

USP

Campus de São Carlos

**Degradação Anaeróbia de Tolueno em
Reatores em Batelada.**

Edmar Delegá da Silva

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Bernadete A. Varesche Silva

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 28 / 04 / 04

Ass.: Leandro Coruoli

DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE TOLUENO EM REATORES EM BATELADA.

Biol. Edmar Delegá da Silva

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Civil-área: Hidráulica e Saneamento.

DEDALUS - Acervo - EESC



31100047281

Orientadora: Profª Drª Maria Bernadete
Amâncio Varesche Silva

São Carlos, SP

2004



Class. TESE-EESC ✓
Cott. 4794
Tombo T119/04
Sysno 1375046

DO DO 85

Leandro Cordeiro

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

S586d Silva, Edmar Delegá da
Degradação anaeróbia de tolueno em reatores em
batelada / Edmar Delegá da Silva. -- São Carlos, 2004.

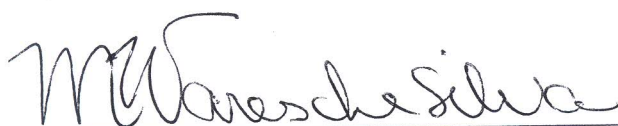
Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de
São Carlos-Universidade de São Paulo, 2004.
Área : Hidráulica e Saneamento.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Amâncio
Varesche Silva.

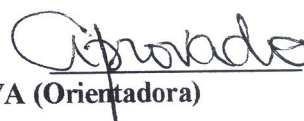
1. Biodegradação. 2. Tolueno. 3. Bactérias
redutoras de sulfato. 4. Biologia molecular.
5. Reatores em batelada. 6. Metanogênese I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

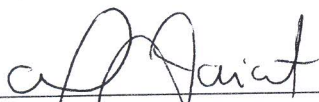
Candidato: Licenciado **EDMAR DELEGÁ DA SILVA**

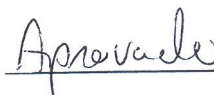
Dissertação defendida e julgada em 13-02-2004 perante a Comissão Julgadora:





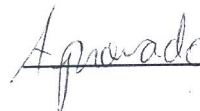
Prof. Dra. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)



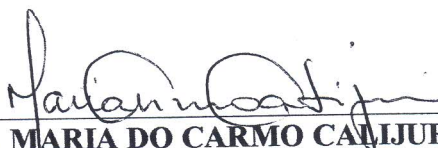


Prof. Dr. **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)





Prof. Dr. **ARY FERNANDES JÚNIOR**
(UNESP/Campus de Botucatu)



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

*Dedico este trabalho à minha mãe (Cleonice),
por ser essa pessoa maravilhosa e ter me
apoiado como ninguém para que eu chegasse
onde cheguei.*

Agradecimentos

A Deus, pela vida e por estar ao meu lado nos momentos de solidão e de fraqueza.

À professora Dr^a Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva pela orientação.

Ao CNPq pela bolsa concedida, sem a qual não poderia realizar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo pela oportunidade de avançar em meus estudos e formação.

Às técnicas (e tias) Janja e Beth pelo imensurável empenho na compreensão dos dados, aplicação das técnicas cromatográficas e apoio nos momentos em que pensei estar tudo perdido.

Ao amigo Éliton e seus pais (Dorival e Cristina) por me apoiarem em minha ida para São Carlos.

Ao amigo Evandro, com quem tive o prazer de dividir o mesmo teto, agradeço pelo apoio, pelos ensinamentos e discussões que tanto me fizeram crescer.

Ao amigo Luis com quem tive a oportunidade de dividir trabalhos e apresentações memoráveis, pela amizade, pelas horas de sabedoria (e de asneiras) nos intervalos do tão precioso café; e a sua maravilhosa família (Carol e Heleninha).

À amiga Flávia por ser essa pessoa encantada e radiante que tanto me ajudou na lida do laboratório e na vida fora dele. Agradeço, também, à sua maravilhosa família pelo apoio.

Aos companheiros de café, Betão, Ari, Arnaldo, Neison (Nelson ou Chabila), Fernandão e Rogers, obrigado pelos ensinamentos na área da engenharia e pelas besteiras que tanto serviram para a descontração de todos.

À amiga Mércia pela amizade e incentivo nos momentos difíceis. E pelas festas também. Isso vale para toda a sua república, Dirlane e Luana.

À Dr^a Isabel (ou simplesmente, amiga Bel) pelo imenso apoio nas técnicas de Biologia Molecular, pela paciência e por sempre me encorajar nos piores momentos.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Processos Anaeróbios. Obrigado por terem feito dos meus dias em São Carlos... dias melhores!

Ao meu irmão Wilson e sua esposa Valéria por sempre me acolherem com tanto carinho. E ao recém chegado Felipe, meu sobrinho.

E, por último... à Fernanda, pelo companheirismo, apoio, carinho e por ser esse anjo que veio me trazer muita paz e amor. E à sua maravilhosa família (Lucimar e Flavinha) por me acolherem tão carinhosamente.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4.1. Tolueno	4
4.1.1. Histórico	4
4.1.2. Propriedades	4
4.1.3. Efeito tóxico	5
4.1.4. Contaminante ambiental	5
4.1.5. Biodegradabilidade	6
4.2. Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)	17
4.3. Aplicação de Técnicas de Biologia Molecular	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1. Reatores	21
5.2. Inóculo	23
5.3. Meio de Cultura	24
5.3.1. Preparação das soluções estoques	24
5.3.2. Solução de Tolueno	27
5.4. Ensaio de Enriquecimento	27
5.5. Ensaio de Estabilização do Tolueno no meio BRS	28
5.6. Ensaio de degradação	29
5.7. Exames Microbiológicos	32
5.8. Procedimentos para Análises Físico-Químicas	32
5.9. Sólidos voláteis totais	32
5.10. Procedimentos para Análises Cromatográficas	33
5.11. Curva de calibração de tolueno	33
5.12. Técnicas de Biologia Molecular	34
5.12.1. Extração dos Ácidos Nucléicos	34
5.12.2. Amplificação do DNA pela Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	35
5.12.3. Eletroforese em Gel de Agarose.	36
5.12.4. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1. Ensaio de Enriquecimento	39
6.2. Quantificação do tolueno	44
6.3. Avaliação da Degradação Anaeróbia do Tolueno	47
6.4. Análise da diversidade microbiana presente nos reatores em batelada.	72
7. CONCLUSÕES	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
Anexos	84

Lista de Figuras

Figura 1. Reator em batelada usado nos ensaios de degradação de tolueno.	22
Figura 2. Vista superior da incubadora com agitação e temperatura controladas, contendo seis reatores durante ensaio de degradação.	23
Figura 3. Variação temporal de sulfato no ensaio de enriquecimento nos reatores em batelada.	40
Figura 4. Variação temporal de metano no ensaio de enriquecimento nos reatores em batelada.	40
Figura 5. Microscopia ótica de contraste de fase e fluorescência de morfologias observadas no ensaio de enriquecimento com lactato, acetato e sulfato: (a) cocos, bacilos e filamentos; (b) estafilococos; (c) <i>Methanosarcina</i> sp.; (d) células dispersas; (e) cocos e (f) bacilos fluorescentes.	41
Figura 6. Estabilização do tolueno nas fases líquida e gasosa em meio BRS em reator em batelada.	44
Figura 7. Concentração do tolueno em função do tempo no <i>headspace</i> e no líquido do reator em batelada alimentado com 2,0mg/L de Tolueno na ausência de Sulfato.	45
Figura 8. Variação temporal de sulfato em reatores alimentados com tolueno.	48
Figura 9. Variação temporal de metano nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato.	48
Figura 10. Microscopia ótica de contraste de fase e fluorescência de morfologias observadas no ensaio de degradação: (a) cocos e bacilos; (b) bacilos com extremidades arredondadas; (c) <i>Methanosarcina</i> sp. e (d) bacilos fluorescentes.	51
Figura 11. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada na ausência de sulfato.	54
Figura 12. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada na ausência de sulfato.	55
Figura 13. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada na presença de sulfato.	56
Figura 14. Variação temporal de sulfato nos reatores em batelada alimentados com tolueno.	57
Figura 15. Variação temporal de metano nos reatores em batelada alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato.	57
Figura 16. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada alimentados com sulfato.	60
Figura 17. Variação temporal de sulfato nos reatores em batelada alimentados com tolueno.	61
Figura 18. Variação temporal de metano nos reatores em batelada alimentados com tolueno e sulfato.	61
Figura 19. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada mantidos em condições metanogênicas.	63
Figura 20. Variação temporal de metano nos reatores em batelada alimentados com tolueno mantidos em condições sulfetogênicas.	63

Figura 21. Variação temporal tolueno no par de reatores que apresentaram problema no momento da inoculação. _____	67
Figura 22. Variação temporal de sulfato nos reatores em batelada com tolueno e sem tolueno. _____	68
Figura 23. Variação temporal de metano nos reatores em batelada com tolueno e sem tolueno. _____	68
Figura 24. Gel de <i>DGGE</i> das amostras submetidas aos <i>primers</i> do domínio <i>Bacteria</i> : _____	73
Figura 25. Gel de <i>DGGE</i> das amostras submetidas aos <i>primers</i> do domínio <i>Archaea</i> : _____	74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Uso dos doadores de elétrons após 15 dias pela Linhagem PRTOL1 _____	12
Tabela 2. Crescimento anaeróbico das linhagens <i>o</i> -XyS1 e <i>m</i> -XyS1 com compostos aromáticos e não aromáticos. _____	15
Tabela 3. Composição do esgoto sintético utilizado na degradação de BTEX em RHALF nas condições metanogênicas, sulfetogênicas e desnitrificantes. _____	16
Tabela 4. Composição do meio de cultura e soluções estoque. _____	24
Tabela 5. Composição das soluções estoques. _____	26
Tabela 6. Composição nutricional do reator em batelada no ensaio de enriquecimento. _____	27
Tabela 7. Concentrações de tolueno e de sulfato nos reatores da primeira etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas. _____	30
Tabela 8. Concentrações de tolueno e de sulfato nos reatores da segunda etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas. _____	31
Tabela 9. Concentrações de tolueno e de sulfato nos reatores da terceira etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas. _____	31
Tabela 10. Diversidade morfológica observada no ensaio de enriquecimento. _____	42
Tabela 11. Resultados de Sólidos Totais Voláteis do lodo inicial e após ensaio de enriquecimento. _____	43
Tabela 12. Valores de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência de amostras do ensaio de enriquecimento. _____	43
Tabela 13. Concentrações iniciais de tolueno no líquido e <i>headspace</i> , de sulfato e metano acumulado em função do tempo. _____	45
Tabela 14. Testes de quantificação do tolueno em meio BRS. _____	47
Tabela 15. Concentrações (mg/L) de ácidos orgânicos nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato. _____	49
Tabela 16. Valores de Sólidos Totais Voláteis dos reatores após ensaio de degradação. _____	50
Tabela 17. Diversidade morfológica observada nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato. _____	52
Tabela 18. Valores iniciais de tolueno e de sulfato, valores máximos de percentual de metano acumulado. _____	53
Tabela 19. Diversidade morfológica observada nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato. _____	58
Tabela 20. Concentração de ácidos orgânicos nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato. _____	58
Tabela 21. Concentração de ácidos orgânicos nos reatores sulfetogênicos. _____	65

Tabela 22. Concentração de ácidos orgânicos nos reatores metanogênicos. _____	66
Tabela 23. Diversidade morfológica observada nos reatores alimentados com tolueno na ausência de sulfato. _____	70
Tabela 24. Diversidade morfológica observada nos reatores alimentados com tolueno na presença de sulfato. _____	71

RESUMO

O presente trabalho avaliou a degradação anaeróbia de tolueno por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), utilizando como inóculo lodo anaeróbio proveniente de reator UASB. Os ensaios foram realizados com reatores em batelada de 2300mL contendo meio de cultura específico para o crescimento de BRS. No ensaio de enriquecimento, com lactato de sódio (2230mg/L) e acetato de sódio (670mg/L) na ausência de tolueno, ocorreu consumo total de sulfato (aproximadamente 1070mg/L) em 192 horas e percentual de metano de 31% em 72 horas. A degradação do tolueno foi realizada em reatores sulfetogênicos e metanogênicos. Nos reatores sulfetogênicos alimentados com 2,1mg/L e 7,7mg/L houve degradação total do tolueno em 264 e 792 horas, respectivamente. Nesses reatores foi observado consumo total de sulfato e percentual de metano de aproximadamente 20,9%. Nos reatores metanogênicos a degradação do tolueno foi de, no máximo, 53%, e percentual de metano de 27,3% em 1032 horas. Nas condições sulfetogênicas, a degradação do tolueno foi mais rápida se comparada às condições metanogênicas. E em ambas as condições, a produção de metano foi relacionada aos bacilos hidrogenotróficos. As alterações na diversidade da população microbiana presente nos reatores, observadas em microscopia ótica, foram confirmadas nas análises por Biologia Molecular.

Palavras-chave: Biodegradação, Tolueno, Bactérias Redutoras de Sulfato, Biologia Molecular, Reatores em Batelada, Metanogênese.

ABSTRACT

The present work evaluated the anaerobic degradation of toluene by sulfate reducing bacteria (SRB), using anaerobic sludge from reactor UASB as inoculum. The essays were accomplished in batch reactors of 2300mL containing specific culture medium for the growth of SRB. In the enrichment essay with sodium lactate (2230mg/L) and sodium acetate (670mg/L) without toluene accrued total consumption of sulfate (approximately 1070mg/L) in 192 hours and percentile of methane of 31% in 72 hours. The toluene degradation it was accomplished in sulfetogenics and methanogenics reactors. In the sulfetogenics reactors fed with 2,1mg/L and 7,7mg/L there was total degradation of toluene in 264 and 792 hours, respectively. In those reactors it was observed total consumption of sulfate and percentile of methane of approximately 20.9%. In the methanogenic reactors the degradation of toluene was to the utmost of 53%, accompanied of production of 27.3% of methane in 1032 hours. In the sulfetogenics conditions, the degradation of tolueno was faster if compared to the methanogenic conditions. In both conditions, the methane production was related to the hydrogenotrophic bacilli. The alterations in the diversity of the microbial population present in the reactors, observed by optic microscopy, were confirmed in the analysis by Molecular Biology.

Keywords: Biodegradation, Toluene, Sulfate Reducing Bacteria, Molecular Biology, Batch Reactors, Methanogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Uma das fontes de poluição mais agressivas às águas subterrâneas e, conseqüentemente, aos aquíferos, é aquela produzida pela percolação de resíduos depositados em solos permeáveis que não dispõem de nenhum método artificial de proteção das camadas superficiais da terra que os constituem. Os líquidos gerados pela degradação de resíduos sólidos industriais ou urbanos, inadequadamente dispostos em áreas permeáveis, e os vazamentos de dutos de condução de petróleo, são exemplos de fontes de poluição dos lençóis freáticos.

Os resíduos sanitários e os produzidos pela atividade agropecuária, constituídos, em sua maioria, por matéria de origem orgânica, são mais freqüentes. No entanto, número significativo de compostos sintéticos, ou xenobióticos, como defensivos agrícolas, solventes orgânicos, compostos poliaromáticos e halogenados também compõem a gama de poluentes orgânicos que são cumulativos e persistem no ambiente.

Solos, sedimentos e lençóis freáticos, freqüentemente, são contaminados com produtos de petróleo resultantes de vazamentos de tanques de armazenamento, técnicas de disposição inadequadas e derramamento não intencional. Entre os vários constituintes do petróleo, os compostos aromáticos homocíclicos, incluídos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são de interesse particular devido ao seu potencial carcinogênico (EDWARDS *et al.*, 1992). BTEX são relativamente solúveis em água, se comparados com outros componentes do petróleo e, freqüentemente, migram em direção ao lençol freático e contaminam a água de abastecimento (FICKER *et al.*, 1999). Em 1986, a *Environmental Protection Agency* (EPA) estimou que 35% dos estoques americanos de combustíveis foram perdidos em vazamentos.

Entre os compostos mencionados anteriormente, tolueno representa risco à saúde humana, particularmente ao sistema nervoso central. Indivíduos expostos por longo período de tempo ao tolueno apresentam perdas de memória, de atenção e de concentração e pouca capacidade de abstração (FOO, 1988). De acordo com a EPA (1986), a concentração de 0,155mM de tolueno, apresenta risco para a saúde ambiental e pública.

Degradações aeróbia e anaeróbia de tolueno são relativamente rápidas se comparadas às de outros poluentes orgânicos (WHITED *et al.*, 1991; FRIES *et al.*, 1994; OLSEN *et al.*, 1994). Na ausência de oxigênio, a degradação de tolueno ocorre somente na presença de aceptores de elétrons, tais como nitrato (EVANS *et al.*, 1991; FRIES *et al.*, 1994) sulfato (EDWARDS *et al.*, 1992; RABUS *et al.*, 1993; BELLER *et al.*, 1996) e ferro (Fe^{+3})

(LOVLEY *et al.*, 1990). Degradação através de metabolismo fermentativo, com produção de fontes de carbono para a metanogênese, também foi evidenciada por BELLER & EDWARDS (2000).

Microrganismos que degradam tolueno por via anaeróbia estão descritos desde 1990, incluindo 16 culturas de bactérias desnitrificantes (DOLFING *et al.*, 1990; EVANS *et al.*, 1991; FRIES *et al.*, 1994) e uma cultura redutora de ferro (LOVLEY *et al.*, 1990). RABUS *et al.* (1993) isolaram a BRS, linhagem Tol2, degradadora de tolueno de ambiente marinho, sob condições anóxicas. ROBERTSON *et al.* (2001) isolaram *Desulfosporosinus meridiei* de lençol freático contaminado com gasolina.

As BRS são microrganismos anaeróbios estritos, ou seja, presentes, principalmente em ambientes isentos de oxigênio, com potencial de oxirredução de -200mV. Os principais nutrientes requeridos para seu crescimento são amônia, como fonte de nitrogênio; formiato, etanol, acetato, fumarato, malato, lactato, piruvato, propionato e succinato, como fontes de carbono. Caracterizam-se pelo uso de sulfato como aceptor final de elétrons durante o metabolismo respiratório, com produção de sulfeto de hidrogênio (WIDDEL, 1988). Apresentam morfologias diversas, mesofílicas ou termofílicas, presentes em ambientes terrestre e aquático, marinho e de água doce, e em sedimentos de bacias petrolíferas (RUETER, 1994). Também são encontradas em lodos de reatores anaeróbios utilizados em tratamentos de esgoto doméstico e de águas residuárias, desempenhando metabolismo fermentativo ou respiratório. Essas características diferenciais dos ambientes refletem a distribuição e a importância fisiológica das BRS na natureza (MADIGAN *et al.*, 1997).

Como pode ser observado, há diversas possibilidades de degradação de tolueno. Essas refletem a aplicação de diferentes fontes de microrganismos associado à versatilidade fisiológica das diversas culturas anaeróbias. Desse modo, o presente trabalho destaca a utilização de lodo anaeróbio proveniente de reatores operados em climas tropicais com possibilidade de novas descobertas a respeito da degradação de tolueno, além de possibilitar conhecimento sobre a degradação desse composto em condições sulfetogênicas.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar degradação de tolueno por lodo de reator UASB, que trata águas residuárias de abatedouro de aves, em condições sulfetogênicas.

Objetivos Específicos

Avaliar o potencial de degradação anaeróbia de tolueno em reatores em batelada em condições ótimas para desenvolvimento de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) provenientes de lodo de reator UASB sem uso de co-substrato e etapa de adaptação.

Analisar a diversidade microbiana presente nos reatores em batelada utilizando-se reação de polimerização em cadeia (PCR) e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Tolueno

4.1.1. Histórico

O tolueno puro foi obtido pela primeira vez por Pelletier e Walter em 1837 a partir da hulha de alcatrão. Em 1841, St. Claire Deville obteve tolueno a partir do bálsamo de Tolu, dando o nome para a substância. Durante a Segunda Guerra Mundial a produção de tolueno teve aumento expressivo devido à necessidade de fabricar o explosivo Trinitrotolueno (TNT) (CAMPOS *et al.*, 1980).

4.1.2. Propriedades

O tolueno é formado por grupo metila ligado a um anel benzênico. É encontrado no óleo diesel e na gasolina (PERUZZO *et al.*, 1993). É líquido, incolor, com ponto de ebulição de 110,6°C, ponto de fusão de -95°C, densidade de 0,86696g/ml a 20°C, solúvel em acetona e miscível com etanol, éter etílico, benzeno, etc. É usado como solvente, tiner e como componente na fabricação de tintas, lacas (tipo de resina), adesivos, na produção de fenol, benzeno e nitrotoluenos (CAMPOS *et al.*, 1980).

CAMPOS *et al.* (1980) agrupam os hidrocarbonetos cíclicos em quatro diferentes classes: (1) hidrocarbonetos aromáticos que contém um anel benzênico; (2) hidrocarbonetos aromáticos com dois ou mais anéis; (3) com anéis condensados; e (4) não benzênicos ou pseudo-aromáticos. A partir do benzeno, outros diferentes compostos são formados com a adição de radicais na estrutura do anel. Assim, cada novo derivado do benzeno ganha nome próprio de acordo com a estrutura que o compõe. O benzeno acrescido de um radical metil (CH₃) em substituição de um hidrogênio forma o metilbenzeno, o qual recebe o nome comercial de tolueno.

Uma forma de obtenção do tolueno a partir do benzeno dá-se pela reação de Friedel-Crafts. Esta reação adiciona um radical metil proveniente de agentes alquilantes em meio de sulfeto de carbono e cloreto de alumínio como catalisador (CAMPOS *et al.*, 1980).

4.1.3. Efeito tóxico

O tolueno é facilmente absorvido pelos pulmões entre 40% a 60 % da concentração total inalada, produzindo visão dupla, fala inarticulada e falta de coordenação, podendo causar estupor (diminuição ou paralisação das reações intelectuais sensitivas ou motrizes), coma e morte (UCKO, 1992).

4.1.4. Contaminante ambiental

Segundo SWOBODA-COLBERG (1995)¹ *apud* PHELPS and YOUNG (2001) são produzidos cerca de 20 milhões de toneladas de gasolina por ano nos Estados Unidos. Cerca de 20% da gasolina, em volume, são constituídos por hidrocarbonetos monoaromáticos, como: benzeno, tolueno, xilenos e etilbenzeno (BTEX). Além do BTEX encontrado na gasolina e em óleos combustíveis, milhões de toneladas de benzeno, tolueno e xilenos são manufaturados, mundialmente, a cada ano, para uso industrial.

Em 1986, a agência americana de proteção ambiental (*Environmental Protection Agency* – EPA) constatou que 35% dos combustíveis estocados em tanques nos Estados Unidos foram perdidos por vazamento.

A posição dos tanques permite rota fácil para contaminação de águas subterrâneas, especialmente para a fração solúvel em água (BTEX). Além da liberação desses compostos pelos vazamentos acidentais, os BTEX são encontrados como constituintes de pesticidas, entrando na formulação entre 7% a 14% em massa (WANG *et al.*, 1995)² *apud* PHELPS and YOUNG (2001). Por essas razões, os hidrocarbonetos monoaromáticos são os mais comuns poluentes ambientais.

¹ SWOBODA-COLBER, N.G. (1995). Chemical contamination of the environmental sources, types and fate of synthetic organic chemical. In: Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. L.Y. YOUNG and C.E. CERNIGLIA. Eds. pp.27-74. Wiley-Liss. Inc. New York. N.Y.

² WANG, W. LISZEWSKI, M. BUCHMILLER, R. and CHERRYHOLMES, K. (1995). Occurrence of active and inactive herbicide ingredients at selected sites in Iowa. *Water Air Soil Pollution*. **83**, 21-35.

4.1.5. Biodegradabilidade

Como mencionado anteriormente, a biodegradação do tolueno ocorre em condições aeróbias e anaeróbias (FRIES *et al.*, 1994). Entretanto, pouco se conhece a respeito dos microrganismos anaeróbios e das vias metabólicas envolvidas na mineralização do tolueno (MADIGAN *et al.*, 1997; FICKER *et al.*, 1999).

A habilidade de culturas puras ou consórcios microbianos para degradar tolueno ocorre sob várias condições fisiológicas, como as relacionadas às bactérias desnitrificantes, redutoras de ferro, redutoras de sulfato e fermentativas-metanogênicas.

Contudo, ainda são limitados os resultados dos esforços para elucidar os caminhos metabólicos da degradação anaeróbia de tolueno, especificamente em relação as BRS.

Na ausência de oxigênio molecular, a quebra do anel benzênico ocorre através de processo redutivo, pela adição de átomos de hidrogênio (PHELPS & YOUNG, 2001). O catabolismo desses compostos ocorre, preferencialmente, pela quebra redutiva do anel aromático e não pela quebra oxidativa, e a degradação é facilitada quando um átomo de oxigênio foi ligado à molécula. O catabolismo anaeróbio envolve redução do anel, seguida de sua quebra, para formar ácidos graxos de cadeia aberta e ácido dicarboxílico, intermediários que podem ser convertidos a acetil-CoA e usados na biossíntese e na produção de energia (MADIGAN *et al.*, 1997).

COZZARELLI *et al.* (1990)³, em estudo de campo com pluma contaminada com BTEX, sob aterro sanitário, sugeriram oxidação dos BTEX via hidroxilação e carboxilação.

EDWARDS *et al.* (1992) verificaram completa mineralização de tolueno e xilenos por cultura mista, proveniente de aquífero contaminado com gasolina (*Seal Beach*, Califórnia), utilizando sulfato como acceptor final de elétrons. Para o estudo, foram utilizados frascos de 250mL como reatores, os quais receberam 100g do material do aquífero e 100mL de meio de cultura rico em minerais e vitaminas. Foi usado sulfato ferroso $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ como fonte de sulfato para a respiração anaeróbia das BRS. O material do aquífero passou por etapa de enriquecimento com tolueno, benzeno, etilbenzeno, *para*- e *orto*-xileno, separadamente. Na etapa de degradação, os compostos foram adicionados ao meio todos juntos na concentração de 5mg/L para cada composto na presença de 768mg/L de sulfato.

O primeiro composto a ser degradado foi o tolueno. Em 40 dias de ensaio restavam apenas 20% da concentração inicial. Não foi detectada percentual de metano e foi observada a formação de precipitado preto somente nos reatores ativos.

³ COZZARELLI, I.M., EGANHOUSE, R.P. and BAEDECKER, M.J. (1990). Transformation of monoaromatic hydrocarbons to organic acids groundwater environment. *Environmental Geol. Water Science*. 16(2), 135-141.

A origem do precipitado foi resultado da combinação do sulfeto com o ferro dando origem ao sulfeto ferroso (FeS). Com isso, foi relacionado o consumo de tolueno com o de sulfato. Para confirmar tal hipótese, foram monitoradas as concentrações de tolueno nos períodos em que o sulfato havia sido todo consumido. Foi observado que a degradação do tolueno ocorreu durante todo o período em que havia sulfato disponível no meio cessando quando todo o sulfato tinha sido consumido. Nesse momento, mais tolueno foi adicionado ao meio de cultura e durante 50 dias não houve variação em sua concentração. Após esse período, foi adicionado sulfato e foi observado que a degradação do tolueno deu início novamente.

Nos reatores de enriquecimento, que estavam ainda contaminados com pequena fração do sedimento original, mais sulfato foi consumido do que a quantidade teoricamente requerida para degradar tolueno e xilenos. Os autores atribuíram a maior demanda por sulfato à presença de matéria orgânica no sedimento. Já nos reatores que não continham mais o sedimento e sim o consórcio de microrganismos já isolado, foi observado consumo de 30 a 40% mais de sulfato que a demanda teórica. A explicação para isso foi que, durante a incubação, que foi de meses seguidos, o hidrogênio (H₂) da atmosfera anaeróbia foi usado pelas BRS. A demanda teórica de sulfato foi calculada com a seguinte equação:



Nesse mesmo trabalho, foi usado molibdato (inibidor da redução de sulfato) para confirmar que a degradação foi realizada pelas BRS. Nos reatores com molibdato não houve consumo de BTEX. Ácido 2-Bromoetanosulfônico (BESA), inibidor da metanogênese, também foi usado; e nos reatores onde havia BESA, mas não molibdato, houve degradação dos BTEX. Isso significou que as metanogênicas não atuaram diretamente na degradação dos BTEX.

A completa mineralização do tolueno e xilenos a CO₂ foi confirmada com o uso de substratos marcados com carbono radiativo (¹⁴C). Com isso, também foi possível demonstrar que quase a totalidade dos compostos foi transformada em CO₂. Somente no caso do o-xileno é que pequena fração ficou na forma de resíduo não volátil. Isto indicou que alguns heterótrofos presentes na comunidade metabolizaram compostos provenientes da decomposição celular, o que levou a liberação do carbono celular como CO₂. Diferentes morfologias microbianas foram observadas em microscopia. Elas apareceram em estreita associação umas às outras e com partículas sólidas, revelando uma estrutura de comunidade

muito complexa e hábil para viver sem sistema doador/aceptor de elétrons que ofereçam pouca energia.

A cultura enriquecida, descrita por EDWARDS *et al.* (1992), utilizou, referencialmente, tolueno a xilenos, e lactato, glicose ou extrato de levedura como substratos orgânicos e não metabolizou benzeno e etilbenzeno. Segundo os autores, os mecanismos bioquímicos para a degradação e o papel dessas bactérias nos sistemas naturais, necessitam ser elucidados; devido, principalmente, à pequena quantidade de energia disponível para a reação anaeróbia.

A linhagem Tol2 definida nominalmente como *Desulfobacula toluolica*, foi a primeira cultura pura de BRS de ambiente marinho capaz de oxidar tolueno sob anaerobiose estrita (RABUS *et al.*, 1993). A bactéria foi isolada através de enriquecimento de amostra de sedimento marinho rico em sulfeto. O enriquecimento, isolamento e cultivo foram feitos em meio definido, contendo aproximadamente 4g/L de sulfato de sódio e 20g/L de cloreto de sódio. Para evitar o efeito tóxico, os hidrocarbonetos aromáticos (tolueno, etilbenzeno e xilenos) foram adicionados como soluções diluídas (usualmente 2%, v/v) em solvente inerte lipofílico. Óleo mineral não fluorescente foi utilizado como fase móvel nos cultivos de rotina. Para a medida exata do consumo de tolueno foi usado um eluente menos viscoso: 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-heptametilonato. Os autores isolaram células da linhagem Tol2, ovais ou cocóides com aproximadamente 1,2µm a 1,4µm por 1,2µm a 2,0µm.

A linhagem Tol2 oxidou várias classes de substratos orgânicos. Os compostos foram testados como doadores de elétrons para crescimento celular e redução de sulfato. Além do tolueno (2% em óleo mineral), os microrganismos isolados usaram outros compostos aromáticos, alguns álcoois de cadeias curtas e ácidos alifáticos. As seguintes substâncias não foram utilizadas pela Tol2 para crescimento ou redução do sulfato: ciclohexano, metilciclohexano, benzeno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, etilbenzeno, (todos em 1% e 2% em óleo mineral), fenol (0,5mM e 2 mM), *o*-cresol (0,5mM e 1mM), *m*-cresol (0,5mM e 1mM), álcool *p*-hidroxibenzil (0,5mM e 1mM), *o*-metilbenzoato (0,2mM e 2mM), *m*-metilbenzoato (0,2 mM e 2mM), *p*-metilbenzoato (0,2mM e 2mM), fenilpropionato (0,2mM e 4mM), hidrogênio (com dióxido de carbono e 1mM de acetato de sódio), metanol (10mM), 2-propanol (5mM), formiato (10mM com 1mM de acetato de sódio), acetato de sódio (10mM), propionato (5mM e 10mM), isobutirato (5mM), valerato (5mM), 2-metilbutirato (3mM), 3-metilbutirato (3mM), caproato (2mM), aprilato (0,5mM), palmitato (0,5mM) e lactato (10mM). Com tolueno adicionado diretamente ao meio de cultura na ausência da fase móvel, o crescimento foi inibido em concentração maior que 0,5mM. Em óleo mineral (30mL/L de

meio) com 2% (v/v) de tolueno, a concentração de equilíbrio na fase aquosa foi de aproximadamente 0,25mM.

A temperatura ótima de crescimento foi de 28°C, com pH ótimo entre 7,0 e 7,1. O crescimento de Tol2 dependeu de alta concentração de cloreto de sódio (340mM), cloreto de magnésio (15mM) e suplementação com vitaminas. O tempo de geração da linhagem Tol2 com tolueno (25mg/L) foi de 27 horas e sensível ao oxigênio (RABUS, *et al.* 1993).

O balanço da degradação foi determinado com baixa e alta concentração de tolueno, dissolvido na fase móvel: 1,79mM e 6,03mM, respectivamente. A produção de sulfeto foi monitorada durante a incubação e as concentrações de tolueno remanescentes nas fases aquosa e hidrofóbica medidas após 332 horas. Tolueno em baixa concentração foi completamente degradado. Nos experimentos com maior concentração houve consumo de 2/3 do valor inicial. Os resultados sugeriram que o crescimento e a oxidação de tolueno foram inibidos por concentrações de sulfeto maiores que 12mM. Aproximadamente 29g de massa celular seca foi produzida por mol de tolueno consumido.

Genealogicamente, a linhagem Tol2, foi intimamente relacionada às espécies de *Desulfobacter*, com diferenças fisiológicas marcantes. As espécies de *Desulfobacter* são oxidadoras especializadas de acetato e usam o ciclo do ácido cítrico. Para esses autores, em função da distância filogenética existente entre outros gêneros, a linhagem Tol2, poderá ser considerada espécie de novo gênero, para qual foi proposta a designação de *Desulfobacula toluolica*.

EDWARDS *et al.* (1992) demonstraram que a degradação de BTEX ocorreu em condições sulfetogênicas e não envolveu a participação direta das arqueas metanogênicas. Posteriormente, EDWARDS *et al.* (1994) estudaram a degradação do tolueno em condições metanogênicas. Nesse novo estudo, foi usado solo de aquífero contaminado com creosoto e pentaclorofenol (PCP) em meio específico para metanogênicas. Frascos de 250mL foram usados como reatores, os quais receberam 100g de solo e 100mL do meio de cultura. O material do aquífero foi submetido a etapa de enriquecimento com 1,5µL a 3µL de tolueno e de *o*-xileno puros durante 8 meses. Na etapa de degradação, 62% do substrato foi levado a metano, 34% a dióxido de carbono e 4% a biomassa e produtos não voláteis. Quando o sulfato foi adicionado, houve pequena diminuição na velocidade de degradação, e com o nitrato houve maior diminuição nessa velocidade. Eles testaram, também, o O₂ como acceptor final de elétrons, o qual foi extremamente tóxico aos microrganismos a partir de 5,6µM. Quando adicionado outro substrato, como acetona, metanol ou glicose, a degradação do tolueno e do xileno foi interrompida, e somente retornou a ser degradado quando o co-substrato havia sido todo consumido.

BELLER *et al.* (1996) isolaram a linhagem PRTOL1, a segunda BRS conhecida capaz de degradar hidrocarbonetos aromáticos e a primeira proveniente de sedimento de água doce contaminado com combustível, capaz de mineralizar tolueno como único doador de elétrons e única fonte de carbono, sob condições anaeróbias estritas. Cerca de 80% do tolueno foram mineralizados em CO₂ e 15% foram convertidos em biomassa e produtos metabólicos não voláteis. A relação estequiométrica observada entre números de mol de sulfato e de tolueno consumidos foi consistente com a relação teórica para a mineralização, com produção de sulfeto de hidrogênio. A linhagem PRTOL1 também utilizou *o*-xileno e *p*-xileno. Os produtos da degradação de tolueno, *o*- e *p*-xileno foram ácido benzil-succínico, ácido 2-metilbenzil-succínico e ácido 4-metil-benzóico, respectivamente. Comparada à TOL2, a linhagem PRTOL1, apresentou sequência do RNAr 16S distinta. A linhagem PRTOL1 foi classificada na subclasse delta da *Proteobacteria*, como todas as outras BRS Gram negativas mesofílicas (WIDDEL, 1988). *Desulforhabdus amnigenus* (OUDE ELFERINK *et al.*, 1995) foi intimamente relacionada à linhagem PRTOL1, com 96% de similaridade. *Desulforhabdus amnigenus* foi isolada de lodo granular anaeróbio, com acetato como fonte de carbono e de energia e não utilizou benzoato ou outros compostos aromáticos.

O uso de compostos orgânicos, que não tolueno, incluindo hidrocarbonetos aromáticos com anel simples, ácidos alifáticos de cadeia curta e outros intermediários potenciais do metabolismo do tolueno foram testados com a PRTOL1 (Tabela 1). Substratos orgânicos como formiato, acetato, piruvato, succinato e fumarato foram metabolizados conforme indicou o consumo de sulfato. O crescimento foi observado para os três últimos ácidos, mas, não foi confirmado para formiato e acetato durante período de 40 dias de incubação.

A linhagem PRTOL1 oxidou fenilpropionato, fenilacetato, benzaldeído, benzoato, *p*-cresol e *p*-hidroxibenzoato. Não oxidou álcool benzílico, *o*-cresol, *p*-toluato e benzilsuccinato, durante 15 dias de incubação. Entre esses compostos aromáticos oxigenados, o benzaldeído foi o mais rapidamente consumido. Entre os hidrocarbonetos de anel simples, não foi observado nenhum consumo de benzeno, etilbenzeno ou *m*-xileno num período de três semanas (BELLER *et al.*, 1996). Na cultura de PRTOL1 em suspensão, concentrações de tolueno (40 μM) e *o*-xileno (35 μM) decresceram durante 10 dias. Após esse período nenhum consumo de *o*-xileno foi detectado. Entretanto, na presença de 55 μM e 60 μM de tolueno houve consumo em 20 e 30 dias, respectivamente.

A benzilsuccinato-sintase, é a enzima que catalisa a adição do carbono metil do tolueno para dupla ligação do fumarato. Essa enzima foi encontrada em degradadores de tolueno, tais como bactérias desnitrificantes, redutoras de sulfato e fototróficas anoxigênicas.

Algumas linhas de evidência sugeriram que a ativação do tolueno via benzilsuccinato sintase é o primeiro passo na sua mineralização (LEUTHNER & HEIDER, 2000).

BELLER & EDWARDS (2000) detectaram alta atividade da benzilsuccinato-sintase durante análise *in vitro* de cultura anaeróbia enriquecida, degradadora de tolueno. Os autores observaram a predominância de *Methanosaeta*, *Methanospirillum*, além de *Desulfotomaculum* e outros microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* (FICKER *et al.*, 1999). Essa cultura mista foi mantida em frascos sob anaerobiose estrita e alimentação em batelada, com aproximadamente 92mg/L de tolueno, durante duas semanas; produzindo 85% a 100% de metano (4,3 mols de metano/mol de tolueno). Os experimentos cinéticos *in vivo* e *in vitro* foram realizados a 30°C, em câmara anaeróbia, sob atmosfera de N₂/CO₂/H₂ (80%/10%/10%). A velocidade de consumo de tolueno *in vivo* foi determinada antes da retirada das células, para análise *in vitro*, da atividade da benzilsuccinato-sintase. O consumo de tolueno *in vivo* foi medido pelo método estático do *headspace* (BELLER *et al.*, 1996).

Tabela 1. Uso dos doadores de elétrons após 15 dias pela Linhagem PRTOL1

Concentração do composto	Metabolismo	
	Doador ^a Elétrons	Sulfato ^b
Hidrocarbonetos aromáticos ^c		
Benzeno (50-60 µM)	-	ND
Etilbenzeno (20-40 µM)	-	ND
<i>o</i> -xileno (20-40 µM)	+ ^d	ND
<i>m</i> -xileno (20-40 µM)	-	ND
<i>p</i> -xileno (20-40 µM)	+ ^d	ND
Ácidos Alifáticos de cadeia curta ^e		
Formiato (5 mM)	-	+
Acetato (4 mM)	-	+
Piruvato (3 mM)	+	+
Succinato (2 mM)	+	+
Fumarato (2 mM)	+	+
Intermediários Potenciais do Tolueno		
Fenilpropionato (0,5 mM)	+	+
Fenilacetato (0,5 mM)	+	+
Benzaldeído (0,5 mM)	+	+
Benzatoato (0,5 mM)	+	+
<i>p</i> -cresol (0,5 mM)	+	+
<i>p</i> -hidroxibenzoato (0,5 mM)	+	+
álcool benzil (0,125 e 0,25 mM)	-	-
<i>o</i> -cresol (0,5 mM)	- ^f	-
Produtos do Alquilbenzeno		
<i>p</i> -toluato (0,5 mM)	-	-
benzilsuccinato (0,5 mM)	-	-

^a +, 70% a 100% de decréscimo na concentração observada em 15 dias; -, nenhum decréscimo na concentração.

^b +, sulfato consumido (>1mM); -, sulfato consumido (<0,2mM); ND, não determinado.

^c Para esses compostos, o tolueno foi consumido sem adição posterior.

^d determinado por cromatografia gasosa e espectro de massa dos produtos metabólicos distintos e por alguns decréscimos observados na concentração do substrato no tempo. Contudo, a taxa do metabolismo foi muito lenta e não pode ser sustentada no tempo. O cometabolismo com tolueno pode ser aplicado a esses compostos.

^e o metabolismo desses doadores de elétrons foi determinado pelo crescimento em vez do decréscimo da concentração.

^f a concentração de *o*-cresol não decresceu no período de 15 dias e o sulfato não foi usado durante esse tempo.

+ crescimento; - nenhum crescimento

Fonte: BELLER *et al.* (1996).

Segundo BELLER & EDWARDS (2000), as associações sintróficas nesse consórcio anaeróbio e metanogênico não foram bem entendidas, particularmente em relação à transferência de metabólitos entre as espécies. O benzil-succinato, aparentemente o primeiro

metabólito da mineralização do tolueno nesse consórcio, é um dos inúmeros candidatos para a transferência entre as espécies. Em muitas culturas degradando tolueno, pequena quantidade de benzil-succinato, representando aproximadamente 0,5% a 7,0% do tolueno consumido, acumula-se no meio (BELLER *et al.*, 1996). Notadamente, neste estudo, benzilsuccinato apareceu de forma transiente, e em baixa concentração durante a degradação do tolueno. Baixa produção de benzil-succinato extracelular e ocorrência transiente durante a degradação do tolueno diferiu marcadamente das observações feitas para cultura pura e foram consistentes com a transferência entre as espécies no consórcio metanogênico.

ROBERTSON *et al.* (2001) isolaram oito linhagens de BRS formadoras de esporos, utilizando amostras de areia provenientes de aquífero superficial (Austrália), contaminado com gasolina. Segundo os autores, por evidências genéticas e fenotípicas, as linhagens foram consideradas membros de nova espécie de BRS. As linhagens usaram nitrato como aceptor de elétrons e não usaram formiato ou caproato como fontes de carbono. O ensaio controle realizado com *Desulfosporosinus orientis* DSM 765T, foi incapaz de reduzir nitrato, embora tenha usado formiato e caproato. As linhagens apresentaram coloração Gram negativa. Mostraram crescimento autotrófico e homoacetogênico com etanol. Para os autores, as diferenças entre as linhagens isoladas e a descrição de *Desulfosporosinus* não foram suficientes para justificar a criação de novo gênero; contudo, propuseram descrição modificada para acomodar essas linhagens, representando uma nova espécie, denominada de *Desulfosporosinus meridiei*.

Vários alquilbenzenos foram utilizados durante o crescimento de BRS enriquecida com óleo cru como única fonte de substrato orgânico. Dessa cultura, dois novos bacilos de BRS, mesofílicos, foram isolados na presença de *o*-xileno e *m*-xileno; ou seja, as linhagens *o*XyS1 e *m*XyS1. Análise da seqüência do RNAr 16S revelou que os isolados afiliaram-se às BRS oxidadoras completas da classe *Proteobacterai* e subclasse δ . A linhagem *o*XyS1 mostrou alta similaridade com *Desulfobacterium cetonicum* e *Desulfosarcina variabilis*, com valores de 98,4 e 98,7%, respectivamente. A linhagem *m*XyS1 foi menos relacionada às espécies conhecidas, com valor de 86,9% em relação a *Desulfococcus multivorans*. A linhagem *o*XyS1 foi capaz de utilizar tolueno, *o*-etiltolueno, benzoato e *o*-metilbenzoato. A linhagem *m*XyS1 oxidou tolueno, *m*-etiltolueno, *m*-isopropiltolueno, benzoato e *m*-metilbenzoato. As linhagens *o*XyS1 e *m*XyS1 não utilizaram *m*-alquiltolueno e *o*-alquiltolueno, respectivamente (Tabela 2). Ambas as culturas cresceram anaerobiamente em óleo cru, com concomitante redução de sulfato a sulfeto (HARMS *et al.*, 1999).

Os tempos de geração foram de 75 horas e 55 horas, para *oXyS1* e *mXyS1*, respectivamente. A BRS PROTL1 e Tol2 exibiram tempo de geração na presença de tolueno de 36 horas (BELLER *et al.*, 1996) e 27 horas (RABUS *et al.*, 1993), respectivamente.

Os dois caminhos metabólicos, freqüentemente postulados, que incluem o ácido benzóico como intermediário, procedem da hidrocarboxilação inicial do anel aromático para formar *p*-cresol ou pela hidrocarboxilação do grupo metil para formar álcool benzil (BELLER & EDWARDS, 2000).

EVANS *et al.* (1992) propuseram os caminhos da transformação e mineralização do tolueno por cultura pura desnitrificante, utilizando-o como única fonte de carbono. BELLER *et al.* (1992) verificaram os mesmos metabólitos finais observados por EVANS *et al.* (1992), e relataram que o ácido benzóico foi o provável intermediário da degradação do tolueno, consistente com descobertas sob condições desnitrificantes, fermentativas e metanogênicas (BELLER & EDWARDS, 2000).

O crescimento da linhagem TOL2 foi inibido na presença de álcool benzílico na concentração de 500 μ M. Para valores iguais a 5 mM não ocorreu a oxidação por células ativas, adaptadas com tolueno, o que indicou que o álcool não foi o intermediário no metabolismo do tolueno. A conversão de *p*-xileno em *p*-metilbenzoato, como produto final, sugeriu que a BRS, semelhante a desnitrificante, iniciou oxidação do tolueno com o grupo metil. Na linhagem desnitrificante (EVANS *et al.*, 1992) e na cultura de lodo enriquecido para BRS (BELLER *et al.*, 1992), aproximadamente 17% e 9% do tolueno foi convertido a benzilsuccinato e benzilfumarato, respectivamente, não utilizados posteriormente. Essas verificações levaram à suposição da possível condensação de tolueno com acetil-coenzima A, formando a fenil-propionil-coenzima A, como produto real de ativação (EVANS *et al.*, 1992).

RABUS & WIDDEL (1995) também detectaram benzil-succinato em suspensão celular da linhagem Tol2, na presença de tolueno; mas, quantificaram apenas 0,1% do substrato consumido (4 mM). Benzil-succinato não foi detectado no sobrenadante da suspensão celular ou em células crescendo com benzoato. Para os autores, possivelmente, Tol2 realizou ativação do tolueno através da condensação oxidativa com o carbono α do ácido carboxílico.

Tabela 2. Crescimento anaeróbico das linhagens *o*-XyS1 e *m*-XyS1 com compostos aromáticos e não aromáticos.

Compostos	Linhagem	
	<i>o</i> -XyS1	<i>m</i> -XyS1
Hidrocarboneto Aromático		
Tolueno (2%)	+	+
<i>o</i> -xileno (2%)	+	-
<i>m</i> -xileno (2%)	-	+
<i>o</i> -etiltolueno (2%)	+	-
<i>m</i> -etiltolueno (2%)	-	+
<i>m</i> -isopropiltolueno (2%)	-	+
Composto aromático com grupo funcional		
Álcool <i>o</i> -metilbenzil (0,5 e 2mM)	+	-
Álcool <i>m</i> -metilbenzil (0,5 e 2mM)	-	-
Benzoato (1 e 4mM)	+	+
<i>o</i> -metilbenzoato (1 e 2mM)	+	-
<i>m</i> -metilbenzoato (1 e 2mM)	-	+
benzilsuccinato (1 e 4mM)	+	-
Outros compostos		
Etanol (1 e 5 mM)	+	-
Formiato (10 e 20mM)	+	+
Acetato (5 e 10mM)	+	+
Propionato (5 e 10mM)	-	+
<i>n</i> -butirato (5 e 10mM)	+	+
lactato (5 e 10mM)	+	-
piruvato (1 e 5mM)	+	+
succinato (1 e 5mM)	+	-
D,L-malato (1 e 5mM)	+	-

+ crescimento; - nenhum crescimento

Fonte: HARMS *et al.* (1999).

NARDI (2002) estudou a degradação de BTEX nas condições metanogênica, desnitrificante e sulfetogênica. Para isso, foi usado Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) com esgoto sintético (Tabela 3). O lodo usado como fonte de microrganismos passou por etapa de adaptação ao esgoto sintético com sulfato na concentração de 114mg/L e fonte adicional de lipídeos. Após a etapa de adaptação, a fonte de lipídeos foi retirada e BTEX

foi adicionado na concentração inicial de 1,5mg/L, para cada composto (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos), e tempo de detenção hidráulica de 13,5 horas. A concentração inicial de cada composto de BTEX foi aumentada para 6mg/L e a concentração inicial de sulfato passou para 470mg/L. Etanol foi adicionado ao meio para aumentar a solubilidade do BTEX e a remoção de sulfato, que era de 28% na fase de adaptação e passou a ser total após a adição do álcool. Porém, com o uso do etanol para solubilizar o BTEX, a DQO do afluente elevou-se de 588mg/L para 2020mg/L, o que causou choque de carga orgânica no reator, comprometendo sua eficiência. Numa segunda etapa de degradação, NARDI substituiu o etanol por detergente comercial para obter solubilidade do BTEX sem comprometer o rendimento do reator. Nas duas etapas de degradação, a concentração de BTEX no efluente do reator ficou abaixo de 0,1 mg/L (limite de detecção) em todas as condições. No reator com sulfato a remoção de DQO foi de 81% enquanto que a redução de sulfato foi de 28% a partir de 470mg/L. Pelos exames microscópicos do conteúdo do reator, foi possível verificar a presença de cocos em cadeia na fase de adaptação, bacilos fluorescentes e *Methanosarcina*, na fase de degradação com etanol, bacilos retos em pares e bacilos com pontuações nas extremidades na fase de degradação com detergente comercial.

Em relação ao reator metanogênico, não houve diferença nos resultados de remoção de BTEX e a presença de sulfato não aumentou nem diminuiu a degradação do BTEX. O consumo de sulfato foi maior na condição em que houve excesso de carga orgânica pelo etanol. Porém, em todas as situações a que foram submetidos os reatores metanogênico e sulfetogênico, houve total ou quase total degradação do BTEX.

Tabela 3. Composição do esgoto sintético utilizado na degradação de BTEX em RAHLF nas condições metanogênicas, sulfetogênicas e desnitrificantes.

	Constituinte	Concentração
Proteínas	Extrato de carne	208 mg/L
Carboidratos	Sacarose	36 mg/L
	Amido comercial	112 mg/L
	Celulose	41 mg/L
Lipídeos	Óleo de soja	0,056 mL/L
Sais minerais	Cloreto de sódio (NaCl)	50 g/L
	Cloreto de magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	1,4 g/L
	Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,9 g/L
Bicarbonato de sódio		200 mg/L

Fonte: NARDI (2002)

4.2. Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

Microrganismos participam da redução de sulfato produzindo gás sulfídrico (H_2S) ou da oxidação desse gás, com formação de sulfato (SO_4^{2-}). O gás sulfídrico é formado a partir da decomposição de compostos orgânicos sulfurados, como os aminoácidos metionina e cistina, e redução de sulfato. Sulfato, a forma mais oxidada do enxofre, é um dos mais abundantes ânions nos oceanos e é usado pelas Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).

Muitos organismos, incluindo os vegetais superiores, algas, fungos, e a maioria dos procariontes, usam o sulfato como fonte de enxofre para a biossíntese. Porém a habilidade de utilizar sulfato comoceptor de elétrons para o processo de geração de energia envolve ampla escala de redução, alcançada pelas BRS (ZEHNDER, 1988).

O íon sulfato é estável e não pode ser utilizado sem a primeira ativação, feita pelo ATP (adenosina trifosfato) através da ATP-sulforilase, formando o complexo APS (adenosinafosfossulfato). Metade do APS é reduzido diretamente a sulfito (SO_3^{2-}) e, com sua formação, as reações subseqüentes de redução processam-se prontamente, até chegar ao gás sulfídrico (ZEHNDER, 1988). O transporte dos elétrons vindo da fonte doadora é feito pelo citocromo, denominado de citocromo-c3, composto altamente eletronegativo e exclusivo das BRS, não sendo encontrado em organismos que utilizam outros aceptores de elétrons (MADIGAN *et al.*, 1997).

As BRS reduzem o sulfato presente em sedimentos profundos e em águas anóxicas produzindo gás sulfídrico (H_2S). Este gás pode alcançar sedimentos rasos ou águas superficiais onde é utilizado por vários organismos, como as bactérias fotossintetizantes verdes e púrpuras. Os microrganismos envolvidos no ciclo do enxofre apresentam características morfológicas e bioquímicas diversas, incluindo bactérias e arqueas de diferentes categorias nutricionais, capazes de crescer em diferentes faixas de temperatura e de pH.

As BRS estão amplamente distribuídas na natureza. O termo Bactérias Redutoras de Sulfato descreve um grupo heterogêneo de microrganismos que apresentam como características comuns o metabolismo dissimilatório de sulfato e anaerobiose obrigatória.

Essas bactérias são geralmente encontradas em lodos de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgoto doméstico e água residuária desempenhado metabolismo fermentativo ou respiratório (respiração anaeróbia). Essas características diferenciais dos ambientes refletem a distribuição e a importância fisiológica das BRS na natureza.

Nos ambientes onde é grande a atividade metabólica, é facilmente perceptível o odor do gás sulfídrico (cheiro de ovo podre) e a água escurecida devido à precipitação do sulfeto ferroso.

Os principais nutrientes requeridos pelas BRS são amônia, como fonte de nitrogênio; formiato, etanol, acetato, fumarato, malato, lactato, piruvato, propionato e succinato, como fontes de carbono (ZEHNDER, 1988; MADIGAN *et al.*, 1997). Por utilizarem compostos de baixa massa molecular como doadores de elétrons, as BRS dependem de bactérias que degradem os polímeros para obtenção de fontes de carbono e energia.

As BRS estão envolvidas nos processos de decomposição relacionados com os ciclos do enxofre e do carbono; e são degradadoras terminais, assim como as arqueas metanogênicas, que produzem metano e gás carbônico, como compostos finais de seu metabolismo (ZEHNDER, 1988; MADIGAN *et al.*, 1997).

Muitas BRS são capazes de crescer utilizando acetato como única fonte de carbono e de energia, sendo a maioria de origem marinha. Esses organismos oxidam completamente acetato a CO₂ e reduzem sulfato a sulfeto.

4.3. Aplicação de Técnicas de Biologia Molecular

A análise do RNAr 16S tem sido amplamente usada para determinar as espécies que compõem as comunidades microbianas. O RNA (ácido ribonucléico) é cópia funcional do código genético e responsável pela síntese de proteínas dentro das células. O RNAr (ribossomal) contém a sub-unidade 16S, a qual é molécula ancestral com regiões que permaneceram conservadas, sem sofrer processos de mutação, ao longo do processo evolutivo (MADIGAN, *et al.*; 1997).

A técnica de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) permite a amplificação, ou multiplicação, da quantidade de material genético da amostra. Isso permite a obtenção de grandes quantidades de material genético para estudo, sem que haja a necessidade de cultivo dos microrganismos para obter a quantidade desejada desse material (CATTONY, 2002).

A técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) é usada para separar o material genético amplificado na PCR. A separação ocorre em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante crescente em mistura de uréia e formamida, submetido a passagem de corrente elétrica (SAKAMOTO, 2001).

De acordo com MYERS *et al.* (1987)⁴ e MUYZER *et al.* (1993)⁵ *apud* TESKE *et al.* (1996b), a técnica do DGGE pode separar os produtos de PCR de mesmo tamanho e

⁴ Myers, R. M., T. Maniatis, and L. S. Lerman. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *MethodsEnzymol.* 155:501–527.

composição inicial de bases. Duas diferentes bandas de DGGE indicam dois diferentes microrganismos componentes de uma população.

TESKE, *et al.* (1996a) estudaram a distribuição de BRS em amostras de água e sedimento de *Mariager*, nos *Fiords* Dinamarqueses. As amostras foram incubadas em meio BRS descrito por WIDDEL & BAK (o mesmo usado neste trabalho), e a quantificação dos microrganismos foi feita com as técnicas de Número Mais Provável (NMP), extração de ácidos nucléicos, Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE). No NMP foram usados lactato e acetato como fontes de carbono. Os ácidos nucléicos foram extraídos do material e, depois, amplificados por PCR. O DGGE continha gradiente desnaturante de 20% até 70%. De acordo com os autores, as diferentes bandas no DGGE correspondem a diferentes fragmentos RNAr 16S obtidos de diferentes espécies ou linhagens bacterianas. Embora, as posições coincidentes ou sobrepostas das bandas de duas diferentes espécies não possam ser excluídas; o padrão de bandas do DGGE foi visto como representação aproximada das espécies microbianas e da diversidade de linhagens na coluna de água do *Fiord Mariager*.

No trabalho de FICKER *et al.* (1999), foi usado sedimento contaminado com creosoto mantido por 10 anos com tolueno como única fonte de carbono. O objetivo do trabalho foi identificar as diferentes espécies e a participação de cada uma delas no consórcio microbiano durante o processo de degradação do tolueno. As tentativas de isolamento utilizando técnicas convencionais de diluição seriada ou plaqueamento não tiveram sucesso. Isso, porque é difícil determinar as associações sintróficas que ocorrem nos consórcios. Para tanto, nesse trabalho FICKER e seus colaboradores usaram abordagem molecular com sequenciamento do DNA, além da hibridação *in situ* (FISH). De acordo com SAKAMOTO (2001), as técnicas de Biologia Molecular oferecem novas oportunidades para análises da estrutura e da composição das comunidades microbianas.

BARROS (2003), em seu trabalho de mestrado no Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, avaliou a remoção biológica do sulfeto por bactérias fototróficas verdes. Neste trabalho, foram utilizadas técnicas de Biologia Molecular para comparar e avaliar as populações de sulfobactérias fototróficas verdes, e as possíveis mudanças ocorridas nessas populações em função da variação das concentrações iniciais de sulfeto. Com a análise das bandas obtidas no gel de DGGE, o autor, verificou elevada similaridade de bandas em todas as condições nutricionais e concluiu que não houve variações na estrutura das

⁵ Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.

populações microbianas em decorrência do aumento da concentração de sulfeto no meio. Constatou também, o mesmo padrão de bandas na cultura enriquecida e nas outras com diferentes concentrações de sulfeto. Esses resultados confirmaram os exames de caracterização morfológica, nos quais foi observado predomínio de um único tipo morfológico semelhante a *Chlorobium sp.*

5. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em 4 etapas distintas que visaram o estabelecimento do consórcio microbiano em condições sulfetogênicas, o conhecimento de como o tolueno comportar-se-ia nas condições propostas e quanto dele era passível de adsorção no lodo, além da constatação do seu processo de biodegradação.

No ensaio de enriquecimento foi usado, como inóculo, lodo anaeróbio submetido ao crescimento com lactato sódico e acetato de sódio, em meio BRS, na presença de sulfato. A porcentagem do lodo usada nos reatores foi de 10% (v/v) do volume de cada reator. As concentrações iniciais de lactato e de acetato foram iguais a 2230 mg/L e 670 mg/L, respectivamente, e a concentração de sulfato, de aproximadamente, 1070 mg/L. Nesse ensaio, foram monitorados o consumo de sulfato e a percentual de metano. Exames microscópicos foram realizados no final do ensaio e amostras para análise da diversidade microbiana por PCR e *DGGE* foram armazenadas para posterior processamento.

A estabilização das concentrações de tolueno entre a fase líquida e de vapor foi realizada no meio BRS (BELLER *et al.*, 1996), com sulfato e tolueno nas concentrações de 1000 mg/L e 18 mg/L, respectivamente, e ausência de inóculo.

Nas duas etapas do ensaio de degradação, os reatores foram inoculados com lodo proveniente de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), processado em liquidificador para desfazer os grânulos. Foram estudadas diferentes concentrações de tolueno, em presença e ausência de sulfato. Os reatores foram monitorados durante 264 horas na primeira etapa e durante 1000 horas na segunda etapa. Foram realizados monitoramentos da percentual de metano e de consumos de sulfato e de tolueno. Exames microscópicos foram realizados no final do ensaio e amostras para análise da diversidade microbiana foram armazenadas para posterior análise.

5.1.Reatores

Nos ensaios de degradação de tolueno foram usados reatores confeccionados especialmente para receber as tampas de butila revestidas de teflon. Os reatores foram confeccionados em borosilicato, com desenho globular. Os reatores usados no ensaio de degradação possuíam duas aberturas superiores fechadas com tampas de butila revestidas de teflon e roscas de teflon (Figura 1). Assim como no ensaio de enriquecimento, o meio basal foi adicionado com todas as soluções estoques e inóculo nas mesmas proporções. Os reatores foram fechados e mantidos em agitação orbital (100 rpm) e temperatura de 30°C (Figura 2).

A capacidade volumétrica dos reatores era de 2300mL, determinado com o enchimento dos mesmos com água de torneira até não mais apresentar espaço livre. Em seguida, com auxílio de proveta de vidro de 1000mL, a água contida em cada reator foi medida obtendo, assim, o valor de 2300mL como capacidade volumétrica de cada reator.



Figura 1. Reator em batelada usado nos ensaios de degradação de tolueno.



Figura 2. Vista superior da incubadora com agitação e temperatura controladas, contendo seis reatores durante ensaio de degradação.

5.2. Inóculo

O inóculo utilizado nos ensaios de enriquecimento e de degradação foi o lodo granulado proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Tietê – SP). O lodo foi coletado em frascos de plásticos e mantidos em geladeira com temperatura de 10°C. Para desfazer os grânulos, foi usado liquidificador caseiro. O lodo granulado foi colocado no liquidificador e homogeneizado até atingir o aspecto pastoso. A transferência do lodo para os reatores foi realizada com auxílio de proveta de plástico previamente esterilizada.

5.3. Meio de Cultura

O meio de cultura descrito por BELLER *et al.* (1996) propicia todos os requisitos nutricionais exigidos pelas Bactérias Redutoras de Sulfato. É composto por um meio basal ao qual são adicionadas soluções estoques. As Tabelas 4 e 5 descrevem a composição desse meio de cultura. O meio basal mineral foi preparado com a solubilização de seus componentes em água ultrapurificada. Foi adicionado resarzurina (0,1%) como indicador de anaerobiose, na proporção de 1mL por litro de meio. O meio basal foi transferido para os reatores onde foi esterilizado em autoclave, por 20 minutos, a 121°C, e 1atm.

Tabela 4. Composição do meio de cultura e soluções estoque.

Componentes	Concentração
Meio Basal Mineral	
NH ₄ Cl	1,490g/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,530g/L
NaCl	0,100g/L
KCl	0,097g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,100g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,100g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,005g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,001g/L
Soluções Estoques	
Sol. de Bicarbonato	1M (Tabela 5)
Sol. Redutora de Sulfeto de Sódio	0,2M (Tabela 5)
Sol. de Sulfato Ferroso	1 M (Tabela 5)
Sol. de Vitamina B ₁₂	0,1mM (Tabela 5)
Sol. de Elementos Traços	0,1mM (Tabela 5)
Sol. de vitaminas	0,1mM (Tabela 5)
Sol. de Selenito- Tungstato	0,1mM (Tabela 5)
Sol. de Tiamina	1M (Tabela 5)

Fonte: BELLER *et al.* (1996)

5.3.1. Preparação das soluções estoques

Cada solução estoque foi preparada nas proporções descritas na Tabela 5 e todas foram esterilizadas em membrana 0,22 µm em conjunto de filtração previamente esterilizado em autoclave (120°C, 1atm, durante 20 minutos), e preparadas de acordo com as técnicas para anaeróbios estritos descritas por VAZOLLER (1995). Depois de filtradas separadamente, as soluções estoques foram transferidas para frascos de 30 mL estéreis, sob

fluxo de N₂ (100%), tampados, lacrados e etiquetados. Todos os procedimentos foram realizados sob assepsia, para evitar a contaminação dessas soluções.

A solução de bicarbonato de sódio foi preparada adicionando-se o sal em água ultrapurificada, pré-aquecida e posteriormente submetida à esterilização. Para a solução redutora de sulfeto de sódio, a água ultrapurificada foi submetida à fervura durante 10 minutos e depois colocada sob fluxo de N₂ (100%). O mesmo procedimento foi realizado na preparação da solução de sulfato ferroso, evitando-se, assim, a oxidação do cátion.

A solução de vitaminas foi preparada em tampão fosfato de sódio 10mM, e pH 7. As vitaminas foram dissolvidas na solução tampão e depois submetida à esterilização por filtração. As soluções de vitamina B₁₂, elementos traços, mistura de vitaminas e tiamina, foram distribuídas separadamente nos frascos de antibiótico, posteriormente selados com tampa de butila e lacrados. Os frascos foram envolvidos com papel alumínio e colocados em geladeira.

As soluções estoques das fontes de carbono, de lactato de sódio e de acetato de sódio foram esterilizadas em autoclave nas mesmas condições descritas anteriormente. A solução de lactato de sódio foi obtida pela mistura de volumes iguais das soluções de ácido láctico 4M e hidróxido de sódio 4M. A concentração final foi de 2M. O pH da solução foi de 5,8, sendo corrigido para 7,0 com hidróxido de sódio 1M. A solução de acetato de sódio (2M) foi preparada dissolvendo-se o sal em água ultrapurificada, realizando-se a distribuição em frascos de antibióticos de 30mL, sob fluxo de N₂ (100%).

Tabela 5. Composição das soluções estoques.

Solução de Bicarbonato	
Água ultrapurificada	1000mL
NaHCO ₃	84g
Solução Redutora de Sulfeto de Sódio	
Água Ultrapurificada	1000mL
Na ₂ S.9H ₂ O	48g
Solução de Sulfato Ferroso	
Água Ultrapurificada	1000mL
FeSO ₄ .7H ₂ O	278,8g
Solução de Vitamina B12	
Água Ultrapurificada	1000mL
Cianocobalamina	0,05g
Solução de Elementos Traços	
Água Ultrapurificada	987,0mL
HCl (7,7M)	12,50mL
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,100g
H ₃ BO ₃	0,030g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,100g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,190g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024g
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,002g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,036g
Solução Selenito Tungstato	
Água destilada	1000mL
NaOH	0,400g
Na ₂ SeO ₃	3,950g
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,008g
Solução de Vitaminas	
Tampão Fosfato de Sódio (10 mM; pH 7)	1000mL
4-Ácido Aminobenzóico	0,04g
D(+)-Biotina	0,01g
Ácido Nicotínico	0,1g
Pantotenato de Cálcio	0,05g
Dihidrocloreto de Piridoxina	0,15g
Solução de Tiamina	
Tampão Fosfato de Sódio (25 mM; pH 3,4)	1000mL
Tiamina Clorídrica.2H ₂ O	1,0g

Fonte: WIDDEL & BAK (1992)

5.3.2. Solução de Tolueno

A solução estoque de tolueno foi preparada em balão volumétrico adicionando-se 0,50 mL de tolueno P.A (Mallinckrodt) em 1000 mL de água Ultrapurificada. Obteve-se, assim, a solução de tolueno com a concentração de aproximadamente 433 mg/L. Em cada ensaio ou etapa onde foi usado tolueno, solução estoque recente foi preparada de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

5.4. Ensaio de Enriquecimento

Para o ensaio de enriquecimento, foram usados quatro frascos de *Duran* como reatores, com capacidade para 2000 mL. Os frascos foram preenchidos com 900 mL de meio de cultura acrescido das soluções estoques e 100 mL de inóculo, compondo, assim, a porção líquida do reator. A porção superior livre do frasco, o *headspace*, foi ocupada pela atmosfera gasosa formada pela mistura padrão de N₂/CO₂ (70%/30%). Os frascos foram fechados com tampas de butila e roscas de plástico.

Os reatores em batelada foram alimentados com meio descrito por BELLER *et al.*, (1996) (Tabela 4), soluções estoque (Tabela 5) e inóculo nas proporções descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Composição nutricional do reator em batelada no ensaio de enriquecimento.

Meio de cultura	Concentração
Meio basal	832,5mL
Solução de metais traço	1mL
Solução de Bicarbonato de Sódio	30mL
Solução de Selenito-Tungstato	1mL
Solução de Vitaminas	1mL
Solução de Tiamina	1mL
Solução de Vitamina B ₁₂	1mL
Solução Redutora de Sulfeto de Sódio	7,5mL
Solução de Sulfato Ferroso	10mL
Lactato de sódio	20mL
Acetato de sódio	5mL
Inóculo	100mL
Volume Total	1010mL
<i>Headspace</i> (N ₂ /CO ₂) (70%/30%)	990mL

O meio foi distribuído nos frascos de Duran e posteriormente, os reatores foram fechados com papel alumínio e recobertos com papel pardo para serem esterilizados em autoclave (121°C e 1 atmosfera, por 20 minutos).

Como mencionado anteriormente, esse meio foi composto de meio basal e soluções estoques, as quais foram adicionadas ao meio basal no momento de inoculação dos reatores.

O ensaio de enriquecimento foi realizado em quadruplicata. No primeiro par de reatores foi monitorado o consumo de sulfato, enquanto no segundo par, foi monitorada a percentual de metano. Como substratos orgânicos, foram usados 2230 mg/L de lactato e 670 mg/L de acetato. Como fonte de enxofre, foi usado sulfato ferroso, na concentração média de 1075 mg/L. Os substratos orgânicos e o sulfato foram adicionados no meio basal como soluções estoques, esterilizadas em autoclave e por filtração em membrana, respectivamente. Os reatores foram mantidos em incubadora com agitação de 150 rpm (DOMINGUES, 2001) e temperatura de 30°C.

Nesse ensaio, os reatores foram monitorados diariamente em relação ao consumo de sulfato e percentual de metano. Os ácidos orgânicos voláteis foram monitorados no início e final do ensaio.

5.5. Ensaio de Estabilização do Tolueno no meio BRS

Para esse ensaio foi necessário calibrar os frascos de antibiótico para que todos possuíssem o mesmo volume interno. Cada frasco, limpo e seco, foi numerado com caneta de retroprojeter, pesado e sua massa anotada.

O passo seguinte foi pesar cada frasco preenchido com água. Nessa etapa, cada frasco foi totalmente preenchido com água destilada, e posteriormente fechado com tampa de butila revestida de teflon. Foi tomado o cuidado para que não ficasse bolha de ar no interior do frasco e para que o mesmo ficasse totalmente seco do lado externo. Feito isso, cada frasco foi pesado e anotado sua massa com água. Foi usada uma única tampa de massa conhecida para fechar os frascos e no final da pesagem com água.

Com os valores das massas dos frascos vazios e cheios, e considerando a densidade da água de 1g/ml foi possível encontrar o volume de cada frasco, descontando-se a massa

da tampa usada na pesagem com água. O frasco de antibiótico com menor volume foi referente a 37,27mL. Esse volume foi usado para aferir os demais frascos. Desse modo, o volume dos frascos foi corrigido com pérolas de vidro (densidade= 2,47 g/ml) deixando-os com volumes internos idênticos.

Os frascos foram inoculados de forma que a fase líquida ocupasse o mesmo volume da fase gasosa. Para isso, metade do volume de cada frasco, ou seja, 18,67 mL, foi preenchido com meio BRS (Tabela 4 e 5) e tolueno (18 mg/L). O meio basal e a solução de sulfato (1000 mg/L) foram colocados nos frascos e submetidos à atmosfera de N₂/CO₂.

Posteriormente, os frascos foram tampados com tampas de butila revestida com teflon e lacrados com alumínio. A seguir, o tolueno foi injetado com auxílio de seringa de vidro SGE de 10mL. A partir da solução estoque de tolueno, com a concentração de aproximadamente 433mg/L, foi injetada a quantidade de 0,77mL obtendo-se a concentração final de 18 mg/L, em cada frasco. O objetivo desse teste foi conhecer o tempo necessário para o equilíbrio de distribuição do tolueno entre a fase líquida e o *headspace* do tolueno. Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm. As amostragens foram realizadas nos seguintes tempos, em horas: 0, 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8 e 24.

Foram usados nove frascos, sendo cada um, utilizado para cada tempo de amostragem. Para determinação do tolueno na fase gasosa (*headspace*), foi usada seringa de vidro do tipo *gastigh* e injeção em cromatógrafo gasoso GC 6890 HP. A fase líquida foi coletada com auxílio de seringa de vidro e agulha descartável, após amostragem do *headspace*. A amostra líquida foi submetida ao método do *headspace* estático, de acordo com a metodologia descrita por NARDI (2002).

5.6. Ensaio de degradação

O ensaio de degradação foi realizado em três etapas. As duas primeiras etapas constaram de seis reatores com três diferentes concentrações de tolueno e de sulfato. A terceira etapa constou de 12 reatores nas condições sulfetogênicas e metanogênicas.

Cada reator foi inoculado com 120mL de lodo homogeneizado (10% v/v) totalizando volume da fase líquida em 1200mL e da fase gasosa em 1100mL.

No final do ensaio foram retiradas amostras para análise da diversidade microbiana utilizando-se as técnicas de Biologia Molecular. Para tanto, as amostras foram congeladas em freezer a -20°C , em frascos de poliestireno com tampas de rosca.

Na primeira etapa experimental os reatores foram monitorados em relação à presença de tolueno no *headspace* e no líquido, em amostragens diárias. A porcentagem de metano no *headspace* também foi analisada diariamente. No entanto, nesses experimentos foi analisada a porcentagem acumulada de metano nos reatores em batelada. O sulfato foi analisado nos tempos zero, 24 horas e 48 horas, e depois, em intervalos de 48 horas. A Tabela 7 apresenta as condições nutricionais dos reatores da primeira etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas.

Tabela 7. Concentrações de tolueno e de sulfato nos reatores da primeira etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas.

Concentração Inicial de Tolueno na Fase Líquida (mg/L)	Concentração Inicial de Tolueno na Fase Gasosa (mg/L)	Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)
2,0	0,016	Ausência
1,31	0,020	Ausência
0,88	0,014	90
0,39	0,014	130
2,0	0,043	288
2,1	0,037	269

Na segunda etapa experimental, os reatores foram monitorados em relação à presença de tolueno apenas na fase líquida com amostragens diárias. Como na etapa anterior, a percentual de metano acumulada no *headspace* foi analisada diariamente. O sulfato foi analisado nos tempos zero, 24 e 48 horas, e depois, em intervalos de 48 horas. A Tabela 8 apresenta as condições nutricionais utilizadas na segunda etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas.

Tabela 8. Concentrações de tolueno e de sulfato nos reatores da segunda etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas.

Concentração Inicial de Tolueno na fase líquida (mg/L)	Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)
2,1	Ausência
1,9	Ausência
4,6	Ausência
4,0	Ausência
4,5	560
3,5	570

Na terceira etapa de degradação foram usados 12 reatores, sendo 6 em condições sulfetogênicas e 6 em condições metanogênicas. A Tabela 9 apresenta as condições nutricionais dos reatores da terceira etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas.

Tabela 9. Concentrações de tolueno e de sulfato nos reatores da terceira etapa de degradação de tolueno em condições sulfetogênicas e metanogênicas.

Concentração Inicial de Tolueno na Fase Líquida (mg/L)	Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)
<u>Reatores Sulfetogênicos</u>	
2,11	194
2,33	220
7,38	600
7,72	610
<u>Reatores Metanogênicos</u>	
1,98	Ausência
1,93	Ausência
3,89	Ausência
3,7	Ausência
7,53	Ausência
7,21	Ausência

5.7. Exames Microbiológicos

Análises microbiológicas dos reatores foram realizadas nos momentos em que a percentual de metano apresentou-se estável em três análises consecutivas. Foram usadas as técnicas de microscopia ótica de contraste de fase e epifluorescência com Microscópio *Olympus BX60*, acoplado à câmara com captura de imagem *Optronics* e *software Image-Pro Plus*.

5.8. Procedimentos para Análises Físico-Químicas

No decorrer dos ensaios foram realizadas análises de consumo de sulfato (STANDARD METHODS, 1992). As amostras foram coletadas retirando-se alíquotas de cada reator com auxílio de seringa e agulha estéreis. O volume da amostra dependia da diluição que seria feita. Deve-se mencionar que o volume total de retirada de amostras foi de 10% em relação ao volume líquido total de cada frasco reator.

As amostras foram colocadas em tubos de poliestireno com tampas de rosca e centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo, em membrana de 0,45 μ m.

A diluição das amostras foi realizada em água ultrapurificada com auxílio de balões volumétricos de 50mL. A diluição das amostras foi necessária para adaptar às concentrações da curva de calibração do método utilizado.

5.9. Sólidos voláteis totais

A quantificação de sólidos voláteis totais foi realizada de acordo com STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1992). A análise foi realizada em triplicata, em cápsulas de porcelana, com amostras do início e final de cada reator com lodo anaeróbio.

5.10. Procedimentos para Análises Cromatográficas

Nos ensaios de enriquecimento, de inativação e de degradação foi realizada diariamente cromatografia gasosa para quantificar a percentual de metano. Foi usada seringa de plástico de 1mL e trava para gás e cromatógrafo *Gow-Mac*.

O consumo de tolueno foi determinado de acordo com a metodologia descrita por NARDI (2002). As amostragens foram diárias com auxílio de seringas de vidro e agulhas estéreis. As amostras, de 5mL, foram congeladas em frascos de antibióticos tampados com tampas de butila revestidas de teflon e lacradas com alumínio. Posteriormente, no momento da análise os frascos contendo as amostras, foram aquecidos por quinze minutos em *banho-maria*. Com auxílio de seringa de vidro pré-aquecida em estufa a 200°C, amostra do *headspace* dos frascos foi injetada em cromatógrafo gasoso HP GC 6890 com detector de ionização de chama (FID). Os frascos usados foram os de antibiótico de 10mL com volumes corrigidos com pérolas de vidro.

A determinação cromatográfica de ácidos voláteis foi feita de acordo com metodologia desenvolvida no próprio Laboratório de Processos Anaeróbios por MORAES *et al* (2000).

5.11. Curva de calibração de tolueno

O tolueno foi quantificado por cromatografia gasosa após levantamento de curvas de calibração constituída com soluções padrões de tolueno em meio de cultura. As concentrações dos padrões de tolueno variaram de 0,1mg/L a 5mg/L. Monoclorobenzeno foi usado como padrão interno. Foram usados frascos de antibiótico com volumes internos padronizados com pérolas de vidro, tampas de butila revestidas de teflon e lacres de alumínio. As curvas foram elaboradas com duplicata de pontos.

A quantificação do tolueno no *headspace* exigiu elaboração de curva padrão de *headspace*. Para isso, foram usados frascos de antibiótico (40 mL) com volumes internos padronizados. Em cada frasco foi colocada a solução padrão de tolueno em meio de cultura e os frascos foram fechados e lacrados. Os frascos foram deixados por 24 horas em incubadora (100 rpm) a 30°C para que o equilíbrio de distribuição do tolueno fosse atingido. Alíquotas de 300 µL do *headspace* foram injetadas no cromatógrafo seguida da

retirada de 2mL da porção líquida, para posterior quantificação do tolueno. A quantidade de tolueno presente no *headspace* dos frascos foi calculada pela diferença entre a quantidade injetada e a determinada no líquido.

5.12. Técnicas de Biologia Molecular

5.12.1. Extração dos Ácidos Nucléicos

Para a extração do material genético foi utilizado o protocolo de MELVIN & MELVIN & HOBSON (1994) como descrito a seguir:

- Centrifugar 3,0 mL (pode ser até 10 mL) da amostra de lodo (tubo de polipropileno), a 6000 RPM por 2 minutos, descartar o sobrenadante;
- Lavar o pellet com 3,0 mL PBS (pH 7,4), centrifugar a 6.000 rpm por 3 minutos;
- Ressuspender o precipitado com 1,0 mL de tampão TESC (pH 8,3);
- Congelar a amostra a -80°C por 15 minutos (ou *over night* à -20°C);
- Descongelar a amostra, em seguida, centrifugar por 3 minutos, descartar o sobrenadante;
- Ressuspender o *pellet* em 300 μL de tampão TESC;
- Adicionar 5,0 μL de *DMSO a esse volume;
- Manter a amostra por 1 min à temperatura ambiente;
- Misturar a amostra usando vortex por 3 a 5 min;
- Adicionar os reagentes na seguinte ordem:
 - 500 μL de guanidina tiocianato 5M;
 - 500 μL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v);
- Agitar no vortex e centrifugar à 6.000 rpm por 10 min;
- Transferir a fase aquosa ($\pm 1,0\text{mL}$) para outro tubo;
- Adicionar 50% do volume da fase aquosa com acetato de amônio 7,5M (não precisa acertar o pH) ou acetato de sódio 3M (pH 5,0-6,0);
- Misturar e dividir em 3 tubos;
- Precipitar o DNA adicionando-se 2,5 volumes de etanol absoluto e agitar levemente;
- Centrifugar a amostra a 6.000 rpm por 10 min, descartar o sobrenadante;
- Lavar o DNA com 300 μL de etanol 70% invertendo-se o tubo várias vezes;
- Centrifugar a 6.000 rpm por 3 min e descartar o sobrenadante com cuidado;
- Secar em estufa a 37°C por 30 min ou em temperatura ambiente;
- Ressuspender o *pellet* em 50-100 μL de tampão TE (pH 8,3) ou água ultrapurificada estéril. Guardar o produto da extração em geladeira a $4,0^{\circ}\text{C}$.

* Substância tóxica – manipular com cuidado e luva.

Obs: As soluções PBS, TESC, DMSO e TE foram preparadas segundo SAKAMOTO (2001).

5.12.2. Amplificação do DNA pela Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A partir do DNA extraído da amostra, foram obtidos fragmentos de DNAr 16S através da amplificação por PCR com *primers* homólogos às regiões conservadas do RNAr 16S. Neste trabalho foram usados *primers* para o domínio *Bactéria* e domínio *Archaea*. Os *primers* utilizados na amplificação e as suas condições estão descritos na Tabela 11.

Foi usado termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (*Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.*) para a realização da PCR. Na amplificação do material genético foram usados os procedimentos descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Solução Mix da PCR, para uma amostra.

Nº de amostras	DH ₂ O	10 x Tampão PCR (1,5mM MgCl ₂)	dNTP (2mM)	Primer forward (100pmol/L)	Primer reverse (100pmol/L)	Ampli Taq (5 U/µL)	Template
1	40,7µL	5 µL	0,4 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,4 µL	1 µL

Tabela 11. Programas utilizados na Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).

Condição da PCR	<i>Bacteria</i> Primer 968fGC – 1392R (Nielsen <i>et al.</i> , 1999)	<i>Archaea</i> Primer 1100fGC – 1400R (Oyaizu <i>et al.</i> , 2000; Kudo <i>et al.</i> , 1997)
Número de ciclos	35	35
Desnaturação inicial	94° C 5 minutos	94° C 90 segundos
Desnaturação	94° C 45 Segundos	94° C 30 segundos
Anelamento	38° C 45 Segundos	55° C 30 segundos
Extensão	72° C 1 minuto	72° C 90 segundos
Final da extensão	72° C 5 minutos	72° C 3 minutos
Resfriamento	4° C	4° C
	CONTROLE POSITIVO: 1) <i>Pseudomonas</i> 2) <i>Allocromatium vinosium</i> – DSM 183	CONTROLE POSITIVO: 1) <i>Halobacterium salinarum</i> - DSM 668 2) <i>Haloferax volcanii</i> – DSM 3757
	CONTROLE NEGATIVO 1) <i>Halobacterium salinarum</i> - DSM 668 2) <i>Haloferax volcanii</i> – DSM 3757	CONTROLE NEGATIVO 1) <i>Pseudomonas</i> , 2) <i>Allocromatium vinosium</i> – DSM 183

5.12.3. Eletroforese em Gel de Agarose.

Essa etapa experimental comumente é utilizada para avaliar o produto resultante da extração do ácido nucléico e da amplificação do gene por PCR. O procedimento experimental é o mesmo, diferindo apenas na concentração de agarose e no marcador. Assim, para verificar o produto do ácido nucléico, a concentração de agarose foi de 1% e o marcador foi o λ *Hind* III *fragment*. Para avaliar o produto da amplificação por PCR a concentração de agarose foi de 1,5%, e o marcador é o ϕ K 174 *HAE* III *digest*. O procedimento dessa etapa experimental está apresentado abaixo:

- Preparar as soluções 1% ou 1,5 %, de agarose mais solução tampão TAE X 1;
- Preparar a “bandeja,” colando fita crepe dos lados;
- Despejar o gel na “bandeja” em seguida colocar o “pente”, para formar as cavidades (poços);
- Esperar 30 minutos para o gel solidificar;

- Retirar o “pente” e a fita crepe;
- Preparar a amostra no parafilme usando 5,0 µL de extrato de ácido nucléico ou produto do PCR com 2,0 µL de *loading dye*;
- Misturar bem a amostra com auxílio de uma pipeta automática;
- Transferir as amostras nas “cavidades” do gel;
- Colocar a bandeja no aparelho, neste trabalho utilizou-se o *Pharmacia Biotech GNA 100* (com programação de 75 V constante, por 30 minutos), e submergir em tampão TAE X 1;
- Transferir o gel para vasilha com brometo de etídio* com auxílio de espátula e deixar por 15 minutos;
- Lavar o gel em outra vasilha, com água ultrapurificada, por 5 minutos;
- Colocar na câmara de transiluminador UV (*Stratagene® - Eagle Eye II*).

* Brometo de etídio é substância cancerígena, assim o reagente deve ser manipulado sempre com luva e muito cuidado. O tampão TAE foi preparado utilizando a metodologia descrita por SAKAMOTO (2001).

5.12.4. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

Essa análise tem por objetivo a separação dos fragmentos dos genes amplificados por PCR. A separação desses fragmentos ocorre de acordo com o grau de desnaturação da dupla hélice de DNA sob a ação de agentes desnaturantes (formamida e uréia). O procedimento dessa análise é descrito a seguir:

- Preparar a solução do gel na concentração desejada. Neste trabalho, utilizaram-se soluções de concentrações 0%, 35% e 55%, preparadas de acordo com a Tabela 12;
- Dissolver a uréia nos reagentes líquidos e completar o volume até 100mL, com água **ultrapurificada**;

Tabela 12. Procedimentos para o preparo da solução do gel gradiente desnaturante.

Concentração do gel – DGGE (%)	0%	35%	55%
40% de gel de acrilamida (mL)	20	20	20
Solução de 50 x TAE (mL)	2	2	2
Formamida (mL)	0	14	22
Uréia (g)	0	14,7	23,1

Fonte: SAKAMOTO, 2001

- Preparar o “sanduíche” com Kit de placas de vidro e suporte;
- Preparar os três géis, utilizando-se a solução descrita na Tabela 12, da seguinte forma:
 - em tubos de centrífuga* de 15mL, adicionar 14mL da solução de 60%, 100µL de 10% APS; 10µL de temed**.
 - em tubos de centrífuga* de 15mL, adicionar 14mL da solução de 30%, 100µL de 10% APS; 10µL de temed**.
 - em tubos de centrífuga* de 15mL, adicionar 3mL da solução de 0%, 20µL de 10% APS; 2µL de temed**.
- * os tubos de centrífuga com as soluções foram mantidos em gelo, enquanto foi realizada a preparação dos géis;
- ** o temed foi adicionado por último, pois este reagente provoca a solidificação do gel.
- Transferir os géis (35% e 55%) simultaneamente para o “sanduíche” de placas de vidro, com auxílio de duas seringas presas ao aparelho injetor;
- Após 10 minutos, colocar uma placa semelhante a um pente, para formar os “poços”. Em seguida, adicionar a solução do gel 0%;
- Aguardar, no mínimo, 1 hora, ou uma noite, para os géis solidificarem;
- Preparar a “câmara eletroforética”, adicionando-se 140mL de 50xTAE e completar para 7 litros, com água ultrapurificada;
- Colocar para aquecer a solução à temperatura de 65°C, no entanto, na “corrida do gel”, utilizar temperatura constante de 60°C;
- Quando a temperatura da “câmara eletroforética” atingir os 65°C, transferir o “sanduíche” para essa câmara;
- Retirar o “pente” e lavar as células ou cavidades formadas pelo “pente” no gel, com solução tampão, utilizando micropipetas;
- Preparar as amostras, misturando 20µL de amostra (“template”) com 4µL de 6 x *loading dye*;
- Transferir a mistura (amostra + corante) para os “poços” do gel;
- Ligar a bomba de agitação e conectar nos eletrodos, à voltagem de 130V;
- Após o tempo de “corrida” (6 horas) do gel, adicionar a solução Brometo de etídio, aguardar 15 minutos;
- Colocar o gel na câmara de transiluminador UV (*Stratagene*[®] - *Eagle Eye II*).
- Fazer a leitura do resultado (nesse caso foi utilizado o *software Eagle Eye II*).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Ensaio de Enriquecimento

Esse ensaio serviu para verificar o potencial do lodo para desenvolver-se em condições sulfetogênicas, testar o meio descrito por BELLER *et al.* (1996), e avaliar o lodo como fornecedor de consórcio microbiano com capacidade de crescimento frente à fonte de carbono, em relação ao consumo de sulfato e percentual de metano.

De acordo com as Figuras 3 e 4, o lodo apresentou boa adaptação ao meio, com consumo de sulfato e percentual de metano. Nos reatores em batelada ocorreu o consumo de aproximadamente 99,98% de sulfato em 168 horas de operação, a partir da concentração média inicial de 1070 mg/L. A percentual de metano atingiu valor próximo a 30% a partir do terceiro dia de ensaio, permanecendo constante até o fim do experimento.

Nas observações microscópicas, foi verificada diversidade morfológica destacando a presença de bacilos, cocos e bacilos com as extremidades afiladas, e sarcinas não fluorescentes, indicando, provavelmente, a presença de BRS. Foi verificada também, a presença de *Methanosarcina* e bacilos fluorescentes, confirmando a presença de arqueas metanogênicas. A Figura 5 apresenta as principais morfologias observadas nos reatores de enriquecimento e a Tabela 10 descreve todos os tipos morfológicos em tal condição.

CATTONY *et al.* (2002), utilizando o mesmo meio de cultura com lactato (2200 mg/L) e etanol (400mg/L) como fontes de carbono na presença de 960 mg/L de sulfato, obtiveram produção de 35% de metano e consumo total de sulfato em 120 horas de ensaio. Os autores observaram a produção de acetato e propionato, os quais podem ser formados pela oxidação incompleta do lactato e do etanol (VAN ES *et al.*, 1984)⁶ *apud* CATTONY *et al.* (2002). Nessas condições, as principais morfologias observadas foram bacilos ovalados, filamentos e cocos, com pequena presença de vibrios.

⁶ VAN ES, F.B.; LAAMBROEK, H.J.; VELDKAMP, H. (1984). Aspects of Microbial Metabolism and Ecology. Cap. 1: Microbial Ecology – An Overview. Published for the Society for General Microbiology by Academic Press.

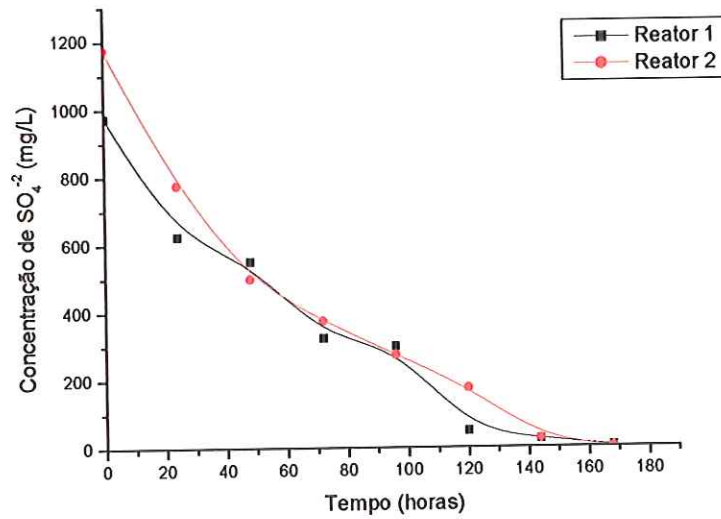


Figura 3. Variação temporal de sulfato no ensaio de enriquecimento nos reatores em batelada.

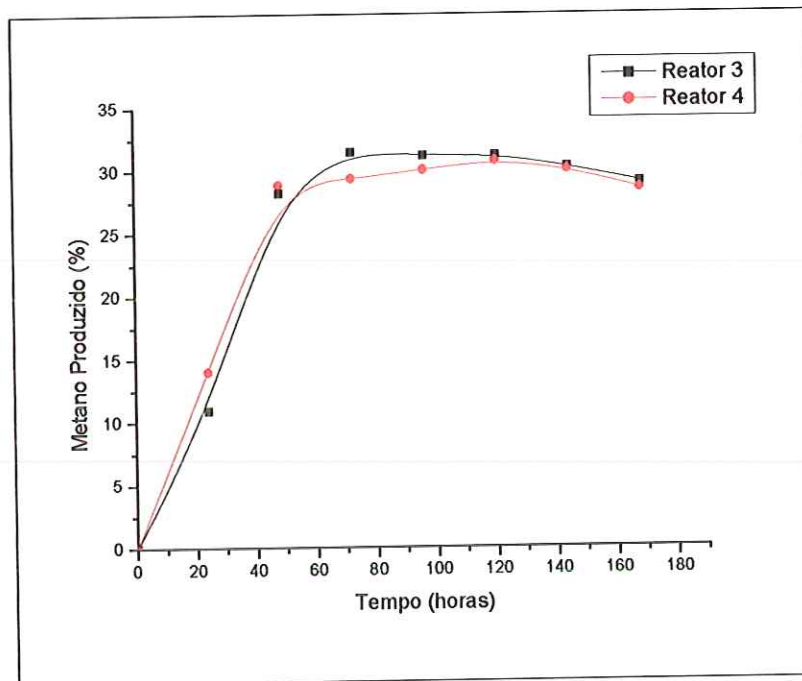


Figura 4. Variação temporal de metano no ensaio de enriquecimento nos reatores em batelada.

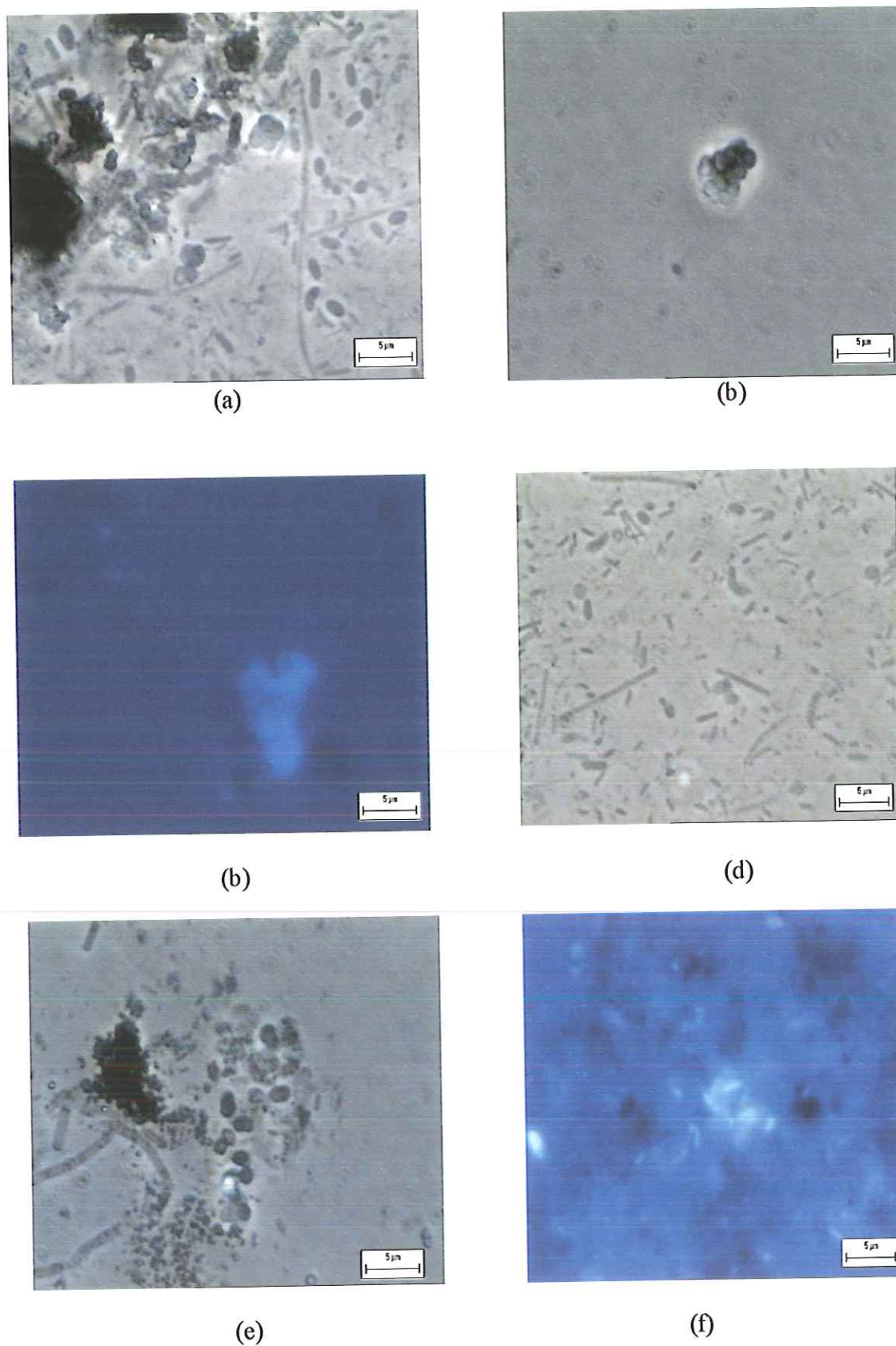


Figura 5. Microscopia ótica de contraste de fase e fluorescência de morfologias observadas no ensaio de enriquecimento com lactato, acetato e sulfato: (a) cocos, bacilos e filamentos; (b) estafilococos; (c) *Methanosarcina* sp.; (d) células dispersas; (e) cocos e (f) bacilos fluorescentes.

Tabela 10. Diversidade morfológica observada no ensaio de enriquecimento.

Morfologias	Condições	Ensaio de Enriquecimento
		Lactato 2230 mg/L Acetato 670 mg/L Sulfato 1070 mg/L
Arqueas Metanogênicas		
<i>Methanosarcina</i> sp.		+++
<i>Methanosaeta</i> sp.		++
Cistos de sarcinas		++
Bacilos fluorescentes		++
Cocos fluorescentes		+
Bactérias		
Bacilos com extremidades afiladas		+
Bacilos com extremidades arredondadas		++++
Bacilos curvos		+
Bacilos delgados		++++
Bacilos ovalados		++
Bacilos		+
Cocos		+++
Cocos em cadeia		++
Filamentos		++
Filamento septado		++
Estafilococos		+++

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

Como mencionado anteriormente, os reatores de enriquecimento foram alimentados com lactato de sódio, acetato de sódio e sulfato ferroso. Nesse sentido, as concentrações médias iniciais desses compostos foram iguais a 2230, 670 e 1070 mg/L, respectivamente. Após 24 horas, o lactato foi totalmente consumido, e, nesse mesmo período, ocorreu consumo de aproximadamente 35% de sulfato e percentual de 12,5% de metano. Esses resultados confirmam a preferência nutricional das BRS pelo ácido láctico (WIDDEL, 1988). Além disso, provavelmente, sob tais condições estiveram presentes bactérias fermentativas e metanogênicas.

Em relação ao ácido acético, ocorreu consumo distinto nas duplicatas dos reatores em batelada. Ou seja, a porcentagem de consumo, nesse período, foi de aproximadamente 96,5% e 90,5% após 24 horas, considerando-se a concentração de 21,4mg/L e 69 mg/L, respectivamente. Em ambos os reatores, esse substrato orgânico não foi detectado no tempo de 168 horas.

Pela análise cromatográfica foi possível detectar a produção, e posterior consumo, de ácido propiônico e ácido isobutírico (Tabela 12). A produção foi simultânea ao consumo dos ácidos láctico e acético. Provavelmente, a cultura enriquecida utilizou os primeiros substratos



para a redução do sulfato. Esses resultados sugeriram o estabelecimento de relação sintrófica entre os diversos grupos de organismos anaeróbios.

Deve-se mencionar, também, que o inóculo era predominantemente metanogênico (HIRASAWA, 2003) e apresentava concentração de sólidos totais voláteis de 45g/L. Como mencionado anteriormente, no ensaio de enriquecimento foi utilizada concentração inicial de, aproximadamente 4,5 gSTV/L. No final do ensaio de enriquecimento (168 horas) a concentração média de sólidos totais voláteis foi de 3,7 g/L (Tabela 11). Esse decaimento sugeriu seleção microbiana em relação a condição nutricional, ou seja, com meio BRS, acetato de sódio (670 mg/L), lactato de sódio (2240,7 mg/L) e sulfato de sódio (1075 mg/L). No entanto, sob tais condições a redução do sulfato foi adequadamente favorecida.

Tabela 11. Resultados de Sólidos Totais Voláteis do lodo inicial e após ensaio de enriquecimento.

Sólidos Totais Voláteis	
Lodo do reator UASB	45g/L
Lodo após ensaio de enriquecimento	
975mg/L SO ₄ ⁻²	3,6g/L
1175mg/L SO ₄ ⁻²	3,8g/L

Tabela 12. Valores de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência de amostras do ensaio de enriquecimento.

Condições iniciais (mg/L)	Tempo	Ácidos Voláteis (mg/L)	Amostra inicial		
			- tempo zero	24 horas	168 horas
Lactato 2124,4		Propiônico	ND*	147,6	4,95
Acetato 612,8		Isobutírico	60,4	56,8	18
Sulfato 975					
Lactato 2357		Propiônico	47,8	152	1,85
Acetato 729,8		isobutírico	68,2	68,6	20,15
Sulfato 1175					

* ND - não detectado. Limite inferior de detecção < 2 mg/L.

6.2. Quantificação do tolueno

O tolueno líquido, formado por moléculas apolares com ponto de ebulição de 111°C, tem tendência a vaporizar-se. Em reator em batelada, hermeticamente fechado, agitado (100 rpm) e temperatura de 30°C, parte do tolueno dissolvido no meio aquoso, passou, juntamente com a água, para a fase de vapor e permaneceu no *headspace* do frasco. Com esse ensaio, foi possível determinar o tempo em que a fase líquida e de vapor do composto entraram em equilíbrio. É importante lembrar que este ensaio foi realizado na ausência de inóculo. De acordo com os resultados apresentados na Figura 6, o equilíbrio ocorreu a partir de oito horas de ensaio. Desse modo, para ensaios em reatores em batelada, provavelmente, seja adequado proceder a amostragens após esse período, visando não interferir no equilíbrio das fases.

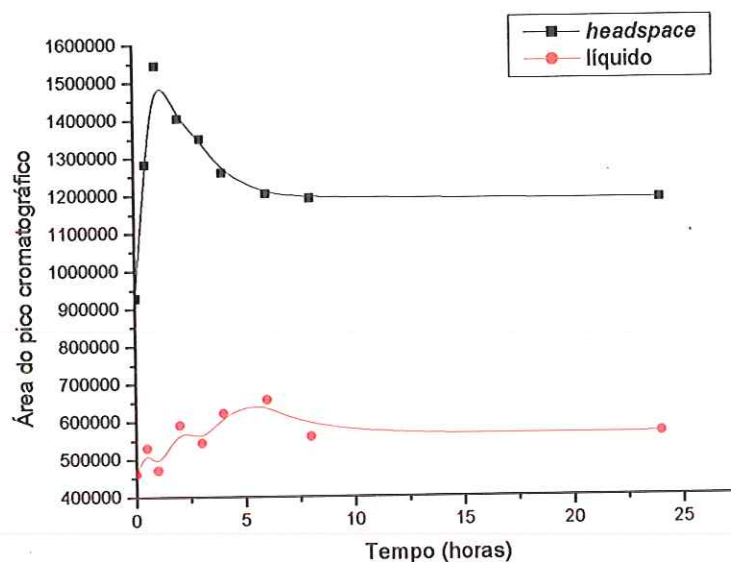


Figura 6. Estabilização do tolueno nas fases líquida e gasosa em meio BRS em reator em batelada.

Além deste procedimento foram realizados, também, ensaios em reatores em batelada com diferentes concentrações iniciais de tolueno e sulfato, visando obter informações em relação à degradação e a distribuição nas fases líquida e gasosa. Para tanto, foram montados seis reatores anaeróbios (Figura 2) com concentrações de tolueno e sulfato descritas na Tabela 13. Os resultados mostraram que a quantidade de tolueno presente no *headspace* dos reatores foi reduzida, permanecendo na faixa de 0,013mg/L a 0,037mg/L, para concentrações iniciais na fase líquida de 0,39mg/L e 2mg/L, respectivamente (Figura 7).

Tabela 13. Concentrações iniciais de tolueno no líquido e *headspace*, de sulfato e metano acumulado em função do tempo.

Tolueno (mg/L)			Sulfato		Metano Acumulado	
Líquido	<i>Headspace</i>	Valor Médio do <i>Headspace</i>	Concentração Inicial (mg/L)	Tempo necessário para 100% de consumo (horas)	% máximo	Tempo (horas)
0,39	0,014	0,013	130	48	7,2	264
0,88	0,014	0,015	90	48	9,3	264
1,31	0,020	0,021	—	—	9,3	264
2,0	0,016	0,017	—	—	10,6	264
2,0	0,043	0,037	288	192	3,1	264
2,1	0,037	0,033	269	192	4,0	264

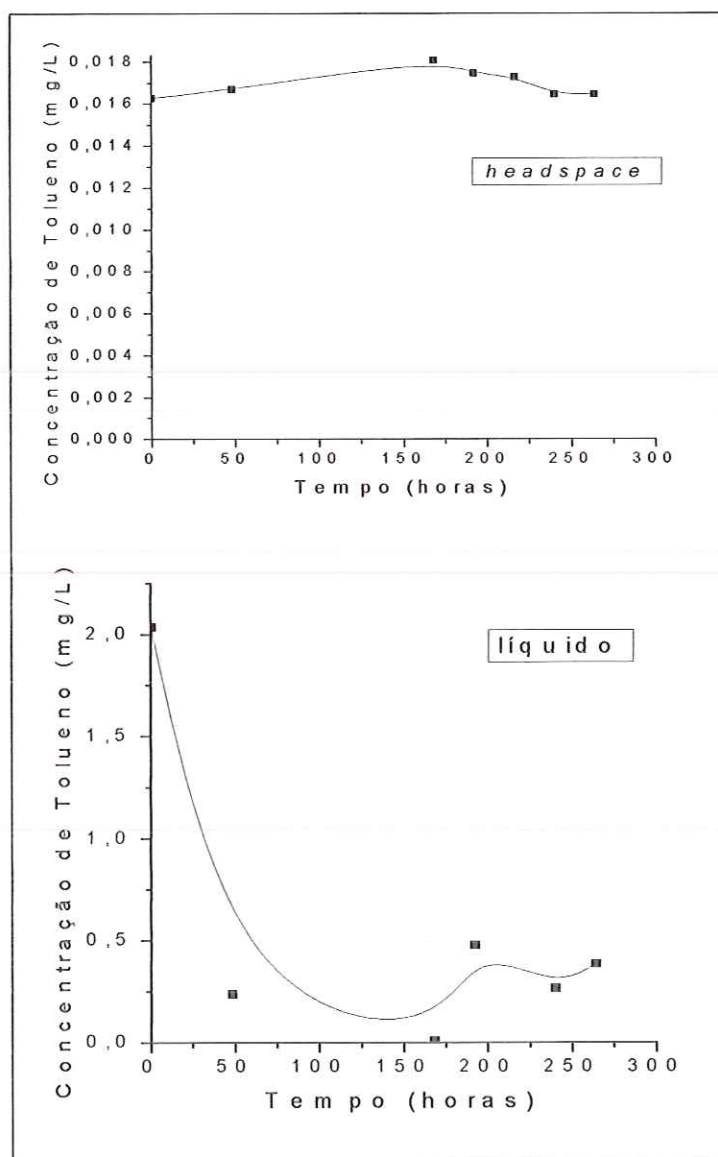


Figura 7. Concentração do tolueno em função do tempo no *headspace* e no líquido do reator em batelada alimentado com 2,0mg/L de Tolueno na ausência de Sulfato.

Os trabalhos de EDWARDS & GRBIC-GALIC (1994), com sedimento proveniente de aquífero contaminado com creosoto e pentaclorofenol, na presença de 30 μ M de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, e de LOVLEY *et al.* (1995), em ensaios em batelada com sedimento contaminado com hidrocarbonos na presença de tolueno (1 μ M) e benzeno (1 μ M), monitoraram o tolueno presente no líquido e no *headspace* dos reatores através de cromatografia gasosa. COSCHIGANO *et al.* (1998), usando cultura pura na presença de 0,3mM a 0,5mM de tolueno, e MECKENSTOCK (1999), usando cultura pura com células planctônicas na presença de 70 μ M a 100 μ M de tolueno, quantificaram o tolueno na fase líquida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

No entanto, em outros trabalhos como de ROCK & VEDI (1999), usando cultura pura com células planctônicas na presença de 1mg/L a 2mg/L de tolueno, e BELLER & EDWARDS (2000), usando consórcio metanogênico na presença de 92mg/L de tolueno, a quantificação foi realizada somente com alíquotas do *headspace* dos reatores.

Especificamente neste trabalho, com reatores sulfetogênicos e metanogênicos, foi possível constatar que a maior fração de tolueno ficava retida na fase líquida (Tabela 13). No entanto, os resultados mostraram variação na concentração do composto na fase líquida, como observado na Figura 7. Em relação a esse aspecto, pode-se mencionar que, provavelmente, ocorreram problemas de falta de homogeneização do tolueno no lodo biológico e também na preparação da amostra para análise cromatográfica. As amostras foram retiradas do reator, transferidas para frascos de vidro, centrifugados e o sobrenadante usado para determinação do tolueno. Esse procedimento foi usado visando limpar a amostra para posterior aplicação da metodologia de extração do tolueno pelo *headspace* estático, de acordo com a metodologia descrita por NARDI (2002).

No entanto, esse procedimento pareceu não ser o mais adequado devido às oscilações observadas em todos os ensaios dessa fase, não sendo possível observar a tendência de degradação do composto.

Como os testes de degradação do tolueno apresentaram resultados diferentes do esperado, sem quedas gradativas com o tempo, foram realizados ensaios para verificar possíveis falhas no método analítico.

Foram analisados 5 tipos de amostras preparadas com o meio BRS contendo 5,0 mg/L de tolueno em presença e ausência de lodo, assim preparadas:

1. Solução de tolueno com meio BRS. Amostra foi centrifugada (sem precipitado original);
2. Solução de tolueno com meio BRS completo (com precipitado original);
3. Solução de tolueno com meio BRS completo mais o lodo;

4. Solução de tolueno com meio BRS completo mais o lodo. Amostra foi centrifugada e filtrada;
5. Precipitado obtido em 4 e ressuspensão em água ultrapurificada.

A Tabela 14 apresenta os valores obtidos para cada amostra.

Tabela 14. Testes de quantificação do tolueno em meio BRS.

Teste 1 - Meio BRS centrifugado com 5 mg/L de Tolueno	Teste 2 – Meio BRS completo com 5 mg/L de Tolueno	Teste 3 – Meio BRS + Lodo com 5 mg/L de Tolueno	Teste 4 – Amostra centrifugada e filtrada de Meio BRS com lodo e 5 mg/L de Tolueno	Teste 5 – Amostra do Teste 4 ressuspensão em Água Ultrapurificada
6,7	4,5	5,6	1,1	1,7
6,5	4,1	5,8	1,0	1,4
4,4	4,2	6,3	0,7	1,7
6,0	4,2	6,0	1,2	1,8
6,5	4,6	5,8	1,2	1,6
Valor Médio = 6,0	4,3	5,9	1,0	1,6

Os resultados obtidos nesse ensaio (Tabela 14) permitiram verificar os seguintes aspectos: (1) na concentração avaliada, as amostras completas apresentaram ótima reprodutibilidade de resultados, mostrando que não houve falhas no método analítico, (2) a filtração da amostra provocou perda de cerca de 83% do tolueno, fato que inviabilizou a possibilidade de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), (3) cerca de 27% de tolueno ficou retido no lodo, (4) o processamento da amostra por centrifugação gerou grande perda de tolueno, o que foi verificado na quantidade de tolueno das amostras do teste 4 e teste 5 que, quando somadas, atingiram valor máximo de 3mg/L, metade do que era esperado.

6.3. Avaliação da Degradação Anaeróbia do Tolueno

De acordo com a Figura 8 os reatores com concentrações iniciais de sulfato iguais a 90 e 130 mg/L, utilizaram essa fonte de enxofre em 48 horas de ensaio. As porcentagens máximas acumuladas de metano nesses reatores foram iguais a 9,3% e 7,2%, respectivamente. Os reatores alimentados com concentrações iniciais de 288mg/L e 269mg/L de sulfato, utilizaram essa fonte de enxofre em 192 horas. Nesse período, as porcentagens acumuladas de metano foram de 3,1% e 4%, respectivamente. Nos reatores controle, sem sulfato, as porcentagens máximas acumuladas de metano foram 9,3% e 10,6% para concentrações

iniciais de tolueno na fase líquida iguais a 1,3mg/L e 2mg/L, respectivamente. Esses resultados indicaram metanogênese reduzida quando comparada com a porcentagem obtida no ensaio de enriquecimento, ou seja, na presença de lactato e acetato de sódio. Provavelmente, tais condições, não foram adequadas para o desenvolvimento das arqueas metanogênicas. A Figura 9 apresenta a porcentagem acumulada de metano nos reatores alimentados com tolueno na presença ou ausência de sulfato

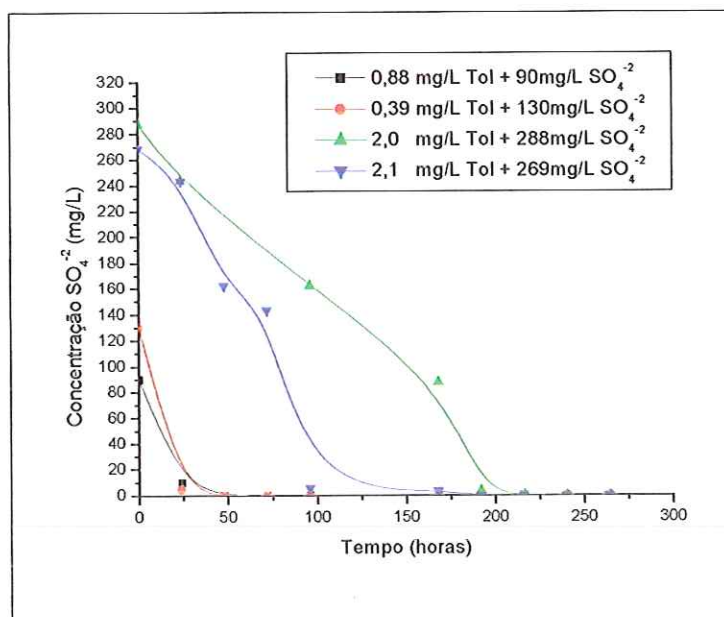


Figura 8. Variação temporal de sulfato em reatores alimentados com tolueno.

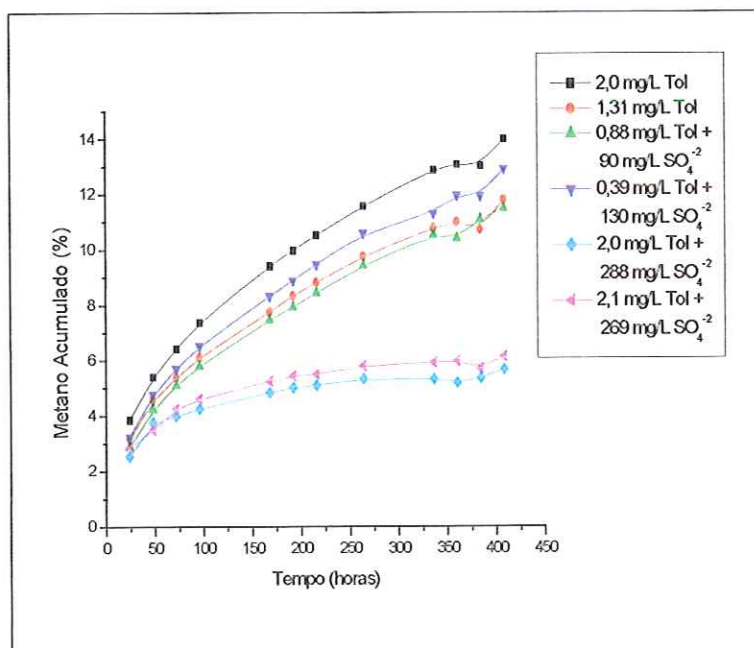


Figura 9. Variação temporal de metano nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato.

Pelas análises cromatográficas foram detectados ácidos orgânicos, como láctico, acético, propiônico, fórmico, isobutírico, isovalérico e valérico nos reatores na presença ou ausência de sulfato. Segundo a Tabela 15, a concentração do ácido acético foi de até 180mg/L, no reator alimentado com 2mg/L de tolueno e 288mg/L de sulfato. No entanto, para este ácido, não houve padrão de comportamento, independente da presença ou ausência de sulfato.

O outro ácido em maior concentração foi o isobutírico, com valores iguais a 130 mg/L e ligeiramente superiores nos reatores alimentados com sulfato. Os demais ácidos orgânicos (láctico, propiônico, fórmico, isovalérico e valérico) apresentaram-se em concentrações na faixa de 1,7mg/L a 40,3mg/L.

Os ácidos propiônico e isobutírico também foram verificados em amostras dos reatores de enriquecimento. Provavelmente, todos os ácidos orgânicos (acético, láctico, propiônico, fórmico, isovalérico e valérico), presentes nos reatores anaeróbios procederam do próprio inóculo, com ligeira contribuição da degradação da biomassa em função das características nutricionais seletivas para determinados grupos microbianos.

Na Tabela 16 estão apresentados os valores de Sólidos Totais Voláteis de cada reator no final do ensaio de degradação. A quantidade de sólidos de cada reator não influenciou diretamente na diferença de tolueno degradado em cada um deles, ou seja, maior quantidade de sólidos no reator não significou maior quantidade de tolueno degradado.

Tabela 15. Concentrações (mg/L) de ácidos orgânicos nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato.

Ácidos \ Condições	0,39mg/L de Tolueno na presença de 130mg/L de Sulfato	0,88mg/L de Tolueno na presença de 90mg/L de Sulfato	1,31mg/L de Tolueno na ausência de Sulfato	2,0mg/L de Tolueno na ausência de Sulfato	2,0mg/L de Tolueno na presença de 288mg/L de Sulfato	2,1mg/L de Tolueno na presença de 269mg/L de Sulfato
Láctico	11,0	4,2	1,8	11,8	21,7	11,8
Acético	146,5	88,0	41,0	133,5	180,5	53,6
Propiônico	3,5	2,0	4,1	3,4	4,0	3,6
Isobutírico	84,3	49,3	112,3	99,0	117,3	129,9
Fórmico	0	3,2	0	11,8	1,7	2,2
Isovalérico	17,4	7,6	27,3	20,7	26,0	40,3
Valérico	0	0	0	32,2	18,7	18,4
Total	262,7	154,3	186,5	312,4	369,9	259,8

Tabela 16. Valores de Sólidos Totais Voláteis dos reatores após ensaio de degradação.

Sólidos Totais Voláteis	
Lodo do reator UASB	45g/L
Lodo após ensaio de degradação	
2,0mg/L Tol	4,1g/L
1,31 mg/L Tol	3,9 g/L
0,88 mg/L Tol + 90mg/L SO ₄ ⁻²	4,5 g/L
0,39 mg/L Tol + 130mg/L SO ₄ ⁻²	3,5 g/L
2 mg/L Tol + 288mg/L SO ₄ ⁻²	4,3 g/L
2,1 mg/L Tol + 269mg/L SO ₄ ⁻²	3,8 g/L

Com os exames microbiológicos do conteúdo dos reatores foi possível visualizar células íntegras (Figura 10) sem quaisquer modificações na forma ou arranjo em relação ao ensaio de enriquecimento, com ausência de tolueno. Também, foi possível observar diversidade morfológica (Tabela 17) relacionada com o predomínio de cocos, estafilococos, bacilos ovalados e *Methanosarcina*. No entanto, foi possível visualizar também a presença de biomassa morta.

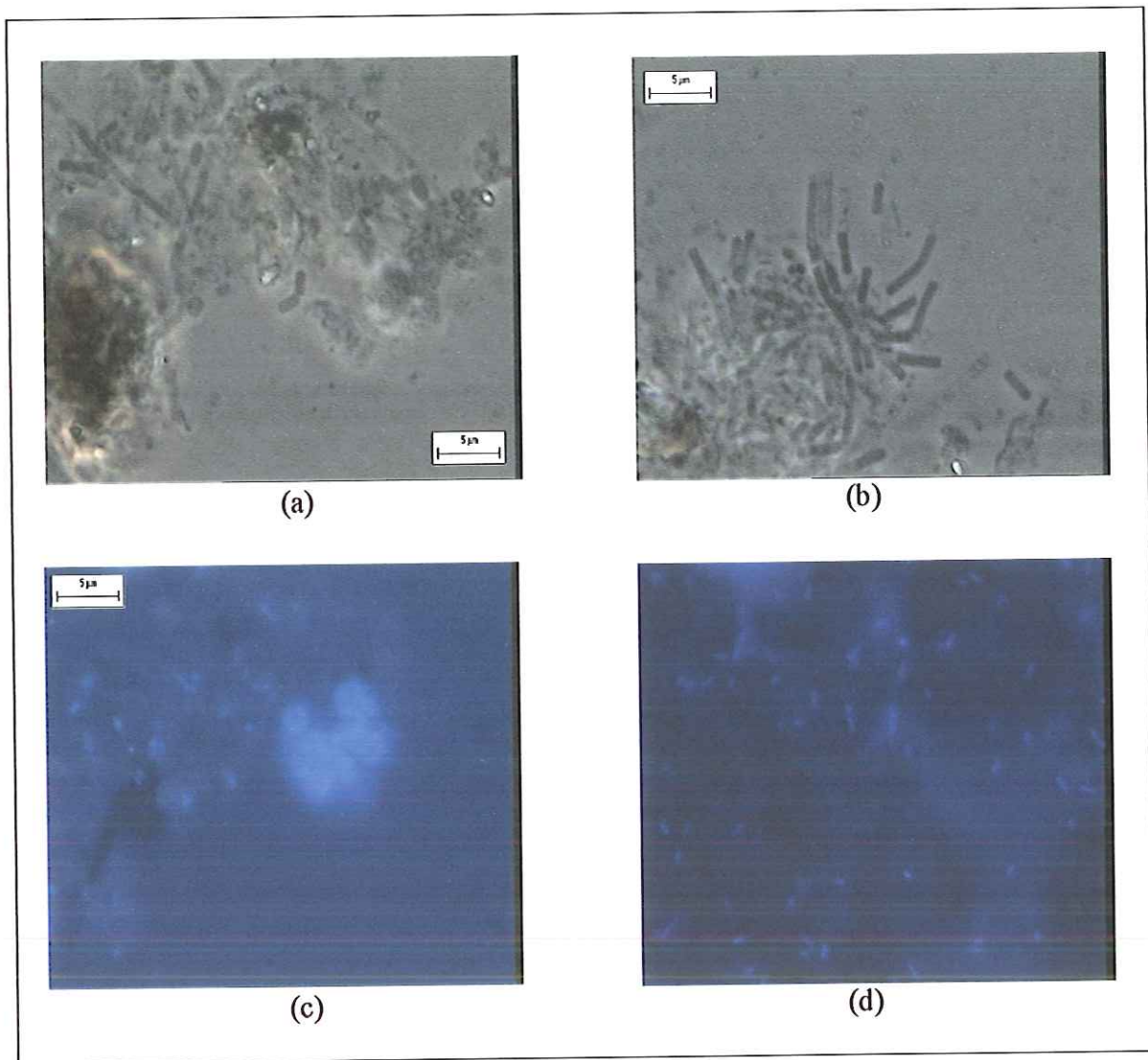


Figura 10. Microscopia ótica de contraste de fase e fluorescência de morfologias observadas no ensaio de degradação: (a) cocos e bacilos; (b) bacilos com extremidades arredondadas; (c) *Methanosarcina* sp. e (d) bacilos fluorescentes.

Tabela 17. Diversidade morfológica observada nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato.

Morfologias	Condições		
	1,31 e 2,0mg/L de tolueno na ausência de sulfato	0,39 e 0,88mg/L de tolueno na presença de 130 e 90mg/L de sulfato	2,0 e 2,1mg/L de tolueno na presença de 288 e 269 mg/L de sulfato
Arqueas Metanogênicas			
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	+++	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	-	++
Cistos de sarcinas	-	-	-
Bacilos fluorescentes	++++	+++	++++
Cocos fluorescentes	-	+++	-
Bactérias			
Bacilos com extremidades afiladas	+++	-	++
Bacilos com extremidades arredondadas	++++	++++	++++
Bacilos curvos	+	-	+++
Bacilos delgados	-	-	-
Bacilos ovalados	++++	+++	++++
Bacilos	++	-	-
Cocos	+++	+++	+++
Cocos em cadeia	-	-	-
Filamentos	++	++	++
Filamento septado	-	-	-
Estafilococos	+++	+++	+++

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

Nos reatores com 4,5mg/L e 3,6mg/L de tolueno e 560mg/L e 570mg/L de sulfato, respectivamente, houve completa degradação do tolueno nos reatores em 1008 horas (Figura 13). Nesses reatores, a porcentagem máxima acumulada de metano nesse período foi de 8,9% e 9,1%, respectivamente (Figura 15). O consumo total do sulfato foi constatado no tempo de 1008 horas para os dois reatores (Figura 14). Nos reatores alimentados apenas com tolueno na faixa de 2,1mg/L a 4,6mg/L, ocorreu porcentagem máxima de metano acumulada na faixa de 17,7% a 21,3% em 1008 horas (Figura 15). As Figuras de 11 a 13 mostram o decaimento da concentração de tolueno em função do tempo nos reatores na presença e ausência de sulfato. Foi possível constatar que, para todas as concentrações de tolueno estudadas na faixa de 1,9mg/L a 4,6mg/L ocorreu a degradação completa (limite de detecção) em 1008 horas.

Semelhantes aos ensaios apresentados anteriormente, foram detectados os mesmos ácidos orgânicos independentemente da presença de sulfato. Nesses casos, a faixa de concentração de ácido acético foi de 178,6mg/L a 332,2mg/L (Tabela 20). O ácido isobutírico foi detectado na faixa de concentração de 119,9mg/L a 189,4mg/L. Os demais ácidos

estiveram presentes nas concentrações de 1,2mg/L a 70,2mg/L. Em função da presença de ácido acético, fórmico e, provavelmente, hidrogênio, foram visualizadas células semelhantes a *Methanosarcina* e bacilos fluorescentes.

Entre as bactérias anaeróbias, foi visualizado o mesmo padrão morfológico observado nos ensaios descritos anteriormente, com predomínio de cocos, bacilos ovalados, bacilos com extremidades arredondadas e estafilococos (Tabela 19).

A Tabela 18 mostra as concentrações iniciais de tolueno e de sulfato, os valores máximos de metano acumulado e o tempo de estabilização no percentual de metano.

Tabela 18. Valores iniciais de tolueno e de sulfato, valores máximos de percentual de metano acumulado.

Tolueno	Sulfato	Metano acumulado	
Concentração inicial (mg/L)	Concentração inicial (mg/L)	% máximo	Tempo (horas)
2,1	—	21,3	1008
1,9	—	17,7	1008
4,6	—	18,3	1008
4,0	—	19,1	1008
4,5	560	8,9	1008
3,5	570	9,1	1008

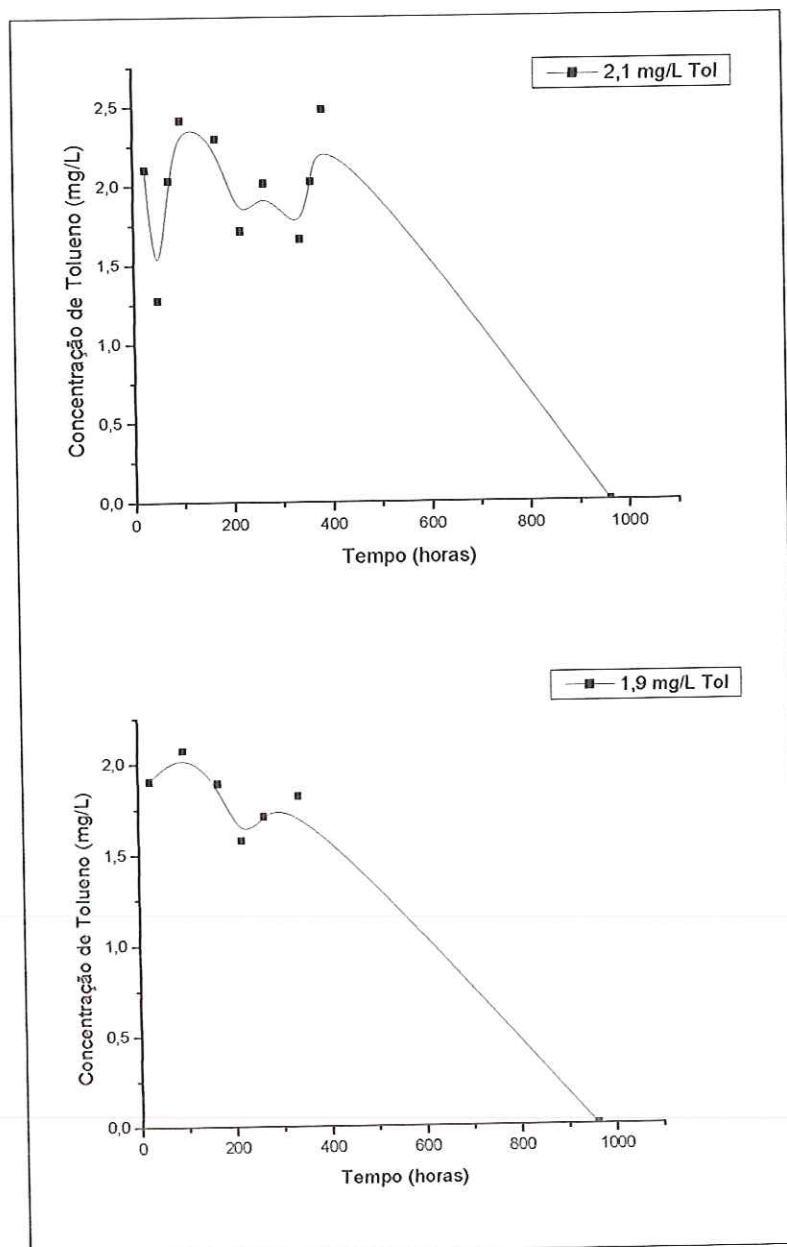


Figura 11. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada na ausência de sulfato.

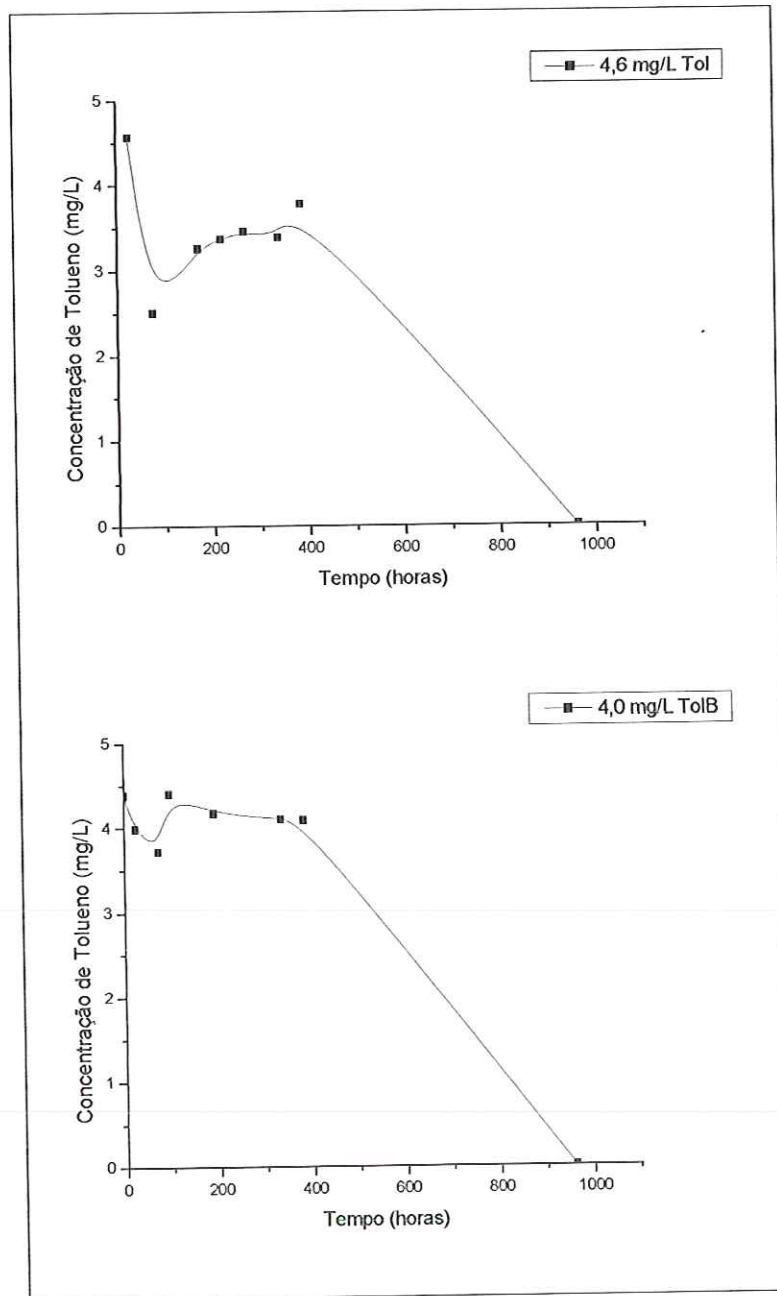


Figura 12. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada na ausência de sulfato.

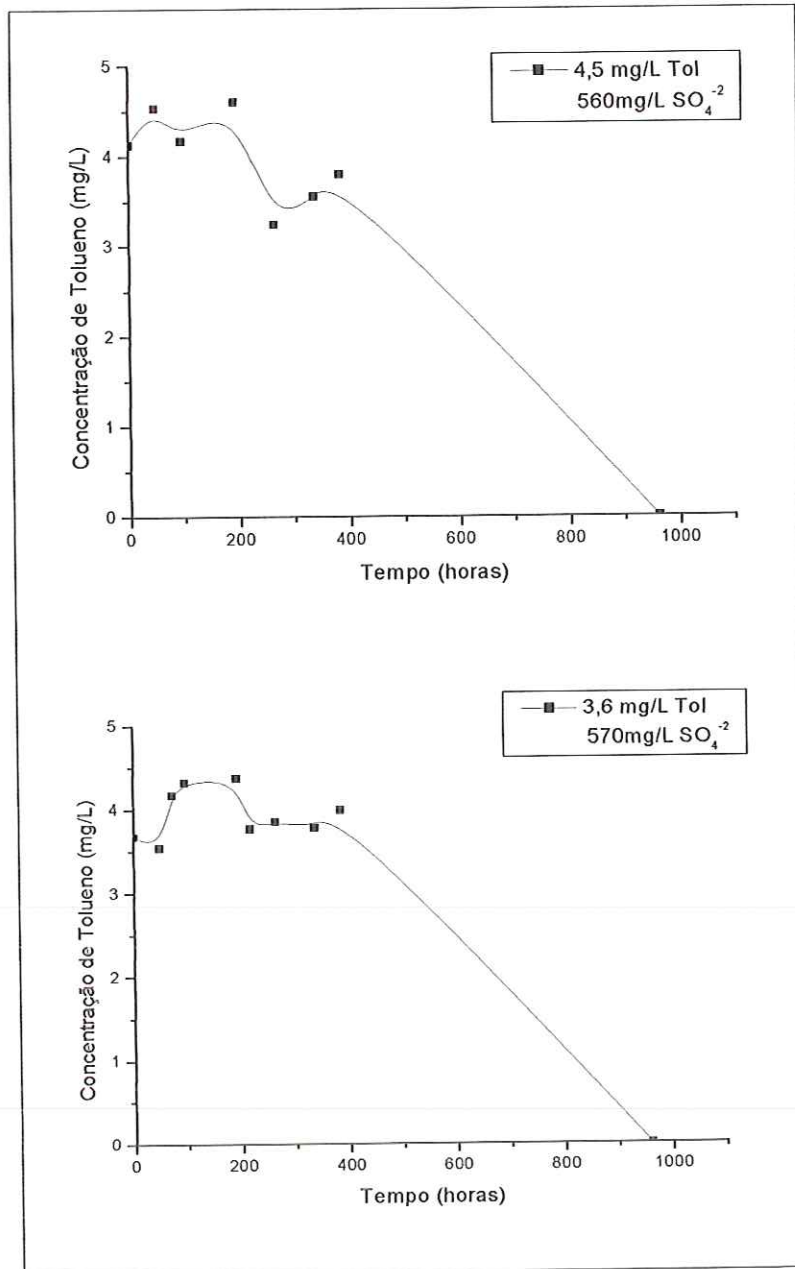


Figura 13. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada na presença de sulfato.

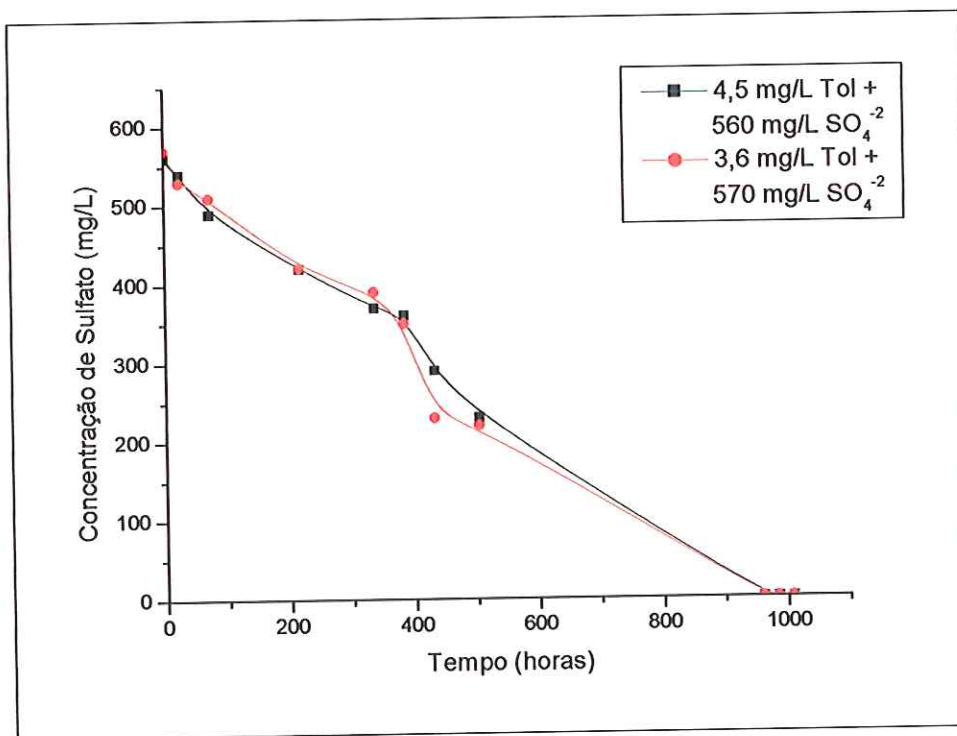


Figura 14. Variação temporal de sulfato nos reatores em batelada alimentados com tolueno.

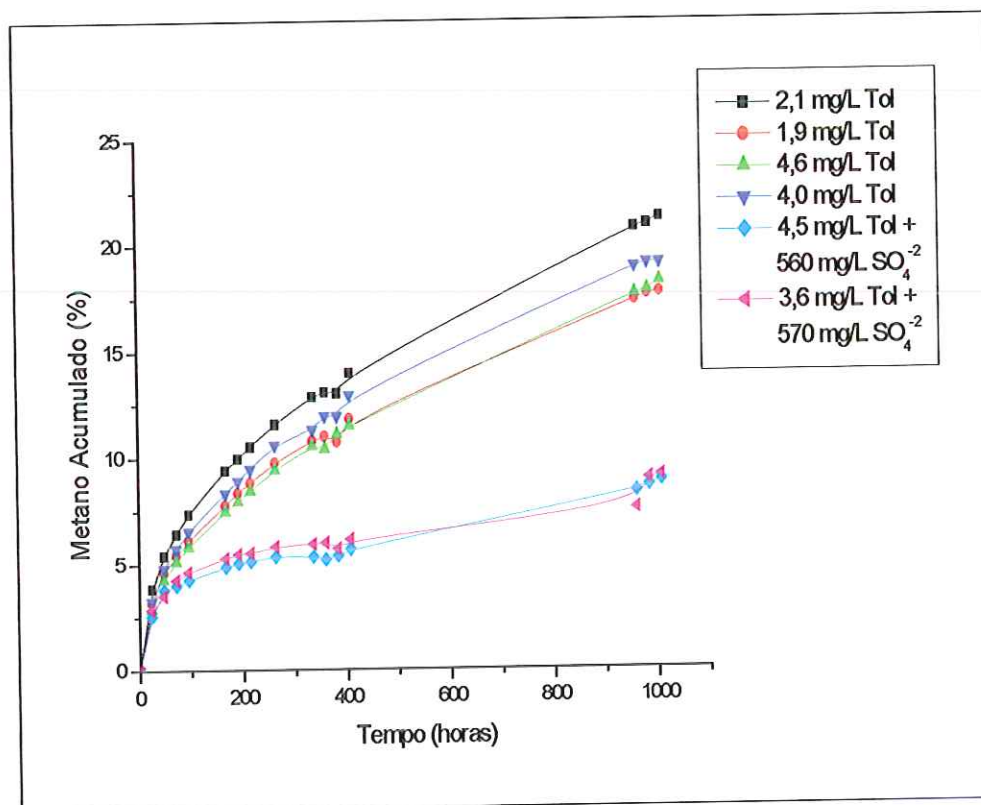


Figura 15. Variação temporal de metano nos reatores em batelada alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato.

Tabela 19. Diversidade morfológica observada nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato.

Morfológicas	Condições		
	2,1 e 1,9mg/L de tolueno na ausência de sulfato	4,6 e 4,0mg/L de tolueno na ausência de sulfato	4,5 e 3,5mg/L de tolueno na presença de 560 e 570mg/L de sulfato
Arqueas Metanogênicas			
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	+++	++++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	-	++
Cistos de sarcinas	-	-	-
Bacilos fluorescentes	+++	++++	++++
Cocos fluorescentes	-	-	-
Bactérias			
Bacilos com extremidades afiladas	-	++	++
Bacilos com extremidades arredondadas	++++	++++	++++
Bacilos curvos	+++	++	+++
Bacilos delgados	-	-	-
Bacilos ovalados	++++	++++	++++
Bacilos	-	-	-
Cocos	+++	+++	+++
Cocos em cadeia	-	-	-
Filamentos	++	++	+++
Filamento septado	-	++	++
<i>Desulfosarcina</i> sp.	++	+++	+++

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

Tabela 20. Concentração de ácidos orgânicos nos reatores alimentados com tolueno na presença e ausência de sulfato.

Ácidos	Condições					
	2,1mg/L de Tolueno na ausência de Sulfato	1,9mg/L de Tolueno na ausência de Sulfato	4,6mg/L de Tolueno na ausência de Sulfato	4,0mg/L de Tolueno na ausência de Sulfato	4,5mg/L de Tolueno na presença de 560 mg/L de Sulfato	3,5mg/L de Tolueno na presença de 570mg/L de Sulfato
Lático	10,1	4,7	0	10,9	14,9	54,0
Acético	332,2	225,4	206,3	178,6	203,5	221,2
Propiônico	3,6	1,2	0	3,4	2,0	3,8
Isobutírico	178,4	132	189,4	127,9	119,9	129,5
Fórmico	13,3	11,6	4,1	14,1	13,7	28,2
Isovalérico	70,2	46,6	73,0	50,8	55,2	58,9
Valérico	35,3	7,5	0	29,7	22,2	29,9
Total	643,1	429,0	472,8	415,4	431,4	525,5

Os resultados apresentados anteriormente mostraram, contudo que durante a operação dos reatores, foi observado que parte do tolueno permaneceu insolúvel dando o aspecto de óleo na água. O tolueno é substância de baixa solubilidade em a água, 670mg/L (MERCK INDEX, 1996), e isto confere aspecto heterogêneo à mistura. Devido a esta mistura heterogênea (lodo, meio de cultura e tolueno), a quantificação do tolueno nas duas primeiras etapas de degradação foi de difícil realização, pois no momento de amostragem da porção líquida, possivelmente, ora foi coletado maior quantidade da porção de óleo, ora da porção aquosa. Essa possibilidade ficou demonstrada nos resultados obtidos nas duas primeiras etapas de degradação nas quais as amostragens foram realizadas de forma simples, uma única amostra para cada tempo desejado. Os resultados iniciais, que deveriam ser sempre maiores, acabaram sendo ultrapassados por resultados de tempos amostrais maiores, momento em que a concentração de tolueno no meio deveria ser menor que a inicial. Essa constatação fez com que as amostragens do último ensaio fossem realizadas em triplicata. Em cada tempo de amostra, foram efetuadas três retiradas do conteúdo de cada reator.

A quantificação do tolueno foi feita da seguinte forma: cada ponto de amostra continha três alíquotas, duas dessas alíquotas foram analisadas para quantificar o tolueno. A terceira alíquota só foi utilizada quando os resultados das duas primeiras alíquotas apresentaram-se muito distantes entre si. Na verdade, a terceira alíquota serviu como contra-prova das análises para quantificação do tolueno.

Na condição de 2,3mg/L de tolueno e 220mg/L de sulfato, a concentração de tolueno ficou abaixo de 0,1mg/L após 264 horas de ensaio. Enquanto que, na condição de 2,1mg/L de tolueno e 194mg/L de sulfato, a concentração de tolueno ficou em 1,4mg/L após 792 horas de ensaio, tempo três vezes maior que o da condição anterior (Figura 16 e Tabela A4 em anexo). Essa diferença na degradação do tolueno entre os dois reatores deve ser decorrente da quantidade de ácidos orgânicos presentes no lodo usado como inóculo e da quantidade de microrganismos nos reatores, já que a quantidade de Sólidos Voláteis Totais (SVT) em cada reator no final do ensaio foi de 4,7g/L e 4,3g/L, respectivamente (Tabela A15 em anexo).

Esses ácidos orgânicos servem de substrato alternativo para o crescimento dos microrganismos, já que foi usado tolueno como substrato alvo, ou principal, para o crescimento dos mesmos. E com substrato alternativo, o tolueno presente no reator de 2,1mg/L só começou a ser degradado a partir de 264 horas de ensaio. No trabalho de EDWARDS *et al.* (1992) foi verificado que o “tolueno é sempre substrato preferido”, em relação aos demais BTEX; mas, quando acrescentados outros co-sustratos, como lactato, glicose e extrato de levedura, a degradação do tolueno cessou completamente até que todo co-sustrato tivesse sido consumido.

Por isso, nos reatores de 2,1mg/L de tolueno e 194mg/L de sulfato e 2,3mg/L de tolueno e 220mg/L de sulfato, as concentrações de tolueno atingiram 1,6mg/L e 2,1mg/L, respectivamente, com 24 horas de ensaio, momento em que a concentração de sulfato chegou a zero, em ambos reatores. Nesses reatores, a redução do sulfato e a degradação de tolueno não apresentaram correlação, sendo o sulfato consumido em 24 horas (Figura 17). Isto significou que a degradação de parte do tolueno ocorreu por via respiratória com redução de sulfato, enquanto que boa parte do tolueno foi degradada por processo fermentativo. A percentual de metano em ambos os reatores para o tempo de 1032 horas foi de 20,9% e 20,0%, respectivamente (Figura 18). Os valores de percentual de metano permaneceram próximos entre si durante todo o decorrer do ensaio, o que não refletiu a diferença na utilização do tolueno ocorrida entre os reatores.

Nos reatores com concentrações iniciais de tolueno de 7,38mg/L e 7,72mg/L, e de sulfato de 600mg/L e 610mg/L, respectivamente, a concentração de tolueno presente em ambos reatores ficou abaixo de 0,1mg/L e a concentração de sulfato chegou a zero com 792 horas de ensaio. A porcentagem de metano acumulado atingiu 18,5% em 816 horas e 18,9% em 936 horas, respectivamente. Esses dois reatores apresentaram perfis de degradação equivalentes entre si, o que era esperado em se tratando de duplicatas (Figuras 16 a 18). E a quantidade de Sólidos Voláteis Totais nos reatores foi de 4,5g/L e 4,6g/L, respectivamente.

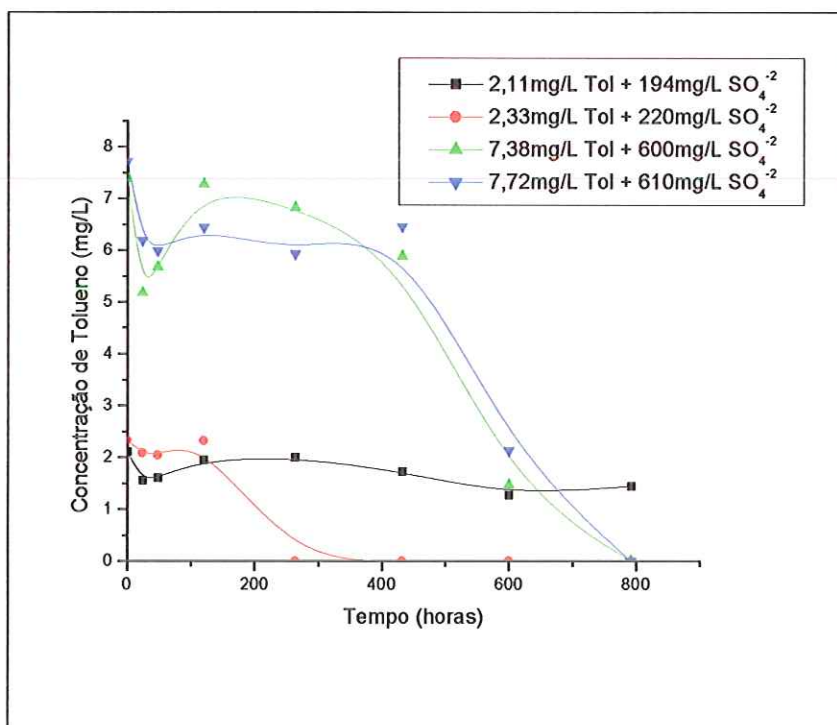


Figura 16. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada alimentados com sulfato.

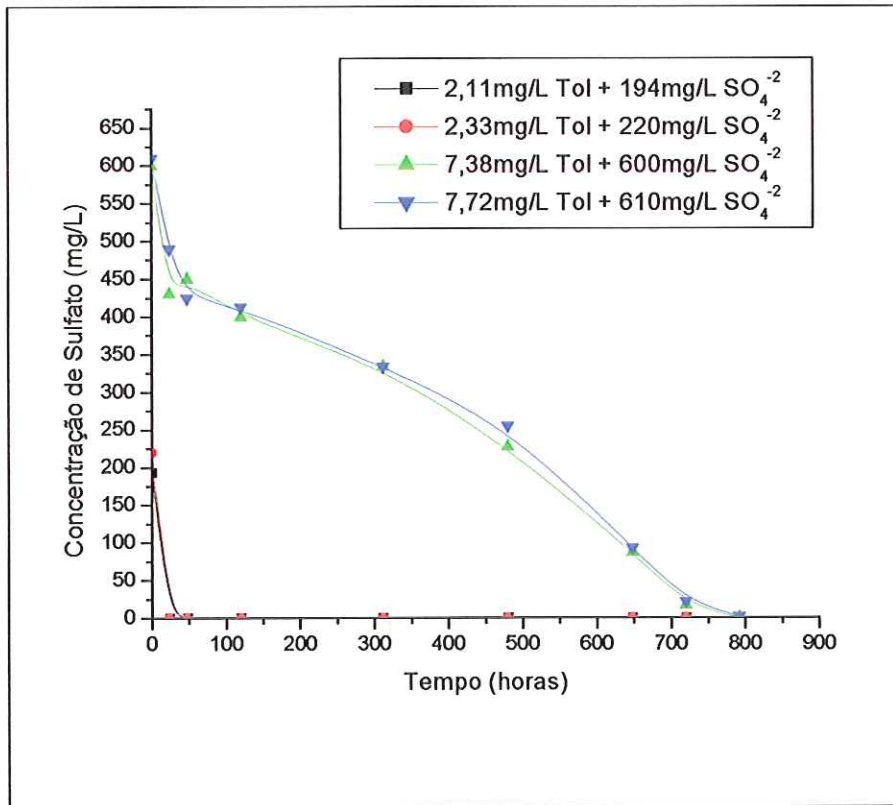


Figura 17. Variação temporal de sulfato nos reatores em batelada alimentados com tolueno.

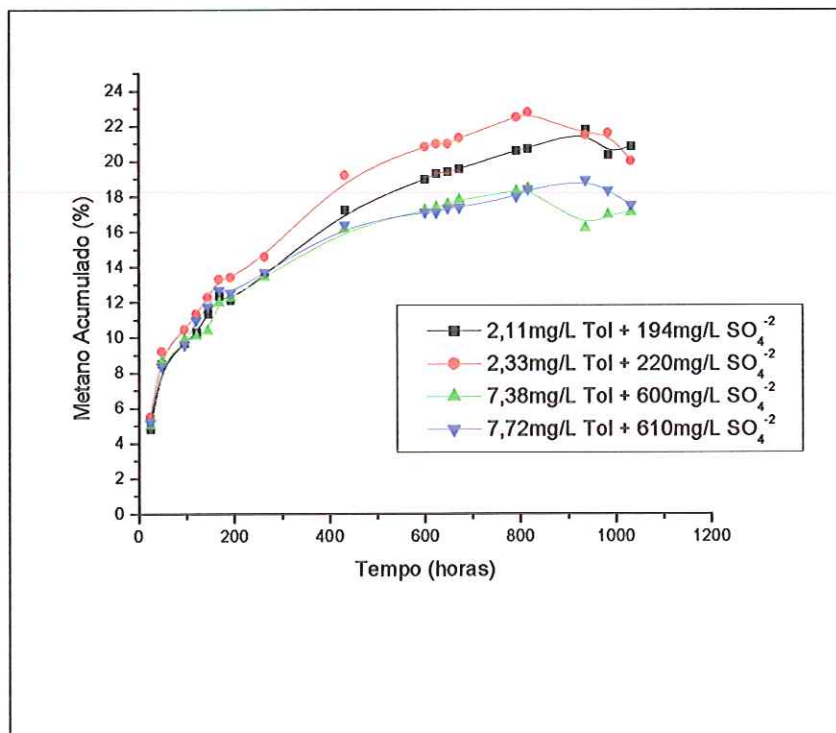


Figura 18. Variação temporal de metano nos reatores em batelada alimentados com tolueno e sulfato.

Com relação aos reatores mantidos em condições metanogênicas, no período de 840 horas de ensaio, foi observado consumo de tolueno de no máximo 53,5% da concentração inicial na condição de 2,0mg/L de tolueno. Nas demais condições, 1,90mg/L, 3,90mg/L, 3,70mg/L, 7,50mg/L e 7,20mg/L, a degradação do tolueno foi de 18,6%, 30,3%, 45,9%, 34,7% e 12,1%, respectivamente, da concentração inicial (Figura 19). Os percentuais de metano foram maiores em relação aos reatores mantidos em condições sulfetogênicas, atingindo valores máximos de 27,3%, 24,8%, 22,1%, 22,7%, 22,9% e 20,4%, respectivamente (Figura 20). Apesar dos reatores metanogênicos terem apresentado maior percentual de metano no gás em relação aos reatores sulfetogênicos, essa maior produção não representou maior consumo de tolueno. É provável que a percentual de metano foi decorrente, também, do consumo dos ácidos orgânicos que compuseram o lodo do inóculo (Tabela 22).

Pelos valores apresentados nas Figuras 18 e 20 e nas Tabelas A13 e A14, em anexo, com relação à percentual de metano, foi constatado que a mesma foi afetada negativamente pela presença do tolueno. Quanto maior a concentração de tolueno nos reatores, menor a percentual de metano nos mesmos. O tolueno é substância tóxica e de difícil degradação devido a sua molécula apresentar anel benzênico. A presença do tolueno no meio de cultura afetou de forma negativa toda biota presente no lodo. Esse fato foi comprovado pelos exames microscópicos realizados com o conteúdo de cada reator. Nos exames microscópicos foi constatado o predomínio de morfologias que foram apenas freqüentes ou raras nas condições ótimas de cultivo da etapa de enriquecimento. Também foi observada a diminuição na diversidade morfológica, indício de diminuição na diversidade biológica do conteúdo dos reatores.

As Figuras 16 e 19 apresentam os resultados da degradação do tolueno em função do tempo nas condições sulfetogênicas e metanogênicas, respectivamente. Quando comparados é possível afirmar que a degradação do tolueno foi mais rápida na condição sulfetogênica, assim como a presença do sulfato, nessas condições, influenciou positivamente na degradação do tolueno. Isto porque, nos reatores sulfetogênicos a degradação do tolueno ocorreu totalmente (abaixo do limite de detecção), enquanto que nos reatores mantidos em condições metanogênicas, a degradação do tolueno foi muito pequena, máximo de 53%, quando comparada aos reatores sulfetogênicos.

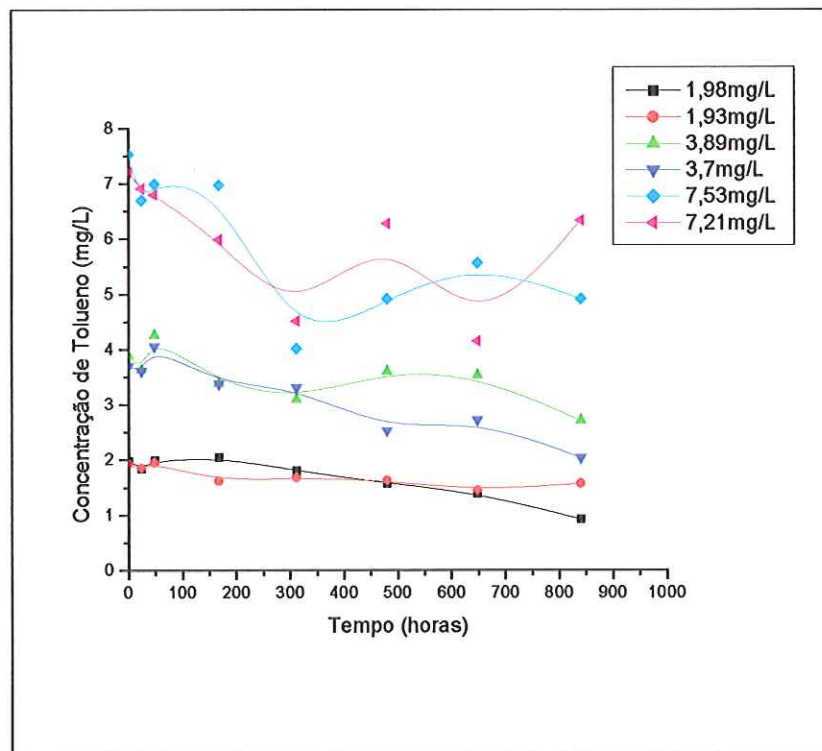


Figura 19. Variação temporal de tolueno nos reatores em batelada mantidos em condições metanogênicas.

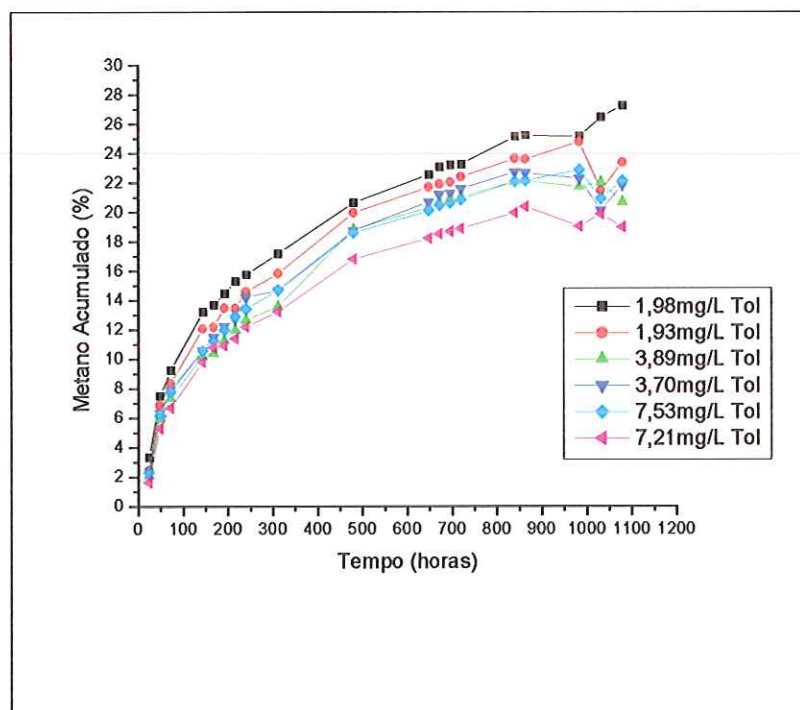


Figura 20. Variação temporal de metano nos reatores em batelada alimentados com tolueno mantidos em condições sulfetogênicas.

Nas condições metanogênicas, a produção acumulada de metano foi maior que nas condições sulfetogênicas (Figuras 18 e 20). Isso porque a utilização de substrato pelas metanogênicas deve ter sido maior, já que, de acordo com MADIGAN *et al.* (1997), em condições metanogênicas as BRS são capazes de obter energia por processo fermentativo. E no processo fermentativo, a liberação de energia é menor, assim como a velocidade de utilização do substrato pelas BRS, o que gera competição com as metanogênicas pelo substrato. Neste caso, as metanogênicas apresentaram maior percentual de metano, o que indicou maior utilização do substrato que na condição sulfetogênica. Em condições sulfetogênicas, as BRS levam vantagem sobre as metanogênicas porque obtêm energia por processo de respiração anaeróbia o qual libera maior quantidade de energia, quando comparado ao utilizado pelas metanogênicas (ZEHNDER, 1988).

Nos reatores sulfetogênicos com concentrações de 7,4mg/L e 7,7mg/L de tolueno, foi possível observar a correlação entre redução de sulfato e degradação de tolueno demonstrada por EDWARDS *et al.* (1992) os quais, trabalhando com a degradação do tolueno e dos xilenos por cultura mista, observaram que a degradação somente ocorreu na presença de sulfato. Como já descrito anteriormente, quando adicionado tolueno para obter concentração final de 30mg/L na ausência de sulfato (condições metanogênicas), o mesmo permaneceu inerte no reator durante 50 dias. Com a adição de sulfato (80mg/L), a degradação do tolueno foi iniciada e sua total utilização ocorreu em 50 dias de ensaio. O presente trabalho difere do descrito por EDWARDS *et al.* (1992), entre outras coisas, pelo fato de que neste trabalho a degradação do tolueno ocorreu, também, em condições metanogênicas.

Pelos resultados da análise de ácidos orgânicos apresentados nas Tabelas 21 e 22, observa-se a presença de grande quantidade de ácidos. A fonte desses ácidos é o próprio lodo usado no inóculo, pois, além do tolueno, nenhuma outra fonte de carbono foi adicionada ao meio de cultura na etapa de degradação. Pelos resultados de ácidos iniciais e finais de cada reator, foi constatado o consumo desses ácidos. Não foi possível saber em que momento esses ácidos foram usados pelos microrganismos, o que se sabe é que esses ácidos serviram de fonte alternativa de energia e de carbono para o crescimento dos microrganismos presentes nos reatores. Nesse aspecto, isso pode ter beneficiado os microrganismos na degradação do composto tóxico como o tolueno. Em diversos trabalhos, é destacado o uso de co-substratos, como o etanol e o detergente (NARDI, 2002), e óleo mineral (RABUS, *et al.*; 1993), entre outros, na degradação de compostos tóxicos como os BTEX. Mais uma vez, o presente trabalho se diferenciou por não fazer uso de co-substratos na etapa de degradação do composto alvo e por não submeter o lodo, usado como fonte de microrganismos, a etapa de adaptação ao meio e ao composto tóxico.

Com os resultados apresentados nas Tabelas 21 e 22, referentes à presença de ácidos orgânicos no início e final do ensaio, pode ser verificado que os ácidos não foram totalmente consumidos até o final do ensaio. E analisando os resultados de consumo de tolueno em função do tempo nos mesmos reatores, fica constatado que a degradação do tolueno ocorreu concomitante ao consumo dos ácidos orgânicos presentes no lodo usado como inóculo.

Tabela 21. Concentração de ácidos orgânicos nos reatores sulfetogênicos.

Condições (mg/L)		Ácidos (mg/L)					
		Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico
2,10	Início	436,70	208,20	107,20	24,50	128,30	4,25
	Final	180,30	40,60	27,0	5,50	31,90	-
2,30	Início	324,50	177,70	82,50	14,10	89,50	1,30
	Final	194,50	38,80	25,10	9,90	41,50	-
3,70	Início	298,70	175,70	77,90	13,80	81,30	0,30
	Final	-	-	6,60	-	16,30	-
Ausência	Início	330,90	187,20	84,30	15,10	92,10	2,60
	Final	121,0	-	17,30	-	18,80	-
7,40	Início	323,10	190,60	87,10	14,90	96,50	-
	Final	-	-	4,40	-	8,90	-
7,70	Início	260,90	188,20	84,50	12,00	87,60	2,20
	Final	113,80	34,30	8,10	11,30	-	-

Tabela 22. Concentração de ácidos orgânicos nos reatores metanogênicos.

Condições (mg/L)		Ácidos (mg/L)					
		Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico
1,90	início	698,50	192,50	142,40	38,00	154,70	8,20
	Final	535,10	166,80	116,80	23,50	114,20	7,60
3,90	Início	129,00	-	16,30	-	15,00	-
	Final	609,60	153,10	116,20	31,50	122,90	6,20
3,70	Início	128,60	-	7,20	-	14,10	-
	Final	553,40	145,10	103,80	29,00	122,60	4,20
7,50	Início	131,70	-	17,50	5,10	17,30	-
	Final	487,20	150,20	111,30	29,50	113,10	31,00
7,20	Início	124,60	-	9,30	-	3,30	-
	Final						

Durante a inoculação dos reatores da última etapa de ensaios de degradação, houve erro no momento de adicionar o tolueno em um dos reatores com concentrações de tolueno próximas a 4mg/L e 400mg/L de sulfato. Um dos reatores foi inoculado com 420mg/L de sulfato e, por falha na operação, não foi adicionado o tolueno. O outro reator, seu par, foi inoculado com 3,7mg/L de tolueno e 410mg/L de sulfato (Figura 21). O erro somente foi descoberto semanas depois, momento em que as amostras de tolueno foram analisadas. Como os valores de consumo de sulfato e percentual de metano em ambos reatores foram semelhantes, foi dada continuidade nas análises desses dois parâmetros no reator sem tolueno. Ficou constatado que a percentual de metano e o consumo de sulfato ocorridos nos reatores foram relacionadas aos ácidos orgânicos presentes no lodo usado como inóculo.

Esses resultados mostraram que no reator com concentração inicial de tolueno de 3,7mg/L e de sulfato de 410mg/L, a concentração de sulfato chegou a zero com 648 horas, enquanto que a degradação do tolueno durou até 792 horas, coincidindo com a estabilização da percentual de metano que, no período, atingiu a porcentagem acumulada de 18,4%.

No reator sem tolueno e com 420mg/L de sulfato, os resultados de consumo de sulfato e percentual de metano foram semelhantes ao reator com 3,7mg/L de tolueno e 410mg/L de sulfato (Figuras 22 e 23).

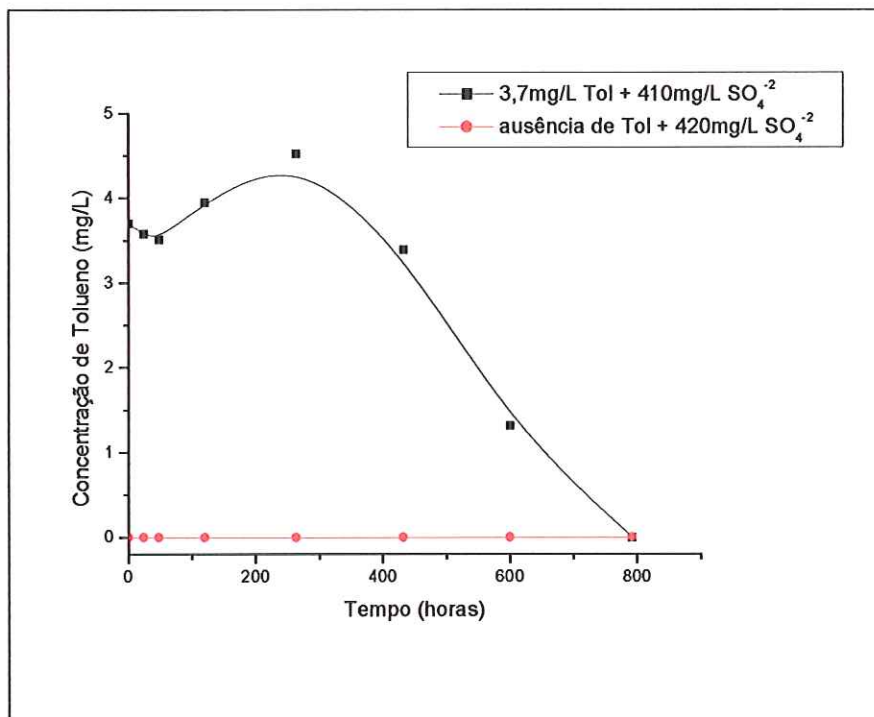


Figura 21. Variação temporal tolueno no par de reatores que apresentaram problema no momento da inoculação.

Esses resultados de consumo de sulfato comprovam a preocupação tida na elaboração do presente trabalho em relação à estequiometria da degradação. Os trabalhos de BELLER *et al.* (1992), BELLER *et al.* (1996) e HEIDER *et al.* (1999) e propõem quantidades de sulfato de 4 a 4,5 vezes mais que a de tolueno. Porém, no trabalho de EDWARDS *et al.* (1992), os reatores de enriquecimento primário, que ainda estavam contaminados com pequena fração do sedimento original, maior quantidade de sulfato foi consumida do que a quantidade teoricamente requerida para degradar tolueno e xilenos. Os autores atribuíram a maior demanda por sulfato à presença de matéria orgânica no sedimento. Já nos reatores que não continham mais sedimento e, sim, com os microrganismos já selecionados, foi observado consumo de 30 a 40% mais de sulfato que a demanda teórica. A explicação para isso foi que, durante a incubação, que foi de meses seguidos, o hidrogênio (H₂) da atmosfera anaeróbia foi usado pelas BRS como fonte de energia, o que demandou maior redução de sulfato. A demanda teórica de sulfato foi calculada com a equação (1) descrita a seguir:



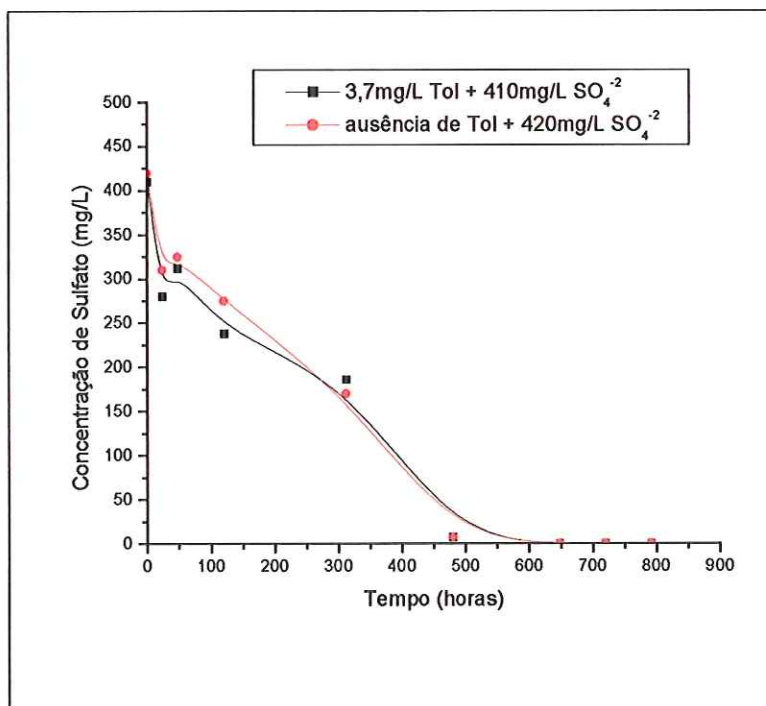


Figura 22. Variação temporal de sulfato nos reatores em batelada com tolueno e sem tolueno.

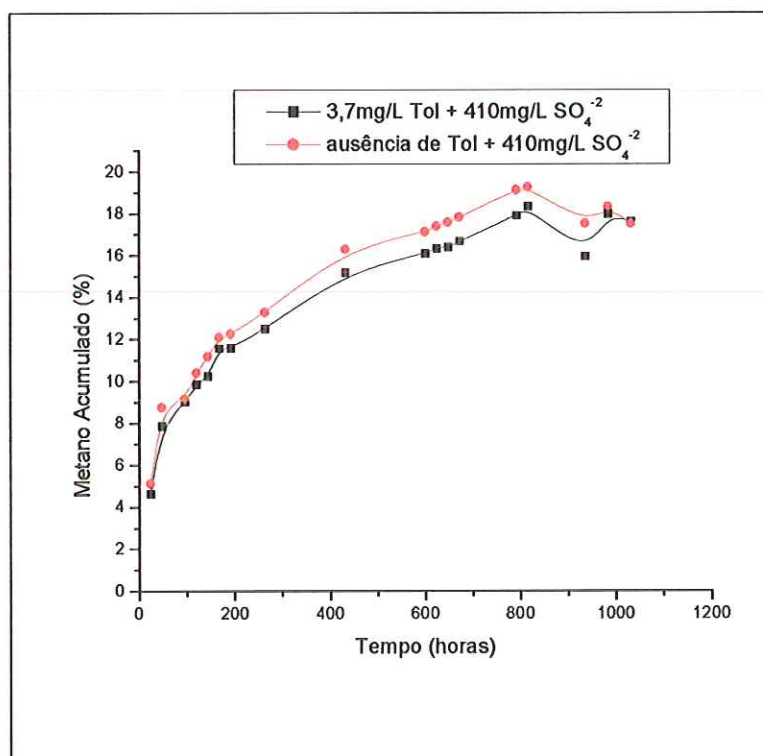


Figura 23. Variação temporal de metano nos reatores em batelada com tolueno e sem tolueno.

Pelas análises microscópicas, foi possível observar morfologias semelhantes em todas as condições as quais o lodo foi submetido. No ensaio de enriquecimento houve predomínio de bacilos com extremidades arredondadas e de bacilos delgados. Foram observados com

freqüência a presença de *Methanosarcina sp*, estafilococos e cocos, e com menos freqüência a presença de filamentos, cocos em cadeia, bacilos ovalados, bacilos fluorescentes, cistos de sarcinas e *Methanosaeta sp*. Raramente foram encontrados cocos fluorescentes, bacilos com extremidades afiladas e bacilos curvos.

Nos ensaios da etapa de degradação, foi observado que as morfologias encontradas nas condições sulfetogênicas e metanogênicas foram praticamente as mesmas. Houve predomínio de bacilos fluorescentes e de bacilos ovalados. Com maior freqüência, foram observados cocos em todas as condições a que o lodo foi submetido e bacilos curvos nos reatores com concentrações acima de 1,9mg/L de tolueno. Comparando as morfologias da Tabela 10 (enriquecimento) com as das Tabelas 24 e 25 (presença de tolueno), foi observado que na condição ótima de crescimento houve equilíbrio na distribuição e freqüência das morfologias encontradas nos reatores, o que indicou equilíbrio entre as populações de microrganismos do lodo. Quando o lodo foi colocado na presença do tolueno, houve queda na diversidade das morfologias antes observadas, assim como, ocorreu predomínio de determinadas morfologias antes observadas com menor freqüência. Essas morfologias, agora predominantes, foram relacionadas aos grupos de microrganismos freqüentemente citados como os responsáveis pela degradação dos compostos aromáticos.

Tabela 23. Diversidade morfológica observada nos reatores alimentados com tolueno na ausência de sulfato.

Morfologias	Condições		
	1,90 e 2,0mg/L de tolueno na ausência de sulfato	3,70 e 3,90mg/L de tolueno na ausência de sulfato	7,20 e 7,50mg/L de tolueno na ausência de sulfato
Arqueas Metanogênicas			
<i>Methanosarcina</i> sp.	++++	+++	++++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	+	++
Cistos de sarcinas	-	-	-
Bacilos fluorescentes	+++	++++	++++
Cocos fluorescentes	-	-	-
Bactérias			
Bacilos com extremidades afiladas	-	++	++
Bacilos com extremidades arredondadas	++++	++++	++++
Bacilos curvos	++	+++	+++
Bacilos delgados	-	-	-
Bacilos ovalados	++++	++++	++++
Bacilos	-	-	-
Cocos	++	+++	+++
Cocos em cadeia	-	-	-
Filamentos	++	+++	+++
Filamento septado	+	++	++
Estafilococos	+++	+++	+++

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

Tabela 24. Diversidade morfológica observada nos reatores alimentados com tolueno na presença de sulfato.

Morfologias	Condições		
	2,10 e 2,30mg/L de tolueno na presença de 194 e 220mg/L de sulfato	3,70mg/L de tolueno na presença de 410mg/L de sulfato	7,40 e 7,70mg/L de tolueno na presença de 600 e 610mg/L de sulfato
	Arqueas Metanogênicas		
<i>Methanosarcina</i> sp.	++++	++++	++++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++	-	++
Cistos de sarcinas	-	-	-
Bacilos fluorescentes	++++	+++	++++
Cocos fluorescentes	-	-	-
	Bactérias		
Bacilos com extremidades afiladas	++	++	++
Bacilos com extremidades arredondadas	+++	++++	++++
Bacilos curvos	+++	+++	+++
Bacilos delgados	-	-	-
Bacilos ovalados	+++	++++	++++
Bacilos	-	-	-
Cocos	+++	++	+++
Cocos em cadeia	-	-	-
Filamentos	++	++	++
Filamento septado	+	++	++
Estafilococos	+++	+++	+++

(++++) predominantes, (+++) frequentes, (++) pouco frequentes, (+) raros, (-) não foram observados.

6.4. Análise da diversidade microbiana presente nos reatores em batelada.

O uso de técnicas de Biologia Molecular permitiu estudar a composição das populações bacterianas e de arqueas metanogênicas após submeter o lodo de reator UASB a diferentes concentrações de tolueno e de sulfato. A biomassa dos reatores passou por processo de extração do material genético, o qual foi amplificado com *primers* do domínio *Bacteria* e *Archaea*, e submetido a separação das bandas em gel de *DGGE*.

De acordo com a Figura 24, que mostra o gel de *DGGE* com as amostras submetidas aos *primers* do domínio *Bacteria*, pode ser observado que o lodo inicial apresentou maior número de bandas em relação às demais condições submetidas a degradação do tolueno. Esse maior número de bandas no gel indicou maior número de populações bacterianas presentes no lodo. Com a introdução do tolueno, houve diminuição no número dessas populações microbianas. Pode ser observada, também, a existência de outras bandas presentes somente nas amostras submetidas a ensaio de degradação com tolueno (canaletas D, E, F, G, H, I). Essas bandas (setas vermelhas) representam populações bacterianas que possivelmente já estavam presentes no inóculo, porém se apresentavam em número muito reduzido para que as técnicas de Biologia Molecular pudessem detectá-las.

O surgimento dessas bandas nos ensaios de degradação pode ter sido decorrente das condições ótimas de crescimento proporcionadas pelo meio de cultura. Como o meio de cultura é específico para BRS, houve seleção dos microrganismos, o que acabou eliminando algumas populações e possibilitou que outras populações pudessem se sobressair.

A eliminação de populações microbianas pode ser observada pela presença de banda somente no inóculo (canaleta C e indicada pela seta verde). A substituição das populações bacterianas já havia sido observada nos exames microscópicos do conteúdo dos reatores. E de acordo com as Tabelas 10, 17, 19, 23 e 24 comparando os ensaios de enriquecimento e de degradação, houve a substituição das populações antes predominantes por populações que eram raramente encontradas.

A substituição das populações microbianas, com a conseqüente diminuição da diversidade microbiana, foi constatada com as análises de PCR/DGGE e confirmaram as observações feitas em microscopia ótica. Como podem ser observadas na mesma Figura, as concentrações crescentes de tolueno e de sulfato não influenciaram na seleção, diminuição ou surgimento de populações bacterianas.

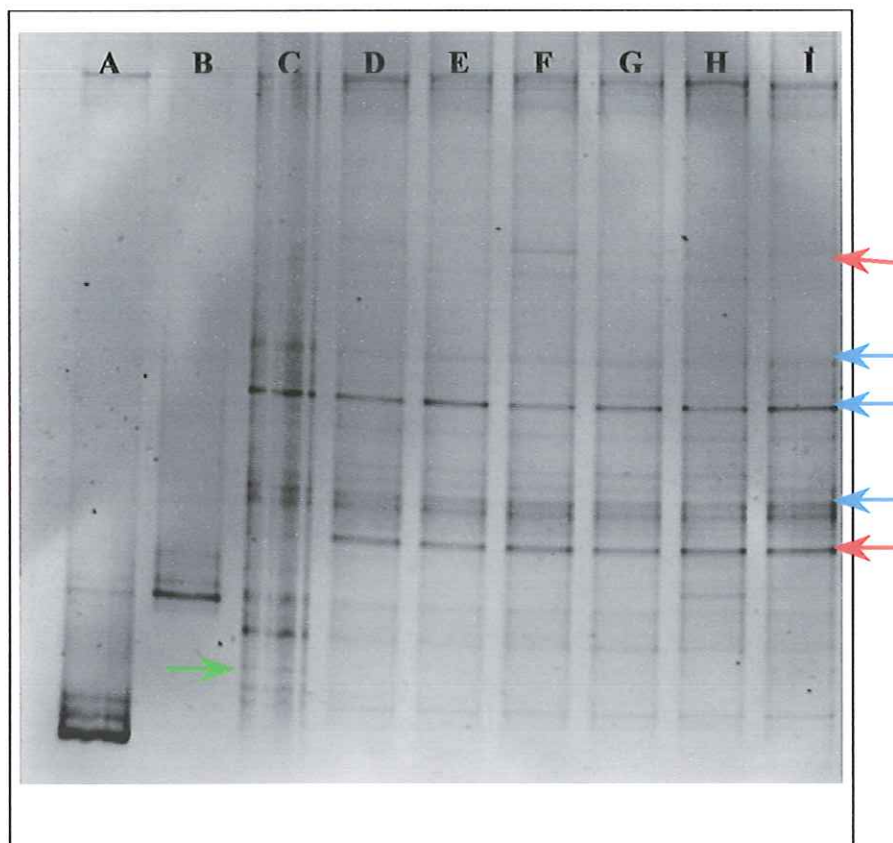


Figura 24. Gel de *DGGE* das amostras submetidas aos *primers* do domínio *Bacteria*:

(A): *Halobacterium salinarum* – DSM 668 (controle positivo); (B): *Haloferax volcanii* – DSM 3757 (controle positivo); (C): Inóculo do reator UASB; (D): Reator 2,11mg/L de tolueno e 194mg/L de sulfato, e reator 2,33mg/L de tolueno e 220mg/L de sulfato; (E): Reator 1,98mg/L de tolueno e reator 1,93mg/L de tolueno; (F): Reator 3,7mg/L de tolueno e 410mg/L de sulfato; (G): Reator 3,89mg/L de tolueno e reator 3,7mg/L de tolueno; (H): Reator 7,38mg/L de tolueno e 600mg/L de sulfato, e reator 7,72 mg/L de tolueno e 610mg/L de sulfato; (I): Reator 7,53mg/L de tolueno e reator 7,21mg/L de tolueno.

A Figura 25 mostra o gel de *DGGE* obtido com as amostras submetidas aos *primers* do domínio *Archaea*. Nela, pode ser observado que houve alteração na diversidade das populações de arqueas nos reatores submetidos ao ensaio de degradação (canaletas D, E, F, G, H e I) quando comparadas ao inóculo (canaleta C). Essa alteração foi constatada pelo surgimento de duas bandas (setas vermelhas) nas canaletas de D a I que não estão presentes na canaleta C. Nos exames microscópicos do conteúdo dos reatores, foi observada mudança na diversidade das populações de arqueas, e as análises de PCR/DGGE vieram confirmar essas alterações.

As setas azuis indicam a presença de populações de arqueas que permaneceram predominantes nas diversas concentrações de tolueno e sulfato. Isto indicou que as crescentes concentrações de tolueno e sulfato a que foi submetido o inóculo de reator UASB não influenciaram na constituição das populações de arqueas. Como já observado e descrito na

revisão bibliográfica, as arqueas metanogênicas não atuam diretamente na degradação do tolueno. A participação delas está na manutenção do equilíbrio da reação através do consumo de íons H^+ e de acetato.

A alteração na diversidade de arqueas deve ter sido decorrente da composição do meio, o qual deve ter possibilitado condições ótimas para o desenvolvimento de populações que estavam em número muito reduzido no lodo inicial e não foram detectadas no mesmo (canaleta C).

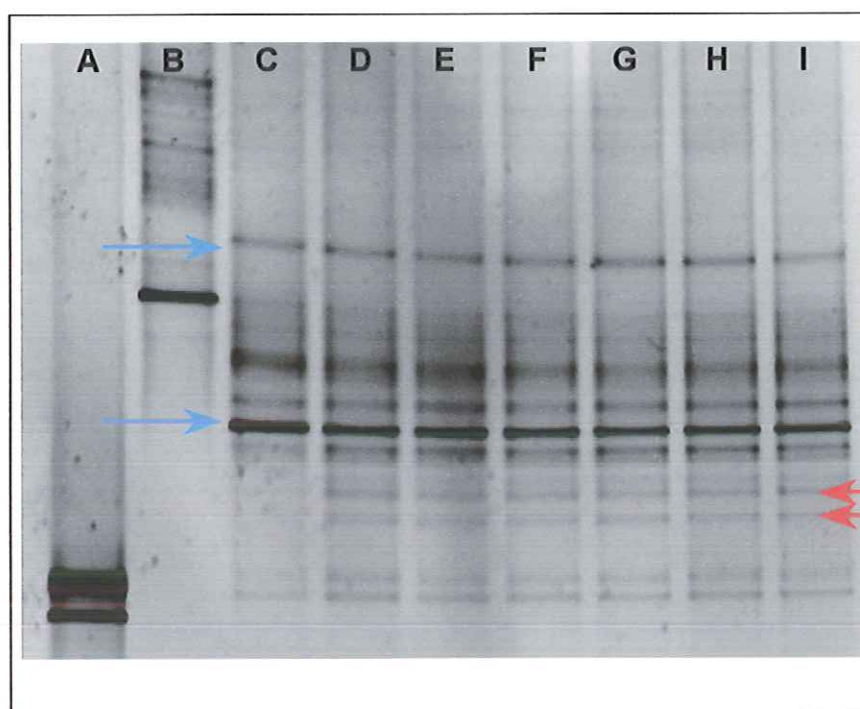


Figura 25. Gel de *DGGE* das amostras submetidas aos *primers* do domínio *Archaea*:

(A): *Halobacterium salinarum* – DSM 668 (controle positivo); (B): *Haloferax volcanii* – DSM 3757 (controle positivo); (C): Inóculo do reator UASB; (D): Reator 2,11mg/L de tolueno e 194mg/L de sulfato, e reator 2,33mg/L de tolueno e 220mg/L de sulfato; (E): Reator 1,98mg/L de tolueno e reator 1,93mg/L de tolueno; (F): Reator 3,7mg/L de tolueno e 410mg/L de sulfato; (G): Reator 3,89mg/L de tolueno e reator 3,7mg/L de tolueno; (H): Reator 7,38mg/L de tolueno e 600mg/L de sulfato, e reator 7,72 mg/L de tolueno e 610mg/L de sulfato; (I): Reator 7,53mg/L de tolueno e reator 7,21mg/L de tolueno.

7. CONCLUSÕES

- O lodo anaeróbio teve boa adaptação ao meio de cultivo enriquecido para BRS em condição sulfetogênica, o que possibilitou o desenvolvimento de consórcio microbiano com capacidade de degradar composto aromático.
- A degradação do tolueno ocorreu tanto por via fermentativa quanto por via respiratória com redução de sulfato. Nos reatores sulfetogênicos, a degradação do tolueno foi mais rápida que nos reatores metanogênicos. Os ácidos orgânicos presentes no inóculo foram precursores para a maior demanda de sulfato e percentual de metano.
- A diminuição da diversidade microbiana ocorrida nos reatores sulfetogênicos com tolueno foi devida ao processo de seleção que o meio de cultura imprimiu aos grupos de bactérias redutoras de sulfato. Essa diminuição da diversidade microbiana foi comprovada pelas técnicas de Biologia Molecular.
- Os testes de quantificação do tolueno mostraram que a metodologia utilizada foi adequada para as condições dos ensaios.
- A metanogênese foi relacionada, principalmente, a bacilos hidrogenotróficos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, E.W.; OERTHER, D.; LARSEN, N.; STAHL, D.A.; RASKIN, L. (1996). The oligonucleotide probe database. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3557-3559.

ANDERS, H-J.; KAETZKE, A.; KÄMPFER, P.; LUDWIG, W.; FUCHS, G. (1995). Taxonomica Position of Aromatic-Degradation Denitrifying Pseudomona Strains K 172 and KB 740 and their Description as New Members of the Genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. Nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., Respectively, Members of the Beta Subclass of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2): 327-333.

BARROS, L.R.A. (2003) Avaliação da Utilização de Sulfeto e Cinética de Crescimento de Sulfobactérias fototróficas verdes. São Carlos, 2003, 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BELLER, H.R. AND EDWARDS, E.A. (2000). Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in a highly enriched methanogenic culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 5503-5505.

BELLER, H.R.; REINHARD, M and GRBIC'-GALIC', D. (1992). Metabolic By-Products of Anaerobic Toluene degradation by Sulfate-Reducing Enrichment Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3192-3195.

BELLER, H.R.; SPORMANN, A.M.; SHARMA, P.K.; COLE, J.R. and REINHARD, M. (1996). Isolation and Characterization of a Novel Toluene-Degrading, Sulfate-Reducing Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 1188-1196.

BRAUN, R. (1992). Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colorless sulphur bacteria. *Appl. Microbiol. And Biotech.* 36: 817-822.

CAMPOS, M.M.; AMARAL, L.F.P.; EL SEUD, O.; ALVARENGA, M. A.; VICENTINI, G.; YOSHIDA, M.; LOPES-FILHO, J.C. e DEL'ÁQUA, A. (1980). *Fundamentos da Química Orgânica*. Ed. Edgard Blucher: EDUSP.

CATTONY, E.B.M. Avaliação da Diversidade Microbiana e das Características Físico-Químicas de Solo Submetido ao Cultivo de Cana-de-Açúcar. Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC – USP, 2001

CATTONY, E.B.M.; ZAIAT, M. e VARESCHE, M.B. (2002) Avaliação da sulfetogênese em reatores em batelada com células planctônicas. In: Anais do I seminário do projeto temático: desenvolvimento, análise, aprimoramento e otimização de reatores anaeróbios para tratamento de águas residuárias. Departamento de Hidráulica e Saneamento, EESC-USP. São Carlos, SP.

COSCHIGANO, P.W.; WEHRMAN, T.S. and YOUNG, L.Y. (1998). Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:1650-1656.

DALY, K.; SHARP, R.J.; MCCARTHY, A.J.(2000). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology*, 146:1693-1705.

DOLFING, J., ZEYER, P., BINDER-EICHER, P. and SCHWARZENBACH, R.P. (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* 154:336-341.

DOMINGUES, M.R. (2001). Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios de leito fixo, sob condições termofílicas. Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

EDWARDS, E.A.; WILLS, L.E.; REINHARD, M. and GRBIC'-GALIC', D. (1992). Anaerobic Degradation of Toluene and Xylene by Aquifer Microorganisms under Sulfate-Reducing Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**:794-800.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U.S. (1986). Test methods for evaluating solid waste, 3rd ed., vol. I.A. SW-846. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

EVANS, P.J., MANG, D.T., KIM, K.S. and YOUNG, L.Y. (1991). Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Applied Environmental Microbiology*. **57**:1139-1145.

EVANS, P.J.; LING, W.; GOLDSCHMIDT, B.; RITTER, E.R. and YOUNG, L.Y. (1992). Metabolites Formed during Anaerobic Transformation of Toluene and *o*-Xylene and Their Proposed Relationship to the Initial Steps of Toluene Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**:496-501.

FICKER, M.; KRASTEL, K.; ORLICKY, S. and EDWARDS, E. (1999). Molecular Characterization of a Toluene-Degrading Methanogenic Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 5576-5585.

FOO, S. C., PHOON, W.O. and LEE, J. (1988). Neurobehavioral symptoms among workers occupationally exposed to toluene. *Asia Pac. J. Public Health*. **2**:192-197.

FRIES, M.R., ZHOU, J., CHEE-SANFORD, J. and TIEDJE, J.M. (1994). Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2802-2810.

HARMS, G.; ZENGLER, K. and RABUS, R. (1999). Anaerobic Oxidation of *o*-Xylene, *m*-Xylene, and Homologous Alkybenzenes by New Types of Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied Environmental Microbiology* **65**: 999-1004.

HEIDER, J.; SPORMANN, A.M.; BELLER, H.R. and WIDDEL, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS. Microbiology Reviews*. **22**:459-473.

HIRASAWA, J.S.(2003). Avaliação da Comunidade Microbiana Anaeróbia em Reator Sulfetogênico Utilizando a Hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH). Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos/USP.

HUNGATE, R.E. (1969). A roll-tube for cultivation of strict anaerobes. In: Norris, J.R. ; Ribbons, D. W., Eds. *Methods in Microbiology*. New York, Academic. v. 38, p. 117-132.

JANSEN, K.; THAUER, R.K.; WIDDEL, F.; FUCHS, G. (1994). Carbon assimilation pathways in sulfate reducing bacteria. Formiate, carbon dioxide, carbon monoxide, and acetate assimilation by *Desulfovibrio baarsii*. *Arch. Microbiol.*, **138**: 257-262.

KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, **22**: 39-48.

LOVLEY, D.R. and LONERGAN, D.J. (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism GS15. *Applied Environmental Microbiology*. **56**:1858-1864.

LOVLEY, D.R., COATES, J.D., WOODWARD, J.C. and PHILLIPS, E.J.P. (1995). Benzene Oxidation Coupled to Sulfate Reduction. *Applied Environmental Microbiology*. **61**:953-958.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. and PARKER, J. (1997). *Biology of Microorganisms*. Eighth Edition. Prentice-Hall, Inc.

MECKENSTOCK, R.U. (1999). Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS. Microbiology Letters*. 177: 67-73.

MELVIN, A. N. G and HOBSON T. W.; P.N. (1994). Identification of anaerobic digester bacteria using a polymerase chain reaction method. *Bioresource Technology*. 47: 73-80.

MERCK INDEX, THE. (1996). *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Susan Budavari, Editor. Twelfth Edition. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. USA.

MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology*, 27: 985-987.

MORAES, E. M.; ADORNO, M. A.T.; ZAIAT, M. (2000). Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: VI oficina e seminário Latino Americano de digestão anaeróbia, Recife. Editora Universitária da UFPE. V.II: 235-238.

NARDI, I. R. (2002). *Degradação de Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos (BTEX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 259p. Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos/USP.

OLSEN, R. H., J. J. KUKOR, and B. KAPHAMMER.(1994). A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* 176:3749-3756.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; MAAS, R.N.; HARMSSEN, H.J.M; STAMS, A.J.M.(1995). *Desulforhabdus amnigenus* gen. nov. sp.nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge. *Arch. Microbiol.* 164:119-124.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VISSER, A.; HULSHOFF POL, L.W., STANS, A.J.M.(1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Ver* 15:119-136.

PERUZZO, T.M.(1993). *Química: na abordagem do cotidiano*. Ed. Moderna.

PHELPS, C.D. and YOUNG,L.Y.(2001). Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Advances in Agronomy*. Vol. 70. Academic Press.

RABUS, R. and WIDDEL, F.(1995). Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch Microbiology*. 164: 448-451.

RABUS, R., FUKUI, M., WILKES, H. and WIDDEL, F.(1996). Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3605-3613.

RABUS, R., NORDHAUS, R., LUDWIG, W. and WIDDEL, F.(1993). Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1444-1451.

ROBERTSON, W.J.; BOWMAN, J.P.; FRANZMAN, P.D. AND MEE, B.J.(2001). *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spor-forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:133-140.

ROCH, F. and VÉDY, J.C.(1999). Modulation of metabolic activity prevents degradation of sorbed toluene. *Chemosphere*. 38:1797-1810.

RUETER, P., RABUS, R., WILKES, H., AECKERSBERG, F., RAINEY, F.A., JANNASCH, H.W. and WIDDEL, F.(1994). Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria. *Nature (London)* 372:455-458.

SAKAMOTO, I.K.(2001). Comparação da Estrutura de comunidades Microbianas Complexas presentes em Sistemas de lodos Ativados Modificados para Remoção Biológica de Fósforo em Excesso, utilizando a Técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC – USP, 2001.

SMALLA, K.; Van OVERBEEK, L.S.; Van ELSAS, J.D.(1993). Prevalence of nptII in kanamycin resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbial Ecology*, 13: 47-58.

STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. Edited by GREENBER, A.E.; CLESCERI, L.S. and EATON, A.D. 18th edition, 1992. Ed. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. WASHINGTON, DC.

TESKE, A; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y. and MUYZER, G.(1996b). Molecular Identification of Bacteria from a Coculture by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of 16S Ribosomal DNA Fragments as a Tool for Isolation in Pure Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, (62): 4210-4215.

TESKE, A; WAWER, C.; MUZYER, G. and RAMSING, N.B.(1996a). Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as Evaluated by Most-Probable-Number Counts and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, (62): 1405-1415.

TSAI, Y.; OLSON, B.H.(1991). Rapid Method for direct Extration of DNA from soil and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, (57): 1070-1074.

UCKO, D.A.(1992). Química para as ciências da saúde: uma introdução a química geral, orgânica e biológica. 2ª ed. 646p. Trad. José Roberto Giglio. São Paulo: Manole.

VAZOLLER, R.F.(1995). Avaliação Do Ecosystema Microbiano De Um Biodigestor Anaeróbio De Fluxo Ascendente E Manta De Lodo, Operado Com Vinhaça Sob Condições Temofílicas. São Carlos, 1995. 259p. Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos/USP.

WHITED, G. M., and D. T. GIBSON.(1991). Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3010-3016.

WIDDEL, F.(1988). Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: *BIOLOGY of anaerobic microorganisms*. Ed. Alexander J. B. Zehnder. John Wiley & Sons, Inc., EUA, 469-586.

WIDDEL, F., and BAK, F.(1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. Chapter 13, *The Prokaryotes*. Second Edition. Springer-Verlag New York Inc.

ZEHNDER, A.J.B.(1988). *Biology of anaerobic microorganisms*. Ed: Wiley-Liss. N.Y.

ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TEIDJE, J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 316-322.

ANEXOS

Tabela A1. Resultados do ensaio de estabilização do tolueno no meio de cultura BRS.

Tempo (horas)	Área do <i>Headspace</i>	Área do Líquido
0	927833	461070
0,5	1282199	530160
1	1544628	471100
2	1404661	590630
3	1350000	543240
4	1261514	622430
6	1204336	657970
8	1191355	559320
24	1187747	567435

Tabela A2. Resultados de concentração de tolueno em função do tempo nos reatores da primeira etapa de degradação:

Reator com 2 mg/L de tolueno.

Líquido			<i>Headspace</i>		
Tempo (horas)	Fator de Resposta	Concentração(mg/L)	Tempo (horas)	Área	Concentração(mg/L)
0	0,009227	2,037471	0	149213	0,016282
48	0,00311	0,238088	48	153315	0,016693
96	0,002333	0,009559	-	-	-
168	0,003923	0,477265	168	154660	0,016827
192	0,006441	1,217794	192	167096	0,018071
216	0,0032	0,264618	216	161014	0,017463
240	0,003601	0,3825	240	159319	0,017293
264	0,003799	0,440853	264	150867	0,016448

Reator com 1,31 mg/L de tolueno.

Líquido			<i>Headspace</i>		
Tempo(horas)	Fator de Resposta	Concentração(mg/L)	Tempo (horas)	Área	Concentração(mg/L)
0	0,006758	1,311206	0	184906	0,019852
48	0,022232	5,862471	48	199536	0,021315
96	0,003037	0,216618	96	206257	0,021987
168	0,006493	1,233147	168	183415	0,019703
192	0,004434	0,627588	192	115538	0,012915
216	0,005443	0,924324	216	90676	0,010429
240	0,00357	0,373647	240	203635	0,021725
264	0,006003	1,089147	-	-	-

Reator com 0,88mg/L de tolueno e 90mg/L de sulfato.

Líquido			Headspace		
Tempo(horas)	Fator de Resposta	Concentração(mg/L)	Tempo(horas)	Área	Concentração(mg/L)
0	0,001395	-0,26632	0	148065	0,016168
24	0,00531	0,885176	24	127508	0,014112
48	0,002882	0,171147	48	121590	0,01352
72	0,002095	-0,06018	72	135720	0,014933
96	0,003429	0,332029	96	135895	0,014951
168	0,003424	0,330588	168	123049	0,013666
192	0,003031	0,215	192	122840	0,013645
216	0,002581	0,082706	216	146602	0,016021
240	0,003939	0,482147	240	131375	0,014499
264	0,003949	0,485029	264	128913	0,014252

Reator com 0,39mg/L de tolueno e 130mg/L de sulfato.

Líquido			Headspace		
Tempo(horas)	Fator de Resposta	Concentração(mg/L)	Tempo(horas)	Área	Concentração(mg/L)
0	0,002505	0,060294	0	128794	0,014241
24	0,002845	0,160324	24	124626	0,013824
48	0,003627	0,390382	48	113366	0,012698
72	0,003074	0,227765	72	118836	0,013245
96	0,003106	0,236912	96	122804	0,013642
168	0,004191	0,556176	168	129768	0,014338
192	0,002598	0,087676	192	121704	0,013532
216	0,002262	-0,01118	216	87875	0,010149
240	0,002067	-0,06841	240	131892	0,01455
264	0,002874	0,168941	264	109058	0,012267

Reator com 2mg/L de tolueno e 288mg/L de sulfato.

Líquido			Headspace		
Tempo(horas)	Fator de Resposta	Concentração(mg/L)	Tempo(horas)	Área	Concentração(mg/L)
0	0,009125	2,007471	0	421448	0,043506
24	0,008687	1,878529	24	376490	0,03901
48	0,007086	1,4075	48	351688	0,03653
72	0,00396	0,488147	72	370959	0,038457
96	0,005776	1,022412	96	364683	0,037829
168	0,009095	1,998588	168	373369	0,038698
192	0,005027	0,802118	192	372383	0,038599
216	0,006661	1,282647	216	259994	0,027361
240	0,0065	1,235176	240	366794	0,038041
264	0,00885	1,926382	264	351169	0,036478

Reator com 2,1mg/L de tolueno e 269mg/L de sulfato.

Líquido			Headspace		
Tempo(horas)	Fator de Resposta	Concentração(mg/L)	Tempo(horas)	Área	Concentração(mg/L)
0	0,006732	1,303412	0	353752	0,036736
24	0,009541	2,129588	24	351929	0,036554
48	0,002074	-0,06647	48	327631	0,034124
72	0,004187	0,555118	72	342431	0,035604
96	0,008406	1,795882	96	332634	0,034625
168	0,00646	1,223412	168	349321	0,036293
192	0,006204	1,148294	192	345406	0,035902
216	0,006807	1,325618	216	184646	0,019826
240	0,005917	1,063791	240	320463	0,033407
264	0,007779	1,611559	264	288671	0,030228

Tabela A3. Resultados da concentração de tolueno em função do tempo nos reatores metanogênicos e sulfetogênicos da segunda etapa de degradação.

Tempo (horas)	2,1mg/L Tolueno	1,9mg/L Tolueno	4,6mg/L Tolueno	4,4mg/L Tolueno	4,1mg/L Tolueno + 560mg/L Sulfato	3,6mg/L Tolueno + 570mg/L Sulfato
0	-	-	-	4,39	4,13	3,67
24	2,1	1,91	4,57	3,99	-	-
48	1,28	-	-	-	4,53	3,54
72	2,03	-	2,51	3,72	-	4,17
96	2,41	2,07	-	4,40	4,17	4,33
168	2,29	1,89	3,26	-	-	-
192	-	-	-	4,17	4,60	4,38
216	1,71	1,58	3,37	-	-	3,77
264	2,02	1,71	3,46	-	3,24	3,86
336	1,66	1,82	3,39	4,1	3,55	3,79
360	2,02	-	-	-	-	-
384	2,48	-	3,78	4,09	3,79	3,99
960	0	0	0	0	0	0

Tabela A4. Resultados da concentração de tolueno em função do tempo nos reatores sulfetogênicos da terceira etapa de degradação.

Tempo	2mg/L A	2mg/L B	4mg/L A	4mg/L B	7mg/L A	7mg/L B
0	2,11	2,335	3,705	0	7,38	7,72
24	1,56	2,085	3,58	0	5,185	6,195
48	1,61	2,045	3,51	0	5,68	5,995
120	1,95	2,325	3,955	0	7,28	6,45
264	2,005	0	4,53	0	6,83	5,94
432	1,73	0	3,39	0	5,895	6,465
600	1,275	0	1,32	0	1,47	2,135
792	1,445	0	0	0	0	0

Tabela A5. Resultados da concentração de tolueno em função do tempo nos reatores metanogênicos da terceira etapa de degradação.

Tempo (horas)	1,98mg/L	1,93mg/L	3,89mg/L	3,7mg/L	7,53mg/L	7,21mg/L
0	1,98	1,93	3,89	3,705	7,535	7,21
24	1,845	1,85	3,635	3,615	6,705	6,915
48	1,99	1,955	4,265	4,065	7	6,805
168	2,05	1,625	3,39	3,385	6,98	5,995
312	1,805	1,69	3,1	3,32	4,025	4,52
480	1,58	1,63	3,605	2,535	4,92	6,285
648	1,395	1,45	3,53	2,725	5,57	4,155
840	0,925	1,575	2,715	2,04	4,92	6,34

Tabela A6. Concentração de sulfato em função do tempo nos reatores em ensaio de enriquecimento com Lactato de Sódio e Acetato de Sódio.

Tempo (horas)	Concentração de Sulfato (mg/L)		
	Reator 1	Reator 2	Média
0	975	1175	1075
24	625	775	700
48	550	500	525
72	325	375	350
96	300	275	287,5
120	50	175	112,5
144	25	25	25
168	3	1,5	2,25

Tabela A7. Resultados da concentração de sulfato em função do tempo nos reatores sulfetogênicos da primeira etapa de degradação.

Tempo (horas)	0,88mg/L Tolueno	0,39mg/L Tolueno	2mg/L tolueno	2,1mg/L Tolueno
0	90	130	288	269
24	10	5	244	244
48	0	0	-	163
72	0	0	-	144
96	0	0	163	6,3
168	0	0	88	4
192	0	0	4	0
216	0	0	0	0
240	0	0	0	0
264	0	0	0	0

Tabela A8. Resultados de concentração de sulfato em função do tempo nos reatores sulfetogênicos da segunda etapa de degradação.

Tempo (horas)	4,5mg/L Tolueno	3,6mg/L Tolueno
0	560	570
24	540	530
72	490	510
216	420	420
336	370	390
384	360	350
432	290	230
504	230	220
960	0	0
984	0	0
1008	0	0

Tabela A9. Resultados de concentração de sulfato em função do tempo nos reatores sulfetogênicos da terceira etapa de degradação.

Tempo (horas)	2,11mg/L Tolueno	2,33mg/L Tolueno	3,7mg/L Tolueno	Ausência de Tolueno	7,38mg/L Tolueno	7,72mg/L Tolueno
0	194	220	410	420	600	610
24	0	0	280	310	430	490
48	0	0	312	325	450	425
120	0	0	238	275	400	413
312	0	0	186	170	334	334
480	0	0	7	7	227	255
648	0	0	0	0	87	93
720	0	0	0	0	17	22
792	0	0	0	0	0	0

Tabela A10. Resultados de percentual de metano em função do tempo nos reatores do ensaio de enriquecimento.

Tempo (horas)	Reator 3	Reator 4	Média (%)
24	10,95	14,03	12,49
48	28,21	28,88	28,54
72	31,50	29,37	30,43
96	31,15	30,05	30,6
120	31,18	30,74	30,97
144	30,27	30,04	30,16
168	29,07	28,53	28,8
192	29,35	29,91	29,63

Tabela A11. Resultados de percentual de metano acumulado nos reatores metanogênicos e sulfetogênicos da primeira etapa de degradação.

Tempo (horas)	2mg/L Tolueno	1,31mg/L Tolueno	0,88mg/L Tolueno e 90mg/L Sulfato	0,39mg/L Tolueno + 130mg/L Sulfato	2mg/L Tolueno + 288mg/L Sulfato	2,1mg/L Tolueno + 269mg/L Sulfato
24	3,85	3,19	2,90	3,28	2,56	2,88
48	5,40	4,61	4,27	4,82	3,80	3,53
72	6,43	5,41	5,14	5,73	4,02	4,28
96	7,37	6,15	5,83	6,56	4,29	4,64
168	9,42	7,78	7,50	8,35	4,87	5,28
192	9,97	8,36	7,95	8,93	5,04	5,47
216	10,52	8,84	8,47	9,49	5,13	5,53
264	11,58	9,78	9,44	10,62	5,36	5,82
336	12,88	10,80	10,56	11,33	5,35	5,94
360	13,08	11,01	10,43	11,98	5,22	6,00
384	13,03	10,74	11,12	11,96	5,38	5,72
408	13,99	11,83	11,51	12,95	5,69	6,16

Tabela A12. Resultados de percentual de metano acumulado nos reatores metanogênicos e sulfetogênicos da segunda etapa de degradação.

Tempo (horas)	2,1mg/L Tolueno	1,9 mg/L Tolueno	4,6mg/L Tolueno	4,0mg/L Tolueno	4,5mg/L Tolueno + 560mg/L Sulfato	3,6mg/L Tolueno + 570mg/L Sulfato
24	3,86	3,19	2,90	3,28	2,56	2,88
48	5,41	4,61	4,27	4,82	3,80	3,53
72	6,43	5,41	5,14	5,73	4,02	4,28
96	7,37	6,15	5,83	6,56	4,29	4,64
168	9,42	7,78	7,50	8,35	4,87	5,28
192	9,98	8,36	7,95	8,93	5,05	5,47
216	10,52	8,84	8,47	9,49	5,13	5,53
264	11,58	9,78	9,44	10,62	5,36	5,82
336	12,88	10,80	10,56	11,33	5,35	5,94
360	13,08	11,01	10,43	11,98	5,22	6,00
384	13,03	10,74	11,12	11,96	5,38	5,72
408	14,00	11,83	11,51	12,95	5,69	6,16
960	20,81	17,37	17,67	18,95	8,35	7,56
984	20,96	17,65	17,82	19,13	8,62	8,96
1008	21,28	17,72	18,26	19,15	8,87	9,11

Tabela A13. Resultados de percentual de metano acumulado em função do tempo nos reatores sulfetogênicos da terceira etapa de degradação.

Tempo (horas)	2,11mg/L Tolueno + 194mg/L Sulfato	2,33mg/L Tolueno + 220mg/L Sulfato	3,7mg/L Tolueno + 410mg/L Sulfato	Ausência de Tolueno + 420mg/L Sulfato	7,38mg/L Tolueno + 600mg/L Sulfato	7,72mg/L Tolueno + 610mg/L Sulfato
24	4,84	5,52	4,65	5,13	5	5,18
48	8,54	9,22	7,87	8,77	8,63	8,41
96	9,7	10,47	9,03	9,16	9,91	9,61
120	10,31	11,35	9,84	10,42	10,1	11
144	11,36	12,3	10,24	11,2	10,4	11,75
168	12,38	13,33	11,56	12,1	12	12,7
192	12,14	13,43	11,6	12,27	12,27	12,54
264	13,53	14,6	12,5	13,31	13,44	13,7
432	17,25	19,22	15,2	16,31	16,18	16,4
600	18,97	20,84	16,1	17,14	17,22	17,12
624	19,3	21	16,35	17,4	17,38	17,1
648	19,41	21	16,41	17,58	17,57	17,35
672	19,56	21,33	16,68	17,84	17,82	17,38
792	20,63	22,51	17,9	19,14	18,3	18
816	20,72	22,78	18,36	19,27	18,46	18,43
936	21,82	21,5	15,95	17,52	16,22	18,93
984	20,35	21,62	17,98	18,33	16,96	18,37
1032	20,87	20,03	17,61	17,52	17,13	17,53

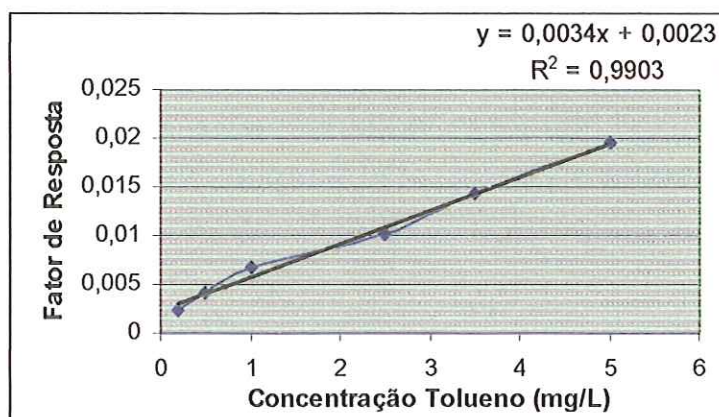
Tabela A14. Resultados de percentual de metano acumulado em função do tempo nos reatores metanogênicos da terceira etapa de degradação.

Tempo (horas)	1,98mg/L Tolueno	1,93mg/L Tolueno	3,89mg/L Tolueno	3,7mg/L Tolueno	7,53mg/L Tolueno	7,21mg/L Tolueno
24	3,32	2,45	2,11	2,19	2,33	1,63
48	7,48	6,88	5,95	6,37	6,19	5,31
72	9,24	8,37	7,36	7,93	7,76	6,7
144	13,2	12,07	10,21	10,61	10,58	9,83
168	13,69	12,2	10,4	11,54	11,28	10,83
192	14,48	13,51	11,31	12,25	12	10,94
216	15,3	13,46	12	12,75	12,93	11,41
240	15,75	14,6	12,7	14,24	13,44	12,23
312	17,2	15,86	13,61	14,71	14,72	13,26
480	20,65	19,97	18,85	18,76	18,6	16,82
648	22,57	21,71	20,34	20,73	20,12	18,24
672	23,11	21,92	20,68	21,22	20,48	18,54
696	23,21	22,05	20,93	21,33	20,63	18,7
720	23,28	22,41	21,04	21,62	20,86	18,9
840	25,15	23,67	22,1	22,74	22,1	19,97
864	25,23	23,63	22,15	22,7	22,17	20,4
984	25,17	24,81	21,73	22,3	22,9	19,06
1032	26,49	21,49	22,05	20,13	20,93	19,89
1080	27,28	23,41	20,7	21,87	22,16	19,01

Tabela A15. Resultados de Sólidos Totais Voláteis do inoculo e dos reatores dos ensaios de enriquecimento e de degradação.

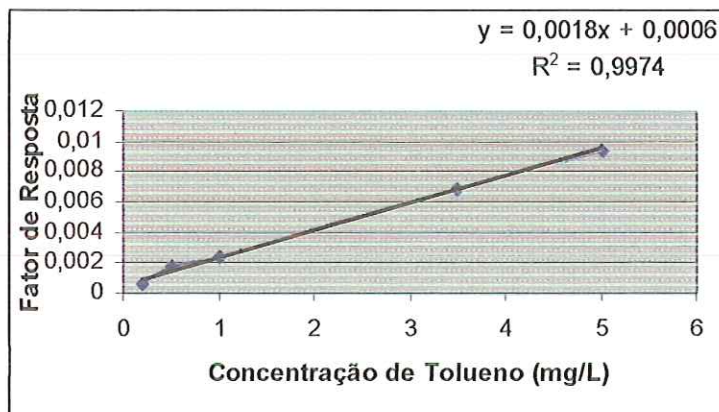
Sólidos Totais Voláteis	
Lodo do reator UASB	45g/L
Lodo ensaio de enriquecimento	
975mg/L SO ₄ ⁻²	3,6g/L
1175mg/L SO ₄ ⁻²	3,8g/L
Lodo degradação	
2,0mg/L Tol	4,1g/L
1,31 mg/L Tol	3,9 g/L
0,88 mg/L Tol + 90mg/L SO ₄ ⁻²	4,5 g/L
0,39 mg/L Tol + 130mg/L SO ₄ ⁻²	3,5 g/L
2 mg/L Tol + 288mg/L SO ₄ ⁻²	4,3 g/L
2,1 mg/L Tol + 269mg/L SO ₄ ⁻²	3,8 g/L
2,1 mg/L Tol	5,2 g/L
1,9 mg/L Tol	4,8 g/L
4,6 mg/L Tol	5,7 g/L
4 mg/L Tol	4,1 g/L
4,5 mg/L Tol + 560mg/L SO ₄ ⁻²	3,7 g/L
3,5 mg/L Tol + 570mg/L SO ₄ ⁻²	4,2 g/L
2,11 mg/L Tol + 194mg/L SO ₄ ⁻²	4,7 g/L
2,33 mg/L Tol + 220mg/L SO ₄ ⁻²	4,3 g/L
3,7 mg/L Tol + 410mg/L SO ₄ ⁻²	4,2 g/L
Ausência de Tol + 420mg/L SO ₄ ⁻²	4,5 g/L
7,38 mg/L Tol + 600mg/L SO ₄ ⁻²	4,9 g/L
7,72mg/L Tol + 610 mg/L SO ₄ ⁻²	4,7g/L
1,93 mg/L Tol	4,6 g/L
3,89 mg/L Tol	4 g/L
3,7 mg/L Tol	3,8 g/L
7,53 mg/L Tol	3,7 g/L
7,21 mg/L Tol	4,4 g/L

Curva padrão de tolueno elaborada em 17/02/2002



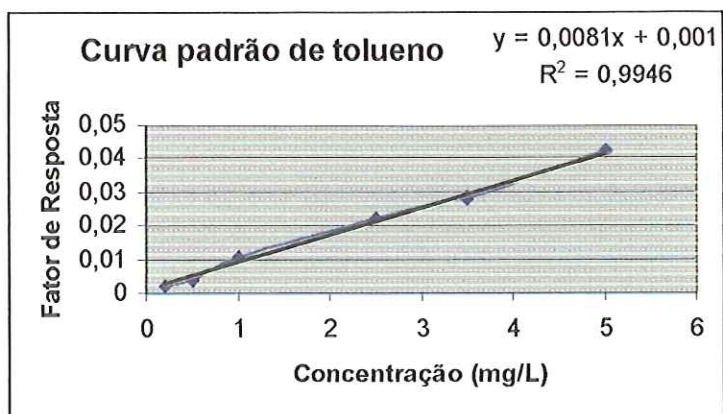
Concentração (mg/L)	Fator de Resposta
0,2	0,002411
0,5	0,004111
1	0,006782
2,5	0,010105
3,5	0,01432
5	0,01961

Curva padrão de tolueno elaborada em 02/05/2002



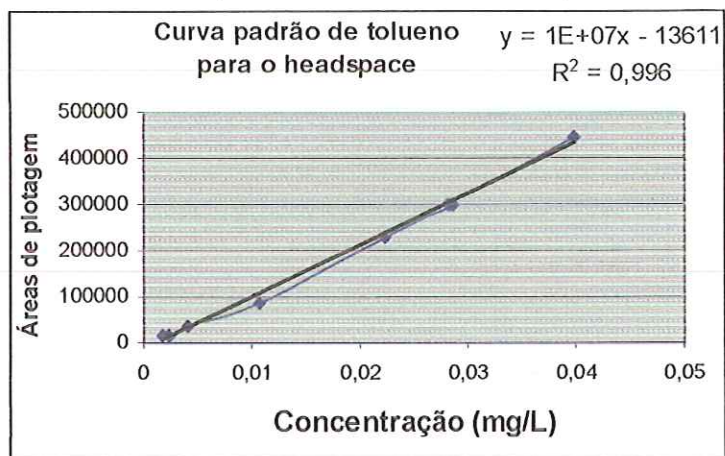
Concentração (mg/L)	Fator de Resposta
0,2	0,000655
0,5	0,001734
1	0,002378
3,5	0,006896
5	0,009499

Curva padrão de tolueno usada para elaboração da Curva padrão do *headspace*.



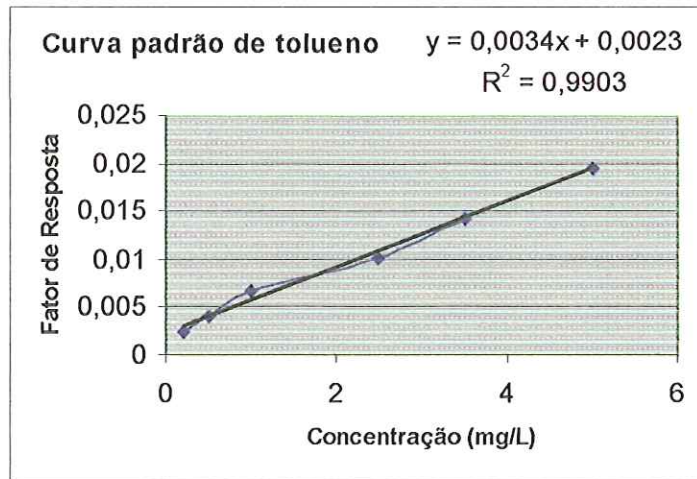
Concentração(mg/L)	Fator de Resposta	Área de Plotagem
0,2	0,002344	16818
0,5	0,004169	37081
1	0,010698	54102
2,5	0,022365	230330
3,5	0,02859	298492
3,5	0,028302	300640
5	0,042374	223085

Curva padrão de tolueno no *headspace*



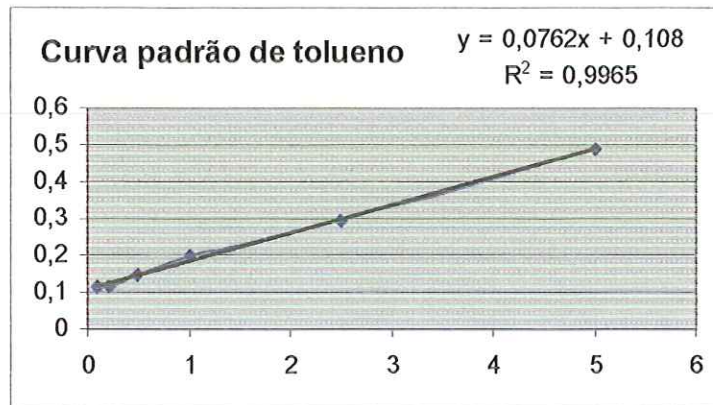
Concentração (mg/L)	Área de plotagem
0,001832	17565
0,002344	16818
0,004169	37081
0,010698	89514
0,022365	230330
0,02859	298492
0,028302	300640
0,039858	446407

Curva padrão de tolueno elaborada em 10/07/2002.



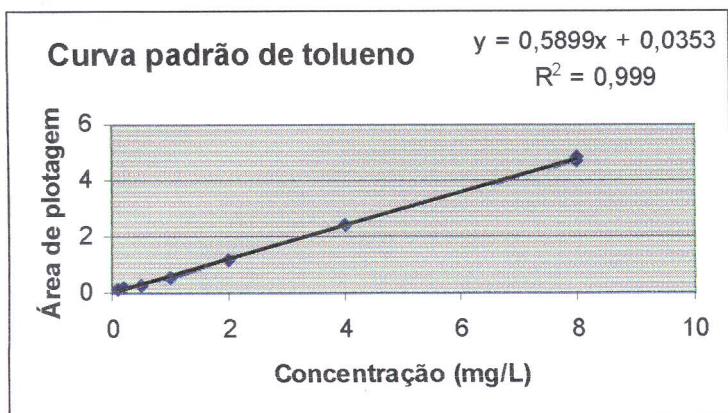
Concentração (mg/L)	Fator de Resposta
0,2	0,002411
0,5	0,004111
1	0,006782
2,5	0,010105
3,5	0,01432
5	0,01961

Curva padrão de tolueno elaborada em 09/09/2002.



Concentração (mg/L)	Fator de Resposta
0,1	0,113191
0,2	0,113543
0,5	0,149514
1	0,19906
2,5	0,292225
5	0,489381

Curva padrão de tolueno elaborada em 16/01/2003.



Concentração	Fator de Resposta
0,1	0,14702
0,1	0,165314
0,2	0,197461
0,2	0,194956
0,5	0,284963
0,5	0,292168
1	0,539574
1	0,563498
2	1,192501
4	2,430747
8	4,712647
8	4,804048