MARIANA FRONJA CAROSIA

Caracterização microbiana e degradação de detergente de uso
doméstico em reator anaeróbio de leito fluidificado

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Bernadete A. Varesche

Versão Corrigida
São Carlos
2011

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

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

C293c Carosia, Mariana Fronja
Caracterização microbiana e degradação de detergente
de uso doméstico em reator anaeróbio de leito
fluidificado / Mariana Fronja Carosia ; orientadora Maria
Bernadete A. Varesche. -- São Carlos, 2011.

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

1. Areia. 2. Surfactante. 3. LAS. 4. Degradação
anaeróbia. 5. RNAr16S. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Licenciada **MARIANA FRONJA CAROSIA**.

Dissertação defendida e julgada em 25/03/2011 perante a Comissão Julgadora:

Prof^ª. Dr^ª. **MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE SILVA** -
(Orientadora)

(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Dr^ª. **ISABEL KIMIKO SAKAMOTO**

(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Prof. Dr. **ROGERS RIBEIRO**

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP)

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 de Pós-Graduação

Dedico este trabalho aos meus pais Ademir e Sueli, com amor, pelo incentivo, pelo otimismo e pelos conselhos que sempre me deram durante todo o período do meu mestrado.

“Porque se chamavam homens
Também se chamavam sonhos
E sonhos não envelhecem”

Márcio Borges

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por estar sempre comigo na realização desse trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Bernadete Varesche, pela disposição a ajudar sempre que precisei, pela orientação e apoio.

Ao colega Dagoberto Okada, pela constante ajuda e pelas preciosas dicas durante a operação e monitoramento do reator.

A Isabel Sakamoto por me acompanhar e auxiliar durante as análises de Biologia Molecular. Obrigada pela paciência e pelo bom humor.

Ao Tininho pelas dicas e sugestões com o reator de leite fluidificado.

A Janja pelo auxílio nas análises com os cromatógrafos e pela amizade.

A todos os bons amigos que tive o prazer de conviver no laboratório e que sempre se mostraram dispostos a ajudar quando precisei: Adis, Ana, Betão, Bruna, Carol, Daniel, Dagoberto, Débora, Deise, Djalma, Drica, Eduardo, Eloísa, Fabricio, Filipe, Gustavo, Guilherme, Isabel, Janja, Jorge, Juliana, Livia, Lorena, Mara, Priscila, Rafael, Regiane Correa, Regiane Ratti, Sandra, Thaís, Theo e Tiago.

Aos funcionários SHS, em especial Pavi, Sá e Rose, pelo auxílio e disposição em ajudar.

Ao meu namorado Daniel por acreditar em mim e sempre me incentivar a seguir em frente.

Aos meus pais Sueli e Ademir, e à minha irmã Marília pela presença, mesmo que distante, e pelo otimismo transmitido.

A todas grandes amigas que fiz em São Carlos e que compartilharam comigo problemas e conquistas, Solange Mucha, Lucas Marcon, Marcela Navarro, Ana Paula Magalhães e Monique Gomes. Muito obrigada pelo carinho!

RESUMO

CAROSIA, M. F. **Caracterização microbiana e degradação de detergente de uso doméstico em reator anaeróbio de leito fluidificado**, 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a remoção de alquilbenzeno sulfonado linear (LAS), presente na composição do detergente em pó doméstico e caracterizar os microrganismos do domínio Bacteria do reator anaeróbio de leito fluidificado. Para tal foi utilizado um reator anaeróbio de leito fluidificado contendo areia como material suporte contendo biofilme maduro. O reator foi operado com TDH de 15 horas. A alimentação consistiu em substrato sintético, com etanol e extrato de levedura, como co-substratos, e detergente em pó comercial. O reator foi operado em 7 etapas diferentes: (I) circuito fechado para adaptação do biofilme maduro a nova água residuária, (II) sistema aberto e a alimentação com substrato sintético, (III) acréscimo de solução redutora de sulfeto de sódio, (IV) nova imobilização e adaptação da biomassa em sistema fechado, (V) circuito aberto e variação da concentração de co-substratos na alimentação em função da estabilização e aumento da eficiência de remoção de DQO, (VI) estabilização da remoção de matéria orgânica, (VII) adição de detergente em pó comercial. Os seguintes parâmetros físico-químicos foram monitorados: pH, alcalinidade, ácidos voláteis, sulfato, sulfeto, DQO, sólidos suspensos totais e concentração de LAS afluente e efluente. Remoção de 48% de LAS foi verificada após 231 dias de operação. A presença do surfactante não alterou significativamente a remoção de DQO, cujos valores foram $87,2 \pm 5,4\%$ e $85,8 \pm 4,9\%$, antes e depois da adição de LAS, respectivamente. Por meio do balanço de massa verificou-se que 42,4% do LAS adicionado no reator foram removidos por degradação biológica, 0,9% ficaram adsorvidos na biomassa e 4,5% adsorvido na biomassa efluente. Clones relacionados aos Filos Proteobacteria, Synergistetes e Fusobacteria foram obtidos, tanto em amostras do material suporte, quanto do separador de fases do reator, sendo que o Filo Verrucomicrobia foi obtido, somente, em amostras do copo do reator. Os filotaxos Bacteroidetes e Firmicutes foram verificados somente em amostras da areia.

Palavras-chave: Areia, Surfactante, LAS, Degradação Anaeróbia, RNAr16S.

ABSTRACT

CAROSIA, M. F. **Microbial characterization and degradation of household detergent in anaerobic fluidized bed reactor**, 2011. 90 f. Dissertation (Master) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

The present research intends to evaluate the removal of linear alkylbenzene sulphonate (LAS), a component present in the manufacturing of domestic detergent powder and characterize the microorganisms of Bacteria domain of the anaerobic fluidized bed reactor. In this case, an anaerobic fluidized bed reactor was employed, with sand containing mature biofilm as support material. The reactor was operated with a 15 hour HRT. Feeding consisted of synthetic substrate and commercial detergent powder, with ethanol and yeast extract as co-substrates. The reactor was operated in 7 different steps: (I) the circuit was kept closed for adaptation of mature biofilm to the new wastewater, (II) the system was opened and food was provided, consisting only of synthetic substrate, (III) a reducing solution of sodium sulfide was added, (IV) the system was closed for new immobilization and biomass adaptation, (V) the circuit was opened and the concentration of co-substrates of food was altered according to the stabilization and the increase of COD removal efficiency, (VI) there was stabilization of organic matter removal, (VII) commercial detergent powder was added. The following physicochemical parameters were monitored: pH, alkalinity, volatile acids, sulphate, sulphide, COD, total suspended solids and LAS concentration. The removal of 48% of LAS was observed after 231 days of operation. The presence of surfactant did not significantly affect COD removal: its values before and after LAS addition were $87.2 \pm 5.4\%$ and $85.8 \pm 4.9\%$, respectively. The mass balance showed that 42.4% of the LAS added to the reactor was removed by biological degradation, 0.9% was adsorbed in the biomass and 4.5% was adsorbed in the effluent biomass. Clones belonging to the Phyla Proteobacteria, Synergistetes and Fusobacteria were obtained, both in the samples in the support material and in the samples in the reactor phases separator. Phylum Verrucomicrobia was found only in samples in the reactor phases separator. Phyla Bacteroidetes and Firmicutes were found only in samples of sand.

Keywords: Sand, Surfactant, LAS, Anaerobic Degradation, RNAr16S.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1: Estrutura do alquilbenzeno sulfonado.....	6
Figura 4.1: Desenho experimental.....	12
Figura 4.2: Diagrama esquemático do reator anaeróbio de leito fluidificado.	13
Figura 5.1: Variação temporal de DQO afluente e efluente e eficiência de remoção	29
Figura 5.2: Variação temporal de LAS afluente e efluente e eficiência de remoção	30
Figura 5.3: Variação temporal do pH afluente e efluente.....	33
Figura 5.4: Variação temporal da alcalinidade parcial afluente e efluente	34
Figura 5.5: Variação temporal da alcalinidade total afluente e efluente	34
Figura 5.6: Variação temporal de ácidos voláteis totais efluente	36
Figura 5.7: Porcentagem da concentração de ácidos voláteis presentes no efluente na Etapa VII.....	36
Figura 5.8: Teste com resazurina no separador de fases do reator de leito fluidificado	39
Figura 5.9: Teste com resazurina no Reator de Leito Fluidificado	40
Figura 5.10: Microscopia de contraste de fase das morfologias observadas na biomassa aderida na areia ao final da Etapa VI: (a) cocos e bacilos, (b) bacilos de tamanhos diferentes, (c) bactéria filamentosa	41
Figura 5.11: Microscopia de contraste de fase das morfologias observadas na biomassa presente no separador de fases do reator ao final da Etapa VI: (a) endósporos e bacilos curvos, (b) espiroquetas e cocos.....	42
Figura 5.12: Microscopia eletrônica de varredura das morfologias observadas em grão de areia do reator de leito fluidificado ao final da Etapa VI de operação: (a) bacilos, (b) filamentosas, (c) cocos e filamentos.....	44
Figura 5.13: Microscopia eletrônica de varredura das morfologias observadas em grão de areia do reator de leito fluidificado ao final da Etapa VII de operação: (a) bacilos curvos, (b) bacilos e filamentos, (c) cocos, (d) filamentos	45
Figura 5.14: Porcentagem de clones relacionados aos diferentes Filos do biofilme da areia ..	46
Figura 5.15: Porcentagem de clones relacionados às diferentes Classes da biofilme da areia.	47
Figura 5.16: Porcentagem de clones relacionados aos diferentes Filos de amostras do separador de fases do reator.....	47
Figura 5.17: Porcentagem de clones relacionados às diferentes Classes de amostras do separador de fases do reator.....	48

Figura 5.18: Porcentagem de clones relacionados às diferentes Classes das amostras do separador de fases e da areia.	57
Figura 5.19: Árvore filogenética mostrando a posição dos clones derivados das sequências do RNAr 16S relacionados ao Domínio Bacteria a partir da amostra da areia. <i>Methanosarcina acetivorans</i> foi usada como grupo externo. A taxa de substituição a cada 1.000 nucleotídeos foi de 0,1 como indicado na barra de escala.	60
Figura 5.20: Árvore filogenética mostrando a posição dos clones derivados das sequências do RNAr 16S relacionados ao Domínio Bacteria a partir da amostra do lodo separador de fases do reator. <i>Methanosarcina acetivorans</i> foi usada como grupo externo. A taxa de substituição a cada 1.000 nucleotídeos foi de 0,2 como indicado na barra de escala.....	61
Figura 5.21: Curva de rarefação dos clones obtidos de amostras da areia, com matriz de distância evolutiva de 0,00 e 0,05	64
Figura 5.22: Curva de rarefação dos clones obtidos de amostras do lodo do separador de fases do reator, com matriz de distância evolutiva de 0,00 e 0,04.....	64
Figura 5.23: Quantificação dos grupos microbianos referentes a amostras do biofilme da areia e da biomassa do separador de fases do reator, para as etapas VI e VII.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Alguns coadjuvantes, aditivos, sinergistas e cargas permitidos na formulação de detergentes	4
Tabela 4.1: Características da areia utilizada como material suporte no reator de leito fluidificado	14
Tabela 4.2: Ingredientes utilizados na formulação do detergente em pó comercial usado no presente trabalho com as respectivas funções	15
Tabela 4.3: Composição do substrato sintético	16
Tabela 4.4: Composição da solução de sais	16
Tabela 4.5: Etapas de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado.....	18
Tabela 4.6. Análise de monitoramento do reator.....	19
Tabela 4.7: Condições cromatográficas para quantificação do LAS.....	19
Tabela 4.8: Solução estoque 1	22
Tabela 4.9: Solução estoque 2	22
Tabela 4.10: Composição da água de diluição	22
Tabela 4.11: <i>Primers</i> para amplificação da região 16S do RNAr para o domínio <i>Bacteria</i>	24
Tabela 4.12: Programação do termociclador para amplificação do RNAr 16S para o domínio <i>Bacteria</i>	24
Tabela 4.13: Composição do Meio LB.....	25
Tabela 4.14: Programação do termociclador para recuperação e amplificação dos fragmentos do DNA clonado de interesse	25
Tabela 4.15: Programação do termociclador para reações de sequenciamento	26
Tabela 5.1: Valores de DQO obtidos em cada etapa de operação do reator	27
Tabela 5.2: Valores de DQO e LAS durante a operação da Etapa VI e VII	29
Tabela 5.3.: Valores dos parâmetros físico-químicos afluente e efluente do reator de leito fluidificado durante as etapas de operação	32
Tabela 5.4: Concentração dos ácidos voláteis monitorados nas Etapas VI e VII	35
Tabela 5.5: Balanço de massa de LAS	37
Tabela 5.6: Valores de sulfato e sulfeto afluente e efluente durante a etapa VII	38
Tabela 5.7: Frequência das morfologias observadas em microscopia de contraste de fase e fluorescência da biomassa da areia.....	42

Tabela 5.8: Frequencias das morfologias observadas em microscopia de contraste de fase e fluorescência da amostra do separador de fases do reator	43
Tabela 5.9: Comparação entre a diversidade de clones das amostras da areia e do separador de fases do reator	58
Tabela 5.10: Sequências obtidas no Genbank relacionadas aos clones das amostras da areia..	62
Tabela 5.11: Sequências obtidas no Genbank relacionadas aos clones da amostra do separador de fases do reator.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRS	bactérias redutoras de sulfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DQO	demanda química de oxigênio
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatograph)
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 (polymerase chain reaction)
RNAr	ácido ribonucléico ribossomal
SPC	sulfonil carboxilato (sulphophenyl carboxylate)
SST	sólidos suspensos totais
SSV	sólidos suspensos voláteis
ST	sólidos totais
STV	sólidos totais voláteis
TDH	tempo de detenção hidráulica
UASB	fluxo ascendente e manta de lodo (upflow anaerobic sludge blanket)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Principal	2
2.2. Objetivos Específicos.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Detergente em pó	3
3.2. Surfactantes	4
3.3. Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS)	5
3.4. Remoção de detergente em pó e LAS	6
3.5. Reator de leito fluidificado	8
3.6. Diversidade microbiana	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Reator de leito fluidificado	13
4.2. Caracterização do material suporte	14
4.3. Composição do substrato sintético.....	14
4.4. Etapas de operação do reator	16
4.5. Análises Físico-Químicas e Cromatográficas	18
4.6. Avaliação do Potencial Redox	20
4.7. Extração do LAS adsorvido por Ultra-som.....	20
4.8. Caracterização da diversidade microbiana.....	21
4.8.1. Exames microscópios	21

4.8.2. Avaliação quantitativa dos grupos microbianos anaeróbios	21
4.8.3. Biologia Molecular.....	23
4.8.3.1. Extração do DNA e PCR	23
4.8.3.2. Clonagem	24
4.8.3.3. Sequenciamento	26
4.8.3.4. Análises das Sequências do fragmento do gene 16 RNAr.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Remoção de DQO.....	27
5.2 Remoção de LAS.....	29
5.3 Monitoramento de pH e Alcalinidade	32
5.4 Monitoramento de Ácidos Orgânicos Voláteis	35
5.5 Balanço de massa.....	37
5.6 Sólidos Suspensos Totais.....	37
5.7 Sulfato e Sulfeto	38
5.8 Potencial Redox.....	39
5.9 Exames microscópicos	40
5.10 Caracterização filogenética do Domínio <i>Bacteria</i>	46
5.11 Técnica dos Tubos Múltiplos	65
6. CONCLUSÕES	67
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	68
8. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de detergentes sintéticos tem crescido expressivamente, chegando a lançar no mercado cerca de 80 mil t/ano de LAS (HARADA, 2003), sendo considerado um dos principais produtores mundiais (JHONSON, 2003). Contudo, apesar do consumo expressivo de detergentes no Brasil, a falta de tratamento de esgoto doméstico nas regiões urbanas tem causado efeitos ambientais indesejáveis, como a formação de espumas nas águas dos rios devido a presença dos surfactantes (PENTEADO et al., 2006).

Alquilbenzeno sulfonado linear (LAS) é o surfactante aniônico mais utilizado no mundo, cuja aplicação em lavanderia e limpeza doméstica representa cerca de 80% do total de uso de LAS no mercado (HERA, 2009). São lançados, tanto em águas residuárias industriais, quanto domésticas. Em virtude do seu grande consumo e impactos decorrentes de seu lançamento no ambiente, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de remover tal tensoativo de efluentes.

No Laboratório de Processos Biológicos foram estudadas algumas configurações de reatores visando à remoção de LAS, como por exemplo, reator anaeróbio horizontal de leito fixo, reator anaeróbio em bateladas sequenciais e reator anaeróbio de leito fluidificado. Dentre essas possibilidades foram obtidos maiores valores de eficiência de remoção na última configuração reacional. Provavelmente, características relacionadas a transferência de massa, bem como a diluição do surfactante devido a recirculação destaca essa tecnologia, em relação as outras possibilidades de tratamento.

Oliveira (2010) obteve remoção acima de 90% de LAS para concentração afluyente variando de 8 a 46 mg/L de LAS em reator de leito fluidificado, em condições mesofílicas, com areia como material suporte. Todavia, em tal trabalho a autora avaliou a remoção do LAS comercial.

Assim, a motivação deste trabalho foi avaliar a remoção de detergente em pó de uso doméstico em reator anaeróbio de leito fluidificado com biomassa imobilizada em areia e inóculo oriundo de reator UASB proveniente de água residuária de abatedouro de aves. Caracterização morfológica e filogenética, além da quantificação celular dos principais grupos de microrganismos anaeróbios, foi realizada com a finalidade de avaliar a diversidade microbiana na presença desse composto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a remoção de detergente em pó em reator anaeróbio de leito fluidificado com biomassa imobilizada em areia e caracterizar os microrganismos do domínio Bacteria desenvolvidos no reator.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Verificar a remoção anaeróbia de matéria orgânica e LAS em reator de leito fluidificado em escala bancada;
- Caracterizar microscopicamente a comunidade microbiana desenvolvida no material suporte e no separador de fases do reator;
- Quantificar as bactérias anaeróbias totais, redutoras de sulfato e arqueias metanogênicas por meio da técnica de tubos múltiplos;
- Identificar as bactérias, na etapa cujo substrato sintético continha LAS, por meio do sequenciamento e afiliação filogenética do RNAr 16S.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Detergente em pó

De amplo uso em lavanderias, a maioria dos detergentes em pó possui geralmente em sua composição seis grupos de substâncias: surfactantes, construtores, enzimas, agentes clareadores, cargas e outros aditivos menores, como agentes dispersantes, argilas amaciadoras de tecidos, ingrediente inibidor de transferência de corantes e branqueadores ópticos (KARSA et al., 1999).

Inúmeros são os ingredientes orgânicos e inorgânicos que podem ser utilizados em cada categoria na formulação de detergentes. Através da **Resolução Normativa nº 1/78 (D.O.U. de 27/11/78)**, referente às normas a serem obedecidas pelos detergentes e seus congêneres, foi divulgada *Lista das substâncias permitidas na elaboração de detergentes e demais produtos destinados à aplicação em objetos inanimados e ambientes*, outorgada por meio da Câmara Técnica de Saneantes Domissanitários do Conselho Nacional de Saúde (Tabela 3.1).

Dentre os detergentes de lavanderia, de uso doméstico e produtos limpeza, os surfactantes são os mais importantes ingredientes, compreendendo de 15 a 40% do total da formulação de detergentes (SCHEIBEL, 2004), sendo que tais produtos correspondem a mais da metade do uso de surfactantes (KARSA et al., 1999).

Tabela 3.1: Alguns coadjuvantes, aditivos, sinergistas e cargas permitidos na formulação de detergentes

COADJUVANTES, ADITIVOS, SINERGISTAS, CARGAS - SOLVENTES E INERTES	
Ingredientes Orgânicos	Ingredientes Inorgânicos
Ácidos poliamino mono ou polihidroxicarboxílicos mono ou polibásicos e seus derivados e seus sais alcalinos	Sais de metais alcalinos e alcalinos terrosos dos ácidos: clorídrico, sulfúrico, carbônico, hipocloroso, silícico, metassulfuroso, sulforoso, entre outros
Ácidos carboxílicos alifáticos mono e polibásicos e seus sais alcalinos	Sais alcalinos dos ácidos: tripolifosfórico, pirofosfórico, ortofosfórico, tetrafosfórico, hexametáfosfórico.
Ácidos hidroxicarboxílicos mono e polibásicos e seus sais alcalinos	Hidróxidos alcalinos, alcali-terrosos e de amônio
Ácidos carboxílicos aromáticos mono e polibásicos e seus sais alcalinos	Sílica e Silicatos naturais
Copolímeros de ésteres acrílicos ou metacrílicos, carboxilados ou não	Alumino – Silicatos
Ácidos glucônicos e glucoheptônicos e seus derivados	Peróxido de Hidrogênio
Enzimas (amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas) protegidas	Ácido acético e seus sais
Destilados leves de petróleo	Ácido bórico e seus sais
Caseína	Quartzo
Lecitina	Alumínio
Lanolina	Zinco
Pectinas	Ferro
Uréia	Dolomita
Álcoois	Bentonita
Açúcares	Caulim
Éteres e estéres de celulose	Talco
Amino e amidos modificados	Calcita

Fonte: Resolução Normativa nº 1/78

3.2. Surfactantes

Surfactantes são agentes que possuem propriedades de limpeza e formam um grupo de produtos químicos com considerável importância ambiental devido ao seu alto volume de consumo e amplo uso, por serem ingredientes essenciais na maioria das lavanderias e produtos de limpeza. Ademais, são usados em diferentes campos, tais como cosméticos, trabalhos com metal, agricultura, papel e indústrias de couro (BERNA et al., 2007).

Também chamados de agentes tensoativos, os surfactantes possuem propriedade anfifílica, cuja estrutura consiste em uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica (HAIGH,

1996). Devido a esta estrutura anfifílica, os tensoativos situam na superfície da água, assim diminuindo a tensão superficial da água e, conseqüentemente, diminuindo o oxigênio dissolvido disponível aos organismos aquáticos, além de levar a formação de espumas. As espumas, além de dificultarem os processos de aeração nos tanques de tratamento de efluentes, transportam inúmeros poluentes e bactérias a longas distâncias (PENTEADO et al., 2006).

Os surfactantes são classificados quanto aos radicais hidrofílicos em **aniônicos** – quando possuem carga negativa; **catiônicos** – quando possuem carga positiva; **não-iônicos** – aqueles que não apresentam nenhuma carga – e **anfóteros** – aqueles que possuem em sua estrutura um átomo de nitrogênio com carga positiva (BORSATO et al., 1999).

Surfactantes formam um grupo de produtos químicos com alta relevância ambiental, devido a combinação de suas propriedades inerentes e seu grande volume de produção. Eles são tipicamente lançados no ambiente através de sistemas de tratamento ou diretamente, em situações na qual não há sistemas de tratamento disponíveis (BERNA et al., 2007).

3.3. Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS)

O alquilbenzeno linear sulfonado é um surfactante aniônico que foi introduzido no mercado em 1964, com a finalidade de substituir o tetrapropilbenzeno sulfonato que apresenta longa cadeia carbônica com ramificações.

LAS é o surfactante mais amplamente usado em detergentes domésticos e industriais. Seu consumo global estimado em 2007 foi de 3.10^6 toneladas por ano (HERA, 2007), representando mais de 40% do total de surfactantes consumido no mundo (MANOUSAKI et al., 2004). Além da sua significativa presença em muitos detergentes domésticos (com concentração típica variando de 3 a 22%) e em produtos para todas as finalidades de limpeza, também é utilizado em algumas aplicações industriais, tais como no campo de produtos têxteis e fibras, químicos e agricultura, todavia, em menor proporção (HERA, 2009).

O LAS comercial é composto, geralmente, por uma mistura de vários homólogos (cadeia alquílica cujo número de carbonos varia de 10 a 14). Cada homólogo contém um anel aromático sulfonado na posição-*para* ligado à cadeia alquil linear em qualquer posição, exceto aos carbonos terminais (MATTHIJS & DE HENAU, 1987) (Figura 3.1), sendo que a solubilidade entre os homólogos de LAS é inversamente proporcional ao aumento da cadeia linear (PENTEADO et al., 2006).

Figura 3.1: Estrutura do alquilbenzeno sulfonado

Fonte: Jensen et al., 2007

Assim como os demais surfactantes aniônicos, LAS é um composto anfipático, que consiste de uma parte hidrofóbica - cadeia alquílica de vários comprimentos – e outra hidrofílica (MUNGRAY & KUMAR, 2008), correspondendo ao anel benzênico.

LAS é considerado um poluente de alta prioridade e sua toxicidade aos microrganismos, plantas, animais terrestres e humanos são bem documentados (HERA, 2007.)

Ademais, estudos ecotoxicológicos verificaram a toxicidade de LAS em organismos aquáticos e relataram bioacumulação em *Daphnia magna* e no peixe *Cyprinus carpio* (ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA, 1996), além da absorção deste tensoativo e seus intermediários de degradação em algumas espécies de algas (SÁEZ et al., 2001). Além disso, estudo realizado com o molusco gastrópode *Hydrobia ulvae* indicou que o potencial toxicológico de homólogos de cadeias maiores de LAS foi maior que aqueles de cadeias menores (MAUFFRET et al., 2010).

Em vista do expressivo consumo do surfactante em questão em todo mundo e seus impactos causados no ambiente aquático, estudos objetivando sua remoção vem sendo realizados a fim de desenvolver técnicas com melhor eficiência de sua remoção.

3.4. Remoção de detergente em pó e LAS

A remoção do LAS pode ocorrer pelos mecanismos de precipitação, adsorção ou degradação (HERA, 2007). Dentre as tecnologias disponíveis, Berna et al. (2007) consideram a degradação o mais importante mecanismo de remoção desse composto em ambientes aquáticos.

Até o final da década de 90, muitos autores afirmavam que o LAS não podia ser degradado por processos biológicos anaeróbios (MARCOMINI et al., 1989), no entanto, vários estudos indicam que sua degradação é possível sob tais condições (SANZ et al. 2003; GARCÍA et al., 2005; LOBNER et al., 2005; DUARTE et al. 2008, OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; DUARTE et al., 2010).

Em virtude das pesquisas relacionadas à biodegradação aeróbia do LAS terem predominado por muito tempo, suas vias de degradação foram bem estudadas e são conhecidas. Portanto, consiste na quebra da cadeia alquílica por meio de ω -oxidação e é seguida por sucessivas β -oxidações formando ácido sulfofenil carboxílico (SPC) (EICHHNOR AND KNEPPER, 2002), para finalmente terminar com a dessulfonação e clivagem do anel aromático (HAGGENSEN et al., 2002).

Apesar da remoção anaeróbia de LAS ser conseguida com sucesso, observava-se recalcitrância desse surfactante em tal condição (GARCIA et al., 2005). Tal recalcitrância foi associada ao potencial de inibição das vias de degradação anaeróbia.

As vias de degradação anaeróbia estão limitadas a poucos estudos, uma vez que a dificuldade de se obter cultura pura aliada ao requerimento de um consórcio de bactérias para degradar completamente o surfactante contribui para a escassez de conhecimento de tais vias (ZHANG & BENNETT et al., 2005). Contudo, possíveis intermediários da degradação anaeróbia de LAS foram verificados em algumas pesquisas. MOGENSEN et al. (2003) verificaram alguns metabólitos, tais como, ácido benzenosulfônico e benzaldeído. Duarte (2006) encontrou benzeno e tolueno no efluente de reator anaeróbio utilizado na degradação de LAS. Ademais, ocorreu dessulfonação da molécula de LAS por bactérias anaeróbias sob condições de enxofre limitado (Denger & Cook, 1999).

Duarte et al. (2008) estudaram a remoção de LAS em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), com TDH de 12 horas e espuma de poliuretano para imobilizar a biomassa. O reator foi alimentado com substrato sintético contendo extrato de carne, amido e sacarose como co-substratos no primeiro estágio; o mesmo substrato sintético acrescido de 7 mg/L de LAS no segundo estágio; o mesmo substrato sintético acrescido de 14 mg/L no terceiro estágio. No quarto estágio foi mantida a mesma concentração de LAS, entretanto, com substituição do extrato de carne por extrato de levedura, sem amido. Após 313 dias de operação, os autores verificaram 35% de degradação biológica de LAS.

Oliveira et al. (2009) avaliaram a remoção de LAS em dois reatores RAHLF, sendo um deles preenchido com carvão vegetal como material suporte para imobilização da biomassa e o outro com leito misto de argila expandida e espuma de poliuretano. O tempo de detenção

hidráulica aplicado foi de 12 horas e a alimentação continha extrato de levedura e sacarose como co-substratos. Os autores verificaram que a presença do surfactante não prejudicou a remoção de DQO, que foi cerca de 90%, em ambos os reatores, para concentração afluyente de 550 mg/L. Foram alcançados valores de 28 e 27% de degradação biológica de LAS para os reatores preenchidos com carvão vegetal e leito misto, respectivamente, para concentração afluyente de 14mg/l, após 344 dias de operação.

Em reator UASB, com TDH de 24 horas, Okada et al. (2009) obtiveram remoção de 50% de LAS para concentração afluyente de 14 mg/L. Tais dados referem, tanto a degradação biológica, quanto adsorção a biomassa granulada. O reator foi operado durante 70 dias com LAS. A alimentação constituiu de meio mineral, com etanol como co-substrato, e solução de vitaminas.

Duarte et al. (2010) avaliaram a remoção de LAS em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa granulada. O reator foi alimentado com substrato sintético composto de extrato de levedura, amido e sacarose. Os autores obtiveram remoção de 53% de LAS, a qual incluía degradação biológica e adsorção, para concentração afluyente de 22mg/L, após 143 dias de operação. Contudo, foi verificado que a degradação de LAS foi maior na ausência de co-substratos do que na presença deles.

3.5. Reator de leito fluidificado

Desenvolvido na década de 70 por Jewell et al. (1981) com o intuito de tratar águas residuárias, o reator de leito fluidificado consiste de um vaso cilíndrico contendo meio suporte inorgânico que é fluidizado devido ao escoamento ascendente de alimentação e recirculação do líquido. No topo do reator, um separador garante a separação do líquido, biogás e sólido. Esse sistema possui leito móvel e filme fixo e envolve a interação entre as fases sólida, líquida e gasosa. A fase sólida é formada pelas biopartículas (material suporte mais biofilme) que se destinam à retenção da biomassa no reator, enquanto a fase líquida é constituída pelo afluyente a ser tratado e a fase gasosa, por sua vez, é oriunda da geração interna de biogás (FAN, 1989).

Em virtude da diluição inicial do afluyente, devido a recirculação, a concentração do substrato é reduzida, assim contribuindo para diminuir o efeito tóxico, no que se refere a toxicidade de surfactantes aos microrganismos (IZA, 1991). Além desse efeito da diluição, reatores de leito fluidificado apresentam excelentes características de transferência de massa.

Reatores anaeróbios de leito fluidificado têm sido empregados na Biotecnologia ambiental, principalmente no tratamento biológico de efluente industrial e municipal (NICOLELLA et al. 2000).

Damiano e Silva (2005) avaliaram o desempenho de reator anaeróbio de leito fluidificado na degradação de vinhaça de cana-de-açúcar, sob condição mesofílica. O reator (770 ml) foi operado por 122 dias com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas. Os autores utilizaram poliestireno como material suporte e inóculo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves. Os autores obtiveram remoção de 70% de matéria orgânica para concentração inicial de 2.023 mg DQO/L. Por meio de microscopia eletrônica de varredura foi observada boa adesão microbiana nas partículas de poliestireno.

Associado a degradação de matéria orgânica de efluentes, tal reator vem sendo utilizado com eficácia também na produção de hidrogênio. Amorim et al. (2009) utilizaram essa configuração de reator para avaliar a produção de hidrogênio. Os autores utilizaram argila expandida, como material suporte, e alimentação consistindo em água residuária sintética a base de glicose. Rendimento de 2,49 mol H₂. mol⁻¹ glicose foram conseguidos com a diminuição do TDH de 8 para 2 horas.

O reator de leito fluidificado favorece a retenção da biomassa e evita o acúmulo de material sólido nos interstícios, como ocorre em reator de leito fixo (CAMPOS & PEREIRA, 1999).

O reator de leito fluidificado com areia como material suporte foi o que apresentou melhor eficiência de remoção de LAS (acima de 90%) (Oliveira, 2010) dentre as configurações de reatores já estudadas no Laboratório de Processos Biológicos do SHS – EESC – USP. A autora obteve essa remoção em reator alimentado com substrato sintético contendo sacarose e extrato de levedura como co-substratos para TDH de 18h.

Oliveira et al. (2010) avaliaram a remoção anaeróbia de LAS em quatro reatores de leito fluidificado em menor escala, com diferentes materiais suportes: sendo R1 com carvão ativado, R2 com argila expandida, R3 com pérolas de vidro e R4 com areia. Para tal foi aplicado TDH de 18 horas e inóculo proveniente de UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Os reatores foram alimentados com substrato sintético contendo extrato de levedura e sacarose, como co-substratos, sendo os sistemas mantidos em condição mesofílica.

Os autores verificaram por meio do balanço de massa remoção de 96%, 83%, 99% e 98% de LAS, respectivamente, nos reatores R1, R2, R3 e R4. Pérolas de vidro (R3) e areia (R4) foram considerados os melhores suportes para serem utilizados em reatores de leito

fluidificado, uma vez que não ocorreu cisalhamento desses materiais. Ademais, o reator com areia foi o que apresentou maior remoção de LAS, com eficiência acima de 99%, para concentração afluyente de 18,8 mg/L. Em todos os reatores foi verificado que a adição de LAS não prejudicou a remoção da matéria orgânica. Além disso, foi observado que na presença de LAS, a eficiência de remoção de DQO foi maior que na sua ausência.

3.6. Diversidade Microbiana

Trabalhos visando caracterizar a comunidade microbiana de reatores usados na remoção de compostos recalcitrantes vêm sendo realizados utilizando técnicas de Biologia Molecular. Por meio da afiliação filogenética dos clones e dos dados disponíveis na literatura é possível formar hipóteses a respeito das funções metabólicas dos grupos (RIVIÈRE et al., 2009).

Oliveira et al. (2010) utilizaram a técnica de clonagem e seqüenciamento do RNAr 16S para avaliar a comunidade microbiana de dois reatores de leito fluidificado usados na remoção de LAS sob condição anaeróbia. Por meio da aproximação filogenética, os autores observaram diferença na comunidade bacteriana dos reatores com pérolas de vidro e areia como materiais suporte. Em ambos os reatores ampla diversidade foi relacionada com os Filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Gemmatimonadetes e Nitrospira. Anaerolineae e Acidobacteria foram encontrados somente no reator contendo areia e clones relacionados a Verrucomicrobia foram verificados somente no reator contendo pérolas de vidro. Todavia as proporções desses grupos foram menores, sendo que Proteobacteria e Bacteroidetes foram os Filos mais freqüentes nos dois reatores.

Duarte et al. (2010) identificaram as populações de microrganismos presentes em reator operado em bateladas seqüenciais usado na remoção de LAS, por meio do seqüenciamento e análise filogenética do RNAr 16S. O inóculo foi proveniente de UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Os autores utilizaram amostra da última etapa de operação do reator, cuja concentração de LAS foi de 22mg/L e alimentação sem co-substratos. Por meio da aproximação filogenética foi constatada ampla diversidade de microrganismos. Os clones foram relacionados a nove Filos, sendo eles: Bacteroidetes (35%), Proteobacteria (18%), Verrucomicrobia (11%), Fibrobacteres (8%), Acidobacteria (5%), Chlorobi (3%), Firmicutes (3%), Actinobacteria (2%) e Chloroflexi (2%). A porcentagem de bactérias não classificadas representou 13% do total seqüenciado. Segundo os autores,

Pseudomonas spp. provavelmente utilizaram a molécula de LAS como fonte de carbono e energia; espécies redutoras de sulfato, tais como, *Syntrophus* podem ter usado o enxofre da molécula de LAS, enquanto *Dechloromonas* spp. podem ter usado o anel aromático da molécula de LAS como fonte de carbono e energia.

Os trabalhos acima citados corroboram a hipótese de que é necessário consórcio de microrganismos para a degradação anaeróbia do surfactante LAS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento desse trabalho foi utilizado um reator anaeróbio de leito fluidificado contendo areia como material suporte com a finalidade de avaliar a remoção de LAS.

Na Figura 4.1 encontra-se detalhado o fluxograma experimental do trabalho. Tal experimento foi instalado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB). O reator foi mantido a 30 °C em câmara climatizada.

Figura 4.1: Desenho experimental

Durante a operação do reator, análises de DQO, pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais, sulfato, sulfeto e concentração de LAS foram realizadas como descritas na Tabela 4.6.

Também foi monitorado o potencial redox e quantificados sólidos suspensos totais. Ao final das duas últimas etapas foi realizada microscopia óptica e microscopia de varredura.

Ao final da Etapa VII de operação do reator foi retirada amostra de biomassa aderida ao material suporte do reator (areia) e do separador de fases do reator para análises de Biologia Molecular.

4.1. Reator de leito fluidificado

O reator anaeróbio de leito fluidificado foi confeccionado em acrílico com 102 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro interno (Figura 4.2). Ao longo do reator foram instalados pontos de amostragem para coleta de amostras, igualmente espaçados. No topo do reator foi instalado um separador de fases para impedir que partículas sólidas fossem levadas do reator e garantir a saída do efluente.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado foi de 15 horas e vazão de alimentação de 68mL/h. A vazão de recirculação usada foi de 74 L/h, ou seja, mais de 1000 vezes maior que a vazão de alimentação.

Figura 4.2: Diagrama esquemático do reator anaeróbio de leito fluidificado

Fonte: Oliveira, 2010.

4.2. Caracterização do material suporte

Como material suporte foi utilizada areia com biofilme maduro, o qual já havia sido utilizado previamente em reator anaeróbio de leito fluidificado na remoção de LAS por Oliveira (2010). Assim, o lodo utilizado como inóculo já havia sido submetido à adaptação em circuito fechado, adaptação ao substrato sintético contendo extrato de levedura e sacarose como co-substratos, e posteriormente adição de LAS, com aumento gradativo de sua concentração (Oliveira, 2010).

A areia utilizada já havia sido previamente tratada com ácido fluorídrico 40% por 24 horas com a pretensão de remover impurezas e favorecer a formação de microvilosidades para adesão microbiana. As características desse material suporte estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Características da areia utilizada como material suporte no reator de leito fluidificado

Suporte	Massa (g)	Diâmetro (mm)	Densidade (g/cm³)	Altura leito fixo (cm)	Altura leito fluidificado (cm)
Areia	308,1	1,4 – 1,7	2,3	24	27,5

4.3. Composição do substrato sintético

Nesse trabalho foi utilizado detergente em pó comercial (*OMO Progress*), cuja composição e função dos ingredientes encontram-se descritas na Tabela 4.2. Tais dados foram fornecidos pela empresa responsável pela elaboração do detergente em pó.

Tabela 4.2: Ingredientes utilizados na formulação do detergente em pó comercial usado no presente trabalho com as respectivas funções

Ingredientes	Função
Tensoativo Aniônico (Alquil Benzeno Sulfonato de Sódio)	Agente de limpeza – Proporciona a remoção da sujeira
Coadjuvantes	Ajudam no processo de estruturação do pó e na remoção da sujeira
Sinergista	Auxilia na remoção da sujeira e possui ação antirredepositante da sujeira
Tamponantes	Responsáveis por manter pH favorável para a melhor remoção da mancha pelo tensoativo da fórmula
Branqueador Óptico	Tem como função realçar a brancura dos tecidos
Corantes	Conferem cor à formulação
Enzimas	Responsável pela remoção de sujeiras específicas
Carga	Responsável por fechar a formulação em 100%, normalmente é um sal com efeito inerte na formulação
Fragrância	Proporciona odor agradável ao produto
Água	Veículo – Proporciona a mistura dos ingredientes
Enzima Polarzyme	Atua na remoção de manchas protéicas. Ex: chocolate
Enzima Lipex	Atua na remoção de manchas gordurosas

O reator foi alimentado com substrato sintético, cuja composição é apresentada na Tabela 4.3, e LAS na forma de detergente em pó comercial. A concentração de LAS da alimentação foi de $14,4 \pm 3,5$ mg/L e aplicada em função da estabilização do reator na remoção de matéria orgânica (DQO).

Para elaboração do substrato sintético foi utilizado esgoto sintético (Torres, 1992) modificado. Todavia, algumas modificações foram necessárias, tais como, a não inclusão de óleo e detergente de cozinha, uma vez que a presença dos mesmos poderia prejudicar as análises de LAS. Além disso, o extrato de carne foi substituído pelo extrato de levedura, em virtude do último ser rico em vitaminas, tais como, do complexo B e ter sido usado com sucesso nos processos de degradação anaeróbia (MAINTINGUER, 2004). Ademais, no presente trabalho, o etanol foi utilizado como co-substrato.

Para armazenar o substrato durante a alimentação do reator utilizou-se frasco Duran[®] de 5,0 L que foi mantido sob refrigeração.

Tabela 4.3: Composição do substrato sintético

Nutrientes	Quantidade (g/L)
Extrato de levedura	0,50
Bicarbonato de sódio	0,48
Solução de Sais (Tabela 4.4)	5,0mL/L
Etanol	0,60

Tabela 4.4: Composição da solução de sais

Sais inorgânicos	Quantidade (g/L)
NaCl	50,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9

Fonte: Torres (1992)

O substrato sintético foi preparado da seguinte maneira:

- (a) A solução de sais (Tabela 4.4) foi preparada previamente em água destilada e mantida em frasco âmbar de 1,0 L em geladeira a aproximadamente 4° C;
- (b) Os demais componentes do substrato foram pesados semanalmente e mantidos em frascos tampados sem umidade;
- (c) Etanol, extrato de levedura e bicarbonato de sódio foram dissolvidos em água da rede pública de abastecimento e agitados até a solução tornar-se homogênea;
- (d) A solução estoque de detergente em pó também foi mantida em geladeira;
- (e) Houve adaptação de balão de borracha no frasco de alimentação para manter a anaerobiose nos frascos com atmosfera preenchida com N₂ (100%).

4.4. Etapas de operação do reator

O reator de leito fluidificado foi operado durante 231 dias (Tabela 4.5). Na Etapa I, cujo tempo de duração total foi de 15 dias, o sistema permaneceu fechado para adaptação do biofilme maduro ao novo substrato sintético. Cabe ressaltar, que o material suporte contendo biofilme maduro foi proveniente de reator alimentado com substrato sintético contendo extrato de levedura e sacarose como co-substratos. A matéria orgânica presente no efluente foi monitorada e suplementação de substrato sintético foi adicionada ao reator sempre que necessário.

Na Etapa II, o reator foi colocado em sistema aberto e alimentado somente com substrato sintético, durante o período de 15 dias.

Na Etapa III, com duração de 13 dias, houve acréscimo de solução redutora de sulfeto de sódio (400mg/L) ao substrato sintético, com intuito de garantir a anaerobiose do sistema. Entretanto, o acréscimo dessa solução na alimentação causou grande instabilidade na remoção de DQO.

Sendo assim, a solução redutora foi retirada da alimentação e o reator foi re-inoculado, dando início a Etapa IV de operação. Nessa etapa foi usado como inóculo lodo proveniente de reator UASB de abatedouro de aves (Avícola Dakar – Tietê), o qual foi previamente triturado em cadinho para desestruturar os grânulos, deixando o lodo pastoso e homogêneo.

A imobilização da biomassa no material suporte foi realizada simultaneamente a adaptação da biomassa ao substrato sintético. Para isso, o sistema foi mantido em circuito fechado com substrato sintético, cuja composição já foi descrita (Tabela 4.3), e 4% (v/v) de lodo. O sistema permaneceu fechado por 8 dias, para que ocorresse imobilização da biomassa no material suporte.

Na Etapa V, o sistema foi aberto e o reator foi alimentado somente com substrato sintético. Nesta etapa, os valores de eficiência de remoção de DQO estiveram muito baixos e, assim, a concentração dos co-substratos da alimentação (extrato de levedura e etanol) foi reduzida até que ocorresse o aumento da sua remoção.

Uma vez que ocorreu aumento da remoção de matéria orgânica, os co-substratos foram aumentados. Essa etapa durou 25 dias e foi caracterizada por grande variação da concentração de DQO afluente, efluente e de sua remoção.

A Etapa VI teve duração de 44 dias e consistiu na estabilização da remoção de matéria orgânica. Na Etapa VII foi adicionado detergente em pó comercial ao substrato sintético e teve duração de 112 dias.

Tabela 4.5: Etapas de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado

Etapas	Duração (dias)	Descrição
I	15	Circuito fechado para adaptação do biofilme maduro ao novo substrato sintético
II	15	Abertura do sistema e alimentação somente com substrato sintético
III	13	Acréscimo de solução redutora de sulfeto de sódio
IV	8	Inoculação e suspensão da solução redutora de sulfeto de sódio devido a desestabilização da remoção de matéria orgânica
V	24	Variação da DQO afluente em função de sua remoção
VI	44	Alimentação somente com substrato sintético e estabilização da remoção de matéria orgânica
VII	112	Alimentação com substrato sintético acrescido de detergente em pó

4.5. Análises Físico-Químicas e Cromatográficas

As análises físico-químicas e cromatográficas e suas respectivas frequências estão indicadas na Tabela 4.6. O monitoramento do reator foi feito com a coleta de amostras em duplicata do afluente e efluente do reator.

Tabela 4.6. Análise de monitoramento do reator

Parâmetro	Método	Frequência das análises	Referência
Ácidos voláteis totais (mg/L)	Cromatográfico HPLC	2x semana	Lazaro et al. (2008)
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	Titulométrico	2x semana	Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley et al. (1986)
DQO bruta e filtrada (mg/L)	Espectrofotométrico	2x semana	APHA (2005)
LAS (mg/L)	Cromatográfico HPLC	2x semana	Duarte et al. (2006)
pH (unidade)	Potenciométrico	2x semana	APHA (2005)
Sólidos suspensos	Gravimétrico	1x semana	APHA (2005)
Sulfato (mg/L)	Turbidimétrico	1x semana	APHA (2005)
Sulfeto (mg/L)	Turbidimétrico	1x semana	APHA (2005)

Para avaliar a remoção de LAS, foi feita a quantificação desse surfactante no afluente e efluente por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), baseada em metodologia desenvolvida e validada por Duarte et al. (2006). As condições cromatográficas empregadas estão descritas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Condições cromatográficas para quantificação do LAS

Coluna	C-8 Supelco, 5 µm, 15 cm, 4,6 mm
Solvente A	solução de NaClO ₄ 0,075 M em água ultra purificada
Solvente B	MeOH puro
Fluxo	0,5 mL/min
Detector	fluorescência, com λ excitação 225 nm e λ emissão 290 nm
Forno	35° C
Fonte: Duarte et al. (2006)	

4.6. Avaliação do Potencial Redox

O potencial redox foi monitorado duas vezes por semana por meio de potenciômetro. Entretanto, também foi realizada a constatação do potencial redox por meio de método indireto, cujo protocolo foi desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos (LPB – EESC/USP). Tal método baseia-se na diferenciação colorimétrica do corante resazurina conforme o potencial redox do meio, no qual a cor azul é característica de aerobiose e a cor branca corresponde à anaerobiose estrita. A cor rosa é característica de meios com potencial redox entre 200 e -200 mV, podendo ser relacionada à condição facultativa.

O experimento consistiu na adição de resazurina 0,1% na alimentação do reator, na proporção 1 mL/L. O frasco com alimentação já acrescida de resazurina foi submetido a atmosfera de N₂ (100%) durante aproximadamente 30 minutos e, em seguida, transferido para alimentação do reator.

4.7. Extração do LAS adsorvido por Ultra-som

Ao final da operação, foram retiradas amostras de material suporte mais biomassa do reator para determinação do LAS adsorvido e cálculo do balanço de massa de LAS .

O protocolo de extração de LAS usado para quantificar o surfactante na biomassa e material suporte foi desenvolvido por Duarte (2006).

Para isso, foram coletadas, em triplicata, as seguintes amostras: (1) areia com biofilme, (2) biomassa aderida no copo do reator, e (3) biomassa efluente. Essas amostras foram transferidas para estufa a 110°C por 24 horas para, posteriormente, ser realizado o processo de extração que consistiu nas seguintes etapas:

- (a) A amostra, previamente seca em estufa, foi pesada e anotada a sua massa;
- (b) Transferiu-se essa massa de amostra para frasco apropriado adicionando-se 50 mL de metanol puro;
- (c) Amostra mais metanol foram transferidos para banho de ultra-som, durante 30 minutos, a temperatura de aproximadamente 50°C;
- (d) Separou-se a amostra e coletou-se a fase líquida;
- (e) As etapas (b), (c) e (d) foram repetidas mais duas vezes;
- (f) Adicionou-se 20 mL de água ultrapurificada a amostra;

- (g) As etapas (c) e (d) foram repetidas;
- (h) A solução formada pelo metanol coletado em cada etapa mais a água foi filtrada em membrana de 0,22 μm ;
- (i) Evaporou-se o extrato metanólico em placa aquecida (60°C) até redução do volume em, aproximadamente, 20 mL;

Para as amostras de sólidos do copo (biomassa) e sólidos totais efluente, foi necessário realizar centrifugação a 4000 rpm e 4°C, durante 10 minutos, para posteriormente ser retirado o sobrenadante. A centrifugação foi realizada sempre após o banho de ultra-som (etapa c).

4.8. Caracterização da diversidade microbiana

4.8.1. Exames microscópios

Foram realizadas observações microscópicas para identificar as principais morfologias dos microrganismos presentes no reator ao final das etapas VI e VII de operação. Tal exame foi feito por meio de microscopia de contraste de fase e fluorescência em Microscópio Olympus BX60, acoplado à câmera com captura de imagem e software Image-Pro Plus para todas as amostras de biofilme do reator.

O acompanhamento do desenvolvimento do biofilme no material suporte foi realizado por meio de microscópio eletrônico de varredura (ARAÚJO, 1994). As amostras do biofilme foram preparadas de acordo com Varesche et al. (1997).

4.8.2. Avaliação quantitativa dos grupos microbianos anaeróbios

A quantificação de bactérias anaeróbias totais, arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato presentes no biofilme aderido a areia e no copo do reator foram realizadas ao final das Etapas VI e VII de operação por meio da Técnica de Tubos Múltiplos (NMP – Número Mais Provável).

Para isso, foi coletado volume conhecido de material suporte contendo biofilme e submetido a atmosfera de N_2 (100%) durante 15 minutos. O frasco contendo esse material foi fechado com tampa de butila e lacre de alumínio. A seguir o frasco foi submetido a agitação manual em ângulo de 45°, durante 20 minutos (VAZOLLER, 1995).

O inóculo foi diluído em água de diluição para posteriormente ser inoculado em frascos contendo o meio já descrito nas Tabelas 4.3, ao final da Etapa VI, e contendo o mesmo meio acrescido de detergente em pó, ao final da Etapa VII. Para a preparação da água de diluição foram utilizadas duas soluções estoque descritas nas Tabelas 4.8 e 4.9.

Tabela 4.8: Solução estoque 1

Solução Estoque 1	Quantidades – q.s.p. 100 ml de água ultrapurificada
K_2HPO_4 (0,2 M)	3,48 g

Tabela 4.9: Solução estoque 2

Solução Estoque 2	Quantidades – q.s.p. 100 ml de água ultrapurificada
KH_2PO_4 (0,2 M)	2,72 g

As soluções estoque 1 e 2 foram esterilizadas em autoclave (1 atm, 121°C, 20 minutos) e armazenadas em geladeira. A água de diluição foi formada pelas soluções estoque 1 e 2, com as quantidades indicadas na Tabela 4.10. Foram adicionados 9,0 mL de água de diluição em cada frasco de antibiótico. Os frascos foram submetidos a atmosfera de N_2 (100%) durante 20 minutos, lacrados com tampa de butila e lacre de alumínio. A esterilização foi realizada em autoclave a 1 atm, 121°C, durante 20 minutos.

Tabela 4.10: Composição da água de diluição

Água de diluição	Quantidades – q.s.p. 250 mL de água ultrapurificada
Solução estoque 1	1 mL
Solução estoque 2	0,25 mL

Foi usada a mesma composição do substrato sintético contendo detergente em pó com LAS na mesma concentração da Etapa VII para a preparação dos frascos de contagem do NMP. Tal substrato sintético foi esterilizado por filtração em membrana (0,22µm) e sistema Millipore previamente esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm, durante 20 minutos. Após a filtração, o substrato sintético foi submetido a atmosfera de N_2 (100%) durante 20 minutos e,

posteriormente, a atmosfera de N_2/CO_2 (70/30%), por mais 20 minutos. A seguir foram transferidos 8,9 mL do substrato sintético para frascos de antibiótico de 30 mL.

Os frascos de antibióticos e tampas foram, anteriormente, esterilizados em autoclave a $121^\circ C$ e 1 atm, durante 20 minutos. Os frascos foram lacrados com tampa de butila e lacre de alumínio. Em todos os frascos de contagem foram adicionados 0,1 mL de solução redutora de sulfeto de sódio (0,4%) (SAKAMOTO, 1996).

Anteriormente à inoculação nos frascos de contagem do NMP, realizou-se a diluição do inóculo em condições anaeróbias. Após inoculação, os frascos de contagem (NMP) foram incubados a $30^\circ C \pm 1^\circ C$ durante 30 dias. As bactérias anaeróbias totais foram quantificadas pela turvação do meio para as diferentes diluições. As arqueias metanogênicas foram quantificadas pela produção de metano por meio de análise cromatográfica. Para tanto, foi coletado 1 μL do *headspace* de cada farsco de contagem com seringa apropriada e injetado em cromatógrafo GOW MAC. A presença ou ausência de metano em cada diluição do NMP foi usada para elaborar tabela de quantificação. As BRS foram quantificadas por meio da presença de sulfeto, em reação com sub-acetato de chumbo, de acordo com metodologia descrita por Sakamoto (1996).

As diluições foram feitas em quintuplicata. Respostas positivas e negativas dos três grupos microbianos foram a base do cálculo para estimar o NMP, por meio da tabela padrão de probabilidade (APHA, 2005).

4.8.3. Biologia Molecular

4.8.3.1. Extração do DNA e PCR

Para análise filogenética foram utilizadas amostras da Etapa VII de operação do reator. As amostras utilizadas foram provenientes do biofilme aderido ao material suporte do reator (areia) e biomassa presente no separador de fases do reator. Para extração de DNA, foram utilizados *glass beads* e fenol/clorofórmio de acordo com o protocolo de Griffiths et al. (2000) modificado. Para amplificação do RNAr 16S foram usados os *primers* 27f e 1492r (LANE, 1991) (Tabela 4.11), cuja programação do termociclador (Eppendorf AG - 22331 Hamburg) está apresentada na Tabela 4.12.

Tabela 4.11: *Primers* para amplificação da região 16S do RNAr para o domínio *Bacteria*

<i>Primers</i>	Seqüências (5' - 3')
27F	5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'
1492R	5' - GGTTACCTTGTTACGACTT -3'

Fonte: Lane (1991)

Tabela 4.12: Programação do termociclador para amplificação do RNAr 16S para o domínio *Bacteria*

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
94 °C 7 min	94 °C 45 s	55 °C 45 s	72°C 60 s	72°C 10 min	4 °C
	35 ciclos				

4.8.3.2. Clonagem

A clonagem em células competentes de *E. coli* foi realizada utilizando os produtos de PCR (fragmento do gene RNAr 16S) e plasmídeo *pGEM Easy Vector System I*. Para adenilação, 3 µL do produto do PCR já purificado foi acrescido a 1 µL de tampão 10x, 1 µL de dATP, 1 µL de *Taq DNA polimerase*, 0,2 µL de MgCl₂ e 3,8 µL de água ultra purificada estéril. O material foi colocado a 70° C por 30 minutos no termociclador.

A etapa de ligação do vetor *pGEM* foi realizada seguindo a adição dos seguintes componentes: 5 µL – 2X tampão de ligação rápido, 1 µL do vetor *pGEM Easy*, 2 µL do produto de PCR adenilado, 1 µL T4 DNA ligase, 1 µL de água ultra purificada estéril. Misturou-se a reação com pipeta e incubou-se 1 hora em temperatura ambiente.

Para transformação, células competentes de *E. coli* foram retiradas a -80° C e mantidas em banho de gelo por 5 minutos. 2 µL do produto de ligação foram misturados com as células de *E. coli* e incubados no gelo por 20 minutos. Posteriormente, as células foram aquecidas em banho-maria a 42° C por 50 segundos, sem agitação. Quando retiradas, foram mantidas em banho de gelo por 2 minutos. 200 µL de meio SOC (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) foram adicionados a temperatura ambiente. O material foi incubado por 1 hora e 30 minutos, com agitação de 150 rpm a 37° C.

Em tubo Falcon foram colocados 50 mL de meio LB (Tabela 4.13) com 80 µL de IPTG (23 mg/mL), 64 µL de X-gal (40 mg/mL) e 30 µL de ampicilina (0,5g em 10 mL de água). Esse conteúdo foi distribuído em duas placas de Petri cada uma com 25 mL. As placas

ficaram em repouso por pelo menos 30 minutos antes do uso. Adicionou-se 100 µL do produto de transformação em cada placa e incubou-se a 37° C por 24 horas. Após esse período, os clones foram selecionados ao acaso e as colônias transformadas que receberam o inserto (colônias brancas) foram transferidas para 5 µL de meio líquido LB acrescidas de 2, 5 µL de ampicilina e mantidas sob agitação a 37° C por aproximadamente 16 horas. 2 mL de cada amostra foram transferidos para frascos apropriados e submetidos a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 500 µL de tampão TE e, novamente, submetido a centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, as amostras foram armazenadas a -20° C com 200 µL de tampão TE.

Tabela 4.13: Composição do Meio LB

Nutrientes	g/L
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	5
Agar	15

Para amplificação do DNA plasmidial foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* M13 *foward* (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') e M13 *reverse* (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3') (CHUN, 1995), de acordo com as condições do termociclador apresentadas na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Programação do termociclador para recuperação e amplificação dos fragmentos do DNA clonado de interesse

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
95 °C 7 min	94 °C 1 min	55 °C 1 min	72°C 1 min	72°C 7 min	4 °C
	25 ciclos				

A purificação do produto da PCR foi feita com o *Kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification* (GE Healthcare).

4.8.3.3. Sequenciamento

Na reação de sequenciamento foi utilizado 1 μ L de Big Dye Terminator (Applied Biosystem®), 1 μ L de Save Money, 3 μ L de Primer 27F (10pmol), 2 μ L do produto de PCR purificado e 3 μ L de água ultra purificada estéril. As condições do termociclador para o sequenciamento são apresentadas na Tabela 4.15. As amostras foram precipitadas em centrífuga logo após a reação de sequenciamento.

A leitura das seqüências de nucleotídeos foi realizada em analisador automático de DNA modelo ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®).

Tabela 4.15: Programação do termociclador para reações de sequenciamento

Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Resfriamento
94°C 2 min	94°C 15 s	50° C 15 s	60°C 2 min	4 °C
	30 ciclos			

4.8.3.4. Análises das Seqüências do fragmento do gene 16 RNAr

O consenso das seqüências obtidas foi realizado no programa “SeqMan” do software DNASTAR (Lasergene sequence analysis). Essas seqüências foram comparadas com as seqüências encontradas no banco de dados NCBI-database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Ribossomal Database Project (RDP: http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp), e foram selecionadas aquelas com mínimo de 95% de similaridade.

A árvore filogenética foi elaborada usando o programa MEGA 4.0, com análises de *bootstrap* baseadas em 1.000 reamostragens.

Para elaboração da curva de rarefação das amostras do material suporte e do copo do reator foi usado o programa DOTUR. Para tanto, foi necessário utilizar a planilha obtida através do programa DNADIST (algoritmo Kimura) (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=dnadist>). Para obtenção desta planilha foi necessário usar o arquivo do alinhamento obtido através do programa MEGA 4.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Remoção de DQO

O reator de leito fluidificado foi operado durante 231 dias. A Etapa I, na qual o sistema permaneceu fechado para adaptação do biofilme maduro ao novo substrato sintético, teve duração de 15 dias. A DQO média efluente desse período foi de 316 ± 131 mg/L, como pode ser observado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Valores de DQO obtidos em cada etapa de operação do reator

Etapas	Composição do substrato sintético	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	Remoção (%)
I	SS	-	316 ± 131	-
II	SS	839 ± 63	233 ± 178	$72,4 \pm 20,3$
III	SS+SR	869 ± 27	331 ± 251	$62,5 \pm 27,4$
IV	SS	-	536 ± 90	-
V	SS	425 ± 31	251 ± 137	$41,5 \pm 31,2$
		232 ± 21	130 ± 75	$45,4 \pm 28,7$
		432 ± 87	131 ± 79	$70,9 \pm 12,4$
VI	SS	532 ± 69	67 ± 28	$87,2 \pm 5,4$
VII	SS+DP	607 ± 60	87 ± 33	$85,8 \pm 4,9$

SS: Substrato sintético; SR: solução redutora; DP: detergente em pó.

Na Etapa II, o reator foi colocado em sistema aberto e alimentado somente com substrato sintético. A DQO afluente para este período foi de 839 ± 63 mg/L, cuja eficiência média de remoção foi $72,4 \pm 20,3\%$, durante período de 15 dias.

Contudo, na Etapa III houve acréscimo de solução redutora de sulfeto de sódio (400mg/L) ao substrato sintético com intuito de garantir a anaerobiose do sistema. Entretanto, foi verificado que após o acréscimo dessa solução, a remoção de DQO foi instável, variando entre 21,3% e 89,3% (Figura 5.1). Nesse período, com duração de 13 dias, a eficiência de remoção foi de $62,5 \pm 27,4\%$ para DQO afluente de 869 ± 27 mg/L.

A desestabilização da remoção de DQO ocorreu, provavelmente, devido a inibição de alguns microrganismos presentes no reator. Sendo assim, a solução redutora foi suspensa e o reator foi re-inoculado, dando início a Etapa IV de operação. O sistema foi mantido em

circuito fechado por 8 dias e foi alimentado somente com substrato sintético, apresentando DQO média efluente de 536 ± 90 mg/L nesse período.

Após a abertura do sistema (Etapa V), os valores de eficiência de remoção de DQO estiveram muito baixos e, assim, matéria orgânica do substrato sintético foi reduzida a aproximadamente metade do valor inicial ($425 \pm 31,2$ mg/L) e, posteriormente, para $232 \pm 21,2$ mg/L para que ocorresse novamente adaptação da biomassa ao substrato sintético e aumento da sua remoção.

A diminuição de DQO afluente ocorreu em função da concentração dos co-substratos (etanol e extrato de levedura) na alimentação. A eficiência de remoção para esses valores de DQO afluente foram de $41,5 \pm 31,2\%$ e $45,4 \pm 28,7\%$, respectivamente. Uma vez que ocorreu elevação da remoção de matéria orgânica, a concentração dos co-substratos foram aumentados para valores correspondentes a 432 ± 87 mg/L de DQO afluente. Essa etapa durou 25 dias e foi caracterizada por grande variação da concentração de DQO afluente, efluente e de sua remoção.

A Etapa VI teve duração de 44 dias e consistiu na estabilização da remoção da matéria orgânica. A concentração dos co-substratos foi aumentada e mantida em valores correspondentes a DQO afluente de 532 ± 69 mg/L. A remoção manteve-se em $87,2 \pm 5,4\%$, e, uma vez que não ocorreu aumento de sua eficiência, não elevou-se a concentração dos co-substratos da alimentação, e, conseqüentemente da DQO, mantendo-os em valores inferiores aos iniciais.

Na Etapa VII foi adicionado detergente em pó comercial ao substrato sintético. A média de remoção da matéria orgânica para este período, com duração de 112 dias, foi de $85,8 \pm 4,9\%$ para DQO afluente de 607 ± 60 mg/L.

Utilizando a mesma configuração de reator, Oliveira (2010) obteve 88% de remoção de DQO para concentração de 8 mg/L de LAS. Mesmo com o aumento gradual da concentração de LAS afluente, chegando a atingir 46 mg/L, a eficiência de remoção de DQO manteve-se alta, ou seja, 91% para 632 mg/L de DQO filtrada afluente.

Tendo em vista os valores obtidos por Oliveira (Op. cit.) e no presente trabalho, pode-se inferir que o surfactante, bem como os demais componentes do detergente em pó, não interferiram na remoção da matéria orgânica.

Figura 5.1: Variação temporal de DQO afluyente e efluente e eficiência de remoção

5.2. Remoção de LAS

Na Etapa VII, cujo tempo de duração foi 112 dias, houve adição de detergente em pó doméstico na alimentação contendo $14,4 \pm 3,5$ mg/L de LAS (Tabela 5.2).

No início dessa etapa, foi verificada eficiência de remoção elevada, atingindo valor máximo de 70% (Figura 5.2). A média foi de $53,8 \pm 11,9\%$ para concentração de LAS afluyente de $13,6 \pm 4,3$ mg/L. Provavelmente, essa remoção deve ter ocorrido em virtude da degradação e adsorção do surfactante na biomassa.

Tabela 5.2: Valores de DQO e LAS durante a operação da Etapa VI e VII

Parâmetros	Etapa VI	Etapa VII
DQO Afluyente (mg/L)	532 ± 69	607 ± 60
DQO Efluente (mg/L)	67 ± 28	87 ± 33
Remoção (%)	$87,2 \pm 5,4$	$85,8 \pm 4,9$
LAS Afluyente (mg/L)		$14,4 \pm 3,5$
LAS Efluente (mg/L)	-	$7,5 \pm 2,2$
Remoção (%)		$47,6 \pm 10,2$

Após 169 dias de operação, a eficiência de remoção de LAS variou, principalmente, entre 30 e 50%. Para esse período, a média foi de $43,6 \pm 7,2\%$ para concentração afluyente de $14,8 \pm 3,1$ mg/L. Uma vez que a remoção diminuiu, tais valores foram atribuídos, portanto, somente a biodegradação desse surfactante.

Durante toda a Etapa VII a eficiência média de remoção de LAS foi de $48 \pm 10\%$.

Figura 5.2: Variação temporal de LAS afluyente e efluente e eficiência de remoção

A presença do surfactante na Etapa VII não interferiu na remoção de DQO, cujo valor foi de $86 \pm 5\%$ para 607 ± 60 mg/L de DQO afluyente.

Em reator anaeróbio de leito fluidificado, Oliveira (2010) obteve 88% de remoção de LAS para a concentração afluyente de $8,2 \pm 1,3$ mg/L, após 28 dias de operação. Mesmo com o aumento da concentração de LAS afluyente, chegando ao valor de $45,8 \pm 5,4$ mg/L na última etapa operacional, a eficiência de remoção manteve-se alta, com média de $93 \pm 3\%$. Nesse reator, cujo tempo de detenção hidráulica foi 18 horas, também foi utilizada areia como material suporte.

Os altos valores de remoção do surfactante encontrados pela autora, em relação ao presente trabalho, podem ser atribuídos aos diferentes co-substratos utilizados. Enquanto no trabalho de Oliveira (2010) foi empregado extrato de levedura e sacarose, no presente

trabalho foi utilizado extrato de levedura e etanol, como co-substratos. Ademais, a origem do inóculo utilizado no reator do trabalho de Oliveira (2010) foi diferente do presente trabalho.

Outra diferença que deve ser ressaltada refere-se ao uso do detergente em pó, nesse trabalho, que contém, além do surfactante, outros compostos, tais como enzimas, sinergista, coadjuvantes, agentes clareadores, entre outros, os quais possivelmente interferiram na remoção de LAS.

Comparando-se com a maioria das configurações de reator, pode-se afirmar que o reator de leito fluidificado apresentou valores superiores de eficiência média de remoção de LAS. Oliveira et al. (2009) avaliaram a remoção deste surfactante em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), cuja concentração afluenta foi de 14mg/L. O substrato sintético utilizado continha extrato de levedura e sacarose. O reator foi preenchido com espuma de poliuretano como material suporte e os autores obtiveram remoção de 35% de todo LAS adicionado. Embora tal configuração de reator tenha apresentado eficiência inferior de remoção de LAS, em relação à matéria orgânica a eficiência manteve-se estável, com valores acima de 90%.

Valores de remoção de LAS satisfatórios foram obtidos por Duarte et al. (2010), em reator operado em bateladas sequenciais com inóculo proveniente de UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Os autores obtiveram 53% de degradação, após 143 dias de operação, para 22mg/L de LAS afluenta, na ausência de co-substratos. Na presença de co-substratos, os valores variaram de 24 a 37%. Assim, verificou-se que a degradação de LAS foi mais elevada na ausência do que na presença de co-substratos.

Os valores de eficiência de remoção de LAS verificados no presente trabalho deveram-se, provavelmente, às características do reator de leito fluidificado. Provavelmente, o sistema de mistura completa associado à imobilização da biomassa no material suporte, tenha favorecido o contato e disponibilidade do surfactante para os microrganismos em relação às outras configurações de reatores.

Além disso, a recirculação favoreceu a diluição do detergente em pó e, por conseguinte, facilitou a manutenção do consórcio microbiano. Outra vantagem dessa configuração é a ampla superfície disponível para aderência no material suporte, onde o microrganismo pode crescer (IZA, 1991).

5.3. Monitoramento de pH e Alcalinidade

Na segunda etapa de operação do reator, com o circuito já aberto, a média de pH afluente foi de 8,2 (Tabela 5.3). Para alcalinidade parcial e alcalinidade total, os valores médios efluente foram 247 ± 17 mgCaCO₃/L e 329 ± 8 mgCaCO₃/L, respectivamente.

Tabela 5.3.: Valores dos parâmetros físico-químicos afluente e efluente do reator de leite fluidificado durante as etapas de operação

Etapa	Amostra	DQO (mg/L)	pH	AP (mgCaCO₃/L)	AT (mgCaCO₃/L)
II	Afluente	839 ± 63	$7,8 \pm 0,1$	200 ± 22	262 ± 18
	Efluente	233 ± 178	$8,2 \pm 0,1$	247 ± 17	329 ± 8
	Efic. (%)	$72,4 \pm 20,3$			
III	Afluente	869 ± 27	$8,2 \pm 0,1$	246 ± 59	303 ± 53
	Efluente	331 ± 251	$7,8 \pm 0,4$	274 ± 30	383 ± 56
	Efic. (%)	$62,5 \pm 27,4$			
IV	Afluente	-	-	-	-
	Efluente	536 ± 90	$7,9 \pm 0,0$	294 ± 28	381 ± 37
	Efic. (%)	-			
V	Afluente	341 ± 108	$8,2 \pm 0,2$	294 ± 105	380 ± 124
	Efluente	171 ± 106	$7,6 \pm 0,3$	325 ± 86	460 ± 102
	Efic. (%)	$49,8 \pm 26,8$			
VI	Afluente	532 ± 69	$7,7 \pm 0,3$	235 ± 46	318 ± 56
	Efluente	67 ± 28	$7,5 \pm 0,2$	313 ± 54	419 ± 64
	Efic. (%)	$87,2 \pm 5,4$			
VII	Afluente	607 ± 60	$7,6 \pm 0,2$	235 ± 53	334 ± 70
	Efluente	87 ± 33	$7,4 \pm 0,1$	322 ± 44	436 ± 57
	Efic. (%)	$85,8 \pm 4,9$			

Após a adição de solução redutora (Etapa III), houve ligeira diminuição do pH efluente para 7,8. Nesse período, os valores obtidos foram 274 ± 30 mgCaCO₃/L de alcalinidade parcial e 383 ± 56 mgCaCO₃/L de alcalinidade total.

No período em que o reator ficou em sistema fechado para imobilização da biomassa no material suporte (Etapa IV), os valores continuaram bastante semelhantes aos da etapa anterior. O pH foi de 7,9, alcalinidade parcial de 294 ± 28 mgCaCO₃/L e alcalinidade total de 381 ± 37 mgCaCO₃/L.

Na Etapa V de operação do reator, caracterizada pela instabilidade de remoção de matéria orgânica, o pH efluente oscilou entre 7,1 e 8,2, com média de 7,6. A alcalinidade parcial e total foi elevada para 325 ± 86 mgCaCO₃/L e 460 ± 102 mgCaCO₃/L, respectivamente.

Na Etapa VI, na qual a remoção de DQO foi estabilizada, os valores de pH mantiveram-se próximos ao neutro com média efluente de 7,5. O sistema apresentou alcalinidade parcial de 313 ± 54 mgCaCO₃/L e alcalinidade total de 419 ± 64 mgCaCO₃/L.

Na Etapa VII, o pH efluente foi de $7,4 \pm 0,1$ e alcalinidade total de 436 ± 57 mg CaCO₃/L, não ocorrendo variação significativa na presença de sabão em pó. Oliveira (2010) obteve maiores valores de pH efluente em reator de leito fluidificado usado na remoção de LAS, com médias variando entre 7,9 e 8,1 em todo período de operação. Contudo, os valores de alcalinidade total encontrados pela autora foram inferiores ao do presente trabalho, variando entre 154 e 164 mg CaCO₃/L, em todo o período na presença de LAS.

Vale ressaltar que, no trabalho de Oliveira (2010), em todas as etapas de operação contendo LAS, a alcalinidade total efluente foi menor que a afluente, indicando que houve consumo de alcalinidade, situação inversa a do presente trabalho. Após a adição de LAS, o metabolismo microbiano pode ter ocasionado o consumo de alcalinidade. Contudo, no presente trabalho, os compostos presentes no detergente em pó podem ter compensado o consumo de alcalinidade, uma vez que mesmo na última etapa de operação do presente trabalho ocorreu produção de alcalinidade.

Nas Figuras seguintes (Figura 5.3 a 5.5) estão apresentados os resultados durante toda operação do reator quanto a pH, alcalinidades parcial e alcalinidade total, cujos valores foram sumarizados na Tabela 5.3.

Figura 5.3: Variação temporal do pH afluente e efluente

Figura 5.4: Variação temporal da alcalinidade parcial afluente e efluente

Figura 5.5: Variação temporal da alcalinidade total afluente e efluente

5.4. Monitoramento de Ácidos Orgânicos Voláteis

A concentração de ácidos voláteis efluente foi relativamente alta tanto na ausência, quanto na presença de LAS, sendo que ligeiro aumento ocorreu após a adição de detergente em pó no sistema, para a maioria dos ácidos (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Concentração dos ácidos voláteis monitorados nas Etapas VI e VII

Ácidos voláteis	Ácidos voláteis (mg/L)	
	Etapas VI	Etapas VII
Cítrico	≤ LD*	≤ LD*
Málico	≤ LD*	≤ LD*
Succínico	≤ LD*	1,8±4,1
Lático	4,3±8,0	9,3±8,5
Fórmico	≤ LD*	≤ LD*
Acético	6,7±5,9	9,5±5,4
Propiônico	9,8±7,1	8,3±6,2
Isobutírico	6,0±6,4	11,4±4,5
Butírico	14,2±17,1	8,2±6,9
Isovalérico	10,9±9,9	12,6±7,6
Valérico	≤ LD*	7,7±7,2
Capróico	15,2±25,2	17,2±14,2

*LD: Limite de detecção

Utilizando a mesma configuração de reator, Oliveira (2010) obteve valores inferiores para ácidos voláteis, cuja concentração efluente média variou entre 12 e 18 mgHAc/L durante todo o período de operação. A autora obteve o valor máximo de 18±6 mgHAc/L, em média, na etapa cuja concentração de LAS foi 8,2±1,3 mg/L. Ademais, verificou também que mesmo com o aumento da concentração de LAS nas etapas consecutivas, os valores de ácidos voláteis mantiveram-se baixos.

Contudo, vale ressaltar que no trabalho de Oliveira (Op. cit.) as análises de ácidos voláteis foram realizadas através do método titulométrico, enquanto no presente trabalho foram realizadas por meio de cromatografia líquida.

A variação de ácidos voláteis efluente, durante as etapas de operação VI e VII, são mostrados na Figura 5.6.

Figura 5.6: Variação temporal de ácidos voláteis totais efluente

Na Etapa VII do presente estudo foram encontrados os seguintes ácidos: succínico, láctico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, capróico. Nessa etapa, houve predominância dos ácidos capróico, isovalérico, isobutírico, acético e láctico (Figura 5.7).

Figura 5.7: Porcentagem da concentração de ácidos voláteis presentes no efluente na Etapa VII

5.5. Balanço de massa

Foi verificado que durante o período de operação, o reator recebeu 2.478 mg de LAS, sendo que 1.294 mg foram observados no efluente (Tabela 5.5). Por meio do balanço de massa foi verificado que 42,4% do LAS adicionado no reator foram removidos por degradação biológica, 0,9% foi adsorvido na biomassa do leito e 4,5% adsorvidos na biomassa efluente.

Oliveira (2010) avaliou a remoção de LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado com areia como material suporte, TDH de 18 horas e sacarose e extrato de levedura como co-substratos. A autora obteve em média 93% de biodegradação para 8 a 46 mg/L de LAS afluente. Provavelmente, essa alta eficiência foi devida a utilização somente de LAS comercial na composição do substrato sintético. Desse modo, nesse trabalho, com adição de $14,4 \pm 3,5$ mg/L de LAS a eficiência foi de 30 a 50%. Deve-se ressaltar que nesse estudo foi usado detergente em pó, o qual contém outros compostos, como coadjuvantes, enzimas, branqueadores ópticos, cargas, corantes, além do surfactante.

No presente trabalho, dentre o total de LAS removido na Etapa VII, 89% foi devido a remoção biológica, enquanto 11% foi devido a adsorção (biomassa mais sólidos suspensos efluente).

Tabela 5.5: Balanço de massa de LAS

Entrada (mg)	Saída (mg)	Remoção (%)	Adsorvido (mg)	Degradação (%)
2.478	1.294	48	133	42

Ressalta-se que no presente trabalho não foi considerada a adsorção de LAS na areia, uma vez que Oliveira (2010) não verificou adsorção desse surfactante nesse material suporte.

5.6. Sólidos suspensos totais

A quantificação de sólidos suspensos totais presentes no efluente foi realizada durante a Etapa VII de operação do reator. A média de sólidos suspensos totais foi de $52,0 \pm 20,5$ mg/L, sendo que desse total $50,1 \pm 21,2$ mg/L foram referentes aos sólidos suspensos voláteis.

5.7. Sulfato e Sulfeto

Além dos parâmetros mencionados até o momento, após a adição do sabão em pó, também foram monitorados sulfato e sulfeto afluente e efluente. Com isso, esperava-se observar, com a lise da molécula de LAS, aumento de sulfeto e sulfato efluente, devido a presença de enxofre ligado ao anel aromático da molécula de LAS.

As análises de sulfato mostraram que a concentração afluente foi de $12,5 \pm 15,2$ mg/L e efluente de $15,9 \pm 15,5$ mg/L. Os valores de sulfato variaram muito durante este período de operação, apresentando desvio padrão muito elevado. Os valores encontrados por Oliveira (2010) referentes à concentração de sulfato foram semelhantes ao do presente estudo, com concentração afluente variando de 5 a 23 mg/L, e efluente variando de 16 a 30 mg/L. Assim como no presente trabalho, a autora obteve concentração de sulfato maior no efluente em todas etapas.

Em relação a concentração de sulfeto, seus valores foram bastante inferiores. No presente trabalho, foi verificada média afluente e efluente de $0,79 \pm 1,09$ mg/L e $1,13 \pm 1,19$ mg/L, respectivamente, enquanto os valores médios de Oliveira (Op. cit.) variaram entre 0,10 e 0,46 mg/L no afluente e entre 0,04 e 0,22 mg/L no efluente. Esses valores foram encontrados no período cuja concentração de LAS foi de 8,2 a 45,8 mg/L.

Tabela 5.6: Valores de sulfato e sulfeto afluente e efluente durante a etapa VII

Etapa	Amostra	Sulfato (mg/L)	Sulfeto (mg/L)
VII	Afluente	$12,5 \pm 15,2$	$0,79 \pm 1,09$
	Efluente	$15,9 \pm 15,5$	$1,13 \pm 1,19$

Em relação aos valores apresentados na Tabela 5.6 pode-se observar que, a concentração de sulfeto efluente esteve maior que no afluente, em média, indicando a provável lise da molécula de LAS pelos microrganismos anaeróbios e liberação de sulfeto no meio líquido.

5.8. Potencial Redox

Na etapa cujo substrato sintético continha solução redutora (Etapa III), os valores de potencial redox obtidos foram de -200 mV a -340 mV.

Durante as seguintes etapas, cujo substrato sintético não continha sabão em pó (Etapa IV a VI), os valores estiveram entre -15 mV a -250 mV.

Após a adição do sabão em pó (Etapa VII), os valores de potencial redox verificados foram inferiores aos das etapas anteriores, variando entre -127 mV a -352 mV.

Assim, pode-se afirmar que mesmo na ausência de solução redutora, o sistema manteve-se anaeróbio.

Realizou-se também teste com resazurina, para constatação da anaerobiose do reator. No separador de fases, situado na porção superior do reator de leito fluidificado, a coloração adquiriu tonalidade rósea (Figura 5.8), indicando potencial redox entre -200 e 200 mV. No entanto, nas demais partes do reator, incluindo o material suporte (Figura 5.9), a coloração manteve-se incolor, indicando anaerobiose estrita.

Figura 5.8: Teste com resazurina no separador de fases do reator de leito fluidificado

Figura 5.9: Teste com resazurina no Reator de Leito Fluidificado

5.9. Exames microscópicos

Ao final das etapas VI e VII de operação do reator foram retiradas amostras da areia e do separador de fases do reator para a realização de exames microscópicos de contraste de fase com a finalidade de se verificar a diversidade de morfologia microbiana.

Na amostra do biofilme da areia, referente ao final da Etapa VI, foram observados cocos, bacilos, bacilos curvos, endósporos e bactérias filamentosas (Figura 5.10).

Figura 5.10: Microscopia de contraste de fase das morfologias observadas na biomassa aderida na areia ao final da Etapa VI: (a) cocos e bacilos, (b) bacilos de tamanhos diferentes, (c) bactéria filamentosa

Na amostra do separador de fases, ao final da Etapa VI, as morfologias encontradas assemelharam-se às da areia, todavia nessa amostra foi encontrada, também, morfologia semelhante a espiroqueta (Figura 5.11).

Figura 5.11: Microscopia de contraste de fase das morfologias observadas na biomassa presente no separador de fases do reator ao final da Etapa VI: (a) endósporos e bacilos curvos, (b) espiroquetas e cocos

Na sétima etapa de operação do reator, contendo detergente em pó, morfologias semelhantes a cocos estiveram mais frequentes, tanto para biomassa aderida na areia quanto a presente no separador de fases (Tabela 5.7 e 5.8). Provavelmente, a adição do detergente em pó favoreceu o crescimento dessas células, devido a presença do surfactante ou dos demais compostos prentes na composição do detergente utilizado.

Além disso, na Etapa VII foram encontrados bacilos fluorescentes em ambas amostras e, somente na amostra do material suporte foram observados cistos de *Methanosarcina*.

Tabela 5.7: Frequencia das morfologias observadas em microscopia de contraste de fase e fluorescência da biomassa da areia

	Morfologias	Etapa VI	Etapa VII
Bactérias	Cocos	+	++
	Bacilos retos	++++	++++
	Bacilos curvos	++	++
	Endósporo	+	++
	Espiroquetas	-	++
	Filamentosas	+++	+++
	Filamentos septados	++	+++
Arquéias	Cistos de sarcinas	-	++
metanogênicas	Bacilos fluorescentes	-	+++

(++++) predominates; (++++) frequentes; (++) pouco frequentes; (+) raros; (-) não foram observados

Tabela 5.8: Frequências das morfologias observadas em microscopia de contraste de fase e fluorescência da amostra do separador de fases do reator

	Morfologias	Etapa VI	Etapa VII
Bactérias	Cocos	+	++
	Bacilos retos	++++	++++
	Bacilos curvos	++	++
	Endósporo	+++	++
	Espiroquetas	+	++
	Filamentosas	+++	+++
	Filamentos septados	+++	+++
Arquéias	Cistos de sarcinas	-	-
metanogênicas	Bacilos fluorescentes	-	++++

(+++++) predomina; (++++) frequentes; (++) pouco frequentes; (+) raros; (-) não foram observados

As diferenças encontradas nas frequências das morfologias tanto para a amostra do separador de fases, quanto do material suporte, após a adição de detergente em pó, mostra que o LAS e os demais compostos do detergente em pó causaram a seleção da comunidade microbiana desenvolvida no reator.

Os bacilos fluorescentes, encontrados somente na Etapa VII, provavelmente estiveram presentes na etapa anterior. Todavia, podem ter sido favorecidos tanto pelos compostos presentes no detergente em pó, quanto pela disponibilidade de subprodutos do metabolismo de bactérias que se desenvolveram nessa última etapa. Desse modo, sugerindo que o surfactante e os demais componentes presentes no detergente em pó levaram a seleção dos bacilos fluorescentes direta ou indiretamente através do consórcio microbiano.

A diferença de frequência das morfologias presentes no biofilme e separador de fases mostra que grupos diferentes de microrganismos foram favorecidos pelas condições encontradas em cada região do reator associadas às suas capacidades fisiológicas.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura também foi encontrada diversidade de morfologias, além de camada de exopolímero cobrindo o material suporte. (Figura 5.12 e Figura 5.13).

Figura 5.12: Microscopia eletrônica de varredura das morfologias observadas em grão de areia do reator de leito fluidificado ao final da Etapa VI de operação: (a) bacilos, (b) filamentosas, (c) cocos e filamentos. (Aumento 5000X)

Figura 5.13: Microscopia eletrônica de varredura das morfologias observadas em grão de areia do reator de leito fluidificado ao final da Etapa VII de operação: (a) bacilos curvos, (b) bacilos e filamentos, (c) cocos, (d) filamentos. (Aumento 5000X)

A grande diversidade de grupos bacterianos encontrados durante a operação do reator corrobora a hipótese de que a degradação do LAS é decorrente de consórcio microbiano.

5.10. Caracterização filogenética do Domínio *Bacteria*

No final da Etapa VII foram retiradas amostras da areia e biomassa do separador de fases do reator para análise filogenética. Amostras do separador de fases foram submetidas a análises de Biologia Molecular devido ao grande volume de biomassa que se fixou nessa região e que, provavelmente, estiveram relacionados a degradação anaeróbia de LAS. Pretendeu-se, assim, comparar a diversidade microbiana desenvolvida nessa biomassa com aquela desenvolvida no biofilme dos grãos de areia, bem como inferir sobre o metabolismo destes organismos.

Ao final das análises de Biologia Molecular, foram obtidos 88 e 43 clones referente a biomassa da areia e do separador de fases, respectivamente. Os clones obtidos do biofilme da areia foram relacionados aos seguintes filos: 77 clones relacionados ao filo Proteobacteria (Classes Beta-, Delta-, Gamma- e Epsilon-proteobacteria), 4 clones ao filo Bacteroidetes (Classes Flavobacteria e Sphingobacteria), 2 clones ao filo Synergistetes (Classe Synergistia), 2 clones ao filo Firmicutes (Classe Clostridia), 1 clone ao filo Acidobacteria (Classe Acidobacteriae), 1 clone ao filo Fusobacteria (Classe Fusobacteria) e 1 clone ao filo Aminanaerobia (Classe Aminanaerobia) (Figura 5.14 e Figura 5.15).

Figura 5.14: Porcentagem de clones relacionados aos diferentes Filos do biofilme da areia

Figura 5.15: Porcentagem de clones relacionados às diferentes Classes do biofilme da areia

Para as amostras do separador de fases do reator, do total de 43 clones, 17 foram relacionados ao filo Proteobacteria (Classes Beta-, Delta-, Gamma- e Epsilon-proteobacteria), 8 clones ao filo Synergistetes (Classe Synergistia), 5 clones ao filo Verrucomicrobia (Classe Verrucomicrobiae), 5 clones ao filo Fusobacteria (Classe Fusobacteria), 1 clone ao filo Cyanobacteria (Classe Cyanobacteria) e 7 clones foram relacionados às bactérias não classificadas (Figura 5.16 e 5.17).

Figura 5.16: Porcentagem de clones relacionados aos diferentes Filos de amostras do separador de fases do reator

Figura 5.17: Porcentagem de clones relacionados às diferentes Classes de amostras do separador de fases do reator

Dentre os clones da amostra da areia relacionados ao Filo Proteobacteria, 38 pertenciam a Classes Betaproteobacteria, Ordem Rhodocyclales. Outros 27 clones foram relacionados a Classe Deltaproteobacteria, sendo 26 clones pertencentes a Ordem Desulfomonadales e um a Ordem Desulfovibrionales. Em relação a Classe Epsilonproteobacteria foram obtidos 11 clones e, apenas um relacionado a Classe Gammaproteobacteria.

A Ordem Rhodocyclales compreende a Família Rhodocyclaceae, que é fenotípica, metabólica e ecologicamente diversa. Inclui microrganismos que realizam metabolismo fotoheterotrófico, aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos que utilizam amplo número de aceptores de elétrons, bem como microrganismos fermentativos e fixadores de nitrogênio (GARRITY et al., 2005). Os clones encontrados nesse trabalho foram relacionados a *Dechloromonas* sp., capazes de utilizar completamente compostos mono-aromáticos, incluindo benzeno, a CO_2 em condição anaeróbia, ou na presença de nitrato como aceptor de elétrons. Além disso, podem usar AQDS (2,6-antraquinona dissulfonada) como doador de elétrons e acetato como fonte de carbono (COATES et al, 2001). Sua presença no reator é justificada pela disponibilização do anel de benzeno liberado através da degradação da molécula de LAS. Além disso, a presença de ácido acético no reator pode ter favorecido o crescimento dessas células.

Outros clones pertencentes a Ordem Rhodocyclales foram relacionados ao gênero *Azospira*. São bacilos curvos, Gram negativos, não formadores de endósporos, com único flagelo. São heterotróficas, capazes de fixar nitrogênio e podem utilizar nitrato e perclorato como aceptores de elétrons. O crescimento ocorre com temperatura ótima por volta de 37° C e pH neutro (BAE et al., 2007). Além disso, crescimento de espécie de *Azospira* já foi verificado em meio contendo etanol (TAN & REINHOLD-HUREK, 2003). Os organismos desse gênero, encontrados no presente trabalho, provavelmente estavam presentes no lodo anaeróbio proveniente de reator UASB usado no tratamento de resíduos do processamento de aves e encontrou ambiente mais favorável no material suporte. A presença de etanol como co-substrato pode ter favorecido o crescimento dessas bactérias no reator.

Outros clones também foram relacionados a bactérias pertencentes à família Rhodocyclaceae encontradas em lodos ativados de sistema de tratamento de esgoto em escala plena, no qual foi verificada desnitrificação, tendo acetato com única fonte de carbono (GINIGE et al., 2005). Embora, no presente trabalho, não havia fonte de nitrato na alimentação, ácido acético produzido através da fermentação anaeróbia pode ter favorecido o crescimento dessas células no reator.

Bactérias pertencentes a Classe Deltaproteobacteria são Gram negativas não formadoras de endósporos (BOONE et al., 2005), e, dentre os 27 clones pertencentes a esta Classe, 26 foram relacionados à Ordem Desulfuromonales e um a Ordem Desulfovibrionales.

A ordem Desulfuromonales compreende células na forma de bacilos usualmente móveis. São estritamente quimiolitoheterotróficos ou quimiorganotróficos anaeróbios com metabolismo respiratório ou fermentativo. Todos os membros são mesofílicos com temperatura ótima para crescimento por volta de 30° C. O gênero *Geobacter* foi encontrado em ambas amostras no presente trabalho e diferencia-se de todas as outras bactérias estritamente anaeróbias tanto fenotípica, quanto genotipicamente, uma vez que, as espécies deste gênero são as primeiras redutoras de Fe(III) que realizam oxidação dissimilatória completa. Também, são os únicos microrganismos descritos capazes de acoplar a oxidação de compostos monoaromáticos, incluindo tolueno, à redução de Fe(III) (KUEVER et al., 2005).

Bactérias do gênero *Geobacter* sp. além de atuarem como redutoras de Ferro³⁺ (HOLMES et al. 2007) têm sido encontradas na presença de PCE (tetracloroetileno) e TCE (tricloroetileno) (DUHAMEL & EDWARDS, 2006).

Hwang et al., (2009) avaliaram a sucessão microbiana, na biorremediação de urânio e tratamento de resíduos de radionuclídeos a longo prazo *in situ*. O estudo revelou que a prevalência de populações de *Geobacter* estava mais fortemente correlatada à

disponibilidade de etanol do que baixos níveis de urânio. Os resultados também sugeriram que *Geobacter* spp. foram mais tolerantes a oxigênio. Uma explicação alternativa pode ser a interação entre *Geobacter* e microrganismos tolerantes a oxigênio.

Os clones sequenciados no presente trabalho foram relacionados a *Geobacter thiogenes* (99% de similaridade) cultivada em meio contendo acetato como doador de elétrons e ácido tricloroacético como aceptor de elétrons, ocorrendo desalogenação redutiva do ácido tricloroacético (TCA) via anaeróbia (DE WEVER et al., 2000). A temperatura e pH ótimos para crescimento desta espécie são 30° C e 7, respectivamente (NEVIN et al., 2007).

Na alimentação do reator utilizado nesse trabalho não havia Fe(III). Todavia, a presença de tolueno em efluente de reator anaeróbio já foi verificada por Duarte (2006) e foi indicado como possível intermediário da degradação de LAS. Embora no presente trabalho o tolueno não tenha sido quantificado, provavelmente este esteve presente e, assim, pode-se justificar a presença desses microrganismos no reator. Além disso, a representativa presença desse gênero, pode estar associada, tanto ao uso de etanol, quanto do ácido acético, proveniente do metabolismo anaeróbio. Ademais, a presença desse gênero nos trabalhos citados acima, demonstra a capacidade desses microrganismos sobreviverem em condições adversas.

Os microrganismos pertencentes a Ordem Desulfovibrionales são bacilos, frequentemente móveis, estritamente anaeróbios quimiorganotróficos ou quimiolitoheterotróficos. *Desulfovibrio* são bacilos curvos ou retos, às vezes sigmoidais ou espiróides. O crescimento é obrigatoriamente anaeróbio em culturas puras e o metabolismo é às vezes fermentativo (KUEVER et al., 2005). Bactérias desse gênero são redutoras de sulfato. Muitas espécies têm capacidade de atuar tanto como consumidores, quanto produtores de hidrogênio (CRESSON et al., 2009). Além disso, têm sido estudadas pela sua capacidade de transformar TNT (trinitrotolueno) e DNT em derivados de amino e hidroxiamino, sob condição anaeróbia, embora sob tais condições nunca foi observada significativa mineralização (ZHANG & BENNETT, 2005). A presença de tais bactérias no reator provavelmente está relacionada ao sulfato proveniente da oxidação do sulfito liberado no rompimento do anel aromático da molécula de LAS. Além de atuarem como redutoras de sulfato, tais microrganismos podem ter produzido hidrogênio, o qual foi disponibilizado para as metanogênicas hidrogenotróficas.

Os clones obtidos no presente trabalho, pertencentes à Classe Epsilonproteobacteria, foram relacionados a bactérias encontradas em quimiostatos anaeróbios contendo butirato como única fonte de carbono e energia (TANG et al., 2007). Ademais, foram relacionados à

população de bactérias epsilonproteobacteria que crescem em águas subterrâneas contaminadas por petróleo em condições anaeróbias (97% de similaridade) (WATANABE et al., 2000). Sua presença no reator do presente trabalho possivelmente está associada tanto a sua capacidade de viver em ambientes sob condições adversas, quanto a disponibilidade de butirato proveniente da degradação anaeróbia de compostos orgânicos, nesse caso representado, principalmente, pelo etanol.

Um clone relacionado à Classe Gammaproteobacteria, Ordem Pseudomonadales, especificamente *Acinetobacter* sp. (97%) foi sequenciado. Espécies do gênero *Acinetobacter* são encontradas facilmente no solo em rizosfera de várias plantas (SACHDEV et al., 2010). Esses microrganismos são bacilos Gram negativos, desprovidos de flagelo. Ocorrem comumente aos pares e também formam cadeias de comprimento variável. As células não formam endósporos e além do solo, ocorrem naturalmente na água e esgoto. A maioria das cepas cresce em meio definido contendo fonte de energia e carbono simples (HOLT et al., 1994). Além disso, estão relacionados a remoção de fósforo sob alternância de condições anaeróbias e aeróbias, devido a capacidade metabólica desses microrganismos (WATER ENVIRONMENT FEDERATION, 2007). Possivelmente, tal bactéria estava presente no lodo anaeróbio usado como inóculo no reator e encontrou ambiente favorável para se manter no material suporte. A disponibilidade de etanol, bem como de ácidos voláteis, podem ter sido utilizados como fontes de carbono por esse microrganismo.

Quatro clones foram relacionados ao Filo Bacteroidetes. Desses clones, três foram relacionados à Classe Flavobacteria, Ordem Flavobacteriales, semelhante a *Fluviicola taffensis* (96% de similaridade). Outro clone foi relacionado à Classe Sphingobacteria, Ordem Sphingobacteriales, especificamente semelhante a *Sediminibacterium salmoneum* (99% de similaridade).

Bactérias do gênero *Sediminibacterium* são bacilos Gram negativos, e, embora apenas um clone tenha sido obtido do gênero *Sediminibacterium* sp., este foi relacionado a bactérias encontradas por Oliveira et al. (2010), em reator anaeróbio de leite fluidificado usado na remoção de LAS. Esse clone também foi relacionado à espécie *S. salmoneum*, isolada de sedimento de reservatório eutrófico, cuja temperatura e pH ótimos para crescimento são 22–28° C e 7,0, respectivamente (QU & YUAN, 2008). Embora o metabolismo dessa espécie ainda seja pouco conhecido, sua presença em reator anaeróbio com sabão em pó sugere que pode estar associada as vias de degradação do surfactante ou participando da fermentação anaeróbia.

A espécie *Fluviicola taffensis*, assim como vários membros do Filo Bacteroidetes, foi isolada de água doce, especificamente do Rio Taff (Cardiff, Reino Unido). Todavia, diferencia-se das outras espécies da família Cryomorphaceae, na qual foi incluída, uma vez que os demais membros desta família tiveram origem marinha. *F. taffensis* é Gram negativa, com morfologia semelhante a bacilo, móvel e apresenta incapacidade de utilizar glicose (O'SULLIVAN et al., 2005). Apesar dessa espécie não estar diretamente ligada a degradação de compostos orgânicos, fazia parte da ampla diversidade presente no inóculo proveniente de lodo de reator UASB tratando água residuária de processamento de aves.

Dois clones foram relacionados ao Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales, com 96% de similaridade a *Clostridium* sp. O filo Firmicutes compreende bactérias sintróficas, as quais podem utilizar ácidos voláteis, tais como ácido butírico, com produção de H₂. Esse gás pode ser usado pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (RIVIÈRE et al., 2009).

Microrganismos pertencentes ao Filo Firmicutes ocupam ampla gama de habitats e podem ser benéficos ou prejudiciais dependendo do contexto, incluindo indústrias relacionadas a comida e bebida, sendo responsáveis pela grande maioria dos incidentes de deterioração de cerveja (HAAKENSEN et al., 2008). Membros da família Clostridiales foram encontrados em digestão anaeróbia contendo substrato sintético na presença de traços de metais. O substrato consistiu de celulose, amido e uréia como fonte de carbono e nitrogênio em proporção semelhante a composição básica de silagem de milho (POBEHEIM et al., 2010).

Morfologicamente, espécies de *Clostridium* são bacilos formadores de endósporos e estão, freqüentemente, arrançados em pares ou cadeias curtas, sendo comumente pleomórficos e obrigatoriamente anaeróbios. Metabolicamente são muito diversos, com temperatura ótima variando de 10 a 65° C (HOLT et al., 1994).

Os clones sequenciados foram semelhantes à *Clostridium saccharolyticum* (99% de similaridade), o qual foi isolado de lodo anaeróbio proveniente de reator UASB. Foi observado em culturas de enriquecimento sob condições anaeróbias crescimento ótimo e transformação do explosivo hexahidro-1, 3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), quando a glicose, etanol ou lactato foram adicionados como fonte de carbono, sendo o RDX fonte de nitrogênio. As espécies de *Clostridium* presentes no meio, incluindo *C. saccharolyticum*, foram capazes de converter RDX em nitrito, formaldeído, metanol e óxido nitroso (ZHAO et al., 2003). Além de *Clostridium* sp. possivelmente estar associada a degradação de LAS, a composição do substrato sintético utilizado no presente trabalho, contendo etanol como co-substrato, pode

ter favorecido o crescimento de tais células. Ademais, organismos desse gênero podem ter colaborado com o consumo de ácidos voláteis e produção de H_2 , disponibilizando-o para as metanogênicas hidrogenotróficas. *Clostridium* sp. também foi identificado por Oliveira (2010) em reator anaeróbio de leito fluidificado usado na remoção de LAS. Segundo a autora, a disponibilidade de aminoácidos (extrato de levedura) e sulfato proveniente da oxidação do sulfito liberado no rompimento do anel aromático da molécula de LAS pode ter favorecido o crescimento de tais células.

Relacionados ao Filo Synergistetes foram sequenciados dois clones, com 96 e 100% de similaridade. Esse Filo engloba microrganismos que ocupam ampla variedade de ambientes e são hábeis em usar aminoácidos e, por sua vez, fornecerem ácidos graxos de cadeia curta e sulfato para bactérias de degradação terminal, tais como arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (VARTOUKIAN et al., 2007). São Gram negativos, estritamente anaeróbios, bacilos ou vibrios, e alguns são móveis. O crescimento ótimo ocorre em pH por volta de 7 e algumas espécies são halofílicas. Embora a maioria das espécies sejam mesofílicas, algumas poucas são moderadamente termofílicas com temperatura ótima de 55 a 65° C. Os clones pertencentes a este Filo foram relacionados a bactérias encontradas em digestor anaeróbio tratando efluentes farmacêuticos (RIVIÈRE et al., 2009) e em reator UASB utilizado no tratamento de águas residuárias de fábrica de papel (ROEST et al., 2005). A presença desses microrganismos no presente trabalho pode ser devido aos aminoácidos disponíveis (extrato de levedura) na alimentação do reator, bem como a resistência destes a condições adversas.

Membros do Filo Fusobacteria são caracterizados como bacilos Gram negativos, obrigatoriamente anaeróbios e apresentam metabolismo quimiorganotrófico heterotrófico (BOONE et al., 2005). Esses organismos não formam endósporos e podem ser comensais ou patogênicos humanos. São diferenciados de outros bacteróides pela produção de maior quantidade de ácido *n*-butírico, e por não produzirem os ácidos isobutírico e isovalérico (BENNETT & ELEY, 1993).

Em meio enriquecido, utilizando lisina como única fonte de energia, foi verificado que o crescimento de bactérias Fusobacteria ocorreu somente se aminoácidos e extrato de levedura estiveram presentes (RUSSEL, 2005). Nesse trabalho, os clones sequenciados relacionaram com bactérias encontradas em Sistema de Circulação Natural (99% de similaridade), um biorreator de purificação de águas residuais em que apenas materiais naturais e sem produtos químicos sintéticos foram usados (NIU et al., 2006). Os organismos

obtidos no presente trabalho podem ter encontrado ambiente favorável no reator, uma vez que havia extrato de levedura na alimentação, assim, colaborando com seu crescimento.

Informações a respeito de organismos pertencentes ao Filo Aminanaerobia são escassas na literatura. Todavia, o clone seqüenciado relacionado Aminanaerobia foi encontrado em digestor anaeróbio de lodo (99% de similaridade) (RIVÉRE et al., 2009), sugerindo que o metabolismo de tal microrganismo é anaeróbio e que poderia estar participando da degradação anaeróbia de compostos orgânicos presentes no reator.

O Filo Acidobacteria (relacionado a 1 clone obtido do reator) é composto por microrganismos acidofílicos, cujo metabolismo ainda não é bem conhecido. Organismos pertencentes à Família Acidobacteriaceae foram encontrados em aquífero contaminado por óleo no qual foi verificada degradação anaeróbia de tolueno com provável redução de sulfato (WINDERL et al., 2008). Assim, sua presença no reator pode estar associada a possível disponibilidade de tolueno, como intermediário da degradação de LAS.

Dentre as amostras do copo do reator pertencentes ao Filo Proteobacteria, 10 foram relacionados à Classe Epsilonproteobacteria, sendo 5 Campylobacterales, semelhante a *Sulfuricurvum kujiense*. Quatro foram relacionadas à Classe Deltaproteobacteria, sendo três da Ordem Desulfomonales, especificamente *Geobacter* sp. (99% de similaridade) e um da Ordem Syntrophobacterales. Dois clones foram relacionados à Classe Betaproteobacteria, Ordem Rhodocyclales, especificamente *Dechloromonas* sp. (98% de similaridade) e um clone à Classe Gammaproteobacteria, Ordem Chromatiales, semelhante a *Thiovirga sulfuroxydans*.

Cinco clones semelhantes a *Sulfuricurvum kujiense* (99% de similaridade) foram seqüenciados. Essa espécie foi isolada de cavidades subterrâneas de armazenamento de petróleo bruto sob condições anaeróbias. *S. kujiense* possui morfologia de bacilo curvo (podendo ser espiral na fase exponencial de crescimento), com mobilidade por meio de flagelo. São Gram negativas, quimiolitotróficas e não formadoras de endósporo. O crescimento foi observado sob baixas concentrações de NaCl e a temperatura e pH ótimos para o crescimento são 25° C (variação entre 10 e 35° C) e 7,0 (variação de 6,0 a 8,0), respectivamente. Crescem anaeróbia e microaerobiamente pela oxidação de espécies de enxofre reduzidas, como o sulfeto, enxofre elementar, tiosulfato e hidrogênio e utilizam oxigênio molecular e nitrato como receptores de elétrons. Crescem autotroficamente em dióxido de carbono e bicarbonato e não crescem em meios com ácidos orgânicos, tais como o acetato, lactato, piruvato, succinato e formato, ou açúcares (KODAMA & WATANABE, 2004). Organismos dessa espécie são capazes de se manterem em condições adversas, uma vez que foram isolados de cavidades anaeróbias contendo petróleo bruto. Ademais, a

disponibilidade de compostos de enxofre presentes no reator pode ter favorecido o crescimento de tais células, desse modo justificando sua presença nesse trabalho.

As bactérias pertencentes a Ordem Syntrophobacterales possuem células ovais ou bacilos, são frequentemente móveis, estritamente quimiorganotróficos ou quimiolitautotróficos anaeróbios, crescem por metabolismo fermentativo ou respiratório. Muitos membros usam sulfato como aceptor de elétrons, reduzindo-o a sulfeto. Entretanto, muitas espécies não são capazes de utilizar sulfato como aceptor de elétrons, mas sim reduzir prótons (ou formiato), e então requerem a presença de organismos utilizadores de H_2 (ou utilizadores de formiato) (metanogênicos ou redutores de sulfato) como parceiros sintróficos. Os membros desta ordem crescem preferencialmente em condições neutras e espécies mesofílicas têm sido isoladas de quase todo tipo de ambiente aquático anoxigênico, incluindo habitats marinhos e água doce, como também de lodos de sistemas de tratamento de esgoto (KUEVER et al., 2005). Os clones sequenciados foram relacionados a membros da Família Syntrophaceae não cultivada, encontrada em aquífero contaminado por óleo, no qual foi verificada degradação anaeróbia de tolueno com provável redução de sulfato (WINDERL et al., 2008). Sendo assim, os microrganismos encontrados no presente trabalho poderiam estar atuando na degradação do tolueno, possível intermediário de degradação anaeróbia de LAS, bem como reduzindo sulfato ou até estabelecendo relações sintróficas com metanogênicas hidrogenotróficas.

Semelhante a *Thiovirga sulfuroxydan* (97% de similaridade) somente um clone foi sequenciado obtido. Espécies de *Thiovirga* são obrigatoriamente quimiolitautotróficas, bacilos Gram negativos e obtém energia de compostos de enxofre inorgânico reduzidos. Não formam endósporos e crescimento heterotrófico não foi observado. As células armazenam polifosfato quando cultivadas em sulfeto. *T. sulfuroxydans* foi isolado de biofilme de águas residuais microaeróbias. Suas células podem ocorrer aos pares e apresentam mobilidade por meio de um flagelo. Crescem quimiolitautotroficamente em tiosulfato, enxofre e sulfeto, como doadores de elétrons. A temperatura e pH para crescimento ótimo são 30–34° C e 7,5, respectivamente (ITO et al., 2005). Sua presença no reator pode estar associada a liberação de sulfeto, devido ao rompimento da molécula de LAS, o qual foi utilizado, provavelmente, como fonte de energia por esta espécie autotrófica.

Oito clones foram relacionados ao Filo Synergistetes, Classe Synergistia e cinco relacionados ao Filo Verrucomicrobia, Classe Verrucomicrobiae para amostra do separador de fases, cuja similaridade foi de 95%. Bactérias Verrucomicrobia são Gram negativas com morfologia de cocos ou bacilos. Os organismos são estritamente aeróbios, anaeróbios

facultativos ou estritamente anaeróbios. A fonte de carbono e energia são principalmente carboidratos como açúcares. O conhecimento do Filo Verrucomicrobia está limitado a relativamente poucas espécies que tem sido obtidas em culturas puras e caracterizadas. Contudo, tem sido verificado que tal filo é ubíquo em gama ampla de habitats terrestres e aquáticos, sendo a maioria eutrófico e também de ambientes fortemente poluídos. Além de estarem em temperaturas moderadas, podem habitar baixas temperaturas no fundo do mar e na Antártida. Ademais, um membro de Verrucomicrobia foi identificado a partir de um *hot spring* (75–95° C) (DWORKIN et al., 2006). Os clones sequenciados foram relacionados a bactérias encontradas em digestor anaeróbio de lodo (RIVIÈRE et al., 2009). Bactérias desse grupo provavelmente estavam presentes no lodo anaeróbio usado como inóculo nesse trabalho, e sua presença está relacionada a capacidade de se manterem em ambientes fortemente poluídos, além de condições extremas, mostrando-se altamente versáteis. Oliveira (2010) também encontrou membros de Verrucomicrobia em reator degradando LAS. Entretanto, tais organismos estiveram presentes somente no reator cujo material suporte utilizado foi pérolas de vidro.

Cinco clones sequenciados nesse trabalho foram relacionados ao Filo Fusobacteria, Classe Fusobacteria e um relacionado ao Filo Cyanobacteria, Classe Cyanobacteria. Esse Filo compreende bactérias fotossintéticas Gram negativas, podendo ser encontradas em grupos unicelulares ou coloniais. Embora a fotossíntese seja anoxigênica e autotrófica em todas as espécies, algumas espécies são capazes de viver anaerobiamente (fermentação) ou através de quimioheterotrofia. Todavia, são geralmente capazes somente de se manterem ou de sustentar reduzido crescimento. O clone sequenciado no presente trabalho teve relação com bacterioplankton encontrado no Lago Michigan, de características oligotróficas, cuja temperatura variou de 3,3 a 22,2° C durante cerca de um ano de amostragem (MUELLER-SPITZ et al., 2009). Ademais relacionou com bactérias encontradas recentemente em coluna de geleiras da China ocidental (99% de similaridade) (AN et al., 2010). Apesar de não estar diretamente ligado a degradação de compostos orgânicos, esse microrganismo fazia parte da comunidade microbiana presente no inóculo do presente trabalho, e sua capacidade de viver anaerobiamente, embora com crescimento reduzido, pode justificar sua presença no reator.

Os clones sequenciados referentes ao Filo Fusobacteria, assim como os obtidos em amostra da areia, relacionaram-se com bactérias encontradas em Sistema de Circulação Natural, um biorreator de purificação de águas residuais, com 99% de similaridade (NIU et al., 2006). As condições encontradas no reator favoreceram o crescimento dessas bactérias tanto no material suporte, quanto na biomassa presente no separador de fases. Ademais, os co-

substratos disponíveis na alimentação foram responsáveis pela seleção de alguns grupos, como nesse caso, devido a presença do extrato de levedura.

Como pode ser verificado, no presente trabalho a maioria dos clones obtidos em amostras da areia relacionaram ao gênero *Dechloromonas* (31%) e *Geobacter* (29%) e ao Filo Epsilonproteobacteria (12%). Contudo a presença do gênero *Azospira* também foi significativa (11%).

Para amostras provenientes do separador de fases do reator, os grupos mais abundantes foram os Filos Epsilonproteobacteria (23%), Synergistetes (19%), Fusobacteria (12%) e Verrucomicrobia (12%). Bactérias não classificadas representaram 16% do total sequenciado de amostras do separador de fases.

Bactérias relacionadas às Classes Fusobacteria, Synergistia, Epsilonproteobacteria e aos gêneros *Dechloromonas* sp. e *Geobacter* sp., foram encontradas em ambas amostras (Tabela 5.9 e Figura 5.18), indicando sua importância na degradação de LAS e sua versatilidade, uma vez que são capazes de se manterem tanto em grandes volumes de biomassa, como aderidas em material suporte, neste caso a areia. Além disso, os co-substratos presentes na alimentação, bem como os compostos do detergente em pó, podem ter favorecido tais grupos.

Figura 5.18: Porcentagem de clones relacionados às diferentes Classes da amostra do separador de fases e da areia

Tabela 5.9: Comparação entre a diversidade de clones das amostras da areia e do separador de fases do reator

Filos	Classes	Areia (%)	Separador de fases (%)
Proteobacteria	Betaproteobacteria	43	5
	Deltaproteobacteria	31	9
	Epsilonproteobacteria	13	23
	Gammaproteobacteria	1	2
Synergistetes	Synergistia	2	19
Bacteroidetes	Flavobacteria	3	0
	Sphingobacteria	1	0
Fusobacteria	Fusobacteria	1	12
Acidobacteria	Acidobacteriae	1	0
Aminanaerobia	Aminanaerobia	1	0
Firmicutes	Clostridia	2	0
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	0	12
Cyanobacteria	Cyanobacteria	0	2
Bactérias não classificadas		0	16

A diversidade da biomassa do material suporte foi ligeiramente maior que a biomassa do separador de fases, uma vez que os clones oriundos de amostra da areia relacionaram com 11 Classes diferentes, enquanto os clones da amostra do separador de fases foram relacionados a 9 clones.

Contudo, diferenças significantes foram encontradas em relação aos grupos Betaproteobacteria e Deltaproteobacteria, que predominaram nas amostras da areia; e Synergistia e Fusobacteria, que predominaram nas amostras da biomassa do copo. Além disso, a Classe Verrucomicrobiae esteve presente somente em amostras do separador de fases.

As diferenças da comunidade microbiana do material suporte e do separador de fases sugerem que as condições de tais locais favoreceram algumas espécies em detrimento de outras. A seleção dos organismos está associada a peculiaridades metabólicas de cada grupo, e, nesse caso, ocorreu provavelmente devido a capacidade de se fixar em material suporte,

competição entre os grupos, bem como a possível diferença do potencial redox de cada local amostrado.

As Figura 5.19 e 5.20 apresentam as árvores filogenéticas construídas com clones da amostra da areia e separador de fases, respectivamente. As Tabelas 5.10 e 5.11 apresentam as sequências obtidas no Genbank relacionadas aos clones proveniente da amostra do material suporte (areia) e do separador de fases, respectivamente.

Oliveira (2010) também obteve em reator anaeróbio de leito fluidificado clones relacionados aos Filos Proteobacteria (Classes Beta, Delta e Gammaproteobacteria), Bacteroidetes (Classes Sphingobacteria e Flavobacteria), Acidobacteria (Classe Acidobacteriae) e Firmicutes (Classe Clostridia), utilizando areia como material suporte na degradação de LAS. A autora também encontrou o Filo Verrucomicrobia em amostra deste material suporte. Todavia, no presente trabalho, membros deste filo foram encontrados somente em amostras do separador de fases.

Embora tenha sido encontrada grande semelhança entre os clones do trabalho de Oliveira (2010) e a composição da comunidade microbiana da amostra da areia do presente trabalho, cabe ressaltar que a proporção das classes foi significativamente diferente. Enquanto no trabalho de Oliveira (2010), as classes mais abundantes foram Sphingobacteria (40%), Betaproteobacteria (29%) e Alphaproteobacteria (9%), no presente trabalho foram encontrados membros da Classe Betaproteobacteria com maior frequência (43%), seguida de Deltaproteobacteria (31%) e Epsilonproteobacteria (14%).

Tal diferença entre as proporções de Classes encontradas em ambos os trabalhos pode ser atribuída a algumas diferenças aplicadas nos estudos, tais como: (a) inóculo proveniente de reatores diferentes, (b) co-substratos diferentes - sacarose no trabalho de Oliveira (2010) e etanol no presente - e (c) utilização de detergente em pó no atual trabalho, o qual contém outros componentes, além de LAS, que podem ter interferido tanto na remoção de LAS, quanto na seleção dos microrganismos estabelecidos no material suporte e no separador de fases.

A diversidade microbiana de ambos os trabalhos não foi significativamente diferente, sendo no presente trabalho os clones foram relacionados a 11 Classes para amostra da areia, enquanto Oliveira (2010) obteve relação com 10 Classes. A ampla diversidade de ambos os trabalhos corrobora a hipóteses da necessidade de se estabelecer um consórcio microbiano para a degradação anaeróbia de LAS.

0.1

Figura 5.19: Árvore filogenética mostrando a posição dos clones derivados das sequências do RNAr 16S relacionados ao Domínio Bacteria a partir da amostra da areia. *Methanosarcina acetivorans* foi usada como grupo externo. A taxa de substituição a cada 1.000 nucleotídeos foi de 0,1 como indicado na barra de escala.

Figura 5.20: Árvore filogenética mostrando a posição dos clones derivados das sequências do RNAr 16S relacionados ao Domínio Bacteria a partir da amostra do lodo do separador de fases do reator. *Methanosarcina acetivorans* foi usada como grupo externo. A taxa de substituição a cada 1.000 nucleotídeos foi de 0,2 como indicado na barra de escala.

Tabela 5.10: Sequências obtidas no Genbank relacionadas aos clones das amostras da areia

CLONES	BLAST	Similaridade (%)	Descrição	Referência
A7, A13, A26, A31, A38, A39, A40, A42, A43, A44, A47, A67, A78, A79, A86, A87, A88, A89, A90, A92, A93, A98, A99, A101, A102, A104, A109, A113	AY032611 CU926928	96 96	<i>Dechloromonas</i> sp. Betaproteobacteria não cultivada	Coates et al. (2001) Rivière et al. (2009)
A2, A3, A5, A25, A28, A33, A46, A50, A51, A57, A59, A61, A64, A65, A68, A71, A76, A80, A82, A91, A95, A96, A100, A105, A111	NR_028775 AY780563	99 99	<i>Geobacter thiogenes</i> <i>Geobacter</i> sp. não cultivada	De Wever et al. (2000) Duhamel & Edwards (2006)
A9, A16, A17, A32, A34, A58, A63, A72, A81, A84, A108	GU196198 AB030591	99 97	Bactéria não cultivada Epsilon proteobacterium não cultivada	Schauer-Gimenez et al. (2010) Watanabe et al. (2000)
A36, A37, A53, A54, A62, A75, A94, A97, A103, A110	GQ183420 AY823971	100 99	<i>Azospira</i> sp. não cultivada Beta proteobacterium não cultivada	Allen et al. (2010) Ginige et al. (2005)
A19, A6, A74	AF493694	96	<i>Fluviicola taffensis</i>	O'Sullivan et al. (2005)
A14	GU568713 EF407879	99 99	Bactéria não cultivada <i>Sediminibacterium salmoneum</i>	Oliveira et al. (2010) Qu & Yuan (2008)
A22	FJ192528	97	<i>Acinetobacter</i> sp. não cultivada	La Duc et al. (2009)
A23	CU918600	100	Synergistetes não cultivada	Rivière et al. (2009)
A41	DQ211504 HM124789	99 97	Fusobacteria não cultivada Bactéria não cultivada	Niu et al. (2006) Lu et al. (2010)
A45	HQ222293	96	<i>Clostridium</i> sp.	Osadolor et al. (não publ.)
A49	AY604565	99	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	Zhao et al. (2003)
A52	EU266820	98	Acidobacteriaceae não cultivada	Winderl et al. (2008)
A56	AJ133797 AF407202	99 98	<i>Desulfovibrio</i> sp. Bactéria não cultivada	Zengler et al. (1999) Alfreider et al. (2002)
A66	CU926332	99	Aminanaerobia não cultivada	Rivière et al. (2009)
A83	DQ168651	97	Desulfuromonadales	Bedard et al. (2006)
A107	CU920561	96	Synergistetes não cultivada	Rivière et al. (2009)

Tabela 5.11: Sequências obtidas no Genbank relacionadas aos clones das amostras do separador de fases do reator

CLONES	BLAST	Similaridade (%)	Descrição	Referência
C14, C27, C29, C33, C39, C48, C46	CU921042	99	Synergistetes não cultivada	Rivière et al. (2009)
C2, C26, C35 C38, C43	DQ211504	99	Fusobacteria não cultivada	Niu et al. (2006)
C24, C40, C41, C47, C53	AB080643	99	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	Kodama & Watanabe (2003)
C5, C11, C16, C36, C56	CU925564	95	Verrucomicrobia não cultivada	Rivière et al. (2009)
C12, C49, C50	AY780563	99	<i>Geobacter</i> sp. não cultivada	Duhamel & Edwards (2006)
C37, C52, C54	GU196215	98	Bactéria não cultivada	Tang et al. (2007)
C22, C44	AB030590	99	Epsilonproteobacterium não cultivada	Watanabe et al. (2000)
C4, C7	FJ525533	98	<i>Dechloromonas</i> sp. não cultivada	Li et al. (2010)
C1	AB476674	97	Chromatiales não cultivada	Yuhana et al. (2009)
	AB118236	97	<i>Thiovirga sulfuroxydans</i>	Ito et al. (2004)
C13	GU246950	99	Bactéria não cultivada	An et al. (2010)
C23	AB558582	99	<i>Synergistetes bacterium</i>	Sekiguchi & Qiu (2010)

Tanto para os clones obtidos a partir de amostra da areia, quanto do separador de fases, foram elaboradas as respectivas curvas de rarefação, que estão apresentadas na Figura 5.21 e Figura 5.22.

Figura 5.21: Curva de rarefação dos clones obtidos de amostras da areia, com matriz de distância evolutiva de 0,00 e 0,05

Figura 5.22: Curva de rarefação dos clones obtidos de amostras do lodo do separador de fases do reator, com matriz de distância evolutiva de 0,00 e 0,04

5.10. Técnica dos Tubos Múltiplos

Após o período de incubação (30 dias a 30° C), os frascos, em quintuplicata para diluições de 10^{-1} a 10^{-19} , foram analisados para verificar o crescimento dos seguintes grupos microbianos: (1) bactérias anaeróbias totais, (2) arqueias metanogênicas e (3) bactérias redutoras de sulfato (BRS).

Na Etapa VI, a quantificação de bactérias da amostra do biofilme da areia pelo método NMP revelou que as arqueias metanogênicas representaram $3,32 \times 10^4$ NMP/g STV, enquanto para amostra do separador de fases equivaleram a $3,32 \times 10^5$ NMP/g STV. Em ambas amostras, nenhuma bactéria redutora de sulfato foi encontrada nessa etapa de operação.

Na Etapa VII, verificou-se que para amostra da areia as arqueias metanogênicas representaram $2,34 \times 10^6$ NMP/g STV e para BRS o valor foi $3,91 \times 10^3$ NMP/g STV.

Para a amostra do separador de fases as arqueias metanogênicas equivaleram a $2,73 \times 10^7$ NMP/g STV, enquanto as BRS a $7,81 \times 10^3$ NMP/g STV.

Os maiores valores encontrados na amostra do separador de fases, em relação a amostra da areia, para todos os grupos em ambas as etapas, deveu-se, provavelmente, ao maior volume de biomassa presente nesse local.

A presença de BRS somente na última etapa de operação do reator (com presença de detergente em pó) indica que estas estavam presentes nas etapas anteriores. Todavia, foram muito mais ativas na presença de LAS. Provavelmente, a presença de sulfato, proveniente do rompimento da molécula de LAS, favoreceu o crescimento dessas células na última etapa operacional.

Oliveira (2010) realizou quantificação dos microrganismos pelo método de NMP ao final da operação do reator, cuja concentração de LAS foi de $45,8 \pm 5,4$ mg/L. A quantificação revelou que as arqueias metanogênicas representaram $1,93 \times 10^4$ NMP/g STV. Para bactérias redutoras de sulfato o valor foi superior ao do presente trabalho, equivalendo a $3,75 \times 10^9$ NMP/g STV.

Para o cálculo de bactérias anaeróbias totais, no presente trabalho, tanto para amostra da areia quanto do separador de fases, a quantificação mostrou que os valores foram superiores a $3,13 \times 10^{22}$ NMP/g STV em ambas as etapas. No trabalho de Oliveira (Op. cit.), as bactérias anaeróbias totais foram menos frequentes, e equivaleram a $3,98 \times 10^{10}$ NMP/g STV.

As diferenças encontradas entre os dois trabalhos, podem ser justificadas tanto pelas diferentes origens do inóculo utilizado nos reatores, quanto pela presença dos compostos do detergente em pó, que favoreceram alguns grupos, em detrimento de outros.

A diferença entre os três grupos avaliados no presente trabalho pode ser visualizada na Figura 5.23.

Figura 5.23: Quantificação dos grupos microbianos referentes a amostras do biofilme da areia e da biomassa do separador de fases do reator, para as etapas VI e VII

6. CONCLUSÕES

- O reator anaeróbio de leito fluidificado foi eficiente na remoção de detergente em pó, com média de 42% de degradação de LAS. Valores de 70% de remoção de LAS foram verificados no início da Etapa VII, e foram atribuídos à biodegradação e adsorção do surfactante na biomassa. Assim, mostrando-se adequado para esta finalidade. Ademais, a remoção de DQO foi eficiente, não sofrendo alterações após a adição de detergente em pó.
- A técnica de tubos múltiplos revelou maior presença de arqueias metanogênicas na Etapa VII. BRS foram verificadas somente nas amostras da Etapa VII de operação, tanto para amostra do biofilme da areia, quanto para a biomassa do separador de fases do reator, sugerindo que estas são muito mais ativas na presença de LAS.
- Por meio das análises das sequências do fragmento do gene RNAr 16S foi possível constatar grande diversidade microbiana com organismos pertencentes aos Filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Synergistetes e Firmicutes, para amostras da areia. Assim inferindo sobre a necessidade de consórcio microbiano para degradação do surfactante LAS.
- Para amostras do separador de fases do reator, filos como Betaproteobacteria e Synergistetes também foram encontrados, contudo alguns grupos diferenciaram-se das amostras do material suporte, tais como Verrucomicrobia e Cyanobacteria.
- As espécies mais frequente em amostras da areia foram *Geobacter* sp., *Dechloromonas* sp., *Azospira* sp. e membros de Epsilonproteobacteria. Para amostras da biomassa do separador de fases as espécies mais abundantes foram *Sulfuricurvum kujiense* bem como outros membros de Epsilonproteobacteria, *Geobacter* sp., além de membros de Synergistetes, Fusobacteria e Verrucomicrobia.
- Diferenças significantes entre as duas amostras ocorreram em relação as Classes Delta e Betaproteobacteria, que predominaram em amostras da areia, enquanto Synergistia e Fusobacteria predominaram em amostras do separador de fases, sendo que Verrucomicrobia só foi encontrada nessa última amostra.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base na experiência adquirida durante este trabalho, sugere-se:

- Estudar a técnica de espectrometria de massa para determinação dos intermediários da degradação anaeróbia do LAS e, assim, tentar estabelecer possível rota metabólica.
- Estudar a remoção de LAS utilizando a mesma configuração de reator e as mesmas condições aplicadas no presente trabalho, todavia com substituição do co-substrato etanol por sacarose.
- Realizar DGGE para amostras do reator referentes a etapa sem LAS, com LAS e amostras de NMP.
- Identificação filogenética (RNAr 16S) para as diluições positivas da quantificação por tubos múltiplos (NMP) para BRS.
- Realizar PCR, clonagem e sequenciamento das amostras de biomassa do reator, utilizando *primers* para BRS.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIN, E.L.C; BARROS, A.R.; DAMIANOVIC, M.R.Z.; SILVA, E.L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded Clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, p.1216-1223, 2009.

AN, L.Z.; CHEN, Y.; XIANG, S.-R.; SHANG, T.-C.; TIAN, L.-D. Differences in community composition of bacteria in four glaciers in western China. *Biogeosciences*, 7, 1937–1952, 2010.

ALFREIDER, A; VOGT, C.; BABEL, W. Microbial diversity in an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Syst Appl Microbiol*, 25, 2, p.232-40, 2002.

ARAÚJO, J.C. Acompanhamento da evolução do biofilme e caracterização química e biológica em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário sintético. *Dissertação de mestrado*, EESC, USP, São Carlos, 1994.

APHA/AWWA/Water Environment Federation. *Standard Methods for the Examination of water and wastewater*. 20th ed. Washington, DC, USA, 2005.

BAE, H.; RASH, B.A.; RAINEY, F.A.; NOBRE, M.F.; TIAGO, I.; COSTA, M.S.; MOE, W.M. Description of *Azospira restricta* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, p. 1521–1526, 2007

BEDARD, D.L.; BAILEY, J.J.; REISS, B.L.; JERZAK, G.V.S. Development and Characterization of Stable Sediment-Free Anaerobic Bacterial Enrichment Cultures That Dechlorinate Aroclor 1260. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4, p. 2460–2470, 2006.

BENNETT, K.W.; ELEY, A. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases *J. Med. Microbiol.*, 39, p. 246-254, 1993.

BERNA, J. L.; COSSANI, G.; HAGER, C. D.; REHMAN, N.; LOPEZ, L.; SCHOWONEK, D.; STEBER, J.; TAEGER, K.; WIND, T. Anaerobic biodegradation of surfactants - scientific review. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 44, n. 6, p. 312+, 2007.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M.; BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Volume 2, The proteobacteria. 1388 p., 2005.

BORSATO, D.; GALÃO, O.F.; MOREIRA, I. Detergentes naturais e sintéticos. Londrina. Editora UEL, 131p. 1999.

CAMPOS, J. R. ; PEREIRA, J. A. R. . Reator Anaeróbio de Leito Expandido/Fluidificado. In: Membros do PROSAB - Tema 2. (Org.). (CAMPOS, J.R.) Tratamento de Esgotos Sanitários por Processos Anaeróbios e Disposição Controlada no Solo. I ed. Rio de Janeiro - RJ: ABES, v. I, p. 199-219, 1999.

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

COATES, J.D.; MICHAELIDOU, U.; BRUCE, R.A.; O'CONNOR, S.M.; CRESPI, J.N.; ACHENBACH, L.A. Ubiquity and Diversity of Dissimilatory (Per)chlorate-Reducing Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12), p. 5234–5241, 1999.

COATES, J.D.; CHAKRABORTY, R.; LACK, J.G.; O'CONNOR, S.M.; COLE, K.A.; BENDER, K.S.; ACHENBACH, L.A. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature*, 411, 2001.

CRESSON, R., DABERT, P., BERNET, N. Microbiology and performance of a methanogenic biofilm reactor during the start-up period. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 863-876, 2009.

DAMIANO, E.S.G., SILVA, E.L. Tratamento da vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidificado. *Anais do IV Seminário do Projeto Temático*, EESC, USP, São Carlos, p. 235-244, 2005.

DENGER, K.; COOK, A.M. Linear alkylbenzene sulphonate (LAS) bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulphur. *Journal of Applied Microbiology*, 86, P.165-168, 1999.

DE WEVER, H.; COLE, J. R.; FETTIG, M.R.; HOGAN, D. A.; TIEDJE, J.M. Reductive Dehalogenation of Trichloroacetic Acid by *Trichlorobacter thiogenes* gen. nov., sp. nov. *APPL.ENVIRON.MICROBIOL.*, 66, 6, p. 2297–2301, 2000.

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

DUARTE, I.C.S. Caracterização Microbiológica da Remoção e Degradação de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) em Reatores Anaeróbios com Biofilme e Células Planctônicas. *Tese de doutorado*, EESC, USP, São Carlos, 2006.

DUARTE, I.C.S., OLIVEIRA, L.L., VARESCHE, M.B.A. Caracterização microbiológica da degradação de alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbio de leito fixo. *Anais do I Seminário do projeto temático – Desenvolvimento de sistemas combinados de tratamento de águas residuárias visando a remoção de poluentes e a reuperação de energia e de produtos dos ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre*. EESC, USP, São Carlos, p. 395-404, 2006.

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. *J. Braz.Chem. Soc.*, 117, 7, p. 1360-1367, 2006.

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*, 19, p. 375-385, 2008.

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

DUHAMEL, M; EDWARDS, E.A. Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by Dehalococcoides. *FEMS Microbiol Ecol* 58, p. 538–549, 2006.

DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. The Prokariotes. 2006.

EICHHORN, P. AND KNEPPER, T.P. β -Unsaturated sulfophenylcarboxylate intermediates detected during aerobic degradation of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) surfactant: direct evidence for oxygenation followed by β -oxidations by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem*, 21, p. 1-8, 2002.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA, 1996.

FAN, L.S. Gas-liquid-solid fluidization engineering. BRENNER, N. (Ed.). *Butterworths series in Chemical Engineering*, 1989.

GARCÍA, M.T., CAMPOS, E. J., RIBOSA, I., LATORRE, A., SÁNCHEZ-LEAL, J. Anaerobic digestion of linear alkylbenzene sulphonates: biodegradation kinetics and metabolite analysis. *Chemosphere* 60, p.1636-1643, 2005.

GARRITY, G. M. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M.; BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Volume 2, The proteobacteria. 1388 p., 2005.

GINIGE, M.P.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L. Investigation of an Acetate-Fed Denitrifying Microbial Community by Stable Isotope Probing, Full-Cycle rRNA Analysis, and Fluorescent In Situ Hybridization-Microautoradiography *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 12, p. 8683–8691, 2005.

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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, p. 5488–5491, 2000.

HAAGENSEN, F., MOGENSEN, A.S., ANGELIDAKI, I., AHRING, B.K., Anaerobic treatment of sludge: focusing on reduction of LAS concentration in sludge. *Water Science and Technology* 46, 159–165, 2002.

HAAGENSEN, M.; DOBSON, C.M.; DENEER, H.; ZIOLA, B. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 3, p. 236-241, 2008.

HAIGH, S. D.; *Sci. Total Environ.*, 185, 161.1996.

HARADA, M.; *Household & Cosméticos*, 4, 18, 2003.

HERA. Human and environmental risk assessment on ingredients of European household cleaning products-linear alkylbenzene sulphonate, LAS – Linear Alkylbenzene sulphonate. 2007.

HERA. Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products - Linear Alkylbenzene Sulphonate, LAS. 2009.

HOLMES, D.E.; O'NEIL, R.A.; VRIONIS, H.A.; N'GUESSAN, L.A.; ORTIZ-BERNAD, I.; LARRAHONDO, M.J.; ADAMS, L.A. WARD, J.A.; NICOLL, J.S.; NEVIN, K.P.; CHAVAN, M.A.; JOHNSON, J.P.; LONG, P.E.; LOVLEY, D.R. Subsurface clade of Geobacteraceae that predominates in a diversity of Fe(III)-reducing subsurface environments. *The ISME Journal*, 1, p. 663–677, 2007.

HOLT, J.G. In: BERGEY, D.H.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HWANG, C.; WU, W.; GENTRY, T.J.; CARLEY, J.; CORBIN, G.A.; CARROLL, S.L.; WATSON, D.B.; JARDINE, P.M.; ZHOU, J.; CRIDDLE, C.S.; FIELDS, M.W. Bacterial community succession during *in situ* uranium bioremediation: spatial similarities along controlled flow paths. *The ISME Journal*, 3, p. 47–64, 2009.

ITO, T.; SUGITA, K.; YUMOTO, I; NODASAKA, Y.; OKABE, S. *Thiovirga sulfuroxydans* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, p. 1059–1064, 2005.

IZA, J. Fluidized Bed Reactor for anaerobic wastewater treatment. *Water Science Technology*, 24, 8, p. 109-132, 1991

JENSEN, J., SMITH, R.S. KROGH, P.H., VERTEEG, D.G., TEMARA, A. European risk assessment of LAS in agricultural soil revisited: species sensitivity distribution and risk estimates. *Chemosphere* 69, p. 880-892, 2007.

JHONSON, S.J. Microbial degradation of linear alkylbenzene cable oil in soil and aqueous culture under aerobic and anaerobic conditions. *Tese de Doutorado*, Universidade de Edinburgo, Escócia, 2003.

KARSA, D.R., BAILEY, R.M., SHELMERDINE, B., MCCANN, S.A., “Overview: A decade of change in the surfactant industry”, In: *Industrial Applications of Surfactants IV*,

KARSA, D.R., ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.

KODAMA, Y. WATANABE, K. Isolation and Characterization of a Sulfur-Oxidizing Chemolithotroph Growing on Crude Oil under Anaerobic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1, p. 107–112, 2003.

KODAMA, Y. WATANABE, K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground

crude-oil storage cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2297–2300, 2004.

KUEVER, J.; RAINEY, F.A.; WIDDEL, F. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M.; BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Volume 2, The proteobacteria. 1388 p., 2005.

KUNII, D.; LEVENSPIEL, O. *Fluidization engineering*. 2. ed. Washington: Butterworth-Heinemann, 492 p. 1991.

LA DUC, M.T.; OSMAN, S.; VAISHAMPAYAN, P.; PICENO, Y.; ANDERSEN, G.; SPRY, J.A.; VENKATESWARAN, K. Comprehensive Census of Bacteria in Clean Rooms by Using DNA Microarray and Cloning Methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 20, p. 6559–6567, 2009.

LANE, D. J. 16s/23s rRNA sequencing. In: *Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Academic, Chichester, UK, p. 115–175, 1991.

LAZARO C. Z., HIRASAWA J. S., VARESCHE M. B. A. AND 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.

LI, X.; UPADHYAYA, G.; YUEN, W.; BROWN, J.; MORGENROTH, E.; RASKIN, L. Changes in the Structure and Function of Microbial Communities in Drinking Water Treatment Bioreactors upon Addition of Phosphorus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 22, p. 7473–7481, 2010.

LOBNER, T.; TORANG, L.; BATSTONE, D.J.; SCHMIDT, J.E.; ANGELIDAKI, I. Effects of process stability on anaerobic degradation of LAS on UASB reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, p. 759–765, 2005.

MAINTINGUER, S.I. Degradação anaeróbia de fenol sob diferentes condições nutricionais. *Dissertação de Mestrado*, EESC, USP, São Carlos, 2004.

MARCOMINI, A.; CAPEL, P. D.; LICHTENSTEIGER, T.; BRUNNER, P. H.; GIGER, W. Behavior of aromatic surfactants and pcbs in sludge-treated soil and landfills. *Journal of Environmental Quality*, 18, 4, p. 523–528, 1989.

MANOUSAKI, E.; PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, D. Degradation of sodium dodecylbenzene sulfonate in water by ultrasonic irradiation. *Water research*, 38, p. 3751–3759, 2004.

MATTHIJS, E.; DE HENAU, H. Determination of linear alkylbenzene sulfonates in aqueous samples, sediments, sludges and soil using HPLC. *Tenside Surfactants Detergents*, 42, p. 193–198, 1987.

MAUFFRET, A.; TEMARA, A.; BLASCO, J. Exposure of the marine deposit feeder *Hydrobia ulvae* to sediment spiked with LAS congeners. *Water Research*, 44, p. 2831–2840, 2010.

- MOGENSEN, A.S.; HAAGENSEN, F.; AIIRING, K. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, p. 706-711, 2003.
- MOSCHE, M., MEYER, U. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic digestion: influence of exposure time. *Water Research*, 36, 3253-3260, 2002.
- MUELLER-SPITZ, S.R.; GOETZ, G.W.; MCLELLAN, S.L. Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan. *Microbiol, Ecol.*, 67, p. 511–522, 2009.
- MUNGRAY, A.K.; KUMAR, P. Degradation of anionic surfactants during drying of UABSR sludges on sand drying beds. *Journal of Environmental Management*, 88, p. 995-1002, 2008.
- NEVIN, K. P.; HOLMES, D.E.; WOODARD, T.L.; COVALLA, S.F.; LOVLEY, D.R.; Reclassification of *Trichlorobacter thiogenes* as *Geobacter thiogenes* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, p. 463–466, 2007.
- NICOLELLA, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M; HEIJNEN, J.J.. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology* 80, 1–33, 2000
- NIU, S.Q.; FUKUSHIMA, J.; JIANG, Y.; ISHIKAWA, Y.; UEDA, T.; MATSUMOTO, S. Analysis of bacterial community structure in the natural circulation system wastewater bioreactor by using a 16S rRNA gene clone library. *Microbiol Immunol.*, 50, 12, p. 937-50, 2006.
- OKADA, D.Y., ESTEVES, A.S., HIRASAWA, J.S., ADORNO, M.A.T., DUARTE, I.C.S., VARESCHE, M.B.A. Degradação de alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbico de manta de lodo e fluxo ascendente. *VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM*, 2009.
- OLIVEIRA, L.L. Influência do material suporte na degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reator anaeróbico. *Dissertação de Mestrado*, EESC, USP, São Carlos, 2006.
- 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* 90, p. 1261-1268, 2009.
- OLIVEIRA, L.L. Remoção de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado. *Tese de doutorado*, EESC, USP, São Carlos, 2010.
- 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*, 101, p. 5112–5122, 2010.
- O’SULLIVAN, L.A.; RINNA, J.; HUMPHREYS, G.; WEIGHTMAN, A.J.; FRY, J.C. *Fluviicola taffensis* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater bacterium of the family

Cryomorphaceae in the phylum 'Bacteroidetes'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, p. 2189–2194, 2005.

PENTEADO J.C.P., SEOUD, O.A.S., CARVALHO, L.R.F. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Quim. Nova*, 29, 5, p.1038-1046, 2006.

POBEHEIM, H.; MUNK, B.; MÜLLER, H.; BERG, G.; GUEBITZ, G.M. Characterization of an anaerobic population digesting a model substrate for maize in the presence of trace metals. *Chemosphere*, 80, 8, p. 829-836, 2010.

PRATS, D., RUIZ, F., VAZQUEZ, B., RODRIGUEZ-PASTOR, M. Removal of anionic and nonionic surfactants in a wastewater treatment plant with anaerobic digestion. A comparative study. *Water Research*, 31, 8, p. 1925-1930, 1997.

QU, J.; YUAN, H. *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum *Bacteroidetes* isolated from sediment of a eutrophic reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, p. 2191–2194, 2008.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C. CONVERSE, L.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*. 58, 106-111, 1986.

RIVIÈRE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBAACH, J.; LI, T.; CAMACHO, P.; SGHIR, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME Journal*, 3, p. 700–714, 2009.

ROEST, K.; HEILIG, H.G.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M.; STAMS, A.J.; AKKERMANS, A.D.; Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater, 28, 2, p. 175-85, 2005.

RUSSELL, J.B. Enrichment of fusobacteria from the rumen that can utilize lysine as an energy source for growth. *Anaerobe* 11, p. 177–184, 2005.

SACHDEV, D.; NEMA, P.; DHAKEPHALKAR, P.; ZINJARDE, S.; CHOPADE, B. Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of *Acinetobacter* community from the rhizosphere of wheat. *Microbiological Research*, 165, p. 627 -638, 2010.

SÁEZ, M.; GOMES-PARRA, A.; GONZALEZ-MAZO, E. *Frezenius J. Anal. Chem.* 371, 486, 2001.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3 rd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANZ, J.L.; CULUBRET, E.; FERRER, J. DE; MORENO, A.; BERNA, J.L. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Biodegradation*, 14, p. 57-64, 2003.

SCHEIBEL, J.J. The Evolution of Anionic Surfactant Technology to Meet the Requirements of the Laundry Detergent Industry. *Journal of Surfactants and Detergents*, 7, 4, p. 319-328, 2004.

TAN, Z.; REINHOLD-HUREK, B. *Dechlorosoma suillum* Achenbach et al. 2001 is a later subjective synonym of *Azospira oryzae* Reinhold-Hurek and Hurek 2000. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, p. 1139–1142, 2003.

TANG, Y.; SHIGEMATSU, T.; MORIMURA, S.; KIDA, K. Effect of dilution rate on the microbial structure of a mesophilic butyrate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75, p.451–465, 2007.

TORRES, P. Desempenho de um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação. *Dissertação de Mestrado*, EESC, USP, São Carlos, 1992.

VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZZOLER, R.F.; FORESTI, E. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, p. 534-538, 1997.

VARTOUKIAN S.R.; PALMER, R.M.; WADE, W.G. The division ‘Synergistes’. *Anaerobe*, 13, p. 99-106, 2007.

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

WATANABE, K.; WATANABE, K.; KODAMA, Y.; SYUTSUBO, K.; HARAYAMA, S. Molecular Characterization of Bacterial Populations in Petroleum-Contaminated Groundwater Discharged from Underground Crude Oil Storage Cavities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 11, p. 4803–4809, 2000.

WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Operation of Municipal Wastewater Treatment Plants: Manual of Practice 11*, Ed. McGraw-Hill Professional, 1296 p., 2008.

WINDERL, C.; ANNESER, B.; GRIEBLER, C.; MECKENSTOCK, R.U.; LUEDERS, T. Depth-Resolved Quantification of Anaerobic Toluene Degraders and Aquifer Microbial Community Patterns in Distinct Redox Zones of a Tar Oil Contaminant Plume. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3, p. 792–801, 2008.

ZENGLER, K.; RICHNOW, H.H.; ROSSELLÓ-MORA, R.; MICHAELIS, W.; WIDDEL, F. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 401, 1999.

ZHANG, C.; BENNETT, G.N. Biodegradation of xenobiotics by anaerobia bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, p. 600-618, 2005.

ZHAO, J.; SPAIN, J. HAWARI, J. Phylogenetic and metabolic diversity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)-transforming bacteria in strictly anaerobic mixed cultures enriched on RDX as nitrogen source. *Microbiology Ecology*, 46, p.189-196, 2003.