,54 mg.gVS⁻¹.d⁻¹, apenas 18% menor que a carga aplicada na Etapa II (1,63±0,48 mg/L) e 89% menor quando comparado com a Etapa III. Desse modo, com a retomada das condições semelhantes à Etapa II acreditava-se que a remoção de LAS fosse re-estabelecida. Entretanto, a remoção de LAS diminuiu 10%, quando comparado com a Etapa II, e aumentou 16% quando comparado com a Etapa III. Testes estatísticos *Anova one-way* seguido do Teste de *Tukey* comprovaram diferença significativa na remoção de LAS para as diferentes etapas.

Provavelmente, a longa exposição da biomassa ao LAS, 211 dias, foi um dos principais fatores que prejudicou a eficiência de sua remoção no sistema. O efeito dessa exposição prolongada pode ser observado nos resultados obtidos de sólidos (item 5.4), granulometria (item 5.4) e ácidos voláteis totais (item 5.5). A eficiência de remoção de DQO (Tabela 5.1), na etapa Etapa IV foi ligeiramente menor, quando comparado com as demais etapas, porém não estatisticamente diferente. Além disso, foi possível constatar de forma notória que as mudanças de TDH durante a operação do reator EGSB (etapas de operação) afetaram diretamente a remoção do surfactante (Figura 5.4).

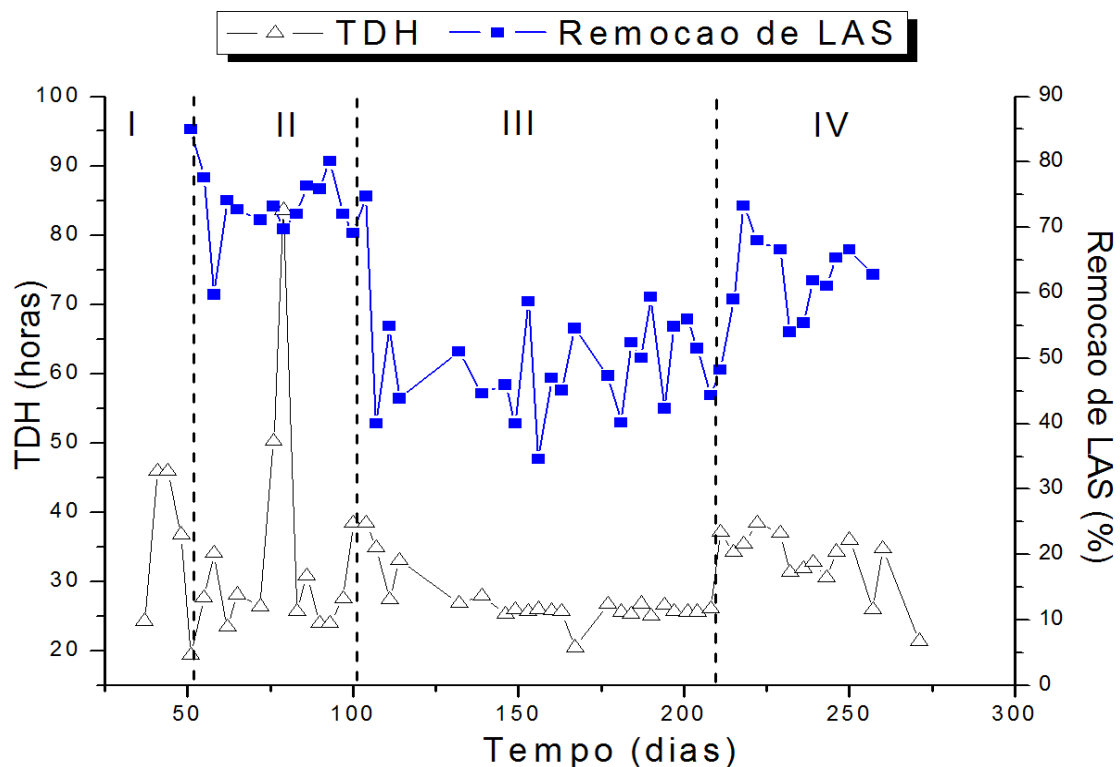


Figura 5.4: Relação TDH e remoção de LAS

Os resultados obtidos nesse estudo, quando comparados com outras pesquisas de remoção de LAS indicaram que o reator EGSB apresentou elevada remoção de LAS nas condições testadas (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Comparação dos resultados obtidos com a literatura

Reator	Inóculo	Alimentação	TDH	LAS afluente	Remoção	Referência
			horas	mg/L	%	
RAHLF	Lodo de ETE	LAS + substrato sintético	12	14	35	(DUARTE <i>et al.</i> , 2008)
RAHLF	UASB abatedouro de aves	LAS + substrato sintético	12	14	35	(DUARTE <i>et al.</i> , 2008)
RAHLF	UASB abatedouro de aves	LAS + substrato sintético	12	14	28	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009)
RAHLF	UASB abatedouro de aves	LAS + substrato sintético	12	14	27	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009)
Leito Fluidificado	UASB abatedouro de aves	LAS + substrato sintético	18	45	93	(DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010b)
EGSB	UASB abatedouro de aves	LAS + Meio Mineral	32	14	74	Nesse Estudo
EGSB	UASB abatedouro de aves	LAS + Meio Mineral	26	14	48	Nesse Estudo

As características hidráulicas do reator EGSB, tais como, recirculação do efluente e, conseqüentemente, melhor transferência de massa foram atributos positivos que permitiram alcançar elevada remoção de LAS. Assim como, o efeito do TDH sobre a remoção do surfactante, explicado anteriormente. A diluição da alimentação em cada etapa de operação (Tabela 4.1) em virtude da recirculação do efluente diminuiu a toxicidade do surfactante contribuindo para sua remoção.

5.3 Alcalinidade, pH, Sulfato e Sulfeto

Por se tratar de um processo anaeróbico, o controle de variáveis como pH e alcalinidade é essencial para otimização da remoção de matéria orgânica. Mudanças bruscas nesses parâmetros afetam a microbiota presente no reator, comprometendo o processo como um todo. Dessa forma, foi monitorado semanalmente esses parâmetros visando a manutenção da estabilidade do reator com valores de pH (Tabela 5.4) próximos da neutralidade (pH 7,0), para tanto ocorreu, também, o monitoramento da alcalinidade (Tabela 5.4). A manutenção da estabilidade do reator segundo Lobner *et al.* (2005) aumenta a eficiência de remoção de LAS.

As variações de pH afluente entre as etapas de operação não ultrapassaram 3% quando comparadas entre si. Mesmo com a adição de LAS, na Etapa II, não ocorreu comprometimento do pH do sistema. Em relação ao efluente, a variação em porcentagem não ultrapassou 4% comparando todas as etapas. O menor valor obtido foi para a Etapa I, com pH $7,16 \pm 0,20$, enquanto, o maior valor observado foi na Etapa IV, com pH $7,4 \pm 0,08$. Portanto, de modo geral a adição do LAS não comprometeu o pH do sistema.

Tabela 5.4: Valores médios de pH, alcalinidade, sulfato e sulfeto

Parâmetros	Etapas			
	I	II	III	IV
pH				
Afluente	$7,47 \pm 0,26$	$7,66 \pm 0,06$	$7,67 \pm 0,14$	$7,62 \pm 0,07$
Efluente	$7,16 \pm 0,20$	$7,27 \pm 0,11$	$7,27 \pm 0,13$	$7,4 \pm 0,08$
Alcalinidade Parcial (mg CaCO₃/L)				
Afluente	245 ± 57	315 ± 23	325 ± 34	357 ± 25
Efluente	170 ± 45	283 ± 16	288 ± 32	309 ± 36
Alcalinidade Total (mg CaCO₃/L)				
Afluente	314 ± 67	399 ± 18	435 ± 45	457 ± 29
Efluente	230 ± 51	371 ± 23	395 ± 36	395 ± 47
Sulfato (mg/L)				
Afluente	-	-	-	-
Efluente	-	$2,29 \pm 1,26$	$3,21 \pm 3,9$	$3,13 \pm 5,1$
Sulfeto (mg/L)				
Afluente	-	-	-	-
Efluente	-	$0,275 \pm 1,3$	$0,111 \pm 3,9$	$0,04 \pm 5,1$
TDH (h)	$32,2 \pm 10,2$	$32,0 \pm 15,1$	$26,0 \pm 4,5$	$32,0 \pm 4,5$
LAS Afluente (mg/L)	-	$14,04 \pm 1,2$	$14,41 \pm 1,0$	$13,33 \pm 3,2$
Duração (dias)	48	52	111	74

Bicarbonato de sódio foi adicionado ao reator de forma gradativa, portanto, justifica o baixo valor de alcalinidade afluente na Etapa I, tanto, para alcalinidade parcial, como para alcalinidade total, quando comparado com as demais etapas. A variação afluente da alcalinidade parcial foi de 45% comparando-se a Etapa I (menor valor, 245 mg CaCO₃/L) com a Etapa IV (maior valor, 357 mgCaCO₃/L). A adição de LAS não afetou a alcalinidade parcial afluente e efluente do reator (Tabela 5.4).

Ocorreu variação de 7,5%, 10% e 15% da alcalinidade total afluente e efluente nas Etapas II, III e IV, respectivamente. Analisando os resultados de pH, alcalinidade total e

parcial pode-se inferir que o sistema apresentou boa capacidade de tamponamento, e conseqüentemente, operação estável.

Em relação aos compostos de enxofre, deve-se salientar que na composição nutricional do meio mineral (Tabela 4.3) não está contemplada fonte de enxofre. Portanto, a única fonte de enxofre na alimentação do reator foi o LAS (Figura 3.1). Portanto, os baixos valores obtidos com relação a sulfato e sulfeto (Figura 5.5 Figura 5.6) foram em virtude da baixa concentração de enxofre na molécula de LAS. As análises de sulfato e sulfeto ocorreram apenas após a adição do LAS tentando estabelecer relação entre remoção de LAS e produção de sulfato/sulfeto.

A etapa final da degradação do LAS é a abertura do anel aromático. Quando isso acontece, a degradação progride rapidamente com a formação de biomassa, dióxido de carbono, água e sulfato. A etapa mais difícil é a ruptura da ligação do radical alquila com o anel aromático sulfonado (CAVALLI *et al.* 1993).

Em sistemas de lodos ativados Cordon *et al.* (1968) observaram liberação de sulfato proveniente do grupo sulfonado do LAS, após 21 dias de operação, correspondendo a 89% da quantidade teórica de LAS adicionada ao reator. Os estágios finais da degradação do LAS correspondem a ruptura do anel aromático e, conseqüentemente, liberação de sulfato.

Denger *et al.* (1997) observaram que o LAS pode ser usado como fonte de enxofre para bactérias anaeróbias sob condições limitadas de sulfato. Os autores usaram cultura enriquecida com LAS em condição anóxica, em meio contendo glicose. Segundo os autores ocorreu a utilização do surfactante, como fonte de enxofre, para o crescimento microbiano. Nessa cultura foi constatada similaridade com bactérias dos gêneros *Aeromonas* (88,2 – 90,1%) e *Shewanella* (87-88,1%).

A concentração média de sulfato efluente foi de $2,29 \pm 1,26$ mg/L na Etapa II, menor valor entre todas as etapas. Na Etapa III ocorreu aumento de 40%, ou seja, esse valor foi de $3,21 \pm 3,9$ mg/L. Na Etapa IV notou-se ligeira diminuição de 2,5%, cujo valor foi de $3,13 \pm 5,1$ mg/L. Destaca-se, portanto, que para concentração reduzida de enxofre, é favorecida a redução assimilativa de sulfato, uma vez que o enxofre é incorporado em constituintes celulares, principalmente aminoácidos e, portanto, baixa produção de sulfeto. Todavia, o sulfeto pode ter sido produzido e, imediatamente consumido por outros microrganismos.

As oscilações nos valores de sulfato podem ser originárias das seguintes considerações: (1) proveniente da oxidação direta do sulfito da molécula de LAS, (2)

proveniente do desproporcionamento biológico do sulfito com formação de sulfato e ácido sulfídrico, (3) e utilização do sulfato para redução assimilativa.

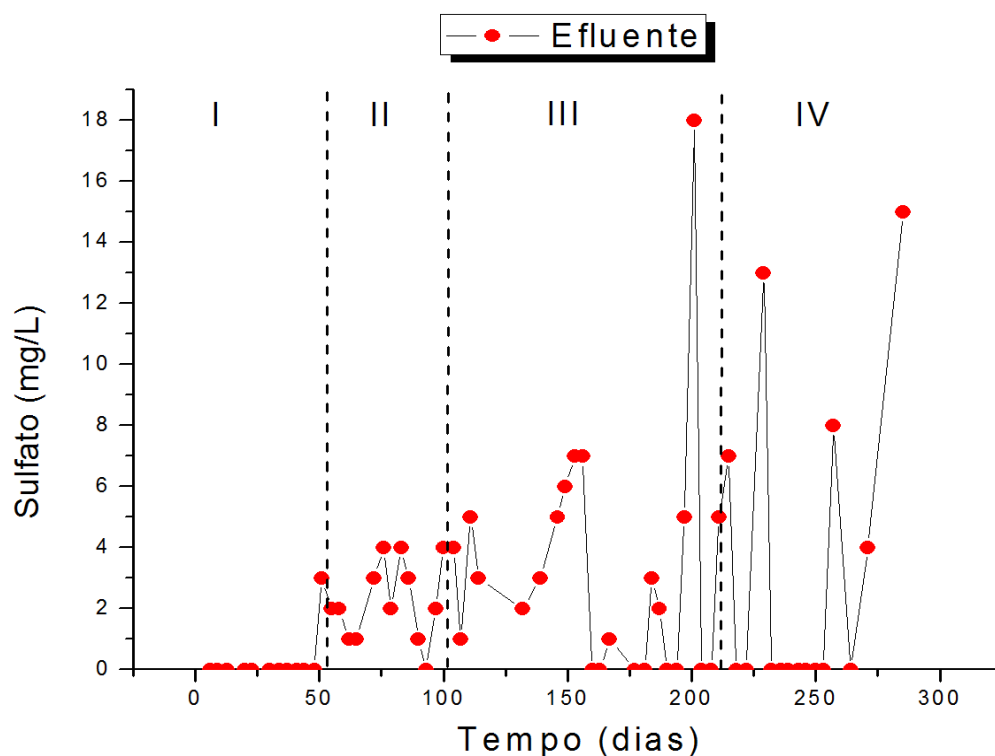


Figura 5.5: Variação temporal do sulfato

Os valores médios de sulfeto efluente não ultrapassaram a 0,3 mg/L. Notou-se diminuição da concentração de sulfeto durante a operação do reator EGSB. O maior valor obtido foi na Etapa II com concentração afluente de $0,275 \pm 1,3$ mg/L, seguido de $0,111 \pm 3,9$ mg/L na Etapa III e $0,04 \pm 5,1$ mg/L na Etapa IV. Valores próximos foram obtidos por Oliveira, 2010, com concentrações baixas de sulfato e sulfeto, todavia, utilizando extrato de levedura na alimentação que representava uma fonte extra de enxofre excluindo o LAS.

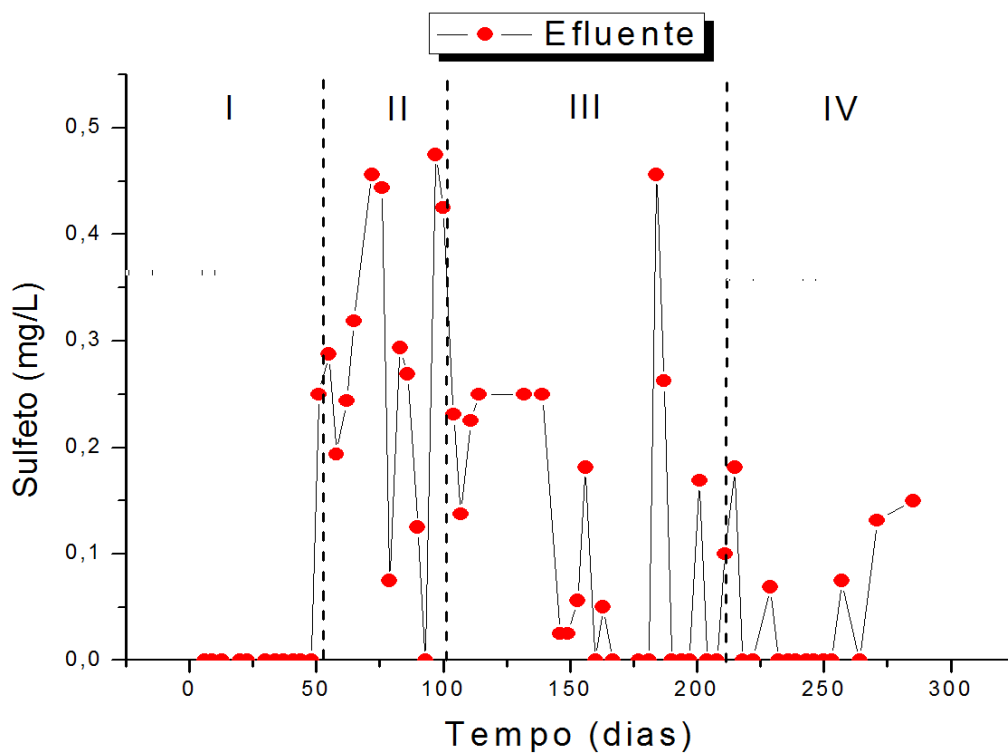


Figura 5.6: Variação temporal do sulfeto

5.4 Granulometria e Sólidos Totais

Os valores de sólidos totais e sólidos voláteis efluente durante a operação do reator EGSB estão apresentados na Tabela 5.5. Os valores de granulometria referentes as etapas I, III e IV estão descritos na Tabela 5.6 e mostrados na Figura 5.7. A granulometria das amostras da Etapa II não foi realizada, uma vez que os valores de sólidos totais estavam elevados. Dessa forma a retirada de mais biomassa para essa análise poderia desestabilizar o reator.

Tabela 5.5: Resultados de sólidos do reator EGSB

Parâmetros	Etapas			
	I	II	III	IV
Sólidos				
Totais (g/L)	0,049	0,128	0,064	0,038
Voláteis (g/L)	0,049	0,128	0,045	0,038
TDH (h)	32,2±10,2	32,0±15,16	26,0±4,57	32,0±4,57
LAS Afluente (mg/L)	-	14,04±1,2	14,41±1,0	13,33±3,2
Duração (dias)	48	52	111	74

A Etapa I foi caracterizada por apresentar 0,049 g/L de sólidos totais. A adição de LAS na Etapa II acarretou em aumento de sólidos totais de 261%, ou seja, teve aumento acentuado na quantidade de sólidos no efluente. A hipótese mais plausível para este fenômeno, provavelmente, foi a instabilidade devido à adição de LAS no reator de forma abrupta, ou seja, em concentração de $14,04 \pm 1,2$ mg/L.

A não adaptação da biomassa afeta negativamente os microrganismos, desestruturando o grânulo. Ruffo *et al.* (1999) estudou a degradação do LAS por processos aeróbios utilizando inóculo adaptado e não adaptado. Os autores constataram que a adaptação do inóculo com LAS representou um ganho na taxa de remoção de surfactante, assim como, tendência no aumento da sua remoção. Para o lodo adaptado a biodegradação em 28 dias foi de 69,6%, enquanto que para o lodo não adaptado foi de 66,7%.

Dessa forma, no reator EGSB, os grânulos tiveram efeito negativo (diminuição do diâmetro médio) com a adição do LAS, uma vez que este não foi adicionado de forma gradativa na alimentação do reator. Além do aumento da quantidade de sólidos efluente, outros efeitos foram observados, tais como, aumento da concentração de ácidos totais voláteis (Tabela 5.7).

Embora, o grânulo funcione com estrutura protetora, principalmente para as arqueias metanogênicas que são mais sensíveis a compostos tóxicos como o LAS, tal estrutura foi relativamente suficiente para a proteção dos microrganismos.

Na Etapa III a concentração de sólidos totais foi de 0,064 g/L, exatamente 50% menor que a fase anterior. Decorrido, 52 dias de operação com LAS na concentração de $14,04 \pm 1,2$ mg/L e TDH de 32 horas, a biomassa estava mais adaptada a condição com LAS, portanto a concentração de sólidos totais efluente foi bem menor. Deve-se destacar que a maior parte dos sólidos efluente correspondeu aos sólidos totais voláteis que representam em grande parte a biomassa. Essa evidencia, também foi observada na Etapa IV que apresentou 0,038 g/L de sólidos totais.

Tabela 5.6: Distribuição do diâmetro dos grânulos nas diferentes etapas

Intervalo de Classes (cm)	Etapas		
	I	III	IV
	Frequências (%)		
0,00 - 0,05	0	0	0
0,05 - 0,10	0	0	0
0,10 - 0,15	0	0	0
0,15 - 0,20	0	1	0
0,20 - 0,25	1	0	0
0,25 - 0,30	6	2	23
0,30 - 0,35	36	28	54
0,35 - 0,40	40	42	18
0,40 - 0,45	13	10	4
0,45 - 0,50	2	1	0
0,50 - 0,55	1	0	0
0,55 - 0,60	0	0	0
0,60 - 0,65	0	0	0
Diâmetro médio dos grânulos (cm)	0,36±0,044	0,36±0,038	0,34±0,036

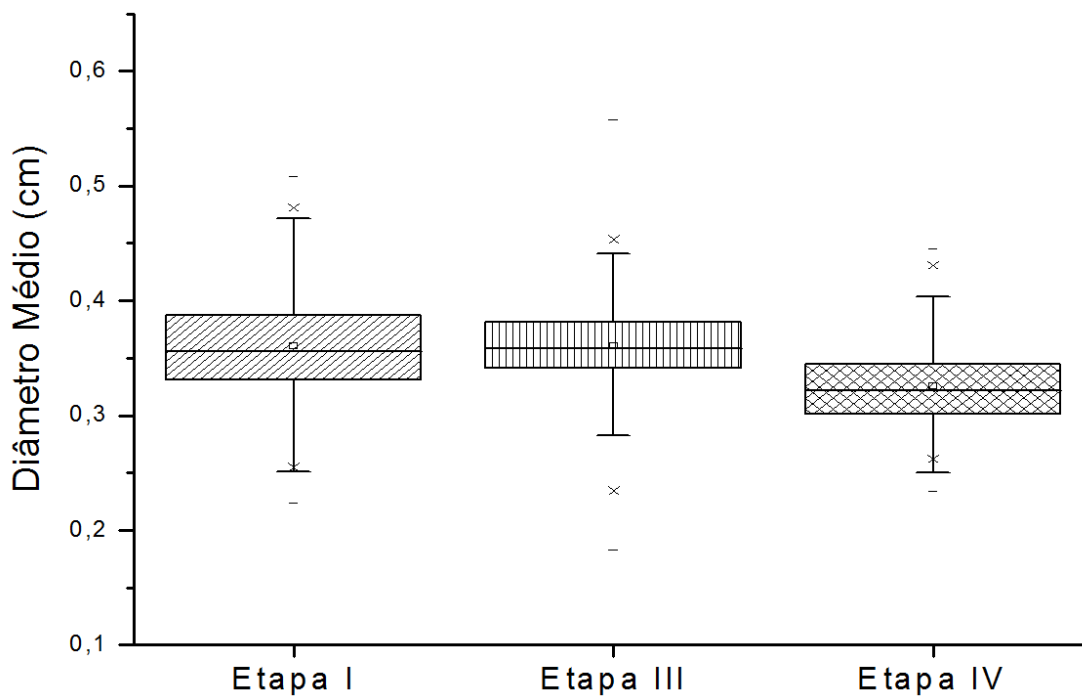


Figura 5.7: Granulometria das Etapas I, II e IV. As barras representam os valores máximos e mínimos e o (□) mostra a média.

Na Etapa I, foi verificada maior frequência de grânulos com diâmetro de 0,35 - 0,40 (cm) e média de $0,36 \pm 0,044$ cm (Tabela 5.6). Na Etapa III os resultados foram semelhantes a Etapa I, com média de $0,36 \pm 0,038$ cm. Todavia, na Etapa IV ocorreu diminuição de 6% do diâmetro médio dos grânulos, com média de $0,34 \pm 0,036$ cm. Duas explicações são possíveis para isso, longo tempo de exposição da biomassa ao surfactante (163 dias) e/ou resultado do longo período da Etapa III, com carga de LAS mais elevada que as outras etapas (111 dias e $2,61 \pm 0,54$ mgLAS.gVS⁻¹.d⁻¹).

5.5 Ácidos Voláteis Totais

Na Tabela 5.7 estão descritos os resultados de ácidos voláteis totais de duas formas: concentração de ácidos voláteis totais em cada etapa e concentração total média de cada ácido específico.

Tabela 5.7: Média de ácidos voláteis totais efluente nas etapas de operação do reator

Concentração	Etapas			
	I	II	III	IV
	(mg/L)			
Cítrico	<LD*	<LD*	<LD*	<LD*
Málico	<LD*	<LD*	<LD*	<LD*
Succínico	<LD*	<LD*	0,53	0,58
Lático	<LD*	<LD*	4,62	4,98
Fórmico	<LD*	<LD*	<LD*	0,81
Acético	3,45	8,59	6,03	5,00
Propiônico	<LD*	<LD*	3,52	5,79
Isobutírico	<LD*	<LD*	9,62	11,76
Butírico	<LD*	0,53	4,73	9,30
Isovalérico	<LD*	<LD*	2,54	0,91
Valérico	<LD*	<LD*	2,86	3,86
Capróico	<LD*	<LD*	3,13	3,37
Somatória	3,45	9,12	37,59	46,38
TDH (h)	32,2±10,2	32,0±15,16	26,0±4,57	32,0±4,57
LAS Afluente (mg/L)	-	14,04±1,2	14,41±1,0	13,33±3,2
Duração (dias)	48	52	111	74

*limite de detecção

Na Etapa I foi detectado apenas ácido acético (3,5 mg/L). Os valores desse ácido nas demais etapas foram de 8,59 mg/L (Etapa II), 6,03 mg/L (Etapa III) e 5,00 mg/L (Etapa IV).

Portanto, o maior valor efluente foi observado na Etapa II, na qual foi adicionado LAS ($14,04 \pm 1,26$ mg/L) e TDH de 32 horas. O reduzido acúmulo de ácido acético pode estar relacionado com a diminuição das arqueias metanogênicas acetoclásticas, possivelmente devido à adição de LAS no reator. Todavia, nas etapas seguintes foi observada diminuição da concentração média do ácido acético efluente indicando adaptação da biomassa a condição com LAS (Figura 5.15). Ácido isobutírico não foi detectado nas Etapas I e II, entretanto, foi predominante nas Etapas III (9,62 mg/L) e IV (11,76mg/L).

A concentração de ácidos voláteis totais aumentou durante a operação do reator EGSB (Tabela 5.7). Esse aumento foi verificado entre as Etapas II e III (9,12 mg/L para 37,59 mg/L), provavelmente, devido ao aumento da carga específica de LAS aplicada na Etapa III. Entre as Etapas III e IV ocorreu aumento de 23% na concentração ácidos voláteis totais. As condições hidráulicas de operação do reator foram semelhantes nas Etapas II e IV, todavia, a biomassa da Etapa IV encontrava-se exposta por longo período ao LAS. Essa longa exposição afetou o crescimento dos microrganismos e, conseqüentemente, o processo como um todo.

Nesse estudo, não foi observada relação entre a concentração de ácido acético e remoção de LAS. Lobner *et al.* (2005) utilizaram reator UASB alimentado com meio mineral contendo glicose (1g/L) e LAS (10mg/L). Os autores obtiveram remoção de 40 a 80% de LAS. As maiores taxas de remoção de LAS foram obtidas para concentração de ácido acético abaixo de 50mg/L.

Por outro lado, foi possível verificar relação entre a somatória de ácidos voláteis efluente e eficiência de remoção de LAS. As maiores remoções foram obtidas para as menores concentrações de ácidos voláteis totais, fato este também observado por Lobner *et al.* (2005). Ahring *et al.* (1995) observaram que o aumento da concentração de ácidos voláteis foi indicador de instabilidade do processo anaeróbio. Portanto, a estabilidade do reator é essencial para obtenção de maiores remoções do surfactante.

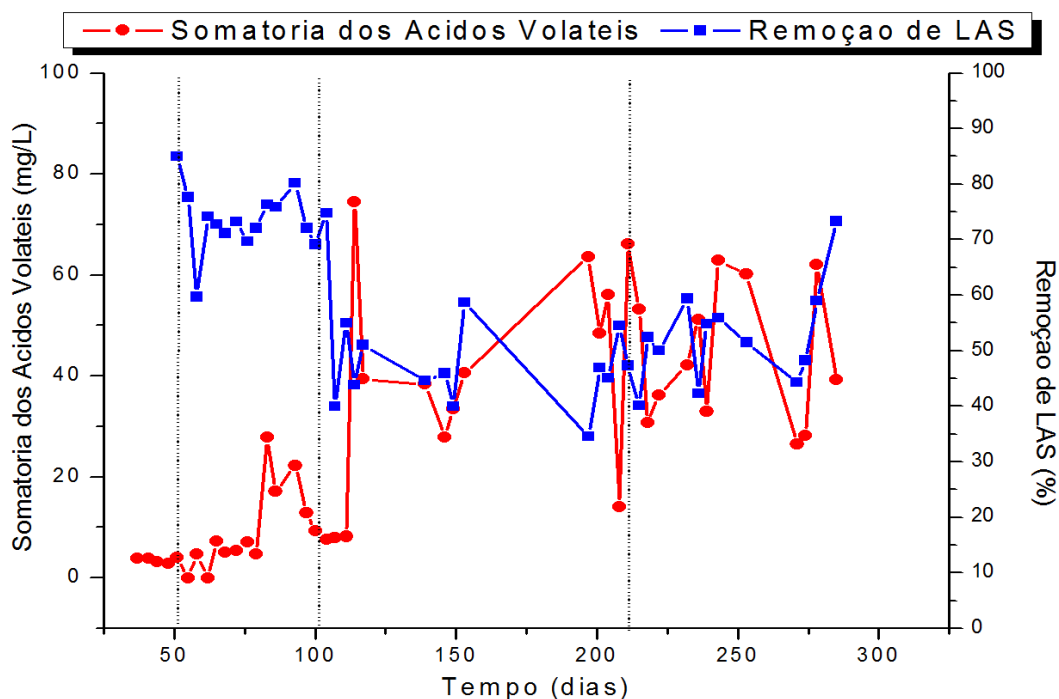


Figura 5.8: Variação temporal da remoção de LAS e s ácidos voláteis efluente

5.6 Anaerobiose do reator EGSB

O ensaio de anaerobiose do reator foi realizado no 190º dia de operação. Nesse teste o reator não apresentou coloração rosada ou roxa (Figura 5.9).

A região superior onde acreditava-se que poderia ocorrer micro-aeração apresentou ausência de cor, assim como, todo o leito. A extremidade da mangueira em contato com o frasco de alimentação ficou parcialmente rosada, todavia, antes do afluente entrar no reator essa coloração sumiu. Por aproximadamente, três dias a resazurina permaneceu no sistema. Tal fato foi comprovado, uma vez que, quando eram retiradas amostras para as análises rotineiras do efluente ocorria a mudança da coloração de incolor para rosada, assim que entrava em contato com o ar atmosférico. Isso demonstrou que o reator estava em condição anaeróbia durante a operação.

Além disso, os resultados microbiológicos detalhados na Tabela 5.11, Figura 5.13 e Figura 5.14, juntamente com os valores obtidos semanalmente das análises de potencial redox corroboram com as conclusões obtidas do ensaio com a resazurina. Arquéias metanogênicas estritamente anaeróbias, tais como, bacilos fluorescentes hidrogenotróficos e *Methanosarcina* são sensíveis a presença de oxigênio (Zhilina, 1972). Tais arqueias foram observadas microscopicamente em todas as etapas de operação. Segundo Zhilina (1972),

Methanosarcina pertence a um grupo de metanogênicas extremamente sensíveis a presença de oxigênio, a meia-vida de algumas espécies é de 4 minutos em meio com ar-equilibrado. Em parte, a sensibilidade dessas metanogênicas é devido ausência de enzimas (catalase, peroxidase e superóxido dismutase) responsáveis pela catálise das formas tóxicas de oxigênio.

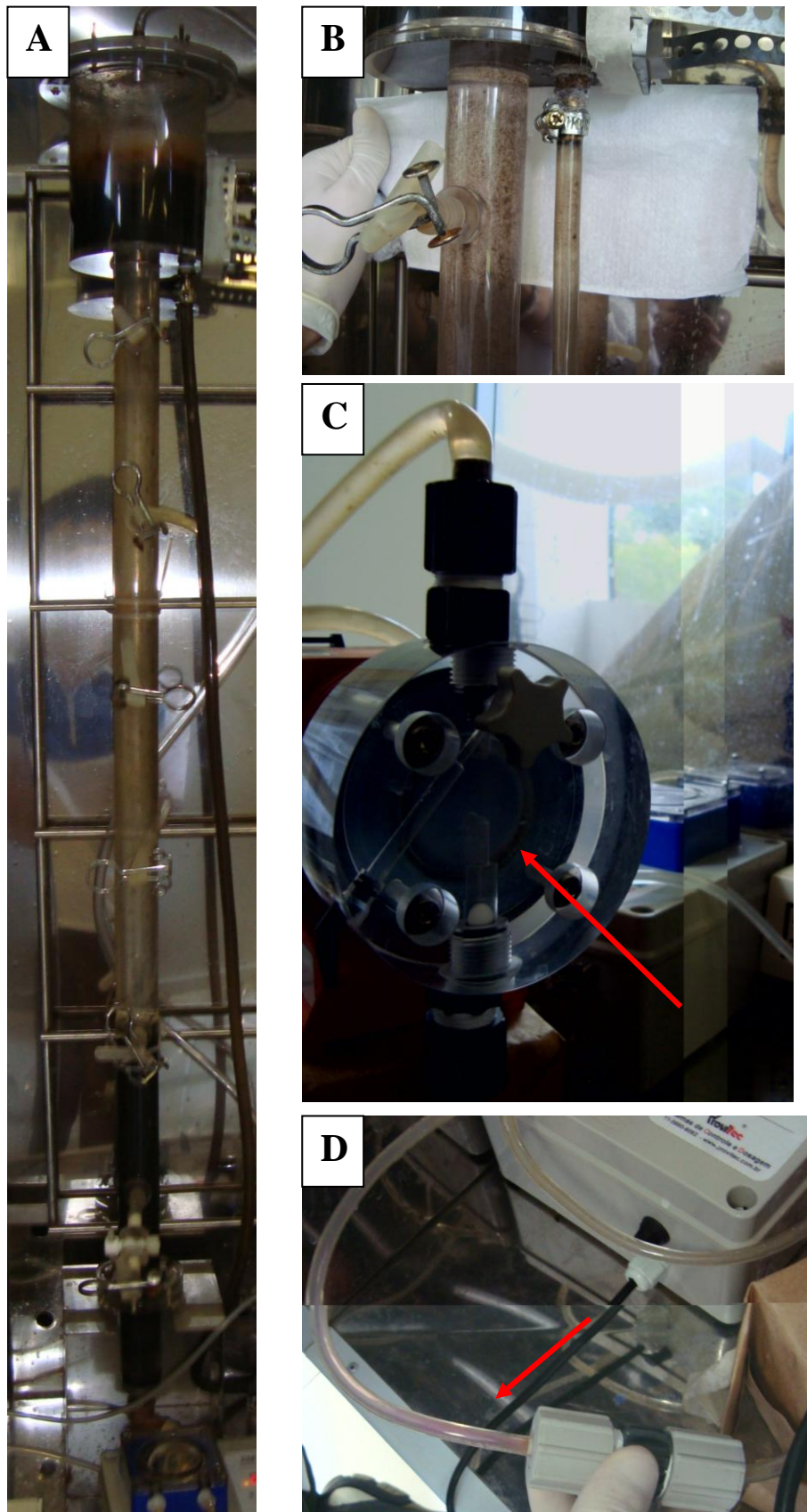


Figura 5.9: Ensaio de anaerobiose do reator. (A) imagem do reator inteiro, (B) região superior do reator, (C) bomba de recirculação (cabeçote) e (D) Bomba de alimentação (mangueira afluyente).

5.7 Balanço de Massa de LAS

O balanço de massa foi realizado apenas no final da operação do reator EGSB. Para tanto, foram adotadas duas estratégias: (1) extração de LAS adsorvido nos grânulos do leito do reator e (2) extração de LAS adsorvido nos SST efluente. Dessa forma, foi possível calcular a massa de LAS removido e a massa de LAS degradado no sistema com base nas fórmulas abaixo.

$$\begin{aligned} \text{LAS removido} &= \text{LAS}_{\text{afl}} - \text{LAS}_{\text{efl}} \\ \text{LAS degradado} &= \text{LAS}_{\text{afl}} - (\text{LAS}_{\text{efl}} + \text{LAS}_{\text{ads}}) \end{aligned} \quad (5.1)$$

Sendo:

LAS removido = massa de LAS removida por processos biológicos e físicos

LAS degradado = massa de LAS removida apenas por processos biológicos

LAS_{afl} = massa de LAS afluente

LAS_{efl} = massa de LAS efluente

LAS_{ads} = massa de LAS adsorvido (SST efluente e biomassa do leito)

Na Tabela 5.8 estão apresentados os resultados obtidos em cada situação.

Tabela 5.8: Valores da extração de LAS no leito e SST efluente

Amostras para Extração	Etapa	Biomassa (g)	Concentração de LAS (mg/L)	Adsorção (mg/gST)	Média (mg/gST)
Leito	IV	0,1498	15,4	16,4	15,00±2,04
		0,1510	12,8	13,6	
SST Efluente		0,1570	15,2	15,5	13,75±2,45
		0,2210	16,6	12,0	

O valor da extração de LAS obtido na biomassa do leito do reator foi de 15,00±2,04 mg/gST e o valor obtido no SST efluente foi de 13,75±2,45 mg/gST. A variação entre as extrações foi de 9%, a pequena diferença entre os dois valores devem-se as características intrínsecas da biomassa nas duas situações, além das características da própria molécula de LAS.

Na Figura 5.10 encontra-se apresentado cromatograma típico de uma extração de LAS adsorvido comparado com cromatograma de LAS em meio líquido (afluente). A adsorção da molécula de LAS está relacionada com a hidrofobicidade dos seus homólogos, uma vez que o carácter hidrofóbico é proporcional ao tamanho da cadeia alquílica. Portanto, quanto maior a cadeia alquílica, maior a hidrofobicidade da molécula e maior a adsorção.

Esse comportamento é facilmente visualizado quando compara-se os quatro homólogos da molécula de LAS de uma amostra de extração de LAS adsorvido (Figura 5.10a); o homólogo com 13 átomos de carbono na cadeia alquílica adsorveu mais e, portanto, ficou mais concentrado nesse tipo de amostra.

A distribuição entre os homólogos pode ser visualizada na Figura 5.10b. Segundo, Duarte (2006), a percentagem dos homólogos na molécula de LAS comercial Aldrich (CAS 25155-30-0) é a seguinte: 18% para C 10, 36% para C 11, 28% para C 12 e 18% para C 13 para LAS.

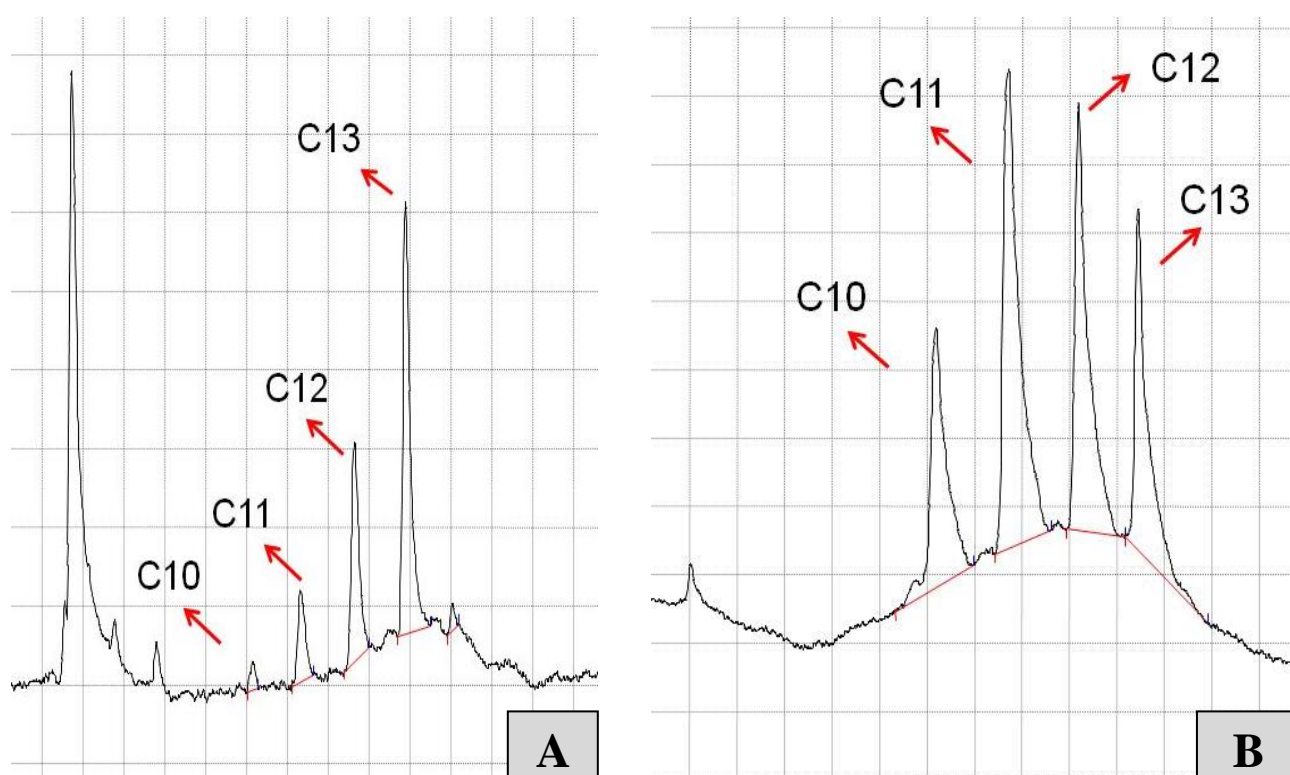


Figura 5.10: (A) Cromatograma típico de uma extração de LAS. (B) Cromatograma de LAS afluente

5.7.1 Balanço de Massa Afluente e Efluente

O balanço de massa afluente e efluente refere-se à massa de LAS que entrou no reator EGSB e a massa de LAS que foi recuperada no efluente. Para tanto, foram consideradas as seguintes variáveis, tanto, para o afluente, como para o efluente: vazão diária, tempo e concentração de LAS (afluente/efluente).

$$\text{Massa LAS}_{(Afl/Efl)} = [LAS] \times Q \times T \quad (5.2)$$

Sendo:

Massa LAS _(Afl/Efl) = massa de LAS acumulada afluente/efluente

[LAS] = concentração de LAS afluente/efluente (mg/L)

Q = vazão afluente/efluente (l/h)

T = tempo de operação do reator (h)

Portanto, a porcentagem total de LAS removido foi de 57% considerando todas as etapas de adição do surfactante (Tabela 5.9).

Tabela 5.9: Balanço de massa LAS afluente/efluente e porcentagem de remoção

Afluente	Efluente	Remoção
mg LAS	mgLAS	%
3917,64	1698,73	57

5.7.2 Balanço de Massa nos Grânulos do leito do reator

Parte da massa de LAS que entrou no sistema ficou adsorvida na biomassa granulada. Dessa forma, foi necessário calcular a quantidade de LAS adsorvido. Para tanto, foi utilizado à seguinte fórmula.

$$LAS_{ads. gran.} = \alpha \times \beta \times V \quad (5.3)$$

Sendo:

LAS _{ads. gran.} = massa de LAS adsorvido nos grânulos do leito do reator EGSB

α = média da concentração de LAS extraído dos grânulos no leito do reator (mg/gST)

β = sólidos totais do reator na Etapa IV (g/L)

V = volume do reator (L)

O resultado da quantidade de LAS adsorvido na biomassa granulada presente no leito do reator foi de 197,55 mg de LAS durante toda a operação do reator.

5.7.3 Balanço de Massa do SST efluente

Parte da massa de LAS saiu do sistema adsorvido junto aos sólidos totais presente no efluente. Dessa forma foi calculada a massa de LAS presente no SST efluente da seguinte forma:

$$LAS_{\text{ads. SST efl.}} = A \times B \times V_{\text{efl.}} \quad (5.3)$$

Sendo:

$LAS_{\text{ads. SST efl.}}$ = massa de LAS adsorvido nos grânulos do leito do reator EGSB

A = média da concentração de LAS extraído no SST efluente (mg/gST)

B = sólidos totais efluente na etapa IV (g/L)

$V_{\text{efl.}}$ = volume total efluente durante todo o período de operação do reator (L)

O resultado da quantidade de LAS adsorvido nos SST efluente foi de 126,25 mg de LAS durante toda a operação do reator.

5.7.4 Balanço de Massa Global

Calculada a massa de LAS afluyente, efluente e adsorvido, tanto, no SST efluente, como na biomassa presente dentro do reator foi possível calcular o balanço de massa global de LAS (Tabela 5.10).

Tabela 5.10: Balanço Global de LAS

Entrada (mg)	Saída			Resultado	
	Efluente (mg)	Adsorvido biomassa do leito (mg)	Adsorvido SST efluente (mg)	LAS removido (mg)	LAS degradado (mg)
3.917,63	1.698,73	197,55	126,25	2.218,9	1.895,1
-	43,4%	5,0%	3,2%	56,6%	48,4%

Portanto, 8,2% de LAS ficaram adsorvidos, 43,4% foram recuperados no efluente e 48,4% foram biodegradados (Figura 5.11). Desse modo, 61% de LAS ficaram adsorvidos na biomassa do leito do reator, enquanto, 39% ficaram adsorvidos no SST efluente (Figura 5.12). Levando em conta o total de LAS removido, 85,4% correspondem a biodegradação e 14,6% por adsorção a biomassa.

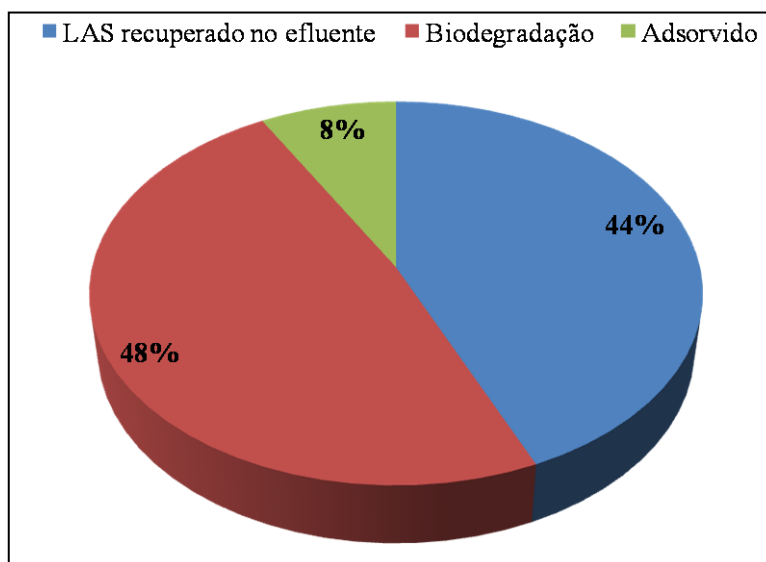


Figura 5.11: Destino do LAS

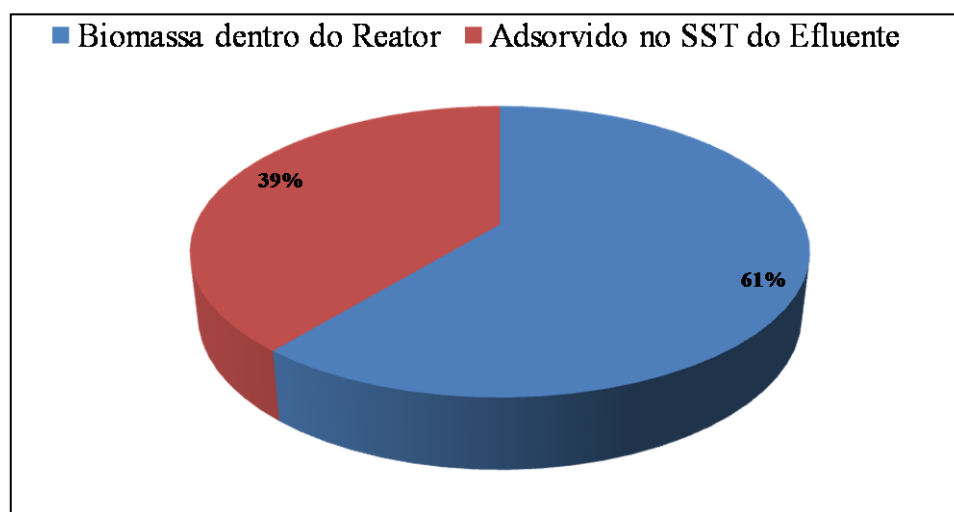


Figura 5.12: Proporção da adsorção do LAS no reator EGSB

5.8 Microscopia de Contraste de Fase e Fluorescência

Ao final de cada etapa de operação do reator EGSB, pequena quantidade de amostra do leito e do copo eram retiradas para os exames microscópicos. Na Tabela 5.11 encontram-se descritas as frequências das principais morfologias visualizadas nas amostras (Figura 5.13 e Figura 5.14). Pouca diferença morfológica foi observada entre a biomassa do copo e do leito.

Tabela 5.11: Caracterização morfológica da biomassa do leito e copo nas diferentes etapas de operação do reator EGSB.

Morfologia	Etapa				
	I	II	III	IV	
Arquéias Metanogênicas	<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	++	++	++
	<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	+++	+++	+++
	Bacilos Fluorescentes	+	++++	+++	+++
	Cocos fluorescentes	-	-	-	-
Bactérias	Bacilos	++++	++++	++++	++++
	Bacilos Curvos	+++	+++	+++	+++
	Cocos	++	++	++	++
	Cocos em cadeia	-	-	-	-
	Endósporo	-	-	-	-
	Espiroqueta	-	-	-	-
	Filamentos	++++	++++	++++	++++
	Filamentos septados	+++	+++	+++	+++

(++++) **predominante**; (+++) **freqüentes**; (++) **pouco freqüentes**; (+) **raros** e (-) **não observados**

Ocorreu pouca variação da diversidade morfológica microbiana durante a operação do reator, mesmo, após a adição do surfactante na Etapa II. Destacou-se a presença constante de bactérias filamentosas, as quais foram relacionadas com a manutenção da estrutura do grânulo; além de filamentosas septadas, bacilos e bacilos curvos. Em relação às arqueias metanogênicas, embora poucos bacilos fluorescentes estivessem presentes ao final da Etapa I, foram predominantes nas etapas seguintes. Sarcinas fluorescentes semelhantes à *Methasarcina* sp. foram visualizadas com relativa freqüência além de cistos fluorescentes (Figura 5.14f). Morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. também foram observadas em todas as amostras das etapas de operação.

Methanosaeta e *Methanosarcina* são arqueias pertencentes a família *Methanosarcinaceae*, conhecidas por serem as únicas a utilizar o acetato como substrato para

a metanogênese. *Methanosarcina* pode também utilizar metanol, metilaminas, e $H_2:CO_2$, todavia, *Methanosaeta* usa exclusivamente acetato. A presença de sarcinas metanogênicas é indicativa de ambiente anaeróbio estrito (ZHILINA, 1972).

Embora, as arqueias metanogênicas, em geral, sejam mais sensíveis a mudanças ambientais e à presença de compostos tóxicos ou inibitórios, em relação às bactérias acidogênicas, é interessante salientar que morfologias semelhantes à tais arqueias foram, também, observadas na biomassa presente no copo do reator. Todavia, a biomassa do copo não apresentava a estrutura granulada que confere proteção a microbiota mais sensível a compostos tóxicos. Tal fato, provavelmente deveu-se, a menor concentração de LAS residual dentro no reator, que durante toda a operação não superou 7 mg/L. Segundo LIU *et al.* (1985), algumas arqueias metanogênicas, tais como, *Methanosarcina mazzei* e *Methanosarcina acetivorans* durante o ciclo de vida podem apresentarem-se na forma de cisto ou possuírem lâmina espessa envolvendo as células cocoides. Tais estruturas conferem resistência a interferentes ambientais como, por exemplo, dessecação.

Segundo, Wagener & Schink (1987), concentrações iguais ou maiores que 10 mg/L de LAS em reator anaeróbio de leito fixo, usando água residuária sintética a 28°C causou inibição da metanogênese e, conseqüentemente, da microbiota responsável pela sua degradação. Gavala & Ahring, (2002) operaram reator em batelada com lodo anaeróbio aclimatado ao LAS, por período superior a um ano e TDH de 15 dias. Os autores constataram que as bactérias consumidoras de ácido propiônico foram mais sensíveis à presença de LAS (100 a 150 mg/L), do que as arqueias metanogênicas acetoclásticas. Provavelmente, a inibição causada pelo LAS foi devida à sua interação com as membranas microbianas das bactérias, impedindo o transporte de nutrientes e/ou substrato para dentro das células bacterianas.

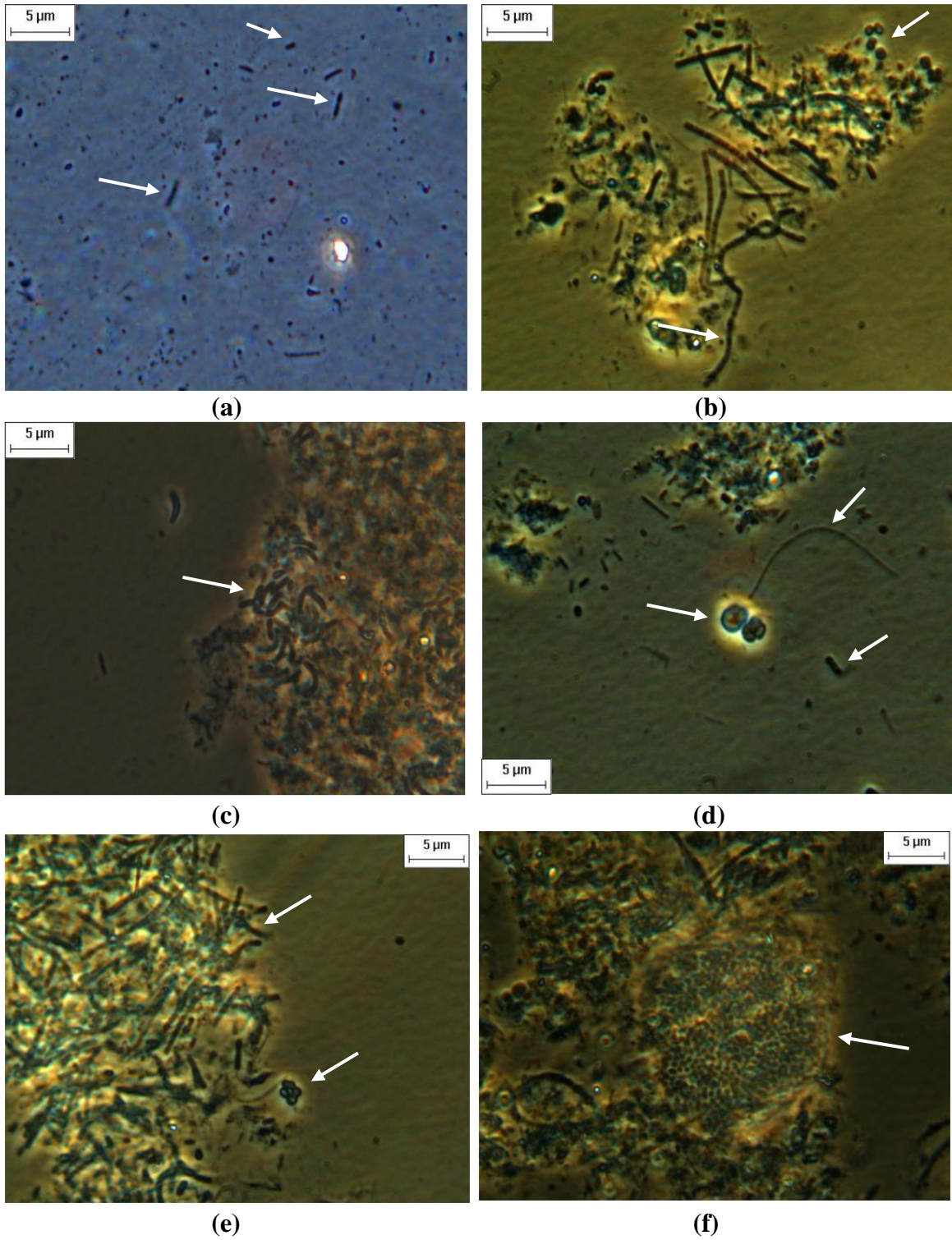


Figura 5.13: Microscopia de contraste de fase das amostras do reator: (a) bacilos, (b) filamentos septados, (c) bacilos curvos, (d) sarcinas, (e) sarcinas e bacilos e (f) cistos.

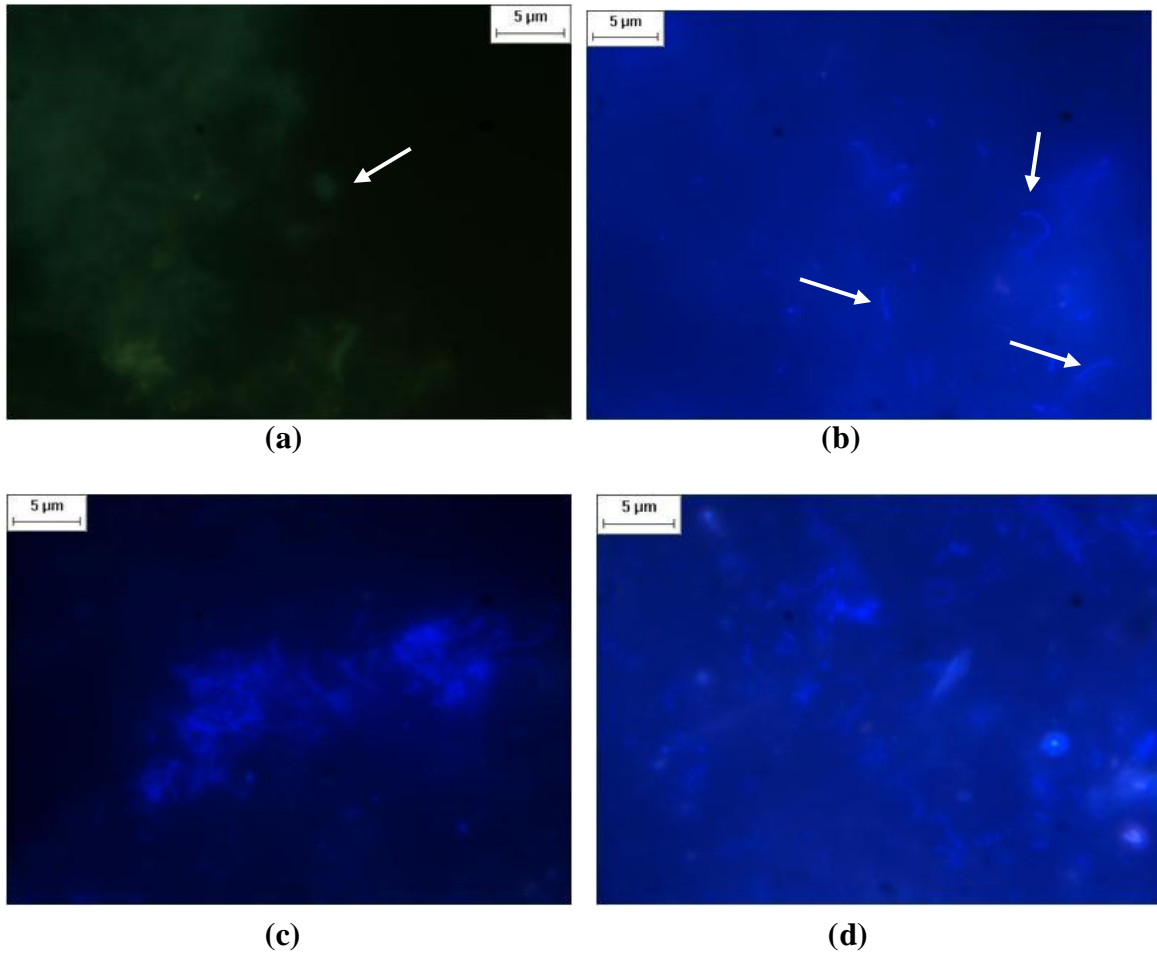


Figura 5.14: Microscopia de fluorescência das amostras do reator. **(a)** bacilos fluorescentes e morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp. **(b)** e **(c)** bacilos fluorescentes.

5.9 Análises Quantitativas

Na Figura 5.15 e Tabela 5.12 encontra-se descrito resumo dos resultados obtidos em relação às análises quantitativas das populações microbianas presentes no reator EGSB nas diferentes etapas de operação. Nas Etapas I e II ocorreu contaminação dos ensaios e, portanto, tais resultados não foram apresentados. O NMP para as bactérias redutoras de ferro foi realizado apenas na Etapa IV em virtude dos resultados obtidos no seqüenciamento da região RNAr 16S das amostras, que indicou bactérias semelhantes a esse grupo microbiano.

Tabela 5.12: NMP das amostras do leite e copo do reator EGSB

Populações Microbianas	Etapas				
	Inóculo	III Leite	IV Leite	IV Leite - BRF	IV Copo
	NMP/gSTV				
Arquéias Metanogênicas	$6,6 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^6$
Bactérias Anaeróbias Totais	$6,6 \times 10^9$	$4,7 \times 10^{12}$	$2,5 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{11}$
Bactérias Redutoras de Ferro	-	-	-	$2,1 \times 10^9$	-
Metanogênicas/Anaeróbias (%)	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$5,6 \times 10^{-2}$	$4,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-3}$

Os resultados obtidos de NMP para o inóculo foram os seguintes: $6,6 \times 10^6$ NMP/gSTV de arqueias metanogênicas e $6,6 \times 10^9$ NMP/gSTV de bactérias anaeróbias totais.

A Etapa III caracterizada por TDH médio de 26 horas, carga específica de LAS de $2,61 \pm 0,54$ mg.gVS⁻¹.d⁻¹ e remoção específica média de 48% apresentou aumento significativo de bactérias anaeróbias totais e diminuição das arqueias metanogênicas. O aumento das bactérias anaeróbias totais pode estar relacionado com a adaptação desses microrganismos as condições do reator. Além disso, a remoção do LAS está associada aos microrganismos do domínio *Bacteria*. A sensibilidade das arqueias metanogênicas ao surfactante LAS já foi constatada por outros autores, tais como, Mösche & Meyer (2001) e Gavala & Ahring (2002).

A Etapa IV foi caracterizada pela remoção de 64% de LAS com carga específica de $1,45$ mg.gVS⁻¹.d⁻¹ e TDH de 32 horas. Os valores de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas para o leite foram maiores aos encontrados no inóculo. Quando comparamos, a quantidade de arqueias metanogênicas com a Etapa III ($4,0 \times 10^4$ NMP/g STV) foi possível observar aumento acentuado na Etapa IV ($1,4 \times 10^7$ NMP/g STV). Esse resultado pode estar relacionado com a carga de LAS aplicada que variou entre essas duas etapas (III e IV) influenciando na proporção das comunidades microbianas.

Todavia, o NMP realizado com a biomassa presente no copo do reator durante a Etapa IV (Figura 5.15 - **IV Copo**) apresentou diminuição da quantidade de arqueias metanogênicas ($2,5 \times 10^6$ NMP/g STV) e aumento da quantidade de bactérias anaeróbias totais ($2,5 \times 10^{11}$ NMP/g STV) quando comparadas com as amostras do leito da Etapa IV.

A diminuição das arqueias metanogênicas condiz com os resultados obtidos de outros autores, que retratam a sensibilidade desse grupo ao LAS. Para entender o aumento da quantidade de bactérias anaeróbias totais por grama de sólidos totais voláteis no copo é interessante ressaltar que a biomassa presente no copo foi depositada ao longo da operação do reator, devido ao cisalhamento dos grânulos em virtude do LAS afluyente e da alta velocidade ascensional efluente. Portanto, no copo ocorreu diminuição do diâmetro médio dos grânulos ao longo da operação reduzindo a presença de arqueias metanogênicas (Tabela 5.6).

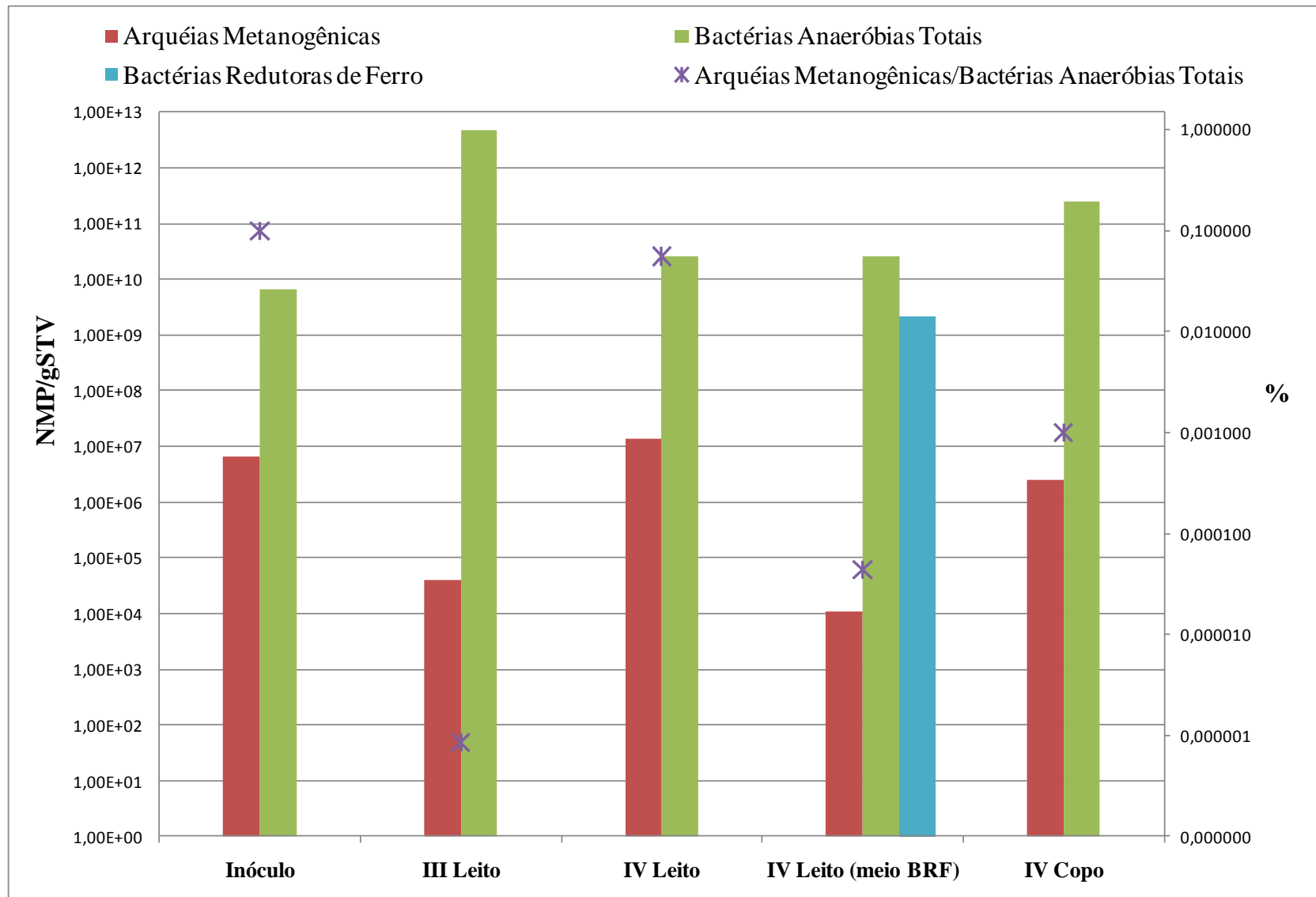


Figura 5.15: Análise quantitativa das populações microbianas

Macleod *et al.* (1990) propuseram que a estrutura do grânulo pode ser dividida em três camadas distintas, a mais interna corresponde as arqueias metanogênicas que podem agir como centros de nucleação, seguido por bactérias que utilizam e produzem H₂ e, por último, na região mais externa bactérias filamentosas, além de cocos e bacilos. Portanto, a predominância de bactérias anaeróbias totais, provavelmente, foi devido ao desprendimento de parte da biomassa externa do grânulo que, devido a alta velocidade ascensional foi carregada para a região superior do reator (copo).

O NMP da Etapa IV com amostra do Leito (meio para Bactérias Redutoras de Ferro) foi realizado com meio específico para favorecer o crescimento de bactérias redutoras de ferro. Além de estimar a quantidade de bactérias redutoras de ferro foi estimada, também, a quantidade de arqueias metanogênicas. Comparando os resultados (Etapa IV Leito e Etapa IV Leito com meio BRF) foi possível observar diminuição das arqueias metanogênicas. Embora a utilização de meios distintos possa resultar em padrões quantitativos distintos, a competição entre as bactérias redutoras de ferro e arqueias metanogênicas pode ser a explicação mais plausível.

A utilização de Ferro III como acceptor final de elétrons para oxidação da matéria orgânica é termodinamicamente mais favorável do que a mineralização da matéria orgânica com redução de sulfato ou produção de metano (RODEN *et al.*, 2000). Tal fato explica a diminuição de arqueias metanogênicas utilizando meio enriquecido com Ferro III, uma vez que a detecção é feita a partir da presença ou ausência de metano no *headspace*. A quantidade de bactérias redutoras de ferro III encontrada foi de $2,1 \times 10^9$ NMP/gSTV, ou seja, 8% das bactérias anaeróbias totais presente.

Oliveira (2010) estudou a remoção de LAS em reator de leito fluidificado em escala de bancada com areia e obteve os seguintes resultados: $3,98 \times 10^{10}$ NMP/gSTV de bactérias anaeróbias totais, $3,75 \times 10^9$ NMP/gSTV de bactérias redutoras de sulfato e $1,93 \times 10^4$ NMP/gSTV de arqueias metanogênicas para 46mg/L de LAS afluente e 93% de remoção. A alimentação utilizada pela autora foi substrato sintético contendo extrato de levedura e sacarose. O extrato de levedura na sua constituição apresenta aminoácidos que contem enxofre na sua composição, isso pode ter favorecido o aparecimento de BRS fato este não observado nesse estudo. Assim como, nesse estudo, Oliveira (2010) também observou que menos de 1% das bactérias anaeróbias totais eram arqueias metanogênicas.

As principais morfologias encontradas no NMP nas diferentes etapas e para as diferentes populações estão apresentadas na Figura 5.16. Em todos os casos a

visualização de arqueias metanogênicas foi esporádica e em baixa quantidade, tal fato está relacionado à baixa quantidade desse grupo microbiano. A morfologia predominante foi bacilos sendo detectadas com menores frequências estruturas celulares na forma de cocos.

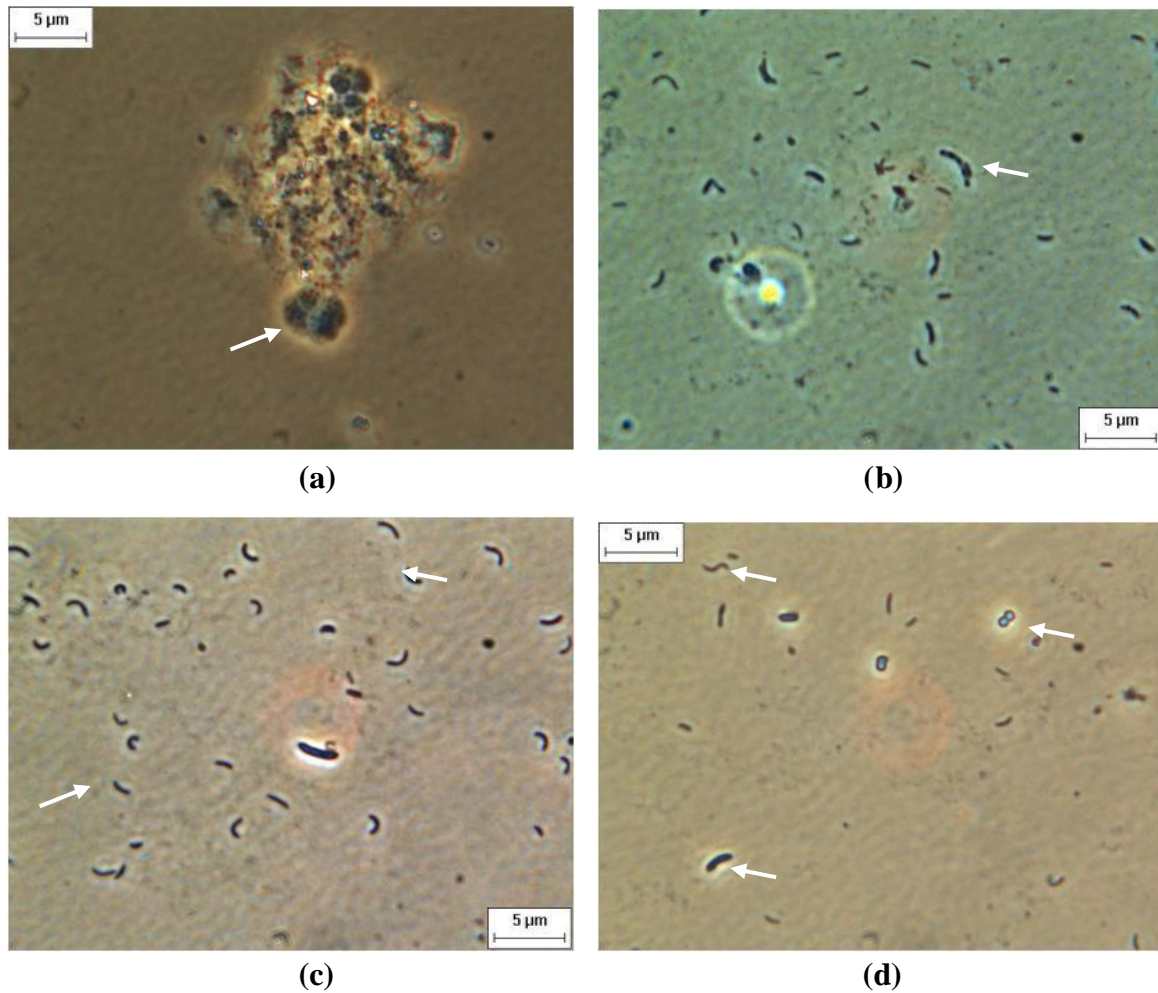


Figura 5.16: Microscopia de Contraste de Fase do NMP. (a) Sarcinas, (b) e (c) bacilos curvos e (d) bacilos, diplococos e espirilo.

Portanto, a adição do surfactante reduziu a população de arqueias metanogênicas durante a operação do reator EGSB. Todavia, a quantidade de bactérias anaeróbias totais foi relativamente estimulada, quando, comparada com o inóculo e entre as etapas do reator.

5.10 Análise Qualitativa

Para a amostra retirada do leite e da região do copo do reator foram obtidos 111 e 59 clones, respectivamente. Os fragmentos seqüenciados tiveram tamanho médio de 600 pares de bases (pb). Na Tabela 5.13 encontram-se descritas as proporções dos filos encontrados em cada região do reator. Ressalta-se que as amostras foram retiradas na Etapa IV, na qual o reator apresentava eficiência de remoção de $63,6 \pm 6,17\%$ e TDH médio de 32 horas.

Tabela 5.13: Proporção dos filos encontrados em cada amostra*

Clones do Leite %	Filos	Clones do Copo %
0,0	Acidobacteria	3,4
0,0	OP10	3,4
0,9	Verrucomicrobia	0,0
0,9	Bacteroidetes	1,7
19,8	Synergistetes	13,6
1,8	Firmicutes **	35,6
52,3	Proteobacteria **	15,3
24,3	Não Classificada	27,1

*Resultados obtidos utilizando *Library Compare Versão 2.2 – Ribosomal database Project*, 95% de confiança

** diferença significativa

As proporções entre os filos foram diferentes em cada região do reator. Diferença significativa foi observada para os filos Firmicutes e Proteobacteria, quando comparada as duas bibliotecas. Na biomassa retirada do leite foi possível observar que os filos predominantes foram Proteobacteria (52,3%) e Synergistetes (19,8%). Todavia, na amostra retirada da região do copo do reator, os filos predominantes foram Firmicutes (35,6%) e Proteobacteria (15,3%).

Em relação ao filo Proteobacteria, a classe Deltaproteobacteria foi a que apresentou maior proporção com 39,6% dos clones da região do leite, e apenas 8,5% dos clones para a região do copo (Tabela 5.14).

Tabela 5.14: Proporção de classes do filo Proteobacteria em cada amostra*

Clones do Leito %	Classes	Clones do Copo %
6,3	Betaproteobacteria	6,8
39,6	Deltaproteobacteria**	8,5
7,2	Epsilonproteobacteria	0
0,9	Não classificada	0

*Resultados obtidos utilizando *Library Compare Versão 2.2 – Ribosomal database Project*, 95% de confiança

** diferença significativa

A única classe encontrada no filo Firmicutes foi Clostridia, ordem Clostridiales, famílias (Incertae Sedis XIII, Veillonellaceae e não classificados). O gênero majoritário foi *Sporomusa* presente apenas na região do copo do reator.

O reator EGSB por ser de mistura completa e, devido a diluição afluente, não ocorre estratificação do meio nutricional e/ou concentração de LAS. Dessa forma, as diferenças quando comparadas as duas bibliotecas não estão relacionados com as disponibilidades nutricionais. Entretanto, pode estar relacionado com a origem da biomassa na região do copo que foi devido ao desprendimento de porções da região externa do grânulo, em virtude da alta velocidade ascensional do efluente e a toxicidade do surfactante. Além disso, a turbulência pode ter agido como fator seletivo, uma vez que a região do leito apresentava alta turbulência em função da necessidade de expansão do leito granulado, situação oposta em relação aquela encontrada na região do copo do reator.

Na Tabela 5.15 encontra-se comparação dos filios encontrados nesse trabalho e aqueles obtidos por outros autores que estudaram a remoção anaeróbia de LAS em configurações distintas de reatores.

É interessante notar que alguns filios foram constantes nas diferentes configurações de reatores, entre eles, foram constatados Firmicutes e Proteobacteria. O filo Proteobacteria foi observado nesse trabalho, em Oliveira *et al.* (2010) e Duarte *et al.* (2010). Todavia, as classes predominantes em cada trabalho foram distintas. Oliveira *et al.* (2010) constataram similaridade de bactérias com a classe Betaproteobacteria. Nesse trabalho, foi observada similaridade de microrganismos relacionados a classe Deltaproteobacteria. Duarte *et al.* (2010) encontram semelhança com microrganismos da classe Alfabroteobacteria. Provavelmente, as diferenças encontradas entre os

trabalhos citados podem ser atribuídas às distintas configurações de reatores, características hidráulicas, composição nutricional e origem do inóculo.

Em contrapartida, os filos Synergistetes e OP 10 foram exclusivos desse trabalho. Filo OP10 foi detectado em Obsidian, Yellowstone National Park, em 1994. Desde então, centenas de RNAr 16S tem sido atribuído similaridade a OP10 de amostras provenientes de ampla variedade de ambientes, incluindo instalações geotérmicas, ambientes hipersalinos, entre outros. Estudos preliminares indicam que tais microrganismos são abundantes e amplamente distribuídos na natureza e diversos filogeneticamente (HARRIS *et al.*, 2004).

O filo Synergistetes, foi descrito por Jumas-Bilak *et al.*, (2009). As bactérias pertencentes a esse filo são encontradas em ampla gama de habitats anaeróbios, tais como, em resíduos de sistema de tratamento de água, solos, poços de petróleo e relacionados a doenças periodontais. São bacilos Gram-negativos e fermentam aminoácidos. Essa característica é comum para a maioria dos membros desse filo, aparentemente essa uniformidade pode indicar que apenas os membros pertencentes a esse filo exploram esse nicho em diferentes ambientes.

Tabela 5.15: Proporção dos filos encontrados em alguns trabalhos sobre remoção de LAS em diferentes configurações de reatores

Filos	Oliveira <i>et al.</i> (2010) ¹	Nesse trabalho Leito ²	Nesse trabalho Copo ²	Duarte <i>et al.</i> (2010) ³	Duarte <i>et al.</i> (2010) ⁴
	%				
Acidobacteria	3	0	3,4	0	5
Actinobacteria	0	0	0	0	2
Bacteriodes	42	0,9	1,7	0	35
Firmicutes	2	1,8	35,6	81	3
Gemmatimonadetes	1	0	0	0	0
Não classificados	5	24,3	27,1	0	13
OP10	0	0	3,4	0	0
Proteobacteria	44	52,3	15,3	19	18
Synergistetes	0	19,8	13,6	0	0
Verrucomicrobia	4	0,9	0	0	11
Fibrobacteres	0	0	0	0	8
Chlorobi	0	0	0	0	3
Chloroflexi	0	0	0	0	2

- ¹ Reator de leito fluidificado com TDH 18 horas e areia como material suporte. Alimentação substrato sintético acrescido de 46 mgLAS/L. Remoção de LAS de 93%.
- ² Reator EGSB com TDH de 32 horas. Alimentação meio mineral modificado, solução de vitaminas, bicarbonato de sódio e 14 mgLAS/L. Remoção de LAS de 63%.
- ³ Reator Anaeróbio Horizontal de leito fixo (RAHLF) preenchidos com espuma de poliuretano com TDH de 12 horas . Alimentação constituída de extrato de levedura, sacarose, sais, bicarbonato de sódio e 14 mgLAS/L. Remoção de LAS de 56%.
- ⁴ Reator operado em bateladas seqüenciais, contendo biomassa granular. Alimentação consistiu de substrato sintético e 22mgLAS/L. Remoções de 53% na ausência de co-substrato.

Na Figura 5.17 estão apresentadas as proporções das famílias encontradas em ambas às regiões do reator (Leito e Copo). Notou-se que algumas famílias foram exclusivas da região do leito, tais como, Syntrophobacteraceae, Syntrophomonadaceae, Solirubrobacterales, Peptococcaceae, Incertae Sedis XI, Incertae Sedis XIII, Desulfomicrobiaceae e Anaerolineaceae. Todavia, a região do copo, também, apresentou famílias exclusivas, tais como, Nautiliaceae, Incertae Sedis XII, Holophagaceae, Gracilibacteraceae e Desulfarculaceae. Tal fato pode evidenciar menor diversidade na amostra presente na região do copo quando comparada com a amostra retirada do leito.

Na amostra retirada do leito existiu predominância da família Desulfuromonadales (27,9%), seguido da família Synergitaceae (18,9%), Rhococyclaceae (5,45%) e não classificadas (29,8%). Na amostra da região do copo notou-se predominância da família Veillonellaceae (35,6%), Synergistaceae (11,9%) e não classificadas (35,5%).

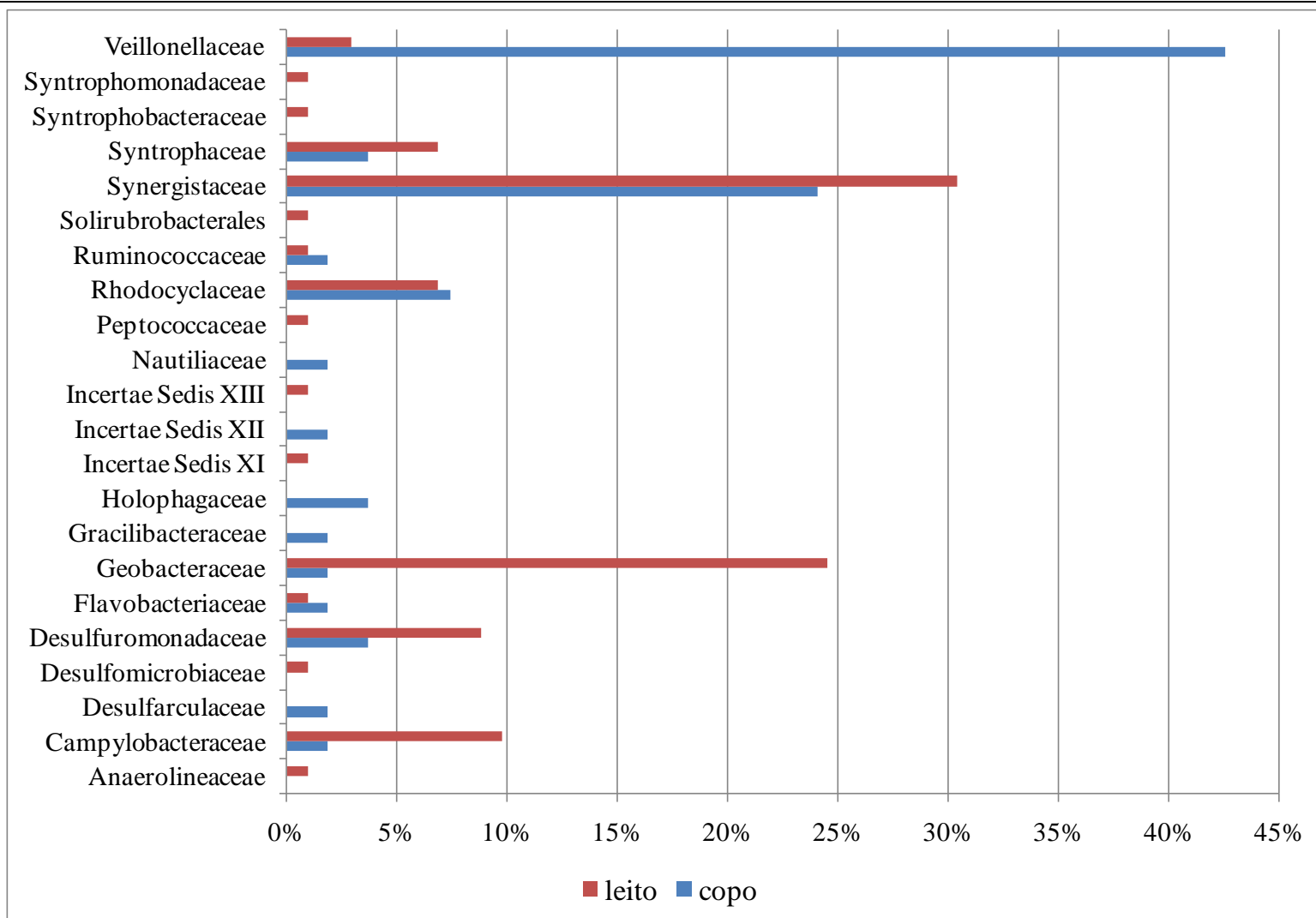


Figura 5.17: Porcentagem dos clones da região do copo e leite relacionados as diferentes famílias com base nos dados RDP *classifier*, 95% de confiança

As bactérias pertencentes à família Geobacteraceae e Holophagaceae em especial, *Geobacter* (2% dos clones do Copo e 25% dos clones do Leito) e *Geotrix* (4% dos clones do Copo e ausentes no Leito), respectivamente, são pertencentes ao grupo de bactérias redutoras de ferro. Tal resultado corrobora com os valores obtidos no NMP, uma vez que 8% das bactérias anaeróbias totais foram representadas por bactérias redutoras de ferro na etapa IV, na qual foi realizado o NMP para BRF e retirada de amostra para análises filogenéticas.

Microrganismos redutores de ferro são conhecidos desde 1920, mas apenas depois de isolado por Lovley *et al.*, (1987), seu metabolismo foi estudado com mais detalhe. Bactérias semelhantes a *Geobacter* são bacilos quimioorganotróficos estritamente anaeróbios, Gram-negativos, não formadores de endósporos. Podem oxidar completamente ácido acético, etanol, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido pirúvico, propanol, butanol, tolueno, benzeno, benzaldeído, benzilálcool, *p*-hidroxibenzoato, *p*-hidroxibenzilálcool, fenol e *p*-cresol a dióxido de carbono, com redução do Ferro III. Provavelmente, parte da degradação da molécula de LAS pode ser atribuída a esse gênero diante da sua versatilidade metabólica.

Como pode ser observado na Tabela 4.3, na composição do meio mineral não há presença de Ferro III, todavia, adicionava-se ferro II ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Provavelmente, durante a alimentação, devido à instabilidade do ferro II ocorreu oxidação para Ferro III. Todavia, a concentração adicionada foi baixa (2mg/L), dessa forma, os microrganismos redutores de ferro atuaram como quimioorganotróficos e não como redutores de ferro.

COATES *et al.*, 2001 isolaram de aquífero contaminado com hidrocarboneto, na zona de redução de Ferro III, bactérias semelhantes a *Geotrix*. Bactérias semelhantes a esse gênero foram verificadas somente na biomassa do Copo do reator. Destacam-se por serem bacilos estritamente anaeróbios, não formadores de endósporos, quimioorganotróficos, que oxidam acetato e compostos aromáticos, com redução do Ferro III. Tais bactérias, provavelmente, usaram LAS e ferro III, como acceptor de elétrons.

A família Desulfuromonadaceae em especial *Pelobacter* (4% dos clones do Copo e 9% do Leito), corresponde a bacilos Gram-negativos estritamente anaeróbios, não formadores de endósporo, que usam número muito limitado de substratos. Podem oxidar benzeno e trihidroxibenzeno como fonte de energia. São comumente encontrados

em áreas contaminadas com metais pesados e hidrocarbonetos (WAGENER & SCHINK, 1987). *Pelobacter venetianus* tem a capacidade de degradar polietilenoglicóis e surfactantes não-íonicos (Wagner & Schink, 1987). Embora, o LAS seja um surfactante aniônico possui as mesmas propriedades anfipáticas dos surfactantes não-íonicos. Desse modo, sua presença no reator justifica-se, provavelmente devido a utilização de LAS. É interessante notar que bactérias semelhantes a esse gênero estiveram presentes, tanto na região do Copo (4% dos clones), como no Leite (9% dos clones) levando a crer que parte da remoção do LAS estava ocorrendo em grande proporção na região do Leite, mas também na região do Copo.

A família Veillonellaceae, com destaque para *Sporomusa* apresentou similaridade com 43% dos clones do Copo e apenas 3% dos clones do Leite. São bactérias anaeróbias, homoacetogênicas, Gram-negativas e formadoras de endósporos. Realizam reações de metoxilação de compostos aromáticos (BREZNAK *et al.*, 1988). A formação de endósporos é comum em bactérias Gram-positivas, todavia, pode ser encontrado em alguns representantes Gram-negativos, tais como, *Sporomusa*. A predominância na região do Copo do reator pode estar relacionada a sua característica metabólica, uma vez que são homoacetogênicas, ou seja, utilizam CO₂ como acceptor final de elétrons e hidrogênio, para a formação de ácido acético.

Entretanto, termodinamicamente essa rota metabólica é rara de acontecer, uma vez que bactérias homoacetogênicas competem com as metanogênicas pelo hidrogênio, todavia, na região do Copo foi observada menor concentração (NMP/gSTV) de arqueias metanogênicas. Desse modo, a região do copo foi ambiente mais propício para o desenvolvimento desse grupo microbiano em relação a região do Leite do reator. Além disso, parte do CO₂ produzido no EGSB encontrava-se no *headspace*, na região do Copo do reator, tornando disponível para esse grupo microbiano em função da alta solubilidade desse gás. A diminuição das arqueias metanogênicas como consequência da toxicidade ao LAS favoreceu a predominância de bactérias semelhantes a esse gênero.

Na família Rhodocyclaceae (7% dos clones Copo e 7% do Leite) foram observadas similaridades com *Azonexus*, *Dechloromonas* e *Azospira*. São bactérias aeróbias ou desnitrificantes e Gram-negativas. Em especial, *Dechloromonas aromática*, tem a capacidade de degradar compostos aromáticos como tolueno, benzoato e clorobenzeno. Dessa forma, sua presença no reator pode estar relacionada ao processo de degradação de compostos aromáticos.

Em relação a família Syntrophaceae (4% dos clones do Copo e 7% do Leito) foi observada semelhança com *Smithella*. São bactérias que crescem preferencialmente em condições fermentativas-metanogênicas, ou seja, a mesma imposta nesse presente estudo. São bacilos Gram-negativos, estritamente anaeróbios que crescem em sintrofismo com as arqueias metanogênicas. Esse gênero apresenta importante função de metabolizar o excesso de ácido propiônico, um intermediário da fermentação, uma vez que, seu excesso acarreta na inibição da digestão anaeróbia (LIU *et al.*, 1999). Provavelmente, sua baixa porcentagem relativa dentre o número total de clones esteja relacionado as baixas concentrações desse ácido encontradas durante a operação do EGSB.

Na família Anaerolineaceae (1% dos clones e exclusivos da região do leito) foi observada semelhança com *Longilinea*. São bactérias filamentosas Gram-negativas, sem mobilidade, não formadora de endósporos que crescem em condição estritamente anaeróbia numa faixa de temperatura entre 20°C e 50°C, sendo pH 7 ótimo de crescimento (YAMADA *et al.*, 2006). Segundo esses autores, essas bactérias são comumente observadas na superfície de grânulos de tratamento de água residuária contendo carboidratos. A sua presença exclusivamente na região do Leito é compatível com a presença de grânulos estruturalmente intactos nessa região, uma vez que na região do Copo encontravam-se apenas porções de biomassa resultante do cisalhamento dos grânulos do Leito. Destaca-se que o reator durante toda a operação apresentou pH próximo da neutralidade e 30°C de condição térmica corroborando com seu crescimento no reator.

Aproximadamente, 10% do total de clones do leito e 2% do Copo apresentaram similaridade com a Família Campylobacteraceae, especificamente semelhante a *Arcobacter*. Bactérias pertencentes a esse gênero são bacilos Gram-negativos, não formadores de endósporos, presentes em carcaças de frango (HOUF *et al.*, 2005). Tal fato, no presente estudo está relacionado diretamente com o inóculo que foi oriundo de abatedouro de aves. O crescimento ideal ocorre entre 15 e 37°C em condições de microaerofilia (3% de O₂). Esse fato justifica sua presença majoritária no Leito uma vez que a alimentação apresentava O₂ dissolvido que foi rapidamente consumido, e corrobora com a anaerobiose do sistema indicando que a região do Copo do reator apresentava-se, também, em anaerobiose estrita.

Aproximadamente 6% do total de clones foram relacionados com bactérias redutoras de enxofre (BRS). A semelhança foi relacionada com *Desulfarculus*,

Desulfomicrobium, *Lebetimonas*, *Desulfoglaeba* e *Gracilibacter*. Mesmo em baixas concentrações de compostos de enxofre, no reator, não ultrapassando $2,29 \pm 1,26$ mg/L de sulfato e $0,275 \pm 1,3$ mg/L de sulfeto, essas bactérias encontraram ambiente propício para o crescimento. Provavelmente, utilizaram grupo sulfonado da molécula de LAS, como fonte de enxofre, além de possíveis impurezas de compostos de enxofre resultado do processo de fabricação do LAS. Podem estar presentes no inóculo (abatedouro de aves) em virtude de grande quantidade de aminoácidos que contem enxofre na sua composição.

Todos os gêneros citados são microrganismos estritamente anaeróbios que crescem em condições mesofílicas. Em especial, *Desulfoglaeba* pode oxidar *n*-alcanos, hidrocarbonetos alifáticos saturados lineares ou ramificados, (Davidova *et al.*, (2006), que se assemelham a cadeia alquílica linear da molécula de LAS.

A família Peptococcaceae (1% dos clones do Leito) contém bacilos Gram-negativos estritamente anaeróbios. Segundo Pierre Juteau *et al.* (2005), *Cryptanaerobacter phenolicus* tem a habilidade de transformar fenol e 4-hidroxibenzoato em benzoato. Portanto, a capacidade de metabolizar compostos aromáticos justifica sua presença no reator.

A família Syntrophomonadaceae (1% dos clones do Leito) são bactérias estritamente anaeróbias, formadora de endósporos que crescem em associação sintrófica com as arqueias metanogênicas (MATTHIES; SPRINGER; *et al.*, 2000). Segundo os autores citados anteriormente, algumas espécies, tais como, *Pelospora glutarica* crescem unicamente na presença de glutamato, metilsuccinato e succinato. Os produtos da fermentação de glutarato e metilsuccinato são ácido butírico, ácido isobutírico e CO₂, e o produto da fermentação do succinato é ácido propiônico. Nesse trabalho foram constatados 0,58 mg/L de ácido succínico no efluente da etapa IV, na qual foi retirada amostra de Biologia molecular. Tal fato, pode justificar a presença desse grupo microbiano no reator.

A família Synergistaceae foi relacionada a 24% dos clones da região do Copo e 30% dos clones da região do Leito. Nessa família foram observadas similaridade a *Thermovirga*, *Cloacibacillus*, *Aminobacterium* e *Aminomonas*.

Membros do gênero *Thermovirga* têm habilidade de formar agregados, apresentam mobilidade, Gram-negativos, não formadores de endósporos e crescem em condições anaeróbias. Algumas espécies têm sido isoladas de poços de petróleo (DAHLE & BIRKELAND, 2006). Sabe-se que o LAS é derivado de hidrocarbonetos

que é encontrado em grandes quantidades no petróleo, portanto, tal fato justifica a presença desse gênero no reator.

Os membros do gênero *Cloabacillus* são bacilos estritamente anaeróbios, sem mobilidade, Gram-negativos, não formam endósporos e fermentam a histidina, arginina, lisina, serina, e triptofano (GANESAN *et al.*, 2008). Os membros do gênero *Aminobacterium* são bacilos curvos Gram-negativos, raramente formam cadeias, não apresentam mobilidade, não formam endósporos e fermentam serina, treonina e glicina (BAENA *et al.*, 1999). A presença desses dois gêneros no reator EGSB deveu-se a carga protéica elevada no efluente de abatedouro de aves favorecendo a manutenção dessas bactérias no reator, mesmo com alteração da composição da água residuária diferente daquela usada no processamento de aves. Dessa forma, apesar de não estar diretamente ligados a degradação de compostos orgânicos, faziam parte da ampla diversidade de bactérias do inóculo proveniente do reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves.

Aproximadamente, 4% do total de clones foram relacionados a ordem Clostridiales, família *Incertae Sedis* XI, XII e XIII com destaque para os gêneros *Acidaminobacter*, *Parvimonas* e *Anaerovorax*, respectivamente. O termo *Incertae sedis* "com posição incerta" é uma expressão latina utilizada na taxonomia para indicar o não estabelecimento da posição exata de um táxon. Tal possibilidade reflete a falta de acordo entre especialistas e/ou falta de informações.

O gênero *Anaerovorax* compreende bactérias estritamente anaeróbias, Gram-positivas, não formadoras de endósporos, fermentam ácido acético, ácido butírico, e utilizam amônia (MATTHIES; EVERS; *et al.*, 2000). Nesse trabalho foi constatada a presença de ácido acético e ácido butírico, na etapa IV, na qual foi retirada amostra de biologia molecular, corroborando com a necessidade metabólica desse gênero. A amônia, provavelmente, foi derivada do cloreto de amônio adicionado na alimentação do reator (Tabela 4.3).

Acidaminobacter são bacilos Gram-negativos com metabolismo fermentativo quimioorganotrófico e estritamente anaeróbios. Sua maior fonte de energia são os aminoácidos com formação de ácido acético (Stams & Hansen 1984). *Parvimonas* são cocos Gram-positivos, não formadores de endósporos e estritamente anaeróbios (MURDOCHA & H. N. SHAHB, 1999). Ambos os gêneros, provavelmente, vieram do inóculo e mantiveram-se no reator, mesmo após a mudança da composição da água residuária diferentemente daquela do reator UASB.

Em relação a família Ruminococcaceae (2% dos clones do Copo e 1% dos clones do leito) foi observada similaridade com *Anaerotruncus*. São bacilos Gram-positivos, não formadores de endósporos e estritamente anaeróbios. Podem utilizar ácido isobutírico, isovalérico, málico, entre outros, para seu crescimento (LAWSON *et al.*, 2004). O ácido málico não foi detectado durante as etapas de operação, todavia, ácido isobutírico e isovalérico foram detectados nas etapas III e IV, sendo, provavelmente, utilizados como substrato para os microrganismos desse gênero.

Portanto, a maior parte da microbiota identificada estava relacionada com as condições de operação do reator, seja com suas características físicas ou químicas, tais como, composição nutricional, co-substratos, LAS e/ou diversidade atribuída ao lodo granulado proveniente de abatedouro de aves.

Com o intuito de analisar a cobertura dos clones obtidos em relação a diversidade presente em cada região do reator, foi elaborado curvas de rarefação distintas, ou seja, uma para a região do leito e outra para a região do copo. Os resultados obtidos das UTOs com diferentes porcentagens de similaridade entre as seqüências (100%, 97% e 90%), para os clones da região do copo e leito estão apresentadas nas Figura 5.18 e Figura 5.19, respectivamente.

Embora, essa análise evidencie a cobertura das seqüências obtidas em relação à diversidade microbiana presente nas regiões do reator, deve-se levar em conta as limitações da metodologia empregada. Dessa forma, a curva de rarefação é apenas um indicativo da representatividade da diversidade presente no reator.

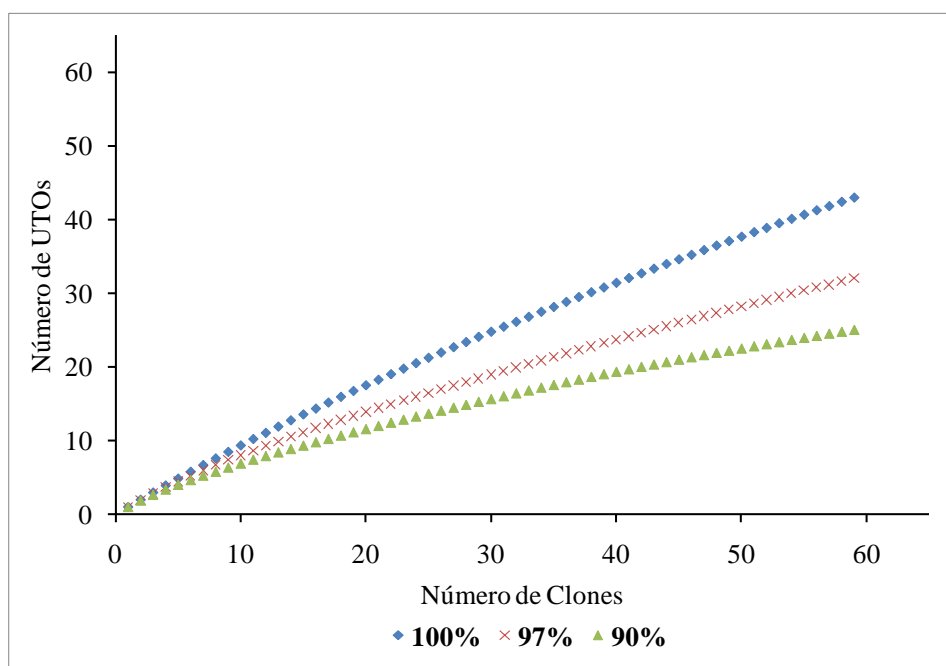


Figura 5.18: Curva de rarefação dos clones da região do copo do reator

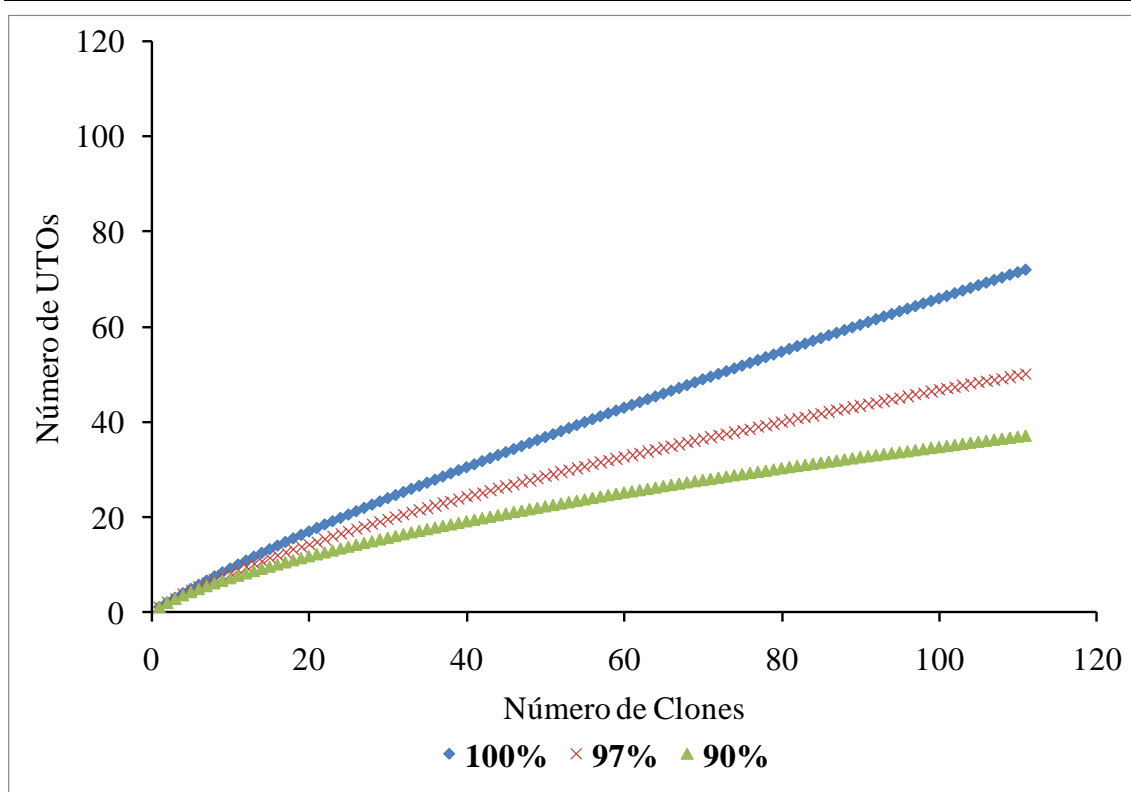


Figura 5.19: Curva de rarefação dos clones do leito do reator.

Para elaboração das árvores filogenéticas unificadas, as seqüências do copo (59) e leito (111) foram agrupadas em 40 unidades taxonômicas operacionais (UTOs), com distância evolutiva de 0,03. Os clones foram agrupados em várias UTOs (Tabela 5.16). Foram elaboradas quatro árvores filogenéticas divididas nos seguintes filis: Firmicutes (Figura 5.20), Proteobacteria (Figura 5.21), Synergistetes e Verrumicrobia (Figura 5.22) e, filo OP10, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi e Bacteroidetes (Figura 5.23).

Tabela 5.16: Números de UTOs e clones considerando distância evolutiva de 0,03. (C) clones do **COPO** e (L) clones do **LEITO**.

UTO	CLONES	UTO	CLONES
1	C1	21	L108
2	C17	22	L123
3	C18	23	L27
4	C20	24	L30
5	C21	25	L42
6	C23, C25, L33, L72, L5, L13, L7, L65	26	L48
7	C27	27	L59
8	C29	28	L69
9	C3, L36, L31	29	L77
10	C32, C30, C39	30	L81
11	C34, L2, L71	31	C4,C11
12	C40	32	L104,C41
13	C47	33	L49,C22
14	C49	34	L79,L114
15	C51, C56, C58, C28, C59, C6, C8, C61, C19, C45, C15, C2, C36, C42, C12, C48, C13, C16, C46, C5, C7, C24	35	L87,C10
16	C62	36	L9,C60
17	L1	37	L38,L115
18	L103	38	L15,L100,L53,
19	L106, L80, L120, L46, L50, L98, L17, L26, C33, C43, L45,L61,L95,L105,L112,L122, L32,L73,L35,L101,L124,L70,L116, L34,L39,L40,L41,L66,L78,L85,L97,L125,L55,L74,L62 , L109,L54,L99, L63, L14, L23,L24	39	L44,L86,L75,L83,C14
20	L107, L8, L84, L88, L119	40	L6, L16, L47, L52, C55,L12,L89,L91,C50,L90,C31,C52,L28,L37,L43,L56,L58,L93, C54, C35, L64,L82,C9,C57,L51,L117

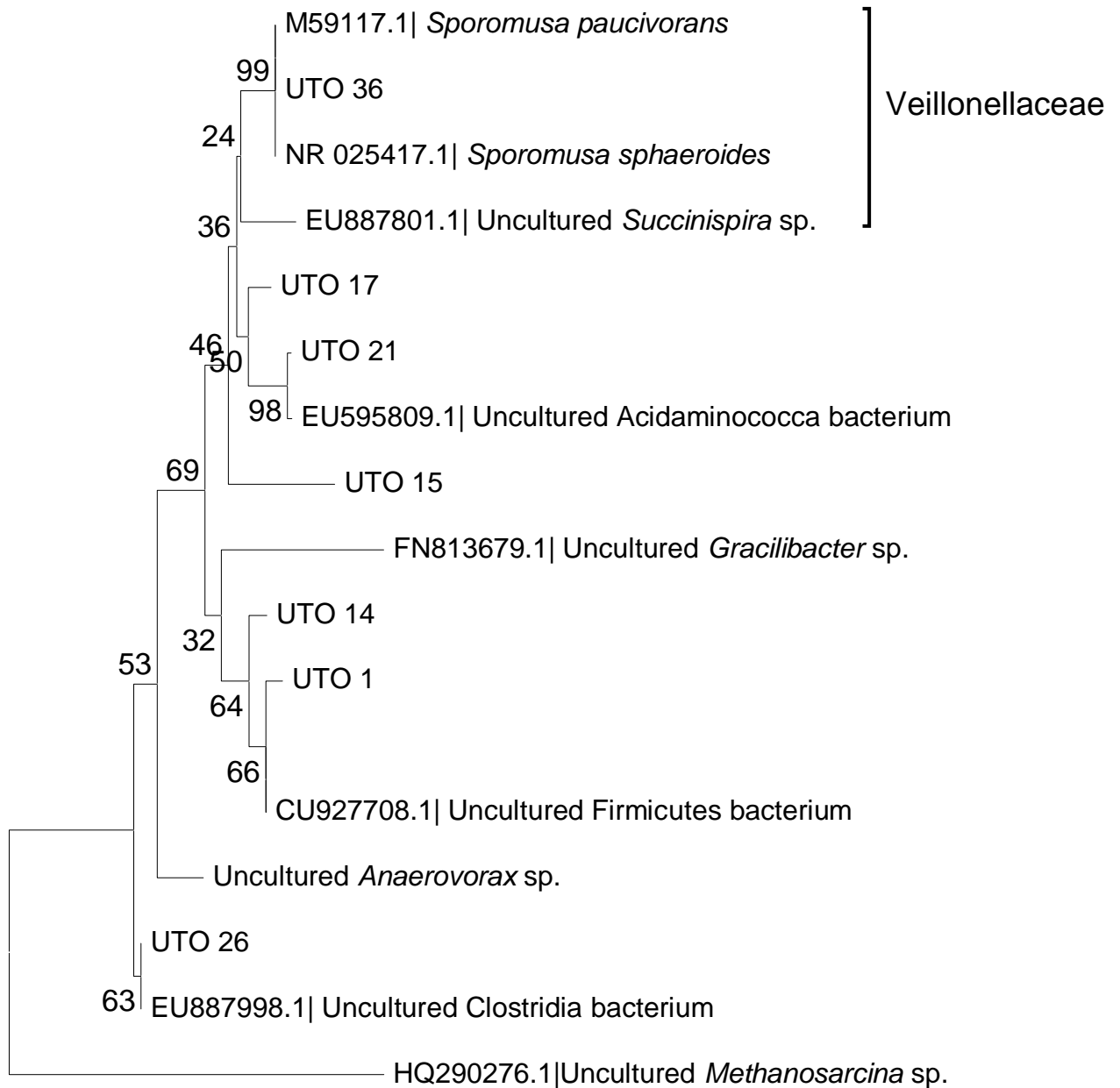


Figura 5.20 Árvore filogenética dos clones relacionados ao filo Firmicutes. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosarcina* sp. foi escolhida como *outgroup*.

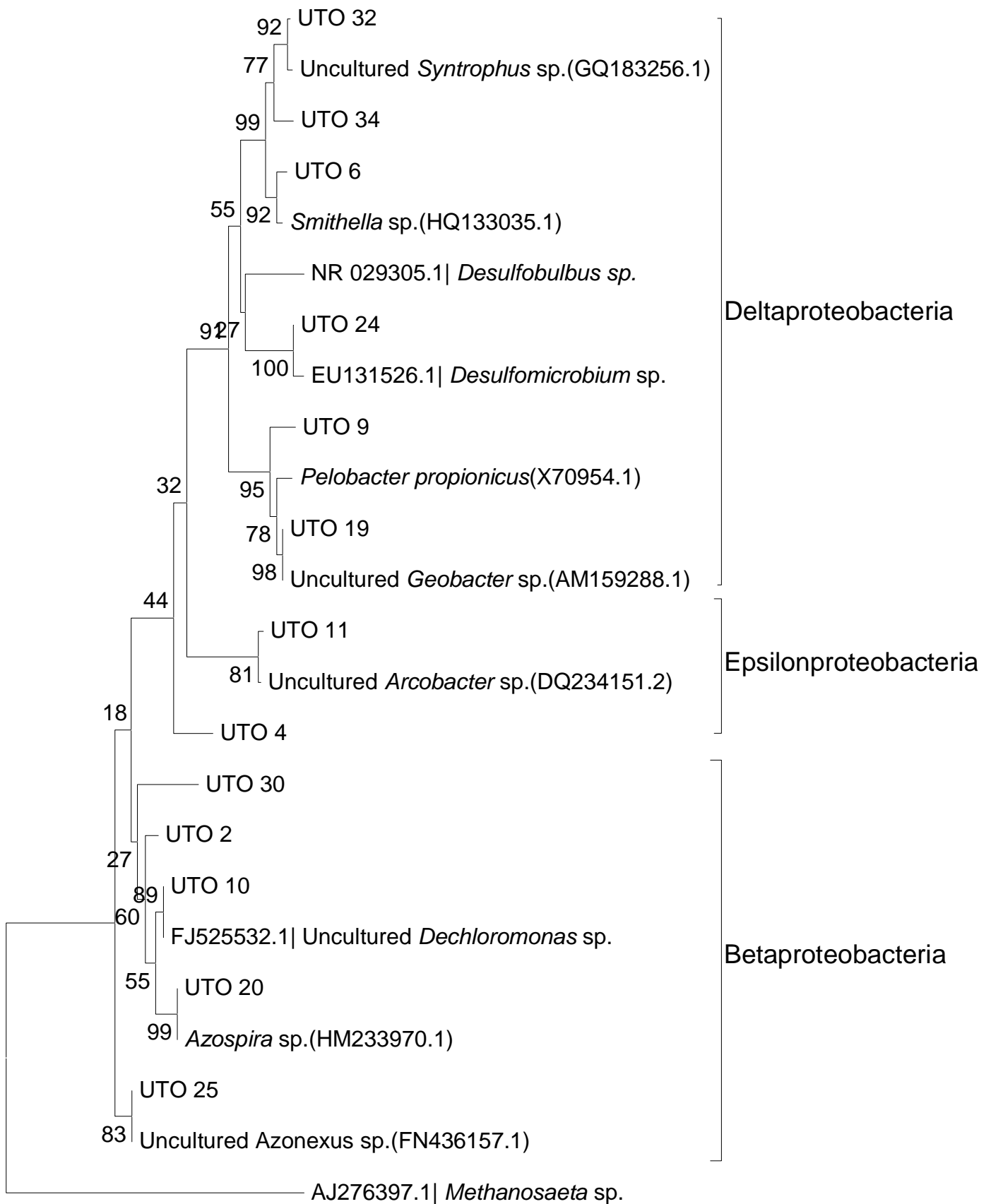
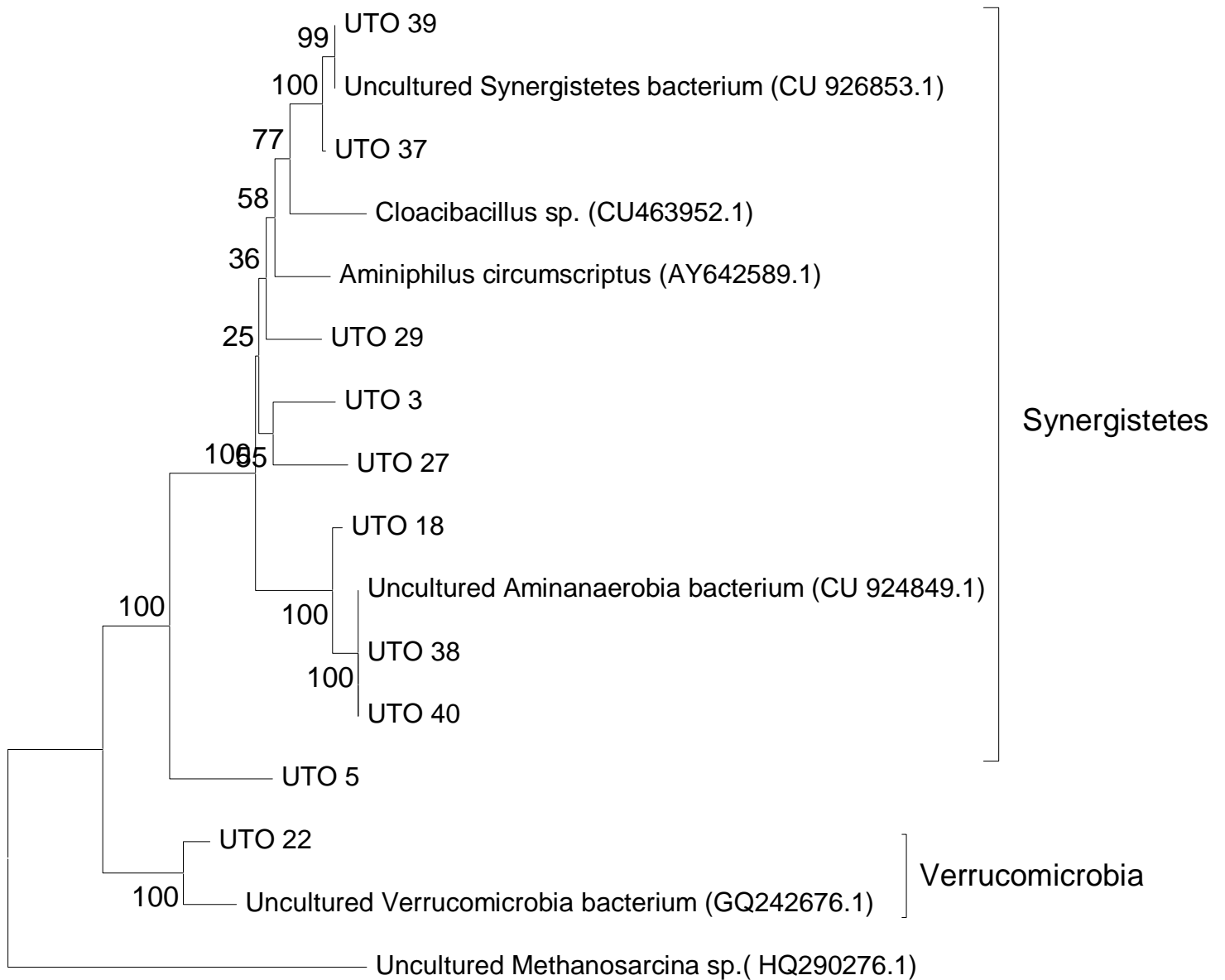
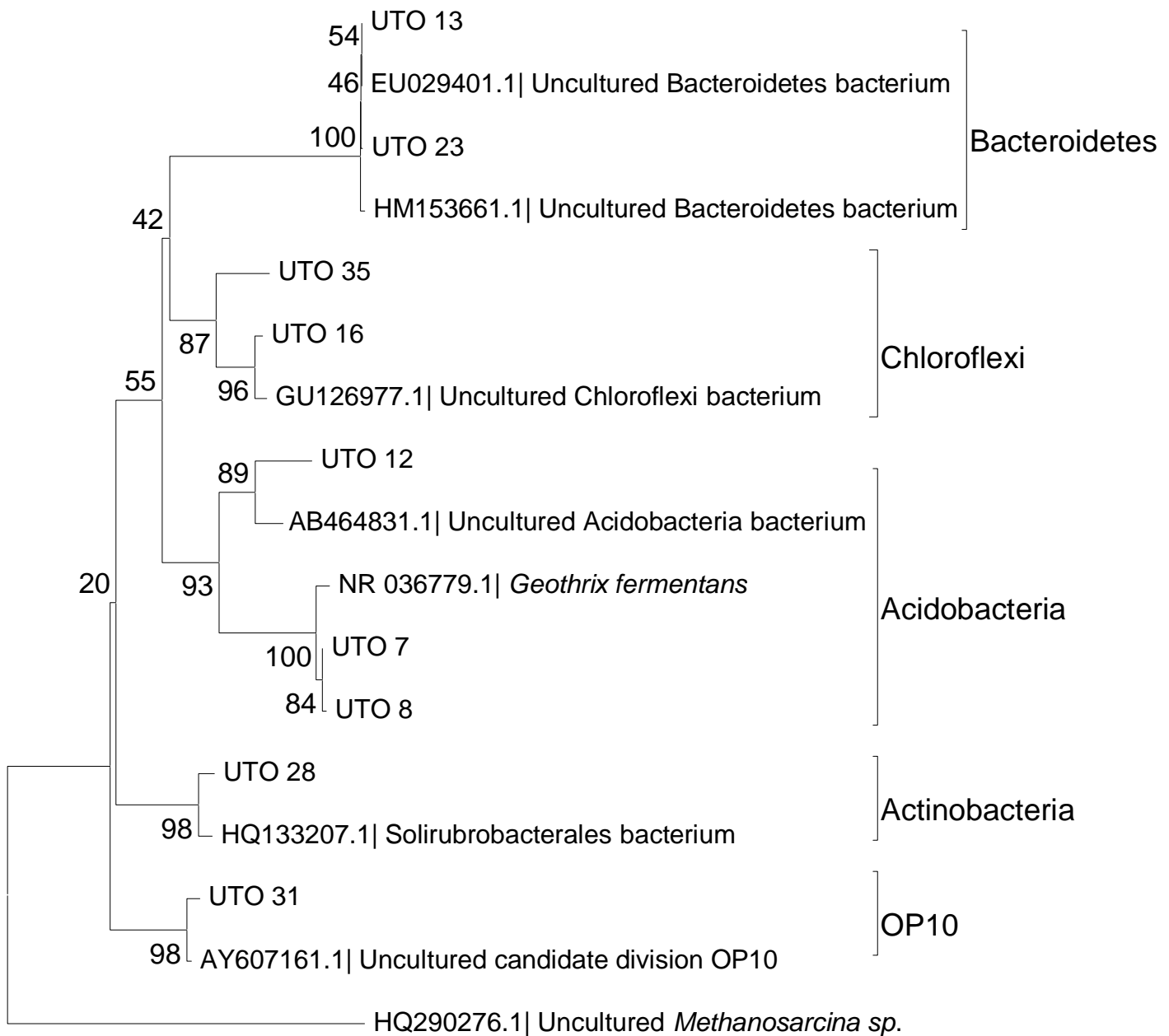


Figura 5.21: Árvore filogenética dos clones relacionados ao filo Proteobacteria. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta* sp. foi escolhida como *outgroup*.



0.05

Figura 5.22: Árvore filogenética dos clones relacionados ao filo Synergistetes e Verrucomicrobia. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosarcina sp.* foi escolhida como *outgroup*.



0.1

Figura 5.23: Árvore filogenética dos clones relacionados ao filo OP10, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi e Bacteroidetes. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosarcina sp.* foi escolhida como *outgroup*

5.10.1 Considerações Finais sobre a Biologia Molecular

Como detalhado anteriormente, a molécula de LAS é sintetizada a partir de subprodutos de petróleo, apresenta na sua estrutura uma cadeia carbônica extensa (região hidrofóbica) e um anel aromático ligado ao grupo sulfonado (região hidrofílica).

O seqüenciamento da região 16S do RNAr para o Domínio *Bacteria* permitiu identificar clones semelhantes a 7 Filos distintos, dos quais podemos destacar alguns gêneros que estão relacionadas com a degradação de compostos aromáticos e ou subprodutos de petróleo e, possivelmente estavam envolvidos com a remoção do LAS.

Na família Geobacteraceae (2% dos clones do Copo e 25% dos clones do Leito) e Holophagaceae (4% dos clones do Copo e ausentes no Leito) em especial os gêneros, *Geobacter* e *Geotrix*, respectivamente. Na família Desulfuromonadaceae em especial o gênero *Pelobacter* (4% dos clones do Copo e 9% do Leito). Na família Veillonellaceae (43% dos clones do Copo e 3% dos clones do Leito), com destaque para o gênero *Sporomusa*. Na família Rhodocyclaceae (7% dos clones Copo e 7% do Leito) em especial o gênero *Dechloromonas*. Na família Peptococcaceae (1% dos clones do Leito) gênero *Cryptanaerobacter*. Na família Synergistaceae (24% dos clones do Copo e 30% dos clones do Leito) em especial o gênero *Thermovirga*.

Os demais gêneros identificados embora não estejam relacionados diretamente com a remoção de compostos aromáticos são importantes para manutenção do consorcio microbiana e dos processos biológicos envolvidos com a digestão anaeróbia.

6 CONCLUSÃO

O reator EGSB foi eficiente na remoção do LAS. A melhor remoção foi no TDH de 32 horas. A remoção de DQO não foi prejudicada pela adição do surfactante. Características hidráulicas, tais como, TDH, diluição do afluente em função da recirculação e transferência de massa foram aspectos positivos que foram diretamente relacionados com a remoção do surfactante.

A recuperação do reator pode ser observada na Etapa IV, no qual, houve a retomada da remoção de LAS para valores acima de 63%. Tal fato indicou a plasticidade da biomassa após uma condição com carga de LAS mais elevada.

Balanco de massa global apontou remoção de 57%, sendo 8% devido à adsorção. A adsorção na biomassa efluente e biomassa do leito foram de 3% e 5%, respectivamente.

Diminuição do diâmetro médio em função da longa exposição ao LAS foi observada, assim como, aumento de ácidos orgânicos voláteis. Foram detectadas concentrações significativas de bactérias redutoras de ferro, bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas pela técnica dos tubos múltiplos (NMP).

Instabilidade da biomassa ao surfactante ficou evidente quando da sua adição, uma vez que aumentou a concentração de sólidos totais efluente.

A microbiota estabelecida em função da alimentação, características hidráulicas do reator e inóculo empregado foram relacionadas com a remoção de compostos aromáticos. Em especial microrganismos redutores de ferro (*Geobacter* e *Geotrix*), e outros, tais como, *Dechloromonas* sp., *Pelobacter* sp. e *Sporomusa* sp. que possivelmente contribuíram para a degradação do LAS. As demais bactérias e arqueias metanogênicas desempenharam função importante na estabilidade do reator; justificando a importância do consórcio microbiano na remoção de compostos recalcitrantes.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a partir da técnica SIP-DNA os microrganismos diretamente envolvidos com a degradação do LAS.
- Avaliar a remoção de LAS em função de diferentes aceptores finais de elétrons.
- Analisar a eficiência de remoção de LAS no reator EGSB com TDH menor.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, M. M.; KHEIFAT, K. M.; BATARSEH, M.; TARAWNEH, K. A.; AL-MUSTAFA, A.; AL-MADADHAH, M. Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzenesulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of acinetobacter calcoaceticus and pantoea agglomerans. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 4, Sep, p. 432-439, 2007.

ALMENDARIZ, F. J.; MERAZ, M.; SOBERON, G.; MONROY, O. Degradation of lineal alkylbenzene sulphonate (las) in an acidogenic reactor bioaugmented with a pseudomonas aeruginosa (m113) strain. *Water Science and Technology*, v. 44, n. 4, p. 183-188, 2001.

ALPHENAAR, P. A.; VISSER, A.; LETTINGA, G. The effect of liquid upward velocity and hydraulic retention time on granulation in uasb reactors treating wastewater with a high sulfate content. *Bioresource Technology*, v. 43, n. 3, p. 249-258, 1993.

ANGELIDAKI, I.; PETERSEN, S. P.; AHRING, B. K. Effects of lipids on thermophilic anaerobic-digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 4, p. 469-472, 1990.

APHA; AWWA; WPCF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005

BAENA, S.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B.; LABAT, M.; THOMAS, P.; GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C. Aminomonas paucivorans gen. Nov., sp nov., a mesophilic anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 975-982, 1999.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BERNA, J. L.; FERRER, J.; MORENO, A.; PRATS, D.; BEVIA, F. R. The fate of las in the environment. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 26, p. 101-107, 1989.

BUHL, K. J.; HAMILTON, S. J. Acute toxicity of fire-control chemicals, nitrogenous chemicals, and surfactants to rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 129, n. 2, p. 408-418, 2000.

CAMPOS, J. R. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbico e disposição controlada no solo *Projeto PROSAB*, p. 464, 1999.

CAVALLI, L.; GELLERA, A.; LANDONE, A. Las removal and biodegradation in a waste-water treatment-plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 12, n. 10, p. 1777-1788, 1993.

CHUN, J. Computer assisted classification and identification of actinomycetes. *Ph.D. Thesis, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK, 1995.*

COSTA, J. C.; ABREU, A. A.; FERREIRA, E. C.; ALVES, M. M. Quantitative image analysis as a diagnostic tool for monitoring structural changes of anaerobic granular sludge during detergent shock loads. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 98, n. 1, Sep, p. 60-68, 2007.

DAHLE, H.; BIRKELAND, N. K. *Thermovirga lienii* gen. Nov., sp nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a north sea oil well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1539-1545, 2006.

DAVIDOVA, I. A.; DUNCAN, K. E.; CHOI, O. K.; SUFLITA, J. M. *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. Nov., sp nov., an n-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 2737-2742, 2006.

OLIVEIRA, L. L.; COSTA, R. B.; OKADA, D. Y.; VICH, D. V.; DUARTE, I. C. S.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (las) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 14, p. 5112-5122, 2010a.

OLIVEIRA, L. L.; DUARTE, I. C. S.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. *Journal of Environmental Management*, v. 90, n. 2, p. 1261-1268, 2009.

DENGER, K.; COOK, A. M. Assimilation of sulfur from alkyl- and arylsulfonates by *Clostridium* spp. *Archives of Microbiology*, v. 167, n. 2-3, p. 177-181, 1997.

DILLALO, R., ALBERTSON, O.E. Volatile acids by direct titration. *Journal WPCF*, v. 33, p. 356-365, 1961.

DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; BUZZINI, A. P.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Development of a method by hplc to determine las and its application in anaerobic reactors. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 7, Nov-Dec, p. 1360-1367, 2006.

DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; MAYOR, M. S.; OKADA, D. Y.; VARESCHE, M. B. A. Degradation of detergent (linear alkylbenzene sulfonate) in an anaerobic stirred sequencing-batch reactor containing granular biomass. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 64, n. 2, Mar, p. 129-134, 2010.

DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; SAAVEDRA, N. K. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of the microbial diversity in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor treating linear alkylbenzene sulfonate. *Biodegradation*, v. 19, n. 3, Jun, p. 375-385, 2008.

GANESAN, A.; CHAUSSONNERIE, S.; TARRADE, A.; DAUGA, C.; BOUCHEZ, T.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; SGHIR, A. Cloacibacillus evryensis gen. Nov., sp nov., a novel asaccharolytic, mesophilic, amino-acid-degrading bacterium within the phylum 'synergistetes', isolated from an anaerobic sludge digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 2003-2012, 2008.

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; RIBOSA, I.; LATORRE, A.; SANCHEZ-LEAL, J. Anaerobic digestion of linear alkyl benzene sulfonates: Biodegradation kinetics and metabolite analysis. *Chemosphere*, v. 60, n. 11, Sep, p. 1636-1643, 2005.

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; SANCHEZ-LEAL, J.; RIBOSA, I. Effect of linear alkylbenzene sulphonates (las) on the anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, v. 40, n. 15, p. 2958-2964, 2006.

GAVALA, H. N.; AHRING, B. K. Inhibition of the anaerobic digestion process by linear alkylbenzene sulfonates. *Biodegradation*, v. 13, n. 3, p. 201-209, 2002.

GONZALEZ-GIL, G.; LENS, P. N. L.; VAN AELST, A.; VAN AS, H.; VERSPRILLE, A. I.; LETTINGA, G. Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 8, p. 3683-3692, 2001.

GOUDAR, C.; STREVETT, K.; GREGO, J. Competitive substrate biodegradation during surfactant-enhanced remediation. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, v. 125, n. 12, p. 1142-1148, 1999.

GOULD, L. A.; LANSLEY, A. B.; BROWN, M. B.; FORBES, B.; MARTIN, G. P. Mitigation of surfactant erythrocyte toxicity by egg phosphatidylcholine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, n. 10, p. 1203-1209, 2000.

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 rna-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

GUJER, W.; ZEHNDER, A. J. B. Conversion processes in anaerobic digestion. *Wat. Sci. Technol.*, v. 15, p. 127-167, 1983.

HARRIS, J. K.; KELLEY, S. T.; PACE, N. R. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division op11. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 2, p. 845-849, 2004.

HERA. Human and environmental risk assesment on ingredients of european household cleaning products-linear alkylbenzene sulphonate, las - linear alkylbenzene sulphonate. [Http://www.Heraproject.Com](http://www.Heraproject.Com), acesso em 01 jan. 2011.

HOUF, K.; ON, S. L. W.; COENYE, T.; MAST, J.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Arcobacter cibarius sp nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 713-717, 2005.

HUANG, C.; VANBENSCHOTEN, J. E.; HEALY, T. C.; RYAN, M. E. Feasibility study of surfactant use for remediation of organic and metal contaminated soils. *Journal of Soil Contamination*, v. 6, n. 5, p. 537-556, 1997.

HUSER, B. A.; WUHRMANN, K.; ZEHNDER, A. J. B. Methanotrix-soehngenii gen-nov-sp-nov, a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiology*, v. 132, n. 1, p. 1-9, 1982.

IGLESIASJIMENEZ, E.; POVEDA, E.; SANCHEZMARTIN, M. J.; SANCHEZCAMAZANO, M. Effect of the nature of exogenous organic matter on pesticide sorption by the soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 33, n. 2, p. 117-124, 1997.

JETTEN, M. S. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Methanogenesis from acetate: A comparison of the acetate metabolism in methanotrix soehngenii and methanosarcina spp. . *FEMS Microbiology Letters*, v. 88, n. 3-4, 1991.

JUMAS-BILAK, E.; ROUDIERE, L.; MARCHANDIN, H. Description of 'synergistetes' phyl. Nov and emended description of the phylum 'deferribacteres' and of the family syntrophomonadaceae, phylum 'firmicutes'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 1028-1035, 2009.

KATO, M. T.; FIELD, J. A.; VERSTEEG, P.; LETTINGA, G. Feasibility of expanded granular sludge bed reactors for the anaerobic treatment of low-strength soluble wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, n. 4, p. 469-479, 1994.

KERTESZ, M. A.; KOLBENER, P.; STOCKINGER, H.; BEIL, S.; COOK, A. M. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related-compounds by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 7, p. 2296-2303, 1994.

LANE, D. J. 16s/23s rrna sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. *Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. New York*, p. 115-175, 1991.

LAWSON, P. A.; SONG, Y.; LIU, C.; MOLITORIS, D. R.; VAISANEN, M. L.; COLLINS, M. D.; FINEGOLD, S. M. Anaerotruncus colihominis gen. Nov., sp. Nov., from human faeces *Int J Syst Evol Microbiol* v. 54, 2004.

LAZARO, C. Z.; HIRASAWA J. S.; VARESCHE M. B. A.; ADORNO M. A. T. Development of an hplc method for the analysis of eleven short chain organic acids in bioproduction of hydrogen. *In: XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO). Florianópolis, SC, Brazil.*, 2008.

LETTINGA, G.; VANVELSEN, A. F. M.; HOBMA, S. W.; DEZEEUW, W.; KLAPWIJK, A. Use of the upflow sludge blanket (usb) reactor concept for biological wastewater-treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 22, n. 4, p. 699-734, 1980.

LIU, Y. T.; BALKWILL, D. L.; ALDRICH, H. C.; DRAKE, G. R.; BOONE, D. R. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs smithella propionica

gen. Nov., sp. Nov. And syntrophobacter wolinii. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 545-556, 1999.

LOBNER, T.; TORANG, L.; BATSTONE, D. J.; SCHMIDT, J. E.; ANGELIDAKI, I. Effects of process stability on anaerobic biodegradation of las in uasb reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, n. 7, Mar, p. 759-765, 2005.

LOVLEY, D. R.; STOLZ, J. F.; NORD, G. L.; PHILLIPS, E. J. P. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature*, v. 330, n. 6145, p. 252-254, 1987.

MACLEOD, F. A.; GUIOT, S. R.; COSTERTON, J. W. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 6, p. 1598-1607, 1990.

MATTHIES, C.; EVERS, S.; LUDWIG, W.; SCHINK, B. Anaerovorax odorimutans gen. Nov., sp nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 1591-1594, 2000.

MATTHIES, C.; SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; SCHINK, B. Pelospora glutarica gen. Nov., sp nov., a glutarate-fermenting, strictly anaerobic, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 645-648, 2000.

MCCRADY, M. H. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 183-212, 1915.

MOGENSEN, A. S.; HAAGENSEN, F.; AHRING, B. K. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, n. 4, p. 706-711, 2003.

MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: *VI Oficina e seminário latino-americano de digestão anaeróbia*. Recife, PE: UFPE, 2000. p. 2813-2823.

MOSCHE, M.; MEYER, U. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic digestion: Influence of exposure time. *Water Research*, v. 36, n. 13, Jul, p. 3253-3260, 2002.

MURAMOTO, S.; OKI, Y.; NISHIZAKI, H.; AOYAMA, I. Variation in some element contents of water hyacinth due to cadmium or nickel treatment with or without anionic surface-active agents. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control*, v. 24, n. 8, p. 925-934, 1989.

MURDOCHA, D. A.; H. N. SHAHB. Reclassification of peptostreptococcus magnus (prevot 1933) holdeman and moore 1972 as finegoldia magna comb. Nov. And peptostreptococcus micros(prevot1933) smith 1957 as micromonas micros comb. Nov *Anaerobe*, v. 5, n. 5, p. 555-559 1999.

NUNEZ, L. A.; MARTINEZ, B. Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in an expanded granular sludge bed (egsb) reactor. *Water Science and Technology*, v. 40, n. 8, p. 99-106, 1999.

OLIVEIRA, L. L. Remoção de alquibenzeno sulfonado (las) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado. . *Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.*, p. 176, 2010.

OLIVEIRA, L. L.; DUARTE, I. C. S.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. *Journal of Environmental Management*, v. 90, n. 2, Feb, p. 1261-1268, 2009.

PAINTER, H. A.; ZABEL, T. The behavior of las in sewage treatment. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 26, p. 108-115, 1989.

PARK, J. W.; JAFFE, P. R. Partitioning of 3 nonionic organic-compounds between adsorbed surfactants, micelles, and water. *Environmental Science & Technology*, v. 27, n. 12, p. 2559-2565, 1993.

PENTEADO, J. C. P.; SEoud, O. A. E.; CARVALHO, L. R. F. Linear alkylbenzene sulfonates: Chemistry, environmental impact and analysis. *Quimica Nova*, v. 29, n. 5, Sep-Oct, p. 1038-1046, 2006.

RAJPUT, V. S.; HIGGINS, A. J.; SINGLEY, M. E. Cleaning of excavated soil contaminated with hazardous organic-compounds by washing. *Water Environment Research*, v. 66, n. 6, p. 819-827, 1994.

RAZO-FLORES, E.; SVITELSKAYA, A.; DONLON, B.; FIELD, J.; LETTINGA, G. The effect of granular sludge source on the anaerobic biodegradability of aromatic compounds *Bioresource Technology*, v. 56, p. 215-220, 1996.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic-digestion of high-strength wastes. *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.

RODEN, E. E.; URRUTIA, M. M.; MANN, C. J. Bacterial reductive dissolution of crystalline fe(iii) oxide in continuous-flow column reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 3, p. 1062-1065, 2000.

RUFFO, C.; FEDRIGUCCI, M. G.; VALTORTA, L.; CAVALLI, L. Biodegradation of anionic and non-ionic surfactants by co2 evolution. Acclimated and non-acclimated inoculum. *Riv. It. Sostanze Grasse*, p. 277-283, 1999.

SAKAMOTO, I. S. Comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo granuloso anaeróbio metanogênico submetido a adições crescentes de sulfato. . *Dissertação de mestrado, EESC, USP, São Carlos,*, 1996.

SANZ, J. L.; CULUBRET, E.; DE FERRER, J.; MORENO, A.; BERNA, J. L. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (las) in upflow anaerobic sludge blanket (uasb) reactors. *Biodegradation*, v. 14, n. 1, p. 57-64, 2003.

SCHOBBERL, P. Linear alkylbenzene sulfonate (las) - monitoring .2. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 32, n. 1, Jan-Feb, p. 25-35, 1995.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, v. 1508, n. 1-2, Nov, p. 235-251, 2000.

SEGHEZZO, L.; ZEEMAN, G.; VAN LIER, J. B.; HAMELERS, H. V. M.; LETTINGA, G. A review: The anaerobic treatment of sewage in uasb and egasb reactors. *Bioresource Technology*, v. 65, n. 3, p. 175-190, 1998.

SINGH, R. P.; RAWAT, J. P.; KUMAR, R. Effect of cationic, non-ionic and anionic surfactants on the adsorption of carbofuran on three different types of indian soil. *Adsorption Science & Technology*, v. 18, n. 4, p. 333-346, 2000.

STAMS, A. J. M.; HANSEN, T. A. Fermentation of glutamate and other compounds by acidaminobacter-hydrogenofomans gen-nov sp-nov, an obligate anaerobe isolated from black mud - studies with pure cultures and mixed cultures with sulfate-reducing and methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology*, v. 137, n. 4, p. 329-337, 1984.

TAN, H.; CHAMPION, J. T.; ARTIOLA, J. F.; BRUSSEAU, M. L.; MILLER, R. M. Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science & Technology*, v. 28, n. 13, p. 2402-2406, 1994.

TOUZEL, J. P.; ALBAGNAC, G. Isolation and characterization of methanococcus-mazei strain mc3. *FEMS Microbiology Letters*, v. 16, n. 2-3, p. 241-245, 1983.

VAZOLLER, R. F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. *Tese de doutorado. EESC, USP, São Carlos*, 1995.

VENHUIS, S. H.; MEHRVAR, M. Health effects, environmental impacts, and photochemical degradation of selected surfactants in water. *International Journal of Photoenergy*, v. 6, n. 3, p. 115-125, 2004.

VERGE, C.; MORENO, A.; BRAVO, J.; BERNA, J. L. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (las). *Chemosphere*, v. 44, n. 8, p. 1749-1757, 2001.

WAGENER, S.; SCHINK, B. Anaerobic degradation of nonionic and anionic surfactants in enrichment cultures and fixed-bed reactors. *Water Research*, v. 21, n. 5, p. 615-622, 1987.

YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. Anaerolinea thermolimosa sp nov., levilinea saccharolytica gen. Nov., sp nov and leptolinea tardivitalis gen. Nov., so. Nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes anaerolineae classis nov and

caldilineae classis nov in the bacterial phylum chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1331-1340, 2006.

YING, G.-G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International* v. 32 p. 417 – 431 2006.

ZHILINA, T. N. Death of methanosarcina in the air. *Microbiology (Engl. Transl.)*, v. 41, p. 980-981, 1972.

9 APÊNDICES

SIMILARIDADE DOS CLONES*

Tabela A1: Similaridade dos clones da região do leito usando a ferramenta RDP *classifier**

Clones	Filo	Família		Gênero	
L69	Actinobacteria	Solirubrobacterales	23%	<i>Conexibacteraceae</i>	20%
L87	Chloroflexi	Anaerolineaceae	36%	<i>Bellilinea</i>	17%
L27	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	100%	<i>Cloacibacterium</i>	99%
L81	Proteobacteria	Comamonadaceae	60%	<i>Alicyclophilus</i>	55%
L2	Proteobacteria	Campylobacteraceae	100%	<i>Arcobacter</i>	100%
L32	Proteobacteria	Campylobacteraceae	100%	<i>Arcobacter</i>	100%
L35	Proteobacteria	Campylobacteraceae	100%	<i>Arcobacter</i>	100%
L70	Proteobacteria	Campylobacteraceae	100%	<i>Arcobacter</i>	100%
L71	Proteobacteria	Campylobacteraceae	48%	<i>Arcobacter</i>	48%
L73	Proteobacteria	Campylobacteraceae	100%	<i>Arcobacter</i>	100%
L101	Proteobacteria	Campylobacteraceae	100%	<i>Arcobacter</i>	100%
L116	Proteobacteria	Campylobacteraceae	100%	<i>Arcobacter</i>	100%
L124	Proteobacteria	Campylobacteraceae	100%	<i>Arcobacter</i>	100%
L42	Proteobacteria	Rhodocyclaceae	98%	<i>Azonexus</i>	84%
L8	Proteobacteria	Rhodocyclaceae	100%	<i>Azospira</i>	100%
L84	Proteobacteria	Rhodocyclaceae	96%	<i>Azospira</i>	95%
L88	Proteobacteria	Rhodocyclaceae	100%	<i>Azospira</i>	100%
L107	Proteobacteria	Rhodocyclaceae	100%	<i>Azospira</i>	97%
L119	Proteobacteria	Rhodocyclaceae	100%	<i>Azospira</i>	100%
L18	Proteobacteria	Desulfobulbaceae	100%	<i>Desulfobulbus</i>	100%
L30	Proteobacteria	Desulfomicrobiaceae	100%	<i>Desulfomicrobium</i>	100%

L14	Proteobacteria	Geobacteraceae	79%	<i>Geobacter</i>	78%
L23	Proteobacteria	Geobacteraceae	100%	<i>Geobacter</i>	100%
L24	Proteobacteria	Geobacteraceae	100%	<i>Geobacter</i>	100%
L26	Proteobacteria	Geobacteraceae	52%	<i>Geobacter</i>	52%
L34	Proteobacteria	Geobacteraceae	72%	<i>Geobacter</i>	72%
L39	Proteobacteria	Geobacteraceae	67%	<i>Geobacter</i>	66%
L40	Proteobacteria	Geobacteraceae	66%	<i>Geobacter</i>	66%
L41	Proteobacteria	Geobacteraceae	83%	<i>Geobacter</i>	83%
L45	Proteobacteria	Geobacteraceae	60%	<i>Geobacter</i>	60%
L46	Proteobacteria	Geobacteraceae	72%	<i>Geobacter</i>	72%
L54	Proteobacteria	Geobacteraceae	77%	<i>Geobacter</i>	77%
L55	Proteobacteria	Geobacteraceae	81%	<i>Geobacter</i>	81%
L61	Proteobacteria	Geobacteraceae	96%	<i>Geobacter</i>	96%
L62	Proteobacteria	Geobacteraceae	69%	<i>Geobacter</i>	69%
L63	Proteobacteria	Geobacteraceae	92%	<i>Geobacter</i>	92%
L66	Proteobacteria	Geobacteraceae	73%	<i>Geobacter</i>	73%
L74	Proteobacteria	Geobacteraceae	85%	<i>Geobacter</i>	84%
L78	Proteobacteria	Geobacteraceae	80%	<i>Geobacter</i>	80%
L85	Proteobacteria	Geobacteraceae	81%	<i>Geobacter</i>	81%
L95	Proteobacteria	Geobacteraceae	62%	<i>Geobacter</i>	62%
L97	Proteobacteria	Geobacteraceae	79%	<i>Geobacter</i>	79%
L98	Proteobacteria	Geobacteraceae	72%	<i>Geobacter</i>	72%
L105	Proteobacteria	Geobacteraceae	71%	<i>Geobacter</i>	71%
L109	Proteobacteria	Geobacteraceae	70%	<i>Geobacter</i>	70%
L112	Proteobacteria	Geobacteraceae	87%	<i>Geobacter</i>	87%
L122	Proteobacteria	Geobacteraceae	61%	<i>Geobacter</i>	61%
L125	Proteobacteria	Geobacteraceae	78%	<i>Geobacter</i>	78%

L106	Proteobacteria	Geobacteraceae	16%	<i>Geothermobacter</i>	10%
L17	Proteobacteria	Desulfuromonadaceae	60%	<i>Pelobacter</i>	60%
L31	Proteobacteria	Desulfuromonadaceae	65%	<i>Pelobacter</i>	65%
L36	Proteobacteria	Desulfuromonadaceae	76%	<i>Pelobacter</i>	75%
L50	Proteobacteria	Desulfuromonadaceae	55%	<i>Pelobacter</i>	49%
L80	Proteobacteria	Desulfuromonadaceae	54%	<i>Pelobacter</i>	54%
L99	Proteobacteria	Desulfuromonadaceae	51%	<i>Pelobacter</i>	51%
L120	Proteobacteria	Desulfuromonadaceae	51%	<i>Pelobacter</i>	51%
L79	Proteobacteria	Syntrophaceae	99%	<i>Syntrophus</i>	76%
L104	Proteobacteria	Syntrophaceae	100%	<i>Syntrophus</i>	75%
L114	Proteobacteria	Syntrophaceae	97%	<i>Syntrophus</i>	64%
L5	Proteobacteria	Syntrophaceae	39%	<i>Smithella</i>	31%
L7	Proteobacteria	Syntrophaceae	64%	<i>Smithella</i>	52%
L13	Proteobacteria	Syntrophaceae	80%	<i>Smithella</i>	67%
L33	Proteobacteria	Syntrophaceae	100%	<i>Smithella</i>	93%
L72	Proteobacteria	Syntrophaceae	58%	<i>Smithella</i>	35%
L25	Proteobacteria	Rhodocyclaceae	93%	<i>Zoogloea</i>	87%
L65	Proteobacteria	Syntrophaceae	38%	<i>Smithella</i>	34%
L49	Firmicutes	Ruminococcaceae	35%	<i>Anaerotruncus</i>	15%
L48	Firmicutes	Incertae Sedis XIII	98%	<i>Anaerovorax</i>	98%
L9	Firmicutes	Syntrophomonadaceae	25%	<i>Pelospora</i>	20%
L1	Firmicutes	Peptococcaceae	19%	<i>Peptococcaceae 1</i>	18%
L10	Firmicutes	Veillonellaceae	22%	<i>Succinispira</i>	13%
L108	Firmicutes	Veillonellaceae	98%	<i>Zymophilus</i>	12%
L29	Firmicutes	Veillonellaceae	22%	<i>Succinispira</i>	14%
L21	Synergistetes	Synergistaceae	100%	<i>Cloacibacillus</i>	95%
L38	Synergistetes	Synergistaceae	100%	<i>Cloacibacillus</i>	36%

L75	Synergistetes	Synergistaceae	100%	<i>Cloacibacillus</i>	34%
L83	Synergistetes	Synergistaceae	99%	<i>Cloacibacillus</i>	55%
L86	Synergistetes	Synergistaceae	100%	<i>Cloacibacillus</i>	38%
L28	Synergistetes	Synergistaceae	79%	<i>Aminiphilus</i>	34%
L115	Synergistetes	Synergistaceae	96%	<i>Aminiphilus</i>	43%
L20	Synergistetes	Synergistaceae	99%	<i>Aminobacterium</i>	67%
L44	Synergistetes	Synergistaceae	58%	<i>Aminobacterium</i>	30%
L59	Synergistetes	Synergistaceae	98%	<i>Aminobacterium</i>	86%
L3	Synergistetes	Synergistaceae	100%	<i>Aminomonas</i>	88%
L4	Synergistetes	Synergistaceae	100%	<i>Aminomonas</i>	89%
L11	Synergistetes	Synergistaceae	100%	<i>Aminomonas</i>	90%
L19	Synergistetes	Synergistaceae	100%	<i>Aminomonas</i>	92%
L6	Synergistetes	Synergistaceae	70%	<i>Thermovirga</i>	25%
L12	Synergistetes	Synergistaceae	98%	<i>Thermovirga</i>	44%
L15	Synergistetes	Synergistaceae	87%	<i>Thermovirga</i>	32%
L16	Synergistetes	Synergistaceae	77%	<i>Thermovirga</i>	28%
L37	Synergistetes	Synergistaceae	95%	<i>Thermovirga</i>	43%
L43	Synergistetes	Synergistaceae	95%	<i>Thermovirga</i>	69%
L47	Synergistetes	Synergistaceae	97%	<i>Thermovirga</i>	59%
L51	Synergistetes	Synergistaceae	84%	<i>Thermovirga</i>	58%
L52	Synergistetes	Synergistaceae	94%	<i>Thermovirga</i>	52%
L53	Synergistetes	Synergistaceae	22%	<i>Thermovirga</i>	14%
L56	Synergistetes	Synergistaceae	95%	<i>Thermovirga</i>	51%
L58	Synergistetes	Synergistaceae	99%	<i>Thermovirga</i>	54%
L64	Synergistetes	Synergistaceae	98%	<i>Thermovirga</i>	57%
L77	Synergistetes	Synergistaceae	90%	<i>Thermovirga</i>	52%
L82	Synergistetes	Synergistaceae	93%	<i>Thermovirga</i>	55%

L89	Synergistetes	Synergistaceae	97%	<i>Thermovirga</i>	54%
L90	Synergistetes	Synergistaceae	91%	<i>Thermovirga</i>	41%
L91	Synergistetes	Synergistaceae	98%	<i>Thermovirga</i>	46%
L93	Synergistetes	Synergistaceae	94%	<i>Thermovirga</i>	61%
L96	Synergistetes	Synergistaceae	22%	<i>Thermovirga</i>	14%
L100	Synergistetes	Synergistaceae	88%	<i>Thermovirga</i>	47%
L103	Synergistetes	Synergistaceae	88%	<i>Thermovirga</i>	50%
L117	Synergistetes	Synergistaceae	92%	<i>Thermovirga</i>	46%

*Os gêneros e filis foram determinados usando a ferramenta RDP *classifier*. A % representa a probabilidade de acordo com o RDP *classifier* para limite de confiança de 95%.

Tabela A2: Similaridade dos clones da região do copo usando a ferramenta RDP *classifier**

Clones	Filo	Família		Gênero	
C27	"Acidobacteria"	Holophagaceae	100%	<i>Geothrix</i>	73%
C29	"Acidobacteria"	Holophagaceae	100%	<i>Geothrix</i>	69%
C40	"Acidobacteria"	Acanthopleuribacteraceae	39%	<i>Acanthopleuribacter</i>	39%
C10	"Chloroflexi"	Anaerolineaceae	25%	<i>Bellilinea</i>	20%
C62	"Chloroflexi"	Anaerolineaceae	67%	<i>Bellilinea</i>	36%
C47	"Bacteroidetes"	Flavobacteriaceae	100%	<i>Cloacibacterium</i>	99%
C4	OP10	-	-	<i>OP10_genera_incertae_sedis</i>	99%
C11	OP10	-	-	<i>OP10_genera_incertae_sedis</i>	99%
C20	"Proteobacteria"	Nautiliaceae	20%	<i>Lebetimonas</i>	16%
C30	"Proteobacteria"	Rhodocyclaceae	100%	<i>Dechloromonas</i>	70%
C32	"Proteobacteria"	Rhodocyclaceae	100%	<i>Dechloromonas</i>	75%
C39	"Proteobacteria"	Rhodocyclaceae	100%	<i>Dechloromonas</i>	92%
C33	"Proteobacteria"	Geobacteraceae	69%	<i>Geobacter</i>	69%
C43	"Proteobacteria"	Geobacteraceae	57%	<i>Geobacter</i>	57%

C34	"Proteobacteria"	Campylobacteraceae	90%	<i>Arcobacter</i>	90%
C17	"Proteobacteria"	Rhodocyclaceae	100%	<i>Azonexus</i>	85%
C3	"Proteobacteria"	Desulfuromonadaceae	51%	<i>Pelobacter</i>	51%
C23	"Proteobacteria"	Syntrophaceae	43%	<i>Smithella</i>	32%
C41	"Proteobacteria"	Syntrophaceae	98%	<i>Syntrophus</i>	55%
C25	"Proteobacteria"	Syntrophaceae	92%	<i>Smithella</i>	79%
C60	"Firmicutes"	"Gracilibacteraceae"	21%	<i>Gracilibacter</i>	21%
C1	"Firmicutes"	"Ruminococcaceae"	43%	<i>Anaerotruncus</i>	19%
C49	"Firmicutes"	"Ruminococcaceae"	30%	<i>Anaerotruncus</i>	17%
C2	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C5	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C6	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C7	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C8	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C12	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C13	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C15	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C16	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C19	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C24	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C28	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C36	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C42	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C45	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C46	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C48	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C51	"Firmicutes"	Veillonellaceae	85%	<i>Sporomusa</i>	56%
C56	"Firmicutes"	Veillonellaceae	97%	<i>Sporomusa</i>	97%
C58	"Firmicutes"	Veillonellaceae	95%	<i>Sporomusa</i>	90%

C59	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C61	"Firmicutes"	Veillonellaceae	100%	<i>Sporomusa</i>	100%
C26	"Firmicutes"	Veillonellaceae	16%	<i>Succinispira</i>	13%
C38	"Firmicutes"	Veillonellaceae	21%	<i>Succinispira</i>	15%
C18	"Synergistetes"	Synergistaceae	100%	<i>Aminobacterium</i>	83%
C14	"Synergistetes"	Synergistaceae	100%	<i>Cloacibacillus</i>	38%
C9	"Synergistetes"	Synergistaceae	90%	<i>Thermovirga</i>	57%
C21	"Synergistetes"	Synergistaceae	63%	<i>Thermovirga</i>	44%
C22	"Synergistetes"	Synergistaceae	17%	<i>Thermovirga</i>	13%
C31	"Synergistetes"	Synergistaceae	97%	<i>Thermovirga</i>	54%
C35	"Synergistetes"	Synergistaceae	99%	<i>Thermovirga</i>	49%
C50	"Synergistetes"	Synergistaceae	97%	<i>Thermovirga</i>	49%
C52	"Synergistetes"	Synergistaceae	89%	<i>Thermovirga</i>	51%
C54	"Synergistetes"	Synergistaceae	93%	<i>Thermovirga</i>	58%
C55	"Synergistetes"	Synergistaceae	90%	<i>Thermovirga</i>	56%
C57	"Synergistetes"	Synergistaceae	95%	<i>Thermovirga</i>	47%

*Os gêneros e filis foram determinados usando a ferramenta RDP *classifier*. A % representa a probabilidade de acordo com o RDP *classifier* para limite de confiança de 95%.

