

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA
REMOÇÃO E DEGRADAÇÃO DE ALQUILBENZENO
LINEAR SULFONADO (LAS) EM REATORES
ANAERÓBIOS COM BIOFILME E CÉLULAS
PLANCTÔNICAS**

Iolanda Cristina Silveira Duarte

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

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

São Carlos
2006

**Aos meus pais Cláudio e Maria Amélia,
com todo meu amor e gratidão**

AGRADECIMENTOS

Á Deus por ser meu refúgio e minha fortaleza

Á minha orientadora Profa. Dra. Maria Bernadete Varesche, por ter acreditado em mim e pela permanente orientação na realização deste trabalho, e grande contribuição à minha formação pessoal e profissional. Obrigada pelo seu apoio e exemplo.

Aos Professores Dr. Eugênio Foresti e Dr. Marcelo Zaiat pelo incentivo, disposição e atenção dada durante meu doutorado,

As queridas Maria Ângela Tallarico Adorno (Janja) e Elizabeth Mattos Moraes (Beth) pela amizade e colaboração inestimável

Aos técnicos Roberto Bergamo, Dra. Eloísa Pozzi e Wagner, muito obrigada.

Á Pavi, Sá, Flávia, Fernanda, Rose, Márcia, Valderez, Cecília e Silvia pela ajuda e atenção dada.

Aos doadores dos lodos Dr. Roberto Alves de Oliveira e Dr. Fernando Passig, muito obrigada.

Á Dra. Andréa Buzzini pela amizade, por ter compartilhado comigo a mesma câmara de reatores.

Á Nora Kátia Saavedra Del Aguila, obrigada por sua amizade e ajuda nas análises de DGGE.

Á Kelly Araújo Rodrigues por sempre estar disposta a ouvir e ajudar.

Aos meus primeiros amigos em São Carlos: Ariovaldo, Arnaldo, Cristina, Estela, Eduardo, José Alberto (Betão), Glória, Kelly, Isabel, Júlia, Sandra e Sidney, obrigada pela acolhida.

A minha companheira de LAS – Lorena Lima de Oliveira, obrigada por compartilhar comigo essa idéia.

Aos todos amigos do LBP em especial Bruna, Dalva, Daniele, Flávia, Leonardo, Lara, Luana, Karina, Ana Paula, Márcia, Mercia, Neyson, Tiago Momenti, Tiago Martins e Gunther.

Aos ex-alunos de iniciação científica que colaboram com este trabalho: Laura, Tatiana e Marcelo, muito obrigada.

As amigas assissenses Luisa e Meire que apesar da distância nunca se esqueceram de mim

Ao meu amigo-irmão Marcelo Khnayfes a quem não tenho palavras para agradecer.

Desejo também expressar meus agradecimentos a toda minha família Silveira e Duarte pela torcida, orações e carinho.

Aos meus queridos sobrinhos Isabella e Matheus por darem um colorido especial em minha vida.

Aos meus pais, meus grandes exemplos de vida, sempre estiveram dispostos a me escutar e sempre serão meu porto seguro para todas as horas.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq pelo financiamento do trabalho.

A todos que convivi durante a realização deste trabalho agradeço pela compreensão, atenção, companheirismo, e pela troca de conhecimentos que foi muito importante para meu crescimento profissional e pessoal.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XXII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XXIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 CARACTERÍSTICAS DOS SURFACTANTES OU AGENTES TENSOATIVOS	4
3.2 ALQUILBENZENO LINEAR SULFONADO	5
3.3 SURFACTANTES E O AMBIENTE	7
3.4 REMOÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LAS.....	11
3.5 DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DO LAS.....	14
3.6 FATORES QUE INTERFEREM NA DEGRADAÇÃO DO LAS	24
3.7 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO LAS	25
3.8 REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO.....	26
3.9 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 DESCRIÇÃO GERAL	33
4.2 SURFACTANTE.....	35
4.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DO LAS.....	35
4.3.1 Condições Cromatográficas Usando Coluna C-18 como Fase Estacionária	36

4.3.2 Condições Cromatográficas Usando a Coluna Synergi MAX-RP como Fase Estacionária.....	37
4.3.3 Condições Cromatográficas Usando a Coluna C-8 como Fase Estacionária	38
4.4 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO LAS	41
4.4.1 Validação do Método Cromatográfico.....	42
4.4.1.1 Linearidade.....	42
4.4.1.2 Precisão	43
4.4.1.3 Limite de Detecção	43
4.4.1.4 Repetibilidade	43
4.5 EXTRAÇÃO DO LAS ADSORVIDO NO LODO E NAS ESPUMAS DE POLIURETANO.	44
4.5.1 Extração do LAS Adsorvido no Lodo.....	44
4.5.2 Extração do LAS Adsorvido nas Espumas de Poliuretano	45
4.5.3 Purificação e Concentração das Amostras para Extração do LAS	46
4.6 TESTES DE ADSORÇÃO DE LAS EM ESPUMAS DE POLIURETANO	46
4.6.1. Curva de Exaustão	47
4.6.2 Tempo de Contato	48
4.6.3 Isotermas	49
4.7 ENSAIOS EM REATOR ANAERÓBIO EM BATELADA	49
4.7.1 Descrição dos Reatores em Batelada	49
4.7.2 Inóculo	50
4.7.3 Ensaio Usando Meio Mineral com Diferentes Concentrações de LAS	50
4.7.4 Ensaios Usando Esgoto Sintético e LAS	51
4. 8 ENSAIOS EM REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO.....	53
4.8.1 Descrição do Reator Contínuo	54
4.8.2 Suporte para Imobilização do Lodo Anaeróbio	55
4.8.3 Inoculação dos reatores.....	55
4.8.4 Preparação e Composição do Esgoto Sintético.....	55
4.9 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS.....	57
4.10 BALANÇOS DE MASSA DO LAS	58
4.11 EXAMES MICROSCÓPICOS	59
4.12 ANÁLISES DA DIVERSIDADE MICROBIANA	59

4.12.1	Amplificação por PCR	60
4.12.2	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante.....	62
4.13	CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS PRESENTES NOS RAHLFS	63
4.13.1	Extração de DNA Genômico Total.....	63
4.13.2	Amplificação do RNAr 16S.....	63
4.13.3	Clonagem em Vetor pGEM T Easy	64
4.13.4	Amplificação do inserto (gene RNAr 16S).....	64
4.13.5	Seqüenciamento do gene RNAr 16S.....	65
4.13.6	Análise Filogenética.....	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	ANÁLISE DO ALQUILBENZENO LINEAR SULFONADO	67
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA DETERMINAÇÃO DO LAS	72
5.3	ADSORÇÃO DE LAS EM ESPUMAS DE POLIURETANO.....	74
5.3.1	Curva de Exaustão	74
5.3.2	Tempo de Contato para Saturação das Espumas.....	76
5.3.3	Isoterma de Adsorção.....	77
5.4	AVALIAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO LAS ADSORVIDO EM LODO BIOLÓGICO.....	79
5.5	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO LAS SOBRE OS MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS	80
5.5.1	Reatores em Batelada Alimentados com Meio Mineral e LAS.....	80
5.5.2	Reatores em Batelada Alimentados com Esgoto Sintético, Ácidos Orgânicos e LAS	87
5.6	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS REATORES ANAERÓBIOS HORIZONTAIS DE LEITO FIXO NO TRATAMENTO DO LAS	91
5.6.1	Balço de massa de LAS.....	134
5.7	ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA	136
5.8	ANÁLISE DE SEQÜENCIAMENTO DO FRAGMENTO DO RNAr 16S	159
6.	CONCLUSÕES	176
7.	RECOMENDAÇÕES	178

ANEXO 1	179
ANEXO 2	180
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	181

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura do alquilbenzeno linear sulfonado	06
Figura 3.2	Degradação anaeróbia de alquilbenzeno linear sulfonado	16
Figura 3.3	Estrutura geral do sulfenil carboxilato	17
Figura 4.1	Fluxograma experimental geral	35
Figura 4.2	Fluxograma das etapas de desenvolvimento da metodologia para determinação do LAS por HPLC	37
Figura 4.3	Fluxograma das etapas de extração de LAS adsorvido no lodo	46
Figura 4.4	Fluxograma dos testes de adsorção de LAS nas espumas de poliuretano	48
Figura 4.5	Esquema do reator diferencial	49
Figura 4.6	Fluxograma dos ensaios em reatores em batelada com meio mineral e LAS	52
Figura 4.7	Fluxograma dos ensaios em reatores anaeróbios em batelada alimentados com esgoto sintético	54
Figura 4.8	Fluxograma experimental da operação dos RAHLFs	55
Figura 4.9	Esquema reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada	56
Figura 4.10	Fluxograma da análise da estrutura da comunidade microbiana presente nas diferentes etapas de operação dos RAHLFs usando PCR/DGGE	61
Figura 5.1	Cromatograma da solução de LAS em fase estacionária -coluna C8, eluição isocrática com MeOH/H ₂ O (perclorato de sódio (0,075 M), fluxo de 0,5 mL/min , detector UV a 230 nm e temperatura de 32°C	71
Figura 5.2	Cromatograma da solução de LAS em fase estacionária -coluna C8, gradiente de eluição com MeOH/H ₂ O e perclorato de sódio (0,075 M), fluxo de 0,5 mL/min , detector fluorescência λ_{exc} 225 nm e λ_{em} 290 nm e temperatura de 35°C	72
Figura 5.3	Concentração de LAS no efluente dos reatores diferenciais e massa adsorvida na espuma de poliuretano	77

Figura 5.4	Adsorção de LAS na espuma de poliuretano em função do tempo de contato	78
Figura 5.5	Variação da relação massa de LAS adsorvida e massa de espuma em função da concentração inicial do surfactante	79
Figura 5.6	Morfologias observadas em microscopia óptica de contraste de fase do lodo granular do reator UASB utilizado no tratamento de resíduos de suinocultura: (a) bacilos, (b) bacilos curvos (c) morfologia semelhante a <i>Methanosaeta</i> sp.,(d) bacilos em cadeia e filamento	82
Figura 5.7	Variação temporal de metano nos reatores anaeróbios em batelada alimentados com meio mineral e LAS. EA-controle, EB—50 mgLAS/L; EC-100 mgLAS/L; ED-200 mgLAS/L	84
Figura 5.8	Variação temporal de metano nos reatores anaeróbios em batelada alimentados com meio mineral, co-substratos e LAS	85
Figura 5.9.	Morfologias observadas em microscopia óptica de contraste de fase das amostras dos reatores em batelada alimentados com meio mineral: (a) morfologia semelhante a <i>Methanosaeta</i> sp. (b) cocos, (c) bacilos curvos e (d) bacilos	88
Figura 5.10	Variação temporal do metano nos reatores em batelada alimentados com esgoto sintético	89
Figura 5.11	Morfologias observadas em microscopia óptica de contraste de fase das amostras dos reatores em batelada alimentados com esgoto sintético: (a) morfologia semelhante a <i>Methanosaeta</i> sp, (b) cocos, (c) bacilos curvos, (d) filamento septado	91
Figura 5.12	Fluxograma experimental das etapas de operação do reator R1	93
Figura 5.13	Fluxograma experimental de operação do reator R2	94
Figura 5.14	Variação espacial dos valores de DQO na operação do reator R1	98
Figura 5.15	Variação espacial dos valores de DQO na operação do reator R2	99
Figura 5.16	Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico na primeira etapa de operação do reator R1	100
Figura 5.17	Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico na primeira etapa de operação do reator R2	100
Figura 5.18	Variação espacial da DQO na segunda etapa de operação do reator R1	102

Figura 5.19	Variação espacial da DQO na segunda etapa de operação do reator R2	102
Figura 5.20	Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico na segunda etapa de operação do reator R1	103
Figura 5.21	Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico na segunda etapa de operação do reator R2	103
Figura 5.22	Variação espacial dos valores de sulfato na segunda etapa de operação do reator R1	104
Figura 5.23	Variação espacial dos valores de sulfato na segunda etapa de operação do reator R2	105
Figura 5.24	Variação espacial da concentração de LAS na segunda etapa de operação do reator R1	105
Figura 5.25	Variação espacial das concentrações de LAS na segunda etapa de operação do reator R2	106
Figura 5.26	Variação espacial dos valores de DQO na terceira etapa de operação do reator R1. 1º perfil antes da colmatação e 2º perfil após colmatação do leito	108
Figura 5.27	Variação espacial dos valores de DQO na terceira etapa de operação do reator R2	108
Figura 5.28	Variação espacial dos valores de ácidos acético, ácido propiônico e ácido isobutírico no primeiro perfil da terceira etapa da operação do reator R1	109
Figura 5.29	Variação espacial dos valores de ácidos acético, ácido propiônico no primeiro perfil da terceira etapa da operação do reator R2	109
Figura 5.30	Variação espacial dos valores de ácidos orgânicos no segundo perfil da terceira etapa da operação do reator R1	110
Figura 5.31	Variação espacial dos valores de ácidos orgânicos voláteis no segundo perfil da terceira etapa da operação do reator R2	110
Figura 5.32	Variação espacial dos valores de LAS na terceira etapa de operação do reator R1. 1º perfil antes da colmatação e 2º perfil após colmatação	111
Figura 5.33	Variação espacial dos valores de LAS na terceira etapa de operação do reator R2	111

Figura 5.34	Variação espacial dos valores de sulfato na terceira etapa de operação do reator R1	112
Figura 5.35	Variação espacial dos valores de sulfato na terceira etapa de operação do reator R2	113
Figura 5.36	Variação espacial dos valores de sulfeto na terceira etapa de operação do reator R1	113
Figura 5.37	Variação espacial dos valores de sulfeto na terceira etapa de operação do reator R2	114
Figura 5.38	Variação espacial dos valores de DQO na quarta etapa de operação do reator R1	116
Figura 5.39	Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico no primeiro perfil da quarta etapa de operação do reator R1	116
Figura 5.40	Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico no segundo perfil da quarta etapa de operação do reator R1	117
Figura 5.41	Variação espacial do LAS na segunda etapa de operação do reator R2	117
Figura 5.42	Variação espacial dos valores de DQO na quarta etapa de operação do reator R2	118
Figura 5.43	Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico da quarta etapa de operação do R2	118
Figura 5.44	Variação espacial dos valores de LAS na quarta etapa de operação do reator R2	119
Figura 5.45	Variação espacial dos valores de sulfato na quarta etapa de operação do reator R1	120
Figura 5.46	Variação espacial dos valores de sulfato na quarta etapa de operação do reator R2	120
Figura 5.47	Variação espacial dos valores de sulfeto na quarta etapa de operação do reator R1	122
Figura 5.48	Variação espacial dos valores de sulfeto na quarta etapa de operação do reator R2	122
Figura 5.49	Variação espacial dos valores de LAS realizado na quinta etapa de operação do reator R2	123

Figura 5.50	Variação espacial dos valores de sulfato na quinta etapa de operação do reator R2	124
Figura 5.51	Variação espacial dos valores de sulfeto na quinta etapa de operação do reator R2	125
Figura 5.52	Variação temporal dos valores de LAS na operação do reator R1	127
Figura 5.53	Variação temporal dos valores de LAS na operação do reator R2	127
Figura 5.54	Eficiência de remoção de LAS durante a operação do reator R1	128
Figura 5.55	Eficiência de remoção de LAS durante a operação do reator R2	128
Figura 5.56	Variação temporal dos valores de DQO bruta durante a operação do reator R1	129
Figura 5.57	Variação temporal dos valores de DQO bruta durante a operação do reator R2	130
Figura 5.58	Variação temporal dos valores de DQO filtrada durante a operação do reator R1	130
Figura 5.59	Variação temporal dos valores de DQO filtrada durante a operação do reator R2	131
Figura 5.60	Eficiência de remoção de DQO bruta e filtrada durante a operação do reator R1	131
Figura 5.61	Eficiência de remoção de DQO bruta e filtrada durante a operação do reator R1	132
Figura 5.62	Variação temporal dos valores de alcalinidade a bicarbonato durante a operação do reator R1	132
Figura 5.63	Variação temporal dos valores de alcalinidade a bicarbonato durante a operação do reator R2	133
Figura 5.64	Variação temporal dos valores de ácidos voláteis totais no efluente durante a operação do reator R1	133
Figura 5.65	Variação temporal dos valores de ácidos voláteis totais no efluente durante a operação do reator R2	134
Figura 5.66	Valores de sólidos totais voláteis nos reatores para diferentes etapas de operação	135
Figura 5.67	Microscopia óptica de contraste de fase de morfologias	

- microbianas presentes nas espumas de poliuretano na primeira etapa de operação do reator R1 alimentado com esgoto sintético: (a) diplococos, (b) bacilos curvos, (c) filamentos delgados e longos e (d) bacilos curvos 141
- Figura 5.68 Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano, na primeira etapa de operação do reator R2, alimentado com esgoto sintético: (a) cocos, cocobacilos, bacilos e filamento (b) bacilos e bacilos curvos, (c) cocos (d) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. 142
- Figura 5.69 Microscopia óptica de contraste de fase de morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na segunda etapa de operação do reator R1, alimentado com esgoto sintético e LAS (7 mg/L): (a) bacilos, bacilos curvos e espirilo, (b) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp., (c) bacilos e bacilos curvos e (d) filamentos 145
- Figura 5.70 Microscopia eletrônica de varredura (5000x) das amostras do biofilme do reator R1, na segunda etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (7 mg/L): (a) bacilos e (b) bacilos curvos 146
- Figura 5.71 Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano, na segunda etapa de operação do reator R2, alimentado com esgoto sintético e LAS (7 mg/L): (a) bacilos, filamentos delgados e cocos, (b) bacilos curvos, (c) e (d) bacilos e cocobacilos 146
- Figura 5.72 Microscopia eletrônica de varredura (5000x) das amostras do biofilme do reator R2, na segunda etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (7 mg/L): (a) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp., (b) bacilos e cocos 147
- Figura 5.73 Microscopia óptica de contraste de fase de morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na terceira etapa de operação do reator R1 alimentado com esgoto sintético e LAS (14 mg/L): (a) espirilos e bacilos, (b) bacilos, filamentos, bacilos curvos e morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. 151
- Figura 5.74 Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na terceira etapa de operação do reator R2 alimentado com esgoto sintético e LAS (14 mg/L): (a) bacilos e bacilos curvos, (b) bacilos, (c) bacilos e cocobacilos (d) bacilos curvos, morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp. e filamento delgado 152
- Figura 5.75 Microscopia óptica de contraste de fase de morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano no final de 153

- operação do reator R1, alimentado com esgoto sintético, extrato de levedura e LAS (14 mg/L), sem amido: (a) *Methanosarcina* sp. (b) bactérias fototróficas semelhantes a *Chromatium* sp.
- Figura 5.76 Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na quarta etapa de operação do reator R2 alimentado com esgoto sintético, extrato de carne e LAS (14 mg/L), sem amido: (a) bacilos curvos, espirilos e bacilos, (b) morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp. 155
- Figura 5.77 Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano, na quinta etapa de operação do reator R2 alimentado com LAS (14 mg/L): (a) bacilos curvos, (b) filamento delgado (c) morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp. (d) bacilos curvos 157
- Figura 5.78 Géis de DGGE das amostras do biofilme nas diferentes etapas de operação dos reatores utilizando *primers* para Domínio *Bacteria*: (a) R1 e (b) R2 (gradiente de 30-60%) 158
- Figura 5.79 Géis de DGGE das amostras do biofilme nas diferentes etapas de operação dos reatores utilizando *primers* para o grupo das BRS: (a) R1 e (b) R2 (gradiente de 30-60%) 159
- Figura 5.80 Géis de DGGE nas diferentes etapas de operação dos reatores utilizando *primers* para o Domínio *Archaea*: (a) R1 e (b) R2 (gradiente de 40-60%) 160
- Figura 5.81 Árvore filogenética do reator R1 mostrando a posição dos clones derivados das seqüências RNAr 16S relacionados Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales. *Cytophaga marinoflava* ATCC 19326 foi usada como grupo externo. Valores de bootstrap ≥ 70 nos nós e internos em 1000 replicações. A taxa de substituição a cada 100 nucleotídeos foi de 0,05 como indicado na barra de escala 165
- Figura 5.82 Árvore filogenética do reator R1 mostrando a posição dos clones derivados das seqüências do RNAr 16S relacionados a Filo Proteobacteria, classe [Alpha](#); Ordem Rhizobiales e [Rhodospirillales](#). *Cytophaga marinoflava* ATCC 19326 foi usada como grupo externo. Valores de bootstrap ≥ 73 nos nós e internos em 1000 replicações. A taxa de substituição a cada 100 nucleotídeos foi de 0,05 como indicado na barra de escala 168
- Figura 5.83 Árvore filogenética do reator R2 mostrando a posição dos clones derivados das seqüências do RNAr 16S relacionados Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales. *Xanthomonas vesicatora* foi usada como grupo externo. Valores de bootstrap ≥ 78 nos nós e internos em 1000 replicações. A taxa de

substituição a cada 100 nucleotídeos foi de 0,05 como indicado na barra de escala 173

Figura 5.84 Árvore filogenética do reator R2 mostrando a posição dos clones derivados das seqüências do RNAr 16S relacionados Filo Proteobacteria, Classe Alfa -Proteobacteria e Delta-Proteobacteria. *Xanthomonas vesicatora* foi usada como grupo externo. Valores de bootstrap ≥ 73 nos nós e internos em 1000 replicações. A taxa de substituição a cada 100 nucleotídeos foi de 0,05 como indicado na barra de escala 176

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Quantidade diária de LAS usada por pessoa	07
Tabela 3.2	Concentração de LAS no esgoto sanitário	08
Tabela 3.3.	Concentração de LAS adsorvido ou precipitado em lodos anaeróbios de estações de tratamento de esgoto sanitário (Espanha)	13
Tabela 3.4	Concentrações inibidoras de surfactantes para a metanogênese	24
Tabela 3.5	Aplicação do RAHLF, em escala de bancada com células imobilizadas em espumas de poliuretano	29
Tabela 4.1	Meio Mineral	40
Tabela 4.2	Primeira versão do sistema de gradiente de eluição na coluna C8	40
Tabela 4.3	Segunda versão do sistema de gradiente de eluição na coluna C8	41
Tabela 4.4	Terceira versão do sistema de gradiente de eluição na coluna C8	41
Tabela 4.5	Quarta versão do sistema de gradiente de eluição na coluna C8	41
Tabela 4.6	Quinta versão do sistema de gradiente de eluição na coluna C8	41
Tabela 4.7	Sexta versão do sistema de gradiente de eluição na coluna C8	42
Tabela 4.8	Sétima versão do sistema de gradiente de eluição na coluna C8	42
Tabela 4.9	Oitava versão de gradiente de eluição na coluna C8	42
Tabela 4.10	Condições cromatográficas para quantificação do LAS comercial em HPLC	43
Tabela 4.11	Sistema de gradiente de eluição	43
Tabela 4.12	Composição do esgoto sintético	53
Tabela 4.13	Composição da solução de sais para esgoto sintético	53
Tabela 4.14	Ácidos orgânicos adicionados nos reatores em batelada	53
Tabela 4.15	Composição do esgoto sintético	57
Tabela 4.16	Etapas de operação do reator R1	58

Tabela 4.17	Etapas de operação do reator R2	58
Tabela 4.18	Frequência das análises realizadas nos reatores R1 e R2	59
Tabela 4.19	<i>Primers</i> usados na PCR	62
Tabela 4.20	Microrganismos-controle positivos no PCR	62
Tabela 4.21	Programação do termociclador para amplificação dos fragmentos do RNAr 16S	63
Tabela 5.1	Curva de calibração, linearidade e limite de detecção para solução padrão de LAS em água	73
Tabela 5.2	Curva de calibração, linearidade e limite de detecção para solução padrão de LAS em esgoto sintético	74
Tabela 5.3	Precisão do método cromatográfico calculado usando o tempo de retenção(n= 3 para cada pico)	74
Tabela 5.4	Repetibilidade do tempo de retenção para 14 mg LAS/L em esgoto sintético (n=9)	75
Tabela 5.5	Recuperação dos homólogos do LAS em esgoto sintético	75
Tabela 5.6	Dados obtidos na curva de adsorção do LAS em espumas de poliuretano em reatores diferenciais	76
Tabela 5.7	Valores médios da concentração de metano no biogás dos reatores em batelada alimentados com meio mineral em função do tempo	84
Tabela 5.8	Concentrações de sólidos totais voláteis nos reatores anaeróbios em batelada após 55 dias de operação com diferentes concentrações de LAS	86
Tabela 5.9	Caracterização morfológica da biomassa dos reatores em batelada	87
Tabela 5.10	Valores médios da concentração de metano no biogás dos reatores alimentados com esgoto sintético	89
Tabela 5.11	Valores de DQO filtrada e eficiência de remoção nos reatores em batelada, alimentados com esgoto sintético	90
Tabela 5.12	Concentrações de sólidos totais voláteis do lodo dos reatores anaeróbios em batelada alimentados com esgoto sintético, após 45 dias de operação	90

Tabela 5.13	Caracterização morfológica da biomassa presente nos reatores em batelada alimentos com esgoto sintético	92
Tabela 5.14	Valores dos parâmetros físico-químicos obtidos durante a operação do reator R1	96
Tabela 5.15	Valores dos parâmetros físico-químicos obtidos durante a operação do reator R2	97
Tabela 5.16	Balanço de Massa de LAS no reator R1	136
Tabela 5.17	Balanço de Massa de LAS no reator R2	136
Tabela 5.18	Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 durante a primeira etapa de operação com esgoto sintético	138
Tabela 5.19	Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 durante a primeira etapa de operação com esgoto sintético	139
Tabela 5.20	Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 durante a segunda etapa de operação com esgoto sintético e LAS (7 mg/L)	142
Tabela 5.21	Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 durante a segunda etapa de operação com esgoto sintético e LAS (7 mg/L)	143
Tabela 5.22	Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 durante o primeiro perfil da terceira etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (14 mg/L) sem amido	147
Tabela 5.23	Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 no segundo perfil da terceira etapa de operação	148
Tabela 5.24	Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 no primeiro perfil da terceira etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (14 mg/L)	149
Tabela 5.25	Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 no segundo perfil da terceira etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (14 mg/L)	150
Tabela 5.26	Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 no primeiro perfil da quarta etapa de alimentação com esgoto sintético, extrato de levedura e LAS (14 mg/L) sem amido	152
Tabela 5.27	Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 no segundo perfil da quarta etapa de alimentação com esgoto sintético, extrato de levedura e LAS (14 mg/L) sem amido	153

Tabela 5.28	Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 durante a quarta etapa de alimentação com esgoto sintético, extrato de carne e LAS (14 mg/L)	154
Tabela 5.29	Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 durante a quinta etapa de alimentação com LAS (14 mg/L)	155

RESUMO

DUARTE, I. C. S (2006). Caracterização microbiológica da remoção e degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reatores anaeróbios com biofilme e células planctônicas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em condições anaeróbias. Os primeiros experimentos foram realizados em reatores em batelada alimentados com diferentes substratos e concentrações de LAS. Apesar do surfactante ficar adsorvido no lodo, não foram observadas interferências no metabolismo de microrganismos anaeróbios, pois dessa forma o LAS tornou-se indisponível para a degradação celular. Reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) foram avaliados quanto à remoção de LAS e inoculados com lodos anaeróbios provenientes de reatores UASB usados respectivamente no tratamento de esgoto sanitário (R1) e tratamento de dejetos suinocultura (R2) imobilizados em espuma de poliuretano. A adição de LAS não influenciou na estabilidade do reator. O LAS começou a ser degradado após 108 dias da sua adição no afluente dos reatores. Porcentagens de remoção, considerando adsorção e degradação de LAS, com 313 dias de operação foram iguais a 50% e 91% para o R1 e R2, respectivamente, quando foram alimentados com esgoto sintético e 14 mg/L de LAS (reator - R1) e somente LAS a 14 mg/L (reator - R2). Em relação ao balanço de massa de LAS, os reatores apresentaram degradações muito semelhantes, sendo 35% para o reator R1 e 34% para o reator - R2. A diversidade microbiana referente aos Domínios *Bacteria* e *Archaea* e ao grupo BRS foi avaliada utilizando a técnica de PCR/DGGE. Para o Domínio *Archaea*, foram observadas diferenças significativas nas populações quando os reatores foram alimentados com LAS. Diferenças foram observadas no Domínio Bactéria e grupo das BRS, para concentrações de LAS de 14 mg/L. A alteração na diversidade microbiana pode ter ocorrido devido à seleção dos microrganismos pela presença do surfactante. A biomassa presente no final da operação foi submetida à técnica de clonagem e seqüenciamento do fragmento do RNAr 16S para o Domínio *Bacteria*. Observou-se que os reatores que apresentaram maior número de clones relacionados ao filo Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales. Provavelmente os microrganismos pertencentes a esse grupo estejam envolvidos com a degradação do LAS.

Palavras chave: alquilbenzeno linear sulfonado, biofilme anaeróbio, degradação, adsorção, células planctônicas, seqüenciamento do RNAr 16S

ABSTRACT

DUARTE, I. C. S (2006). Microbiological characterization of the removal and degradation of linear alkylbenzene (LAS) in anaerobic reactors with biofilm and planktonic cells.

The objective of this work was to evaluate the degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in anaerobic conditions. The first experiments were accomplished in reactors in batch fed with different substrates and concentration of LAS. In spite of the surfactant to be adsorbed in the sludge interferences was not observed in the metabolism of anaerobic microorganisms, because in that way LAS became unavailable for the cellular degradation. Horizontal anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactors were appraised as for the removal of LAS and inoculated with coming anaerobic sludge of reactors UASB used respectively in the treatment of sanitary sewage (R1) and treatment of wastewater swine (R2) immobilized polyurethane foam. The addition of LAS didn't influence in the stability of the reactor. LAS began to be degraded after 108 days of its addition in the tributary of the reactors. Removal percentages, considering adsorption and degradation of LAS, with 313 days of operation was same to 50% and 91% for R1 and R2, respectively, when they were fed with synthetic sewage and 14 mg/l of LAS (reactor – R1) and only LAS to 14 mg/L (reactor – R2). In relation to the balance of mass of LAS, the reactors presented very similar degradations, being 35% for the reactor R1 and 34% for the reactor R2. The microbial diversity regarding the *Bacteria* and *Archaea* Domain and to the group BRS was evaluated using the technique of PCR/DGGE. The alteration in the microbial diversity might have happened due to the selection of the microorganisms for the presence of the surfactant. The biomass present in the end of the operation was submitted the cloning technique and sequencing of the fragment of 16S rRNA for the bacteria Domain. It was observed that the reactors presented larger number of clones related to the phylum Firmicutes, Clostridia, Clostridiales. Probably the microorganisms belonging to that group are involved with the degradation of LAS.

Words key: linear alkylbenzene sulfonate, anaerobic biofilm, degradation, adsorption, planktonic cells, sequencing of 16S

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Alcalinidade a Bicarbonato
ABS - Alquilbenzeno Sulfonado
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS - Perssulfato de Amônia
ARDRA - Análise de Restrição do DNA Ribossomal
AVT - Ácidos Voláteis Totais
BRS - Bactérias Redutoras de Sulfato
CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CG - Cromatografia Gasosa
CMC - Concentração Micelar Crítica
COD - Carbono Orgânico Dissolvido
COV - Carga Orgânica Volumétrica
DATS - Diatil Tetralinsulfonado
DGGE - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA - Ácido Desoxiribonucléico
DQO - Demanda Química de Oxigênio
DQO_b - Demanda Química de Oxigênio bruta
DQO_f - Demanda Química de Oxigênio filtrada
ETE - Estação de Tratamento de Esgoto
Hac – ácido acético
HLPC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LAB - Alquilbenzeno Linear
LAS - Alquilbenzeno Linear Sulfonado (Linear Alkylbenzene Sulfonate)
MBAS - Substâncias Ativas ao Azul de Metileno
MeOH - metanol
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
NMP - Número Mais Provável
PCP - Pentaclorofenol
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
R1 - Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo inoculado com lodo de estação de tratamento de esgoto
R2 - Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo inoculado com lodo de dejetos de suinocultura
RAHLF - Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
RNA - Ácido Ribonucléico
rpm – Rotações por minuto
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SPC - Sulfofenil Carboxilato (sulfophenil carboxilate)
ST - Sólidos Totais
STV - Sólidos Totais Voláteis
TAE – Tris Ácido Acético EDTA
TDH - Tempo de Detenção Hidráulica
T-RFLP - Polimorfismo de Fragmentos de Restrição Terminais de DNA
UASB - Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

UFC - Unidade Formadora de Colônia
UV - Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

A- adenina
b - Coeficiente Linear
C - citosina
Co - Concentração de LAS no afluente
Ce - Concentração de LAS no efluente
C.V. - Coeficiente de Variação
D - Diâmetro (cm)
 \sum - Somatória
G - Guanina
L - Comprimento (cm)
L/D - Relação comprimento por diâmetro
LD - Limite de Detecção
M – Molaridade
m - Coeficiente angular
mLAS - Massa de LAS adsorvida
N - Normalidade
n - Número de Amostras
pH - Potencial Hidrogênico
Q – Vazão
T – Timina
Taq – *Thermophilus aquaticus*
R² - Quadrado do Coeficiente de Correlação
SE_b . Erro Padrão do Intercepto
 Δt - Variação do Tempo
 λ_{exc} - Comprimento de onda de excitação (nm)
 λ_{em} - Comprimento de onda de emissão (nm)
t_r - Tempo de Retenção
V – volts

1. INTRODUÇÃO

Alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) é um surfactante aniônico amplamente usado em produtos de limpeza doméstica e industrial. O consumo mundial anual de LAS foi estimado em 2,5 milhões de toneladas (SANZ et al., 2003).

As moléculas de LAS são formadas por grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Os primeiros são constituídos por cadeias alquílicas com diferentes números de átomos de carbono, enquanto o grupo hidrofílico (anel aromático sulfonado) pode estar ligado a qualquer átomo de carbono secundário.

Alquilbenzeno linear sulfonado presente na composição do esgoto sanitário e água residuária industrial muitas vezes não é degradado nos sistemas de tratamento, acarretando alguns efeitos nocivos aos ecossistemas aquáticos. Por exemplo, a presença de LAS pode levar à formação de espuma, inibição dos processos de depuração natural e disseminação eólica da espuma contendo bactérias e impurezas. Apesar de encontrados em baixas concentrações nas águas residuárias, os surfactantes aniônicos podem estar adsorvidos nos lodos biológicos e em sedimentos. Em esgotos sanitários, as concentrações de LAS podem variar de 1 a 22 mg/L (RUIZ BEVIA et al., 1989; HOLT et al., 1995; GREINER & SIX, 1998).

Usualmente, LAS é encontrado em digestores de lodos anaeróbios em concentrações de 5 a 15 g/kg, e pode atingir valores de até 30 g/kg sem inibir o processo metanogênico (SANZ et al., 2000). Porém os surfactantes podem influenciar de forma negativa o metabolismo de microrganismos aeróbios e anaeróbios, por desnaturar enzimas, romper membranas e dificultar excreções celulares.

A degradação de LAS em condição anaeróbia vem sendo estudada recentemente no Brasil. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera o n-dodecilbenzeno sulfonado de sódio (LAS comercial) como padrão de biodegradabilidade para detergentes (Portaria nº 874, de 5 de novembro de 1998). O

ensaio de biodegradabilidade descrito pela ANVISA (Portaria nº 393 de 15 de maio de 1998) envolve processo aeróbio e quantificação dos surfactantes aniônicos através de método espectrofotométrico, de substâncias ativas ao azul de metileno (MBAS). Entretanto, esse método é não específico para LAS, quantifica surfactantes aniônicos em geral e tem como interferentes substâncias húmicas e outros surfactantes (SWISHER, 1987). Métodos de determinação de LAS em cromatografia líquida e gasosa vêm sendo aplicados com sucesso em amostras de esgoto, água e sedimentos.

Entre as diferentes configurações de biorreatores usados no tratamento de efluentes, o UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) em escala de bancada foi o mais aplicado no tratamento anaeróbio do LAS. No entanto, reatores anaeróbios com biomassa imobilizada em material suporte vêm sendo usados com sucesso no tratamento de diversas águas residuárias como, por exemplo, as contaminadas com fenol, formaldeído, pentaclorofenol e BTEX. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho, foi estudar a degradação de LAS em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano e caracterizar as bactérias envolvidas no processo, por meio de técnicas de biologia molecular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a degradação de LAS em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano e caracterizar as bactérias envolvidas no processo, por meio de técnicas de biologia molecular.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Desenvolver método cromatográfico em HPLC para quantificação de LAS;
- b) Avaliar a influência do LAS sobre os microrganismos anaeróbios;
- c) Comparar o desempenho da degradação de LAS em dois reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) inoculados com biomassas distintas;
- d) Avaliar a comunidade microbiana nos RAHLFs utilizando técnicas de Biologia Molecular (PCR/DGGE) e caracterização morfológica;
- e) Caracterizar, por seqüenciamento dos fragmentos do gene RNAr 16S, as bactérias envolvidas na degradação do LAS na última fase de operação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características dos Surfactantes ou Agentes Tensoativos

Surfactantes ou agentes tensoativos são substâncias que dissolvidas em água diminuem sua tensão superficial e induzem à formação de espumas. Ao diminuir a tensão superficial da água, os surfactantes favorecem a limpeza de superfícies como, roupas, louças, vidros, etc. Os surfactantes formam micelas e podem ser usados para emulsionar óleos, gorduras, petróleo, etc (MEZZANOTTE et al., 2003).

A concentração micelar crítica (CMC) refere-se à quantidade de surfactante necessária para que as moléculas formem agregados moleculares denominados micelas. A formação de micelas ocorre quando a quantidade de LAS supera a concentração micelar crítica (CMC), igual a 264 mg/L (MUKERJEE & MYSELS, 1971). Após atingir essa concentração, a tensão superficial da solução deixará de diminuir, permanecendo constante. A formação de micelas ocorre devido à presença de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na molécula. As micelas conferem propriedade detergente e de solubilização de material orgânico apolar (BORSATO et al., 1999).

Entre os diferentes surfactantes comercializados no Brasil a maioria apresenta moléculas com anel aromático ligado a uma cadeia alquílica. Nesses compostos o grupo hidrofílico, geralmente, é iônico e o grupo hidrofóbico formado por hidrocarbonetos com 8 a 18 átomos de carbono, na forma linear ou ramificada (BORSATO et al., 1999).

As naturezas dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos de uma molécula determinam sua especificidade de limpeza (KARSA & PORTER, 1995). Em função das características do grupo hidrofílico os surfactantes sintéticos são classificados em: aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfóteros. Os surfactantes aniônicos são freqüentemente usados em formulações de detergentes domésticos, xampus

automotivos, desinfetantes domésticos, limpa-vidros, limpa-carpetes, sabão em pó, entre outros produtos (BORSATO et al., 1999).

Os surfactantes podem ser empregados para aumentar a dessorção de muitos poluentes ambientais. A interação pode facilitar a dessorção de ampla variedade de poluentes ambientais polares e apolares (BURRIS & ANTORTH, 1992). Entre as aplicações dos surfactantes destaca-se a remoção de pesticidas do solo (IGLESIAS & JIMENEZ et al., 1997). A adição de surfactantes no solo modifica a dessorção dos pesticidas e também acelera sua decomposição (HIDAKA et al., 1992). A aplicação do LAS na dessorção de pentaclorofenol (PCP) adsorvido em partículas de solo foi mais efetiva do que o uso de Triton X – surfactante não iônico (BANERJI et al., 1993).

Surfactantes aniônicos podem formar micro-emulsões com vários clorocarbonatos, aumentando a solubilidade em água e promovendo a remediação do solo (BARAN et al., 1994). Os surfactantes também podem ser usados para remover produtos petroquímicos no solo. Segundo Peters et al. (1992), entre os 22 surfactantes investigados, os aniônicos apresentaram melhor desempenho, promovendo a remoção de óleo diesel de solo com diferentes características. Elementos como, cromo e arsênio presentes em solos contaminados foram removidos com a ajuda de surfactantes (PULS et al., 1994).

Além de facilitar a dessorção e dissolução de vários poluentes ambientais, os surfactantes podem aumentar a adsorção de alguns compostos, como naftaleno e fenantreno sobre superfícies de óxido de alumínio resultando em melhor controle de poluição de água (PARK & JAFFE, 1993).

3.2 Alquilbenzeno Linear Sulfonado

O alquilbenzeno sulfonado (ABS) foi o primeiro surfactante sintético a ser fabricado no mundo (década de 50) (BORSATO et al., 1999), mas devido à sua difícil degradação biológica, foi substituído, na década de 1960, por alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) (KOCAL et al., 2001).

Alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) representa um dos principais constituintes dos detergentes e pode ser usado em vários produtos de limpeza. LAS

pertence ao grupo dos surfactantes aniônicos, cuja estrutura básica contém o anel aromático sulfonado hidrofóbico, ligado à cadeia alquílica, hidrofóbica (Figura 3.1). A cadeia alquílica pode apresentar diferentes números de carbono e diferentes posições do anel aromático (PRATS et al., 1993).

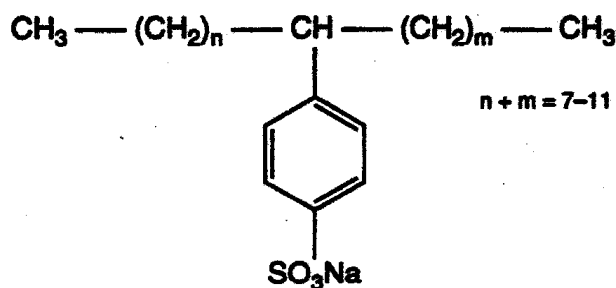


Figura 3.1 - Estrutura do alquilbenzeno linear sulfonado

Fonte: JENSEN et al. (1999)

Na Europa, o LAS usado em detergentes é uma mistura de homólogos contendo 10 a 14 átomos de carbono na cadeia alquílica, em média 11,7 átomos de carbonos, com massa molecular de aproximadamente 343 gramas (MORENO et al., 1994).

A descoberta do alquilbenzeno linear (LAB) foi considerada o marco da indústria de detergentes (KOCAL et al., 2001). Essa molécula foi usada como precursora na fabricação de LAS, mas apresenta maior resistência à degradação microbiana (ISOBE et al., 2004).

Na fabricação do LAS ocorre reação entre alquilbenzeno e ácido sulfúrico resultando em ácido sulfônico, posteriormente, neutralizado com hidróxido de sódio (FERRER et al., 2002).

No Oeste da Europa, a produção de LAS de aproximadamente 420 mil toneladas por ano (HOLT & BERNSTEIN, 1992) representou mais que 40% de todos os surfactantes usados no mundo (SCOTT & JONES, 2000). Segundo a Associação Brasileira de Indústria Química e de Produtos Derivados, a produção de detergentes sintéticos, em 1998, foi de 1095 toneladas.

A Tabela 3.1 apresenta quantidades diárias de água e de LAS usadas por pessoa por dia, em diferentes países.

Tabela 3.1- Quantidades diárias de LAS usadas por pessoa

Países	Uso de água (L/dia)	Uso de LAS (g/dia)
Estados Unidos da América	560	2,6
Espanha	-	5,6
Alemanha	185	2,2
Reino Unido	208	2,5
Japão	120	2,3
Brasil	132 *	-

Fonte: PAINTER & ZABEL (1989)

* Sistema Nacional de Informações Sobre Saneamento (2004)

Águas residuárias provenientes da fabricação de detergentes, descartadas sem tratamento, podem causar sérios impactos ao ambiente (PAPADOPOULOS et al., 1997). Entre as impurezas geradas na fabricação do LAS, diatil tetralinssulfonado (DATS) e alquilbenzeno sulfonado (ABS) de cadeia ramificada são os mais importantes e mais difíceis de serem degradados. Além disso, o composto aromático tolueno sulfonado é um dos aditivos de algumas formulações de detergentes (KERTESZ et al., 1994) e como todos os sulfonados aromáticos são considerados recalcitrantes e xenobióticos (JIMENEZ et al., 1991; ELSGAARD et al., 2003).

3.3 Surfactantes e o Ambiente

O LAS, composto xenobiótico encontrado freqüentemente em águas residuárias urbanas (PERALES et al., 1999), contribui com porção considerável no total de surfactantes introduzidos no ambiente (PERALES et al., 2003).

Os principais efeitos do detergente no ambiente aquático são: (1) formação de espumas, que inibem ou paralisam os processos de depuração natural ou em estações de tratamento de esgoto (ETE), onde concentram impurezas e podem disseminar bactérias e vírus; (2) diminuição da dissolução de oxigênio atmosférico na água; (3)

perturbação do transporte de oxigênio através das membranas dos organismos aquáticos e (4) favorecimento da eutrofização de lagos resultante do aumento da concentração de fosfatos, usados como seqüestrantes nas formulações de detergentes (CEPIS et al., 1998).

Em ambientes anaeróbios, os surfactantes podem ser encontrados em: (1) lodos de digestores anaeróbios tratando esgoto sanitário; (2) sedimentos de rios, lagos e oceanos e (3) solos que receberam lodo como fertilizante (BERNA, 2000).

Apesar do elevado consumo, as concentrações de LAS em águas superficiais são baixas, menores que 0,05 mg/L (MORENO et al., 1994), mas no esgoto sanitário podem variar de 1 a 22 mg/L (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Concentração de LAS no esgoto sanitário

Concentração de LAS (mg/L)	Localização	Referência Bibliográfica
1 a 10	ND	WAGENER & SCHINK (1987) BRUNNER et al. (1988)
3 a 21	ND	HOLT et al. (1995); RUIZ BEVIA et al. (1989)
17 a 22	Zurique	BOLLER (1993)
4	Nova Zelândia	WATERS & FEIJTEL (1995)
6,6 a 7,4	Alemanha	GREINER & SIX (1998)
3	Reino Unido	HOLT et al. (1998)
3 a 6	Brasil	CETESB (2005)

ND – não determinado

Nos últimos anos, em trechos do rio Tietê, Pinheiros e represa Billings, mais acentuadamente nas descargas das barragens de Pirapora (rio Tietê) e Traição (rio Pinheiros) têm ocorrido elevada formação de espumas produzidas por detergentes. As espumas são ricas em material particulado e metais pesados como cobre, chumbo, níquel e cádmio (BARBIERI et al., 2000). Em São Paulo, a concentração de detergentes no rio Tamanduateí, em 1992, foi de 2,3 mg/L (CETESB, 1992) e no rio Tietê, na região de Pirapora, foi 1,6 mg/L (HATUMARA et al., 1993).

Segundo Hatamura et al. (1993), as concentrações de metais nas espumas do rio Tietê superaram os valores em 20 a 188 vezes aos observados na água, destacando-se, principalmente ferro (188 vezes) e alumínio (151 vezes). Íons de cobre, cádmio e zinco apresentaram aumentos de 60, 50 e 49 vezes, respectivamente. No rio Macacu, Estado do Rio de Janeiro, foram encontradas concentrações de LAS e intermediários de sua degradação nas faixas de 14 a 155 µg/L e 1,2 a 14 µg/L, respectivamente. A presença de intermediários da degradação indicou que a comunidade microbiana presente foi capaz de oxidar o LAS (EICHHORN et al., 2002). Segundo Larson & Payne (1981), devido a contínua exposição aos surfactantes, os microrganismos aeróbios tornam-se adaptados e produzem enzimas necessárias para degradá-los.

Os intermediários da degradação, como por exemplo, o sulfonil carboxilatos (SPC) também são encontrados nas águas de abastecimento, como observado por Eichhorn et al. (2002). Foram encontrados SPC nas águas que abasteceram as cidades de Niterói e São Gonçalo, em concentrações de 1,6 e 1,4 µg/L, respectivamente, e valores de até 3,7 µg/L no Rio de Janeiro.

Concentração residual de surfactantes aniônicos tem aumentado em plantas, rios e águas residuárias (CSERHÁTI et al., 2002; CHEN & PIETRZYK, 1994). De acordo com Tolls et al. (2000), o LAS tem acumulado nos organismos e, conseqüentemente, ao longo da cadeia alimentar. Quanto maior a cadeia alquílica, maior a hidrofobicidade e, portanto, maior a bioacumulação. Na biota terrestre, a bioacumulação é significativamente menor quando comparada à aquática (FIGGE & SCHÖBERL, 1989).

Freqüentemente, os surfactantes são degradados em sistemas de tratamento de esgoto antes de serem lançados nos corpos receptores (STEBER & WIERICH, 1985). Entretanto, a degradação pode ser incompleta, levando à formação de alquil fenóis altamente tóxicos a peixes e pequenos invertebrados (GIGER et al., 1981).

Segundo Lee (1970), os surfactantes adsorvidos na superfície celular causam reduções na absorção de nutrientes essenciais, no consumo de oxigênio e na liberação de produtos metabólicos tóxicos, podendo provocar a morte celular. Além dos processos fisiológicos, podem alterar a pigmentação e a morfologia dos microrganismos.

Deve-se considerar, também, que os surfactantes influenciam de forma negativa os organismos presentes nos sedimentos marinhos, na vitalidade dos microrganismos e no crescimento de vegetais (PRATS et al., 1995). Os efeitos nocivos podem ser agravados com o aumento da concentração do surfactante e com o tamanho da cadeia alquílica (HOUSAINDOKN et al., 1993). Segundo Swisher (1987), Kotani et al. (1994) e Cserhádi et al. (2002) os tamanhos das cadeias alquílicas podem influenciar na toxicidade dos surfactantes: cadeias mais longas podem causar efeitos mais severos provocando, por exemplo, destruição ou ruptura da membrana celular e desnaturação de proteínas. Além disso, a toxicidade de LAS é influenciada pela posição do anel aromático: quanto mais próximo da extremidade da cadeia alquílica maior a toxicidade (PRATS et al., 1993).

Segundo Housaindokh et al. (1993), os surfactantes podem ativar ou inibir enzimas, dependendo da concentração e do tamanho da cadeia alquílica. Podem ainda alterar a estrutura da cadeia polipeptídica e mudar a carga superficial da molécula. Essa modificação estrutural leva a alterações funcionais das proteínas (CSERHÁTI et al. 2002).

Plantas expostas ao LAS apresentaram as membranas das células radiculares destruídas, alterações na permeabilidade e nos processos fisiológicos e fotossintéticos. Vários autores têm mencionado que concentrações entre 5 a 10 mg/kg não geraram problemas na germinação e no crescimento de plantas hidropônicas ou em outros meios de cultivo. No entanto, concentrações do LAS mais elevadas, entre 10 a 40 mg/kg, apresentaram efeitos tóxicos (MIEURE et al., 1990). Efeitos adversos sobre plantas e animais foram observados quando esses organismos foram expostos a 10 mg/L de LAS (SCOTT & JONES, 2000).

Para organismos aquáticos, a toxicidade aguda de LAS varia entre 1,7 e 270 mg/L, sendo a *Daphnia magna* a espécie mais sensível (VERGE & MORENO, 2000). Dependendo da concentração de cálcio, LAS pode estar solubilizado ou precipitado, no último caso, ocorre diminuição da fração disponível para os organismos aquáticos e conseqüentemente, redução da toxicidade.

As brânquias dos peixes podem ser atingidas pelos surfactantes devido à sua ampla área superficial e tecido epitelial muito delgado. Células do tecido epitelial das brânquias são usadas como modelos *in vitro* para testes de toxicologia aquática. Roy

(1988) observou que LAS alterou a composição lipídica dos tecidos celulares dos peixes *Rita rita* e pode modificar o comportamento desses, gerando espasmos musculares (PARTEARROYO et al., 1991).

Segundo Hampel & Blasco (2002), os homólogos de LAS com cadeias alquílicas longas (C13 e C14) foram mais tóxicos em relação aqueles com menores números de átomos de carbono (C10, C11 e C12). Os homólogos com 13 e 14 carbonos foram 100% letais aos ovos de peixes expostos a concentrações de 0,10 a 0,25 mg/L.

Os surfactantes aniônicos também podem causar danos à pele humana. Pesquisas indicam que o tamanho da cadeia alquílica tem considerável impacto sobre o potencial de irritação da pele. Compostos com 10 a 16 átomos de carbono causaram e desnaturação de proteínas e destruições severas das células epidérmicas (KOTANI et al., 1994).

As informações a respeito da toxicidade de LAS (ou outro surfactante) em bactérias de sedimentos são escassas (CAVALLI et al., 2000). Segundo Berna et al. (2000), as concentrações de LAS entre 5 a 17 mg/kg, encontradas nos sedimentos de rios, não inibiram o metabolismo bacteriano.

Algumas pesquisas mostraram efeitos adversos para os microrganismos nas concentrações entre 10 a 50 mg LAS/kg de solo. A maioria dos estudos de toxicidade usou a formulação de LAS comercial misturado diretamente no solo. Provavelmente, essa condição favorece a biodisponibilidade do LAS e, conseqüentemente, a toxicidade é mais acentuada do que a adição de LAS adsorvido em lodo. No entanto, é importante considerar que a sensibilidade ao composto tóxico está relacionada diretamente às características morfológicas e fisiológicas dos diferentes microrganismos. Conseqüentemente, os mecanismos biológicos responsáveis pela degradação ou pelo papel inibidor de surfactantes em solos, sedimentos ou lodos são difíceis de serem determinados (JENSEN, 1999).

3.4 Remoção físico-química do LAS

A adsorção é o processo de transferência de um ou mais constituintes (adsorbatos) da fase líquida (adsortivo) para a superfície sólida (adsorvente). No processo de adsorção, moléculas ou íons presentes na fase líquida são atraídos para a

zona interfacial na superfície do adsorvente. A adsorção do LAS em solos pode ser influenciada pelo pH e pela quantidade de matéria orgânica presente. A adsorção de surfactantes aniônicos ocorre por meio de dois mecanismos diferentes: (1) interação eletrostática entre a molécula do surfactante e a superfície sólida de carga positiva e (2) interação hidrofóbica entre o surfactante e a matéria orgânica. Longas cadeias alquílicas de LAS conferem maior hidrofobicidade e maior tendência em adsorver (SCOTT & JONES, 2000).

Adsorção de qualquer substância pode ser avaliada através de isoterma. O procedimento experimental consiste em estabelecer o contato do componente a ser adsorvido com diferentes massas de adsorvente, até atingir a concentração de equilíbrio (RUTHVEN, 1984).

A adsorção de surfactantes aniônicos em superfícies sólidas (SOMASUNDARAN & HUANG, 2000) pode modificar as características dessa superfície e dificultar a transferência de elétrons (WANG et al., 2000). Além disso, pode ocasionar a formação de agregados semelhantes a micelas (LUCIANI et al., 2001), aumentar a espessura do filme líquido e adsorver outras moléculas (CHURAEV, 2000; ESUMI et al., 2000; MIYAZAKI et al., 2000).

Surfactantes aniônicos não somente modificam as características superficiais de sólidos pela adsorção, mas também podem realçar a solubilidade de compostos insolúveis em água (HARRISON et al., 1999) e reduzir a transferência de massa (VAZQUEZ et al., 2000).

Jensen (1999) observou as concentrações de LAS em lodos de esgotos tratados em vários locais no mundo. O autor constatou que lodos de esgoto tratados aerobiamente apresentaram concentrações de LAS entre 100 a 500 mg/kg. No entanto, para lodos tratados sob condições anaeróbicas, as concentrações foram consideravelmente maiores, atingindo 5 a 15 g/kg. Por conseguinte, a contaminação do lodo pelo LAS está fortemente envolvida com o sistema de tratamento de esgoto e o método empregado na digestão do lodo. Na Tabela 3.3 estão destacados alguns exemplos de concentrações do LAS em lodos de estações de tratamento anaeróbio de esgoto (FERRER et al. 2002).

Tabela 3.3 - Concentração de LAS adsorvido ou precipitado em lodos anaeróbios de estações de tratamento de esgoto sanitário (Espanha)

Estação de Tratamento de Esgoto	LAS (g/kg)
Estepona	17,47
Fuengirola	21,09
La Víbora	8,88
Churriana	8,70
Los Vados	12,05

Fonte: FERRER et al. (2002)

Quando lodo anaeróbio for disposto em áreas agrícolas, prática comum na Europa, surfactante será introduzido no solo (CAVALLI & VALTORTA, 1999). Figge & Schöberl (1989) encontraram LAS em solos que receberam lodos de estações de tratamento de esgoto, com meia vida de 13 a 26 dias. A concentração encontrada no solo, imediatamente após aplicação foi de 40 mg/kg (HAIGH, 1996). O LAS também atinge o solo como agente emulsificante, dispersante e espessante de fertilizantes e pesticidas agrícolas ou através de água residuária usada na irrigação (KHANISLAMOVA, 1991). Segundo Marcomini et al. (1989), solos que não receberam lodos biológicos apresentaram aproximadamente 5,0 mg/kg de LAS.

Muitos métodos de extração e remoção de surfactantes aniônicos foram desenvolvidos com técnicas físico-químicas e microbiológicas. Um dos métodos físico-químicos mais utilizados na remoção de surfactantes é a adsorção, principalmente pelo emprego de carvão ativado que possibilita elevadas eficiências de remoção (BASAR et al., 2004). No entanto, esse método é mais eficiente para surfactantes aniônicos do que para os não iônicos, com remoção média de 67,4% e 31,7%, respectivamente, em amostras de esgoto sanitário (ADACHI et al., 1990). Processos de coagulação e precipitação têm sido testados para remoção de surfactantes aniônicos e não iônicos em águas residuárias (CSERHÁTI et al., 2002).

Outros métodos de tratamento são aplicados para remover o LAS, como por exemplo, reações fotocatalíticas com TiO₂ (dióxido de titânio) (TANAKA &

ICHIWA, 1993), oxidação avançada, oxidação térmica e ozonização (BELTRAN et al., 2000).

Sanz et al. (2003) estudaram a oxidação fotoquímica do LAS (2,5 g/L) utilizando radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio com aproximadamente 50% de eficiência.

O emprego do ozônio na oxidação de surfactante gera estruturas mais simples. De acordo com Cepis et al. (1998), a aplicação do ozônio dependerá do efluente a ser tratado, e sempre deve ser usado em combinação com outros processos físico-químicos e/ou biológicos.

3.5 Degradação Biológica do LAS

Vários sistemas microbiológicos utilizando culturas puras ou mistas e diferentes condições nutricionais têm sido empregados na degradação de surfactantes (CSERHÁTI et al., 2002). A degradação do LAS envolve a quebra da cadeia alquílica, do grupo sulfonado e finalmente, do anel aromático (PERALES et al., 1999).

Segundo Schöberl (1989), as vias para a degradação aeróbia de LAS compreendem as seguintes etapas: (1) conversão oxidativa de um ou dois grupos metila da cadeia alquílica a um grupo carboxila (ω -/ β - oxidação); (2) oxidação da cadeia alquílica (β - oxidação); (3) oxidação do anel aromático; (4) quebra da ligação C-S, liberando sulfato (dessulfonação). Provavelmente, a degradação inicial ocorre pela ω -oxidação, com subsequente β -oxidação da cadeia alquílica, seguida pela abertura do anel aromático e dessulfonação (Figura 3.2).

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

Os isômeros de cadeias com maior número de átomos de carbono são mais facilmente degradados (SWISHER, 1987) e há preferência por isômeros de posição próximas ao final da cadeia alquílica (KERTESZ et al., 1994). Para culturas microbianas capazes de utilizar o enxofre do LAS, foi observado o comportamento

contrário, ou seja, isômeros de cadeia curta foram mais facilmente degradados do que os de cadeia longa.

Segundo Cavalli et al. (1993), a degradação aeróbia do LAS progride via oxidações ω/β das cadeias alquílicas que levam à formação dos produtos intermediários (sulfofenil carboxilatos - SPC) de acordo com a Figura 3.3.

Larson & Payne (1981) relataram que a meia vida dos SPCs em águas naturais foi de 3 dias. A degradação incompleta do LAS também foi demonstrada por Yoshimura et al. (1984) em água de rio.

Di Corcia et al. (1991) quantificaram o LAS e seus produtos intermediários (SPC) em afluentes e efluentes de sistemas de tratamento de esgoto sanitário da cidade de Roma. Identificaram vários SPC de cadeia curta (com menos de 7 carbonos) em concentrações variando de 0,6 a 22 mg/L.

Berna et al. (1993) monitoraram sete sistemas de tratamento de esgoto sanitário na região de Madri (Espanha), e encontraram SPC nas concentrações entre 0,25 e 0,85 mg/L no afluente e de 0,7 a 1,2 mg/L no efluente. Estes pesquisadores observaram, através de espectrometria, que a massa molecular do LAS foi menor no efluente de sistemas de tratamento de esgoto, quando comparado com o produto usado na formulação dos detergentes.

Esses intermediários da degradação também foram encontrados em sedimentos marinhos anaeróbios da Baía de Cádiz, na Espanha (GONZÁLES-MAZO et al., 1997; LEÓN et al., 2000). Entretanto, os intermediários da degradação anaeróbia em condições mesofílicas, ainda, não foram identificados. Em efluentes de reator anaeróbio termofílico, usado no tratamento de LAS (2 mg/L.dia), com TDH de 12h, foram constatadas as presenças de ácido benzenossulfônico, ácido sulfônico *p*-tolueno, 1-fenildodecano, ácido 2-fenilbutírico, 2-butilbenzeno, 1-fenilhexano e ácido acético (MONGENSEN & AHRING, 2002).

Segundo Painter & Zabel (1989) sistemas de lodos ativados podem remover mais do que 95% de surfactantes aniônicos, enquanto em filtros biológicos de baixa taxa, a remoção é menor que 91%, para concentrações encontradas no esgoto sanitário (1 a 21 mg/L). Porém, os autores não mencionaram a porcentagem de LAS adsorvido no lodo. Giger et al. (1987) analisaram o desempenho de oito plantas de lodos ativados na Suíça e observaram que a remoção de LAS foi de 65 a 99,8%, com

eficiência média de 99,5%. Trehy et al. (1996) verificaram que as remoções de LAS e SPC foram de 99,5% e 99,1%, respectivamente, em quatro sistemas de lodos ativados.

Tentativas têm sido feitas para definir uma expressão cinética que descreva o processo de degradação de LAS em diferentes condições ambientais. Para estabelecer a expressão cinética para o processo de degradação de LAS, Larson & Payne (1981) empregaram equação de primeira ordem. Yoshikuni et al. (1992) estabeleceram expressão cinética de ordem zero para descrever tal processo. Larson et al. (1983) utilizaram equação de pseudo-primeira ordem. Larson & Vashon (1993) indicaram que a degradação do LAS segue a cinética de primeira ordem e que o tamanho da cadeia alquílica e a posição do grupo fenil não influenciaram na cinética de degradação.

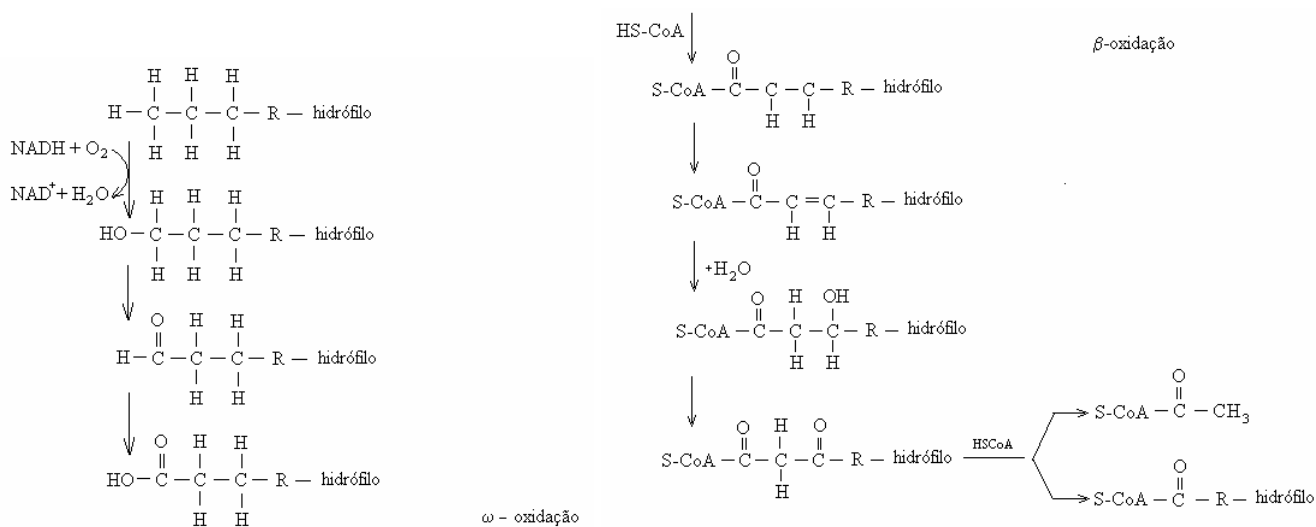


Figura 3.2 - Degradação aeróbia de alquilbenzeno linear sulfonado

Fonte: CAVALLI et al. (1996)

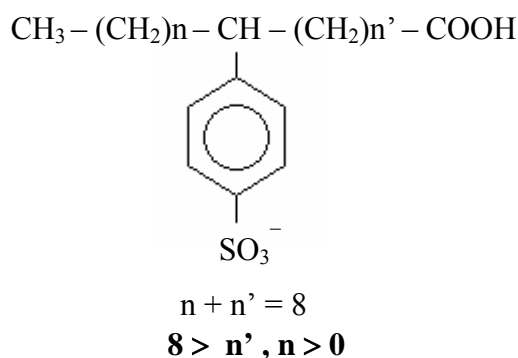


Figura 3.3 - Estrutura geral do sufofenil carboxilato

Fonte: SÁEZ et al. (2000)

No ambiente, várias espécies de microrganismos interagem na degradação do LAS. Jimenez et al. (1991) estudaram o consórcio microbiano constituído por três espécies de *Pseudomonas* sp. e uma de *Aeromonas* sp. O LAS foi adicionado a 1 µg/mL como única fonte de carbono, todas as espécies estudadas foram capazes de degradar mais de 25% do LAS e esse foi convertido a CO₂.

Vários autores afirmaram que o LAS não é degradado em condições anaeróbias (GIGER et al., 1989; PAINTER & ZABEL, 1989 e SARRACIN et al., 1999). Aspecto semelhante foi mencionado por Federle & Schawab (1992), empregando biomassa anaeróbia adaptada durante anos, os quais detectaram degradação de LAS após a adição oxigênio molecular.

Entretanto, outros trabalhos mostraram que LAS pode ser degradado em condições anaeróbias (ANGELIDAKI et al., 2000; MONGENSEN & AHRING, 2002). Nessas condições, nenhuma linhagem bacteriana isolada foi capaz de utilizar o carbono do LAS (GAVALA & AHRING, 2002). A rota de degradação anaeróbia do LAS também não está totalmente esclarecida. Segundo Kertesz et al. (1994), ainda é necessário aprofundar o conhecimento da degradação da cadeia alquílica e da dessulfonação do anel aromático.

Os microrganismos anaeróbios podem utilizar os sulfonados de três formas: a) como aceptores de elétrons; b) como doadores de elétrons para a respiração anaeróbia; ou c) como substrato para a fermentação. A redução do grupo sulfonado foi descoberta em culturas puras de *Desulfovibrio desulfuricans*, isolada de

sedimentos marinhos. Esse organismo foi capaz de reduzir o organossulfonado em combinação com lactato como doador de elétrons (DENGER & COOK, 1999).

Huddleston et al. (1979) e Steber (1979) conduziram ensaios de degradação do LAS comercial com ¹⁴C marcado, sob condições anaeróbias. Os resultados obtidos indicaram que mais de 60% do LAS degradado foi convertido a CO₂.

Wagener & Schink (1987) avaliaram a degradação de surfactantes aniônicos (LAS e SDS) e não iônicos (alquil etoxilado - AE) em reator anaeróbio de leito fixo, usando água residuária sintética a 28°C. Os autores usaram como inóculo lodo de sedimento anóxico e lodo de esgoto sanitário imobilizados em pérolas de vidro. O LAS não foi degradado e causou inibição da metanogênese em concentrações iguais ou maiores que 10 mg/L. O dodecil sulfato de sódio (SDS) foi parcialmente degradado depois da adaptação do lodo a concentrações iguais ou menores a 100 mg/L e o grupo sulfato foi reduzido a sulfeto. Alquil etoxilatos foram completamente metabolizados formando metano e dióxido de carbono em concentrações de até 1,0 g/L. A duração do experimento foi de 37 dias. Os autores observaram que o surfactante não iônico não inibiu a metanogênese, enquanto o LAS (surfactante aniônico) causou inibição em concentração de 10 mg/L.

Denger et al. (1996) isolaram *Clostridium* sp. EV4SPB, capaz de utilizar 2-(4- sulfofenil) butirato como fonte de enxofre. Os bacilos gram-positivos ocorreram em células isoladas, em pares ou, ocasionalmente, em cadeias, e apresentaram esporo subterminal. Cultura de *Clostridium* sp. EV4 utilizou fenil sulfonado, *p*-benzeno-sulfonado e naftaleno-2,6-dissulfonado.

Denger & Cook (1999) usaram culturas enriquecidas com LAS em condições anóxicas, em meio contendo glicose. Essas culturas utilizaram o surfactante como fonte de enxofre para o crescimento microbiano. O organismo isolado foi chamado de RZLAS, cujas características foram as seguintes: bacilo gram-negativo, oxidase negativa, catálise negativa, crescimento anaeróbio facultativo. Os autores obtiveram os maiores valores de similaridade para os gêneros *Aeromonas* (88,2-90,1%) e *Shewanella* (87-88,1%). Esses microrganismos foram descritos como capazes de usar o enxofre de LAS em condições anaeróbias.

Visscher et al. (1999) verificaram que 2-amino etano sulfonado foi utilizado pelas bactérias redutoras do íon sulfato (BRS) como fonte de carbono e de enxofre

para o crescimento sob condições anaeróbias. Após a clivagem da ligação carbono-enxofre, sulfito foi reduzido a sulfeto.

Lie et al. (1999) isolaram cultura de BRS, *Desulforhopalus singaporensis*, em meio enriquecido com 10 mM de 2-amino etano sulfonado como fonte de carbono, nitrogênio e energia. A fermentação dessa substância resultou na produção final de acetato, amônia e sulfeto. Outros compostos sulfonados não foram fermentados, incluindo 2-hidroxi etano sulfonado e alanina-3-sulfonado. Na presença de malato houve redução de sulfato, sulfito e tiosulfato.

Almendariz et al. (2001) avaliaram a degradação de LAS em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), acidogênico e metanogênico com volumes de 0,34 L e 1,35 L, com TDH de 6 horas e 24 horas, respectivamente, operados a 35°C. As concentrações do LAS testadas foram 20 e 50 mg/L. Lactose (1g/L) foi usada como fonte de carbono e nitrato como acceptor de elétrons na proporção de 1:1 (LAS/NO₃⁻). Esses pesquisadores utilizaram a técnica de bioaugmentação através da recirculação da linhagem de *Pseudomonas* sp. no reator acidogênico. Com a supressão de LAS na alimentação, ocorreu a dessorção desse composto do lodo anaeróbio. Os resultados obtidos por esses pesquisadores demonstraram que o metabolismo das bactérias acidogênicas não foi prejudicado pelo LAS. No entanto, as arqueias metanogênicas sofreram alterações no seu metabolismo. A produção de metano voltou ao normal quando o LAS foi retirado da água residuária afluyente aos reatores, demonstrando que o efeito nocivo do LAS foi reversível para as metanogênicas.

A linhagem de *Pseudomonas* sp. não se adaptou ao reator acidogênico, iniciando com 10⁸ UFC/mL de lodo e, após 40 dias 10⁴, até alcançar 10³ UFC/mL, no final do experimento. Nitrato de potássio foi consumido completamente. Os pesquisadores concluíram que o LAS foi degradado somente no primeiro reator, pelas bactérias acidogênicas. O LAS adsorvido no lodo não inibiu as bactérias acidogênicas e sua degradação foi de 41% no final de 250 dias de operação. Os microrganismos metanogênicos não foram capazes de degradar LAS. A concentração celular da linhagem de *Pseudomonas* sp. retida no reator foi muito pequena, dessa maneira, a degradação do LAS não pode ser atribuída a essa espécie bacteriana. Isso

pôde ser confirmado com o experimento controle, onde a linhagem não foi inoculada e os resultados de degradação foram semelhantes.

Alquilbenzeno linear (LAB) é formado em condições anaeróbias quando há remoção do grupo sulfonado da molécula de LAS. No trabalho de degradação de LAS realizado por Mongense & Ahring (2002), não foi detectada a presença de LAB. Tal fato foi confirmado pela detecção de ácido benzenossulfônico no efluente do reator. Portanto, os microrganismos presentes no processo não foram capazes de utilizar o enxofre do grupo sulfonado.

Sanz et al. (2003) usaram dois reatores UASB de 5,4 L cada, TDH de 24 horas e temperatura de 30°C para verificar a degradação de LAS. Os reatores foram inoculados com lodo granular de reator UASB, usado no tratamento de água residuária de indústria de açúcar de beterraba, localizada em La Bañeza (Espanha). Cada reator foi inoculado com 130 g de sólidos voláteis e alimentado com mistura de co-substratos: acetato, propionato, butirato, lactato, metanol, etanol e sacarose, além de macronutrientes e elementos traços. A carga orgânica aplicada foi de 9,0 g DQO/L.dia. Em ambos os reatores a estabilidade na remoção da matéria orgânica (DQO) foi alcançada após 20 dias, com eficiência de remoção de 90%.

No reator I (RI), alimentado com os co-substratos e LAS, a biomassa aumentou em 25%. No reator II (RII), alimentado somente solução de LAS, na ausência de co-substratos, a biomassa diminuiu em 11%. A massa de LAS adsorvida no lodo do RI, após duas semanas foi de 42,3 mg (0,320 mg LAS/g de lodo) e a massa total adicionada igual a 329 mg. Nesse período, não foi detectado LAS no efluente e a remoção foi de 85%.

Após 14 dias de operação, as concentrações de LAS no efluente e no lodo aumentaram em ambos os reatores atingindo 1,5 a 2,0 mg/L e 1,5 a 2,0 mg/g, respectivamente. Em 100 dias, a remoção foi de 64%, sendo que 14% do LAS adicionado, ficaram adsorvidos no lodo e 22% foram descartados no efluente. No início da operação do RII, a concentração de LAS no efluente foi de 4,3 mg/L e a adsorvida igual a 0,18 mg LAS/g de lodo. A partir do 80º dia, as concentrações de LAS no efluente atingiram 0,9 mg/L e 1,9 mg/g no lodo. O balanço de massa no final do experimento indicou que 6% do total de LAS adicionado foram recuperados no efluente, enquanto, 9% ficaram retidos no lodo. Dessa maneira, 85% do total de LAS

adicionado no reator foram removidos, considerando a concentração inicial de 4 a 5 mg LAS/L.

Comparando esses reatores, os autores concluíram que a degradação do LAS foi maior no reator alimentado sem co-substratos. Com ausência de co-substratos, ocorreu diminuição da concentração de biomassa, embora, com elevada degradação de LAS. Nesse caso, a degradação pode ser interpretada como degradação primária (perda da característica surfactante), quando LAS foi usado como fonte de carbono e de energia. Efeito similar foi encontrado em condições aeróbias, na ausência de glicose, em reatores inoculados com *Pseudomonas putida*, quando a degradação do LAS foi maior na ausência de co-substratos (MARQUES et al., 1999). No entanto, a quantidade de LAS adicionada foi insuficiente para a manutenção da biomassa e, conseqüentemente, promover enriquecimento da população de bactérias com potencialidade de degradar LAS.

Culturas bacterianas puras ou mistas em condições fermentativas vêm sendo empregadas com a finalidade de realçar a decomposição dos surfactantes (CSERHÁTI et al., 2002). Todavia, os estudos indicam que, para completa degradação do LAS é necessário o envolvimento de consórcio microbiano devido à limitada capacidade metabólica de uma espécie de microrganismo específica (LEE et al., 1995).

Segundo Goudar et al. (1999), a degradação de surfactante aniônico torna-se mais rápida com utilização de culturas mistas do que com culturas isoladas. Segundo Cook & Hrsak (2000) a utilização de culturas puras para degradação do LAS não foi bem sucedida, pois as enzimas necessárias para promover a ruptura da molécula não foram sintetizadas.

O conhecimento da diversidade microbiana e identificação dos principais microrganismos envolvidos nesse processo são fundamentais para favorecer o crescimento de microrganismos com potencial em degradar LAS nos sistemas de tratamento e, conseqüentemente, acelerar sua degradação (MONGENSEN & AHRING, 2002)

Cserhádi et al. (2002) resumiram algumas informações sobre o uso de culturas puras imobilizadas para o tratamento de surfactantes. Por exemplo, Roig et al. (1998) utilizaram, com sucesso, *Comamonas terrigena* N3H, imobilizada em espuma de

poliuretano na degradação de surfactantes aniônicos. Huska et al. (1996) promoveram a imobilização das células dessa mesma espécie, em espumas de poliuretano e alginato. Maior degradação foi encontrada em pH 7,5 e temperatura de 50°C. No entanto, não foi relatada a porcentagem de degradação alcançada com essa espécie bacteriana.

Pseudomonas é outro gênero de bactérias indicado como possível degradador de surfactantes. As bactérias desse gênero têm sido apresentadas como surfactante-redutoras, e usadas na forma imobilizada, em diferentes materiais suportes, tais como gel de poliácridamida (THOMAS & WHITE, 1991), vidro (JERABKOVA et al., 1999) e espuma de poliuretano (ROIG et al., 1999). No entanto, como mencionado anteriormente, nem sempre a aplicação de culturas puras é bem sucedida no processo de degradação de surfactantes.

O LAS pode inibir os processos de tratamento biológico (GARCIA-MORALES et al., 2001). A presença desse surfactante tem sido prejudicial em ambos processos de tratamento, aeróbio (PÉREZ et al., 1994) e anaeróbio (SWISHER, 1987). A digestão anaeróbia de lodo de esgoto foi inibida com concentrações acima de 15 g LAS/ kg (PAINTER & ZABEL, 1989).

Detergentes em geral são considerados prejudiciais à digestão anaeróbia (GAVALA et al., 2001) e os surfactantes sintéticos foram considerados inibidores severos desse processo. (FEITKENHAUER & MEYER, 2002). Segundo Gavala & Ahring (2002), a inibição da digestão anaeróbia é uma das possíveis causas da persistência do LAS nesses ambientes.

Shcherbakova et al. (1999) realizaram vários estudos com o objetivo de verificar a toxicidade dos surfactantes na degradação anaeróbia. Esses pesquisadores utilizaram como inóculo lodo de reator UASB empregado no tratamento de água residuária da indústria de papel e celulose para avaliar os efeitos dos surfactantes no processo metanogênico a partir de acetato. Os reatores foram operados com 0,5 g/L de sólidos suspensos voláteis, em frascos de vidro contendo 50 mL de meio de cultura (somente sais minerais), suplementado com 30 mM de acetato. Os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) e incubados anaerobiamente, a 29°C. Foram testados os seguintes compostos: detergentes aniônicos (Sulfanol NP-1 e Dodecil Sulfato de Sódio - SDS), detergentes catiônicos (Alkamon DS e Catamin

AB) e detergentes não aniônicos (Triton X-100). Os resultados indicaram menor toxicidade do SDS e Triton X-100 para a metanogênese, enquanto que Alkamon DS apresentou-se altamente tóxico. Já os compostos aromáticos, como Sulfanol NP-1 e Catamin AB, apresentaram atividade inibidora intermediária, conforme dados apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Concentrações inibidoras de surfactantes para a metanogênese

SURFACTANTE	Inibição		
	20%	50%	80%
	CONCENTRAÇÃO (MG/L)		
Sulfanol NP-1	292	675	1250
Dodecil Sulfato de Sódio	228	573	925
Alkamon DS	78	154	235
Catamin AB	195	345	495
Triton X-100	214	538	883

Fonte: SHCHERBAKOVA et al. (1999).

De acordo com Mösche & Meyer (2001), a digestão anaeróbia envolve vários grupos tróficos de microrganismos, que podem reagir de diferentes maneiras às substâncias tóxicas. O metabolismo das arqueias metanogênicas, por exemplo, é mais sensível ao surfactante do que o das bactérias acidogênicas. Entre as arqueias, as metanogênicas acetoclásticas são mais prejudicadas pelo surfactante do que as metanogênicas hidrogenotróficas.

Gavala & Ahring (2002) avaliaram o efeito inibitório de LAS sobre as etapas acidogênicas e metanogênicas da digestão anaeróbia. Os experimentos foram realizados em batelada com lodo anaeróbio aclimatado ao LAS, por período superior a um ano. Os reatores foram operados em condições mesofílicas, com TDH de 15 dias. O LAS inibiu a acetogênese a partir de 1 g/L de propionato e a metanogênese a partir de 1 g/L de acetato e extrato de levedura a 0,2 mg/mg de propionato e 0,15 mg/mg de acetato. As bactérias consumidoras de propionato foram mais sensíveis à presença de LAS (100 a 150 mg/L) que as metanogênicas acetoclásticas.

Provavelmente, a inibição causada pelo LAS foi devida à sua interação com as membranas microbianas, impedindo assim o transporte de nutrientes e/ou substrato para dentro das células bacterianas.

3.6 Fatores que Interferem na Degradação do LAS

A degradação de LAS pode ser afetada pelos seguintes fatores: concentração de oxigênio dissolvido (KRUEGER et al., 1998), complexidade das moléculas dos surfactantes catiônicos (UTSUNOMIYA et al., 1997), insolubilidade na presença de sais de cálcio ou de magnésio (WOLF & FEIJTEL, 1998), presença de outros contaminantes (ABDALLAH & SRORR, 1998) e alteração do pH durante a degradação aeróbia (GARCIA et al., 1996).

Quiroga et al. (1989) investigaram a influência da salinidade, temperatura, e presença de sedimento na degradação do LAS em água marinhas. A salinidade não alterou a degradação, mas o aumento da temperatura acelerou esse processo. A presença de sedimento, também aumentou a degradação, provavelmente devido à concentração dos surfactantes e de bactérias na sua superfície.

Perales et al. (1999) avaliaram a degradação de LAS a 5, 10 e 20 mg/L em condições aeróbias nas temperaturas de 7, 13, 21 e 25°C. Em todas as temperaturas o surfactante foi degradado mais de 90%. O período necessário para adaptação foi maior em temperaturas mais baixas. Os homólogos com maior número de carbonos foram degradados mais rapidamente em temperaturas acima de 13°C. Segundo Rapaport & Eckhoff (1990), em sistemas de tratamento em grande escala a temperatura teve pouco ou nenhum efeito na remoção de LAS.

Há evidências que a biodegradabilidade primária do LAS (C10 a C14), em geral, eleva-se com aumento do tamanho da cadeia alquílica. Para os isômeros de um dado homólogo, quanto maior a distância entre o grupo sulfônico e o grupo terminal metil, mais rápida será a degradação (GARCIA et al., 2005). Swisher (1987) tem chamado essa distância de “distância principal” e esse fenômeno tem sido observado em condições aeróbias.

3.7 Métodos de Determinação do LAS

A degradação do LAS tem sido extensivamente estudada em laboratório (CAVALLI et al., 1993), através de métodos não específicos (KARSA & PORTER, 1995), como: carbono orgânico dissolvido (COD), produção de CO₂, consumo de O₂ e também através do método de quantificação de substâncias reativas ao azul de metileno (MBAS). A avaliação da degradação também pode ser realizada por meio de técnicas analíticas específicas, tais como: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (CG) (MATTHIJS & DE HENAU, 1987).

A concentração total do LAS é avaliada pelo método padrão de substâncias ativas ao azul de metileno (MBAS). Essa técnica, descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998), é extensivamente usada em programas de monitoramento de estações de tratamento de esgoto (MATTHIJS & DE HENAU, 1987). Este método é considerado, bastante sensível, simples e economicamente viável, mas não específico e pode sofrer algumas interferências de outros detergentes aniônicos (SWISHER, 1987), tais como alquil sulfato, éter sulfato e alceno sulfato (PAINTER & ZABEL, 1989), ou de substâncias húmicas (DI CORCIA et al., 1991). Deste modo, o método de azul de metileno é indicado para determinar a concentração total de surfactante aniônico. Segundo Sedlak et al. (1986), 71% a 84% do total de MBAS analisado corresponderam ao LAS.

Outra possibilidade de determinação de LAS refere-se à cromatografia gasosa. Esta técnica requer a pré-conversão de LAS em derivados voláteis (NAKAE et al., 1981), procedimento que dificulta a utilização dessa metodologia.

O método mais aceito para determinação de LAS é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (NAKAE et al., 1981). Essa técnica é amplamente empregada como método específico para determinação de LAS em amostras de diferentes origens (YOKOYAMA & SATO, 1991). A aplicação de métodos cromatográficos é mais vantajosa, pois pode detectar os possíveis intermediários gerados na degradação.

O HPLC vem sendo empregado desde 1975 para determinar a concentração de LAS. Nakae et al. (1980) utilizaram HPLC com detecção por fluorescência, para determinação de LAS em águas de rios, sem nenhuma pré-concentração e pré-purificação.

A determinação de LAS por HPLC utiliza diferentes fases estacionárias: colunas C8 e C18 e, como fase móvel: solventes orgânicos combinados com água ou com eletrólitos (CHEN & PIETRZYK, 1994).

O uso de sistemas de gradientes de eluição, como descrito por Matthijs & De Henau (1987), resultou na melhor separação dos homólogos do LAS. Além disso, o emprego da solução de perclorato de sódio a 0,15 M como um dos eluentes foi necessário para obter retenção suficiente do LAS na coluna.

Nakae et al. (1981) observaram excelente separação dos isômeros usando coluna Hitachigel 3053 como fase estacionária e acetonitrila/água (45/55 - v/v) com perclorato (NaClO_4) como fase móvel. Na ausência de perclorato na fase móvel, as áreas cromatográficas de LAS apresentaram tempo de retenção muito pequeno. Com a sua adição, os homólogos do LAS foram bem separados. Todavia, outros sais inorgânicos como cloreto de sódio, nitrato de sódio, cloreto de amônio, em vez de perclorato de sódio, podem ser empregados e gerar resultados semelhantes.

Para análise quantitativa de amostras muito diluídas (baixas concentrações de LAS), técnicas de pré-concentração devem ser usadas. Di Corcia et al. (1991) concentraram amostras diluídas de LAS em colunas de troca iônica, empregadas também para purificar o LAS. Matthijs & De Henau (1987) obtiveram 100% de recuperação com eluição com metanol em colunas de fase sólida (C-8) para pré-concentração do LAS. Kikuchi et al. (1986) e Sáez et al. (2000) também usaram o metanol para eluir o LAS da coluna C-18, previamente condicionada.

Neste trabalho, as colunas SAX e C-18, foram usados para purificar e concentrar as amostras da extração do LAS adsorvido nas espumas de poliuretano com biomassa imobilizada, proveniente de reatores anaeróbios horizontais de leito fixo.

3.8 Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo

O reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), em escala de bancada, foi desenvolvido por Zaiat *et al.* (1994). Esse reator foi concebido para ser preenchido com biomassa imobilizada em matrizes cúbicas de poliuretano de 3 a 5 mm de aresta e proporcionar escoamento predominantemente pistonado. A concepção original do reator compreende um tubo de vidro de boro-silicato com 99,8

cm de comprimento e 5,04 cm de diâmetro interno. A relação comprimento/diâmetro (L/D) foi de aproximadamente 20. O volume total do reator foi de 1991 mL, sendo o volume útil reacional de 1735 mL e 265 mL destinados à separação do gás formado no seu interior.

Para a coleta do biogás foi instalado, ao longo do reator, na parte superior, um tubo perfurado de 0,94 cm de diâmetro. Também foram colocados quatro amostradores, nas seguintes posições L/D= 4, 8, 12 e 16.

O RAHLF foi utilizado inicialmente por Foresti *et al.* (1995) para o tratamento de água residuária de indústria de papel reciclado. O inóculo foi o lodo anaeróbio proveniente de reator UASB tratando efluente da indústria de papel reciclado, imobilizado em espuma de poliuretano. O reator foi operado à temperatura ambiente (média de 23°C) durante 26 dias, com TDH de 23 horas e carga orgânica de 2,0 kgDQO/m³/dia. Depois de 8 dias de operação, a concentração de ácidos voláteis no efluente foi próxima de zero. A remoção de matéria orgânica expressa em DQO foi de 86% no décimo dia de operação, demonstrando rápida adaptação e crescimento da biomassa. Por meio dos valores de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente (90 mg/L) os autores observaram que não houve arraste severo da biomassa.

Estudos hidrodinâmicos realizados por Cabral (1995) permitiram considerar o RAHLF um reator pistonado ou tubular para fins de simulação e projeto.

Zaiat (1996) verificou os efeitos da velocidade superficial do líquido (Vs) sobre o arraste da biomassa no RAHLF. Para tanto, o autor utilizou tubo de vidro de 10 mL com 1,5 cm de diâmetro preenchido com espumas de poliuretano retiradas do RAHLF, tratando água residuária de indústria de papel reciclado. A porosidade do leito foi de 40% e foram aplicadas oito vazões diferentes, para obter velocidade superficial (Vs), na faixa entre 0,3 cm/s e 2,2 cm/s. De acordo, com os resultados obtidos nesse experimento, para maior velocidade aplicada (2,2 cm/s), somente 9% dos sólidos em suspensão voláteis foram arrastados das matrizes.

Zaiat *et al.* (1997) operaram RAHLF a 30°C, preenchido com espuma de poliuretano contendo lodo anaeróbio imobilizado, obtido de reator UASB tratando dejetos de suinocultura. A água residuária utilizada foi substrato sintético à base de glicose (esterilizada em autoclave), com DQO de 2090 mg/L. O TDH foi de 8 horas

e a velocidade superficial, de 12,6 cm/h. O reator atingiu equilíbrio dinâmico aparente no décimo dia de operação, com 98% de eficiência de remoção de DQO (L/D= 20) e concentração de ácidos voláteis no efluente igual a 15 mg/L.

Esse reator, em escala de bancada, vem sendo aplicado no tratamento de diferentes águas residuárias, como destacado na Tabela 3.5.

Sarti (1998) avaliou o desempenho do RAHLF em escala de bancada, inoculado com lodo de ETE, imobilizado em espuma de poliuretano. As eficiências de remoção de matéria orgânica (DQO) foram de 81%, 80%, 84%, 82% e 77% para os respectivos TDH de 10; 5; 3,3; 2,5 e 2 horas. O melhor desempenho do reator ocorreu quando o mesmo foi operado com TDH de 3,3 horas.

Tabela 3.5 - Aplicação do RAHLF, em escala de bancada, com células imobilizadas em espumas de poliuretano

Água Residuária	TDH (h)	Eficiência de Remoção (%)	Referência Bibliográfica
PCP	24 e 18	>95	DAMIANOVIC (1997)
Compostos fenólicos (50 a 1200mg/L)	12,3	99	BOLAÑOS (2001)
Formaldeído (30 a 1500mg/L)	12	99,7	OLIVEIRA (2004)
Vinhaça (10 000 mgDQO/L)	26,2	70 (DQO)	TELH (2001)
BTEX (15 mg/L de cada composto)	11,4 e 13,5	100	de NARDI (2002)
Benzeno (41,4 mg/L)	12	89,4	
Tolueno (30,8 mg/L)		99,6	GUSMÃO (2005)
etilbenzeno (33,3 mg/L)		98,8	
m-xilemo (32,1 mg/L)		99,7	

Lima (2001) avaliou o desempenho do RAHLF no tratamento de esgoto sanitário, após passagem por peneira de malha de 1 mm, durante dois anos de operação. O volume total do reator foi de 235,5 L, construído com tudo de PVC de 14,5 cm de diâmetro, dispostos por 5 módulos horizontais em série, perfazendo comprimento total de 14,4 m e relação L/D de 100. A espuma de poliuretano (1,0 cm de aresta) foi usada como suporte para a imobilização da biomassa, sem inoculação

prévia. Em 70 dias de operação foi observado o predomínio de *Methanosaeta* sp, aos 90 dias de operação obteve a melhor eficiência de remoção de matéria orgânica (71%). No decorrer do tempo de operação, a eficiência de remoção foi reduzida, em consequência dos constantes entupimentos. Esses entupimentos, provavelmente, foram devidos à produção de polímeros extracelulares, promovendo efeito sinérgico com os microrganismos filamentosos e com os sólidos particulados retidos no leito.

Em função dos conhecimentos adquiridos na aplicação do RAHLF para o tratamento de diferentes águas residuárias, optou-se neste trabalho pela sua utilização. Na literatura, a remoção e degradação de LAS, em condições anaeróbias foram conduzidas, em sua maioria, em reatores UASB.

3.9 Técnicas de Biologia Molecular como Ferramenta no Estudo da Diversidade Microbiana

A identificação de microrganismos anaeróbios envolvidos nos sistemas de tratamento de água residuária é muito limitada. Essa limitação pode ser parcialmente atribuída às técnicas convencionais de microbiologia, relacionadas com isolamento, cultivo em placas e número mais provável (NMP). Essas técnicas acabam sendo seletivas, e podem em algumas condições não representar a complexidade da comunidade microbiana presente no meio (AMANN et al., 1995). Segundo Cases & de Lorenzo (2002), somente 0,5 a 10% da diversidade procariótica têm sido identificada.

A avaliação da composição da diversidade microbiana em reatores anaeróbios avançou muito com a introdução das técnicas de Biologia Molecular, permitindo, inclusive, o acompanhamento de mudanças temporais. Muitas técnicas moleculares foram desenvolvidas e adaptadas para o estudo da sistemática e ecologia microbiana. Baseadas na análise de ácidos nucleicos (DNA e RNA), essas permitem a detecção, identificação, quantificação e visualização dos microrganismos, sem a necessidade de cultivá-los previamente em laboratório (DORIGO et al., 2005).

Dessa forma, as técnicas moleculares criam a perspectiva do acesso, não somente a número maior de espécies, como também, a informações sobre a distribuição geográfica, as relações ecológicas, a atividade celular e a proporção

numérica entre diferentes populações microbianas quando em seus ambientes naturais. Essas informações são valiosas para o desenvolvimento de estratégias de isolamento e cultivo de novos microrganismos em laboratório.

As técnicas moleculares envolvem geralmente a lise celular e a extração de DNA e RNA de populações microbianas mistas. Alguns exemplos dessas técnicas são a clonagem e seqüenciamento de genes do RNAr 16S, a hibridização do RNAr, hibridização DNA/DNA, e as estratégias baseadas na reação de PCR (reação em cadeia da polimerase), como o DGGE (eletroforese de gel em gradiente desnaturante), ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal) e T-RFLP (polimorfismo de fragmentos de restrição terminais de DNA) (OSBORN et al., 2000).

As análises do DNA fornecem informações sobre a composição de espécies, ou seja, sobre a estrutura das comunidades microbianas. O estudo do RNA, por sua vez, revela a atividade metabólica (função) de populações particulares de microrganismos.

Os géis de DGGE são considerados confiáveis, reprodutíveis e rápidos. Além disso, permitem a análise de várias amostras ao mesmo tempo, o que facilita os estudos de comparação entre comunidades distintas ou relacionadas ao monitoramento de mudanças espaciais e temporais, em populações microbianas, ao longo de sucessões ecológicas, mudanças ambientais ou processos biotecnológicos. As limitações da técnica, por outro lado, estão ligadas, principalmente, à eficiência da extração de DNA, aos problemas intrínsecos das técnicas de PCR e à necessidade do manuseio cuidadoso das amostras para evitar alterações na comunidade microbiana. Um dos problemas do DGGE é o baixo poder de detecção. A sobreposição de bandas ocorre devido as características de mobilidades similares de alguns fragmentos, ou ainda, a presença, em uma única espécie, de várias cópias do gene de RNAr 16S com pequenas diferenças na composição das bases nitrogenadas, fazendo com que várias bandas sejam geradas (DORIGO et al., 2005).

Apesar das limitações, a técnica de DGGE apresenta algumas vantagens, tais como: ampla variedade de aplicações, visando inferir a afiliação filogenética de membros das comunidades, possibilidade de se testar a pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais.

Também possibilita estudar a dinâmica de populações específicas frente a variações nos parâmetros ambientais ou condições de operação de um sistema (HUANG et al., 2005).

Em estudos de comunidades microbianas complexas, o DGGE pode ser particularmente útil como método de investigação inicial para distinguir comunidades, identificar os membros numericamente dominantes e detectar diferenças na distribuição espacial e temporal de populações microbianas. O uso de *primers* de genes catabólicos, como a metano monoxigenase, coloca o DGGE como alternativa interessante para o estudo da diversidade funcional e a caracterização de comunidades envolvidas em processos específicos, como o ciclo do carbono e degradação de compostos recalcitrantes e xenobióticos. Finalmente, a associação do DGGE com outras técnicas, como o seqüenciamento do DNA presente nas bandas, são estratégias usadas, freqüentemente, para identificar microrganismos de interesse, evidenciados pelos padrões de bandas do gel de DGGE (NAKAYAMA, 2005). Por exemplo, Tartakovsky et al. (2001) associaram o aparecimento de bandas no gel de DGGE com intermediários clorados, detectados por cromatografia, em reator anaeróbio alimentado com glicose e pentaclorofenol (PCP). Por meio do seqüenciamento do RNAr 16S presente nas bandas do gel, os autores puderam associar o gênero *Clostridium* sp. com a degradação direta do PCP e *Syntrophobacter/Syntrophomonas* spp. com o consumo de benzoato e dos ácidos orgânicos produzidos como intermediários.

O seqüenciamento do RNAr 16S tem oferecido detalhes sobre a composição da estrutura das comunidades microbianas anaeróbias, apontando inclusive a existência e atuação de vários organismos que ainda não estavam descritos em literatura. A técnica de seqüenciamento de RNA para a identificação e classificação dos microrganismos utilizando o ribossomo começou a ser amplamente empregada no final da década de oitenta. Essa técnica é indispensável para a caracterização da comunidade microbiana, principalmente quando se leva em consideração que a maioria dos microrganismos não são cultiváveis (OSBORNE et al., 2005).

Estudar a diversidade de microrganismos, no entanto, não é tarefa fácil, principalmente, no caso dos procariontes. As espécies nem sempre podem ser facilmente determinadas, e a obtenção das informações limitava-se apenas às

espécies cultivadas em laboratório. Mais uma vez, as técnicas moleculares permitem analisar diretamente a diversidade microbiana em amostras ambientais e representa importante avanço no conhecimento taxonômico das diferentes comunidades e sua distribuição geográfica. Outro aspecto que deve ser considerado é o estudo da diversidade funcional dos microrganismos, uma vez que as unidades funcionais e nichos formados por eles são mais facilmente distinguidos que os estabelecidos por organismos superiores. Além disso, o enfoque funcional da diversidade abre novos horizontes para o entendimento das relações e papéis exercidos pelas diferentes comunidades microbianas nos ecossistemas e permite ir além da simples diversidade de espécies entre microrganismos.

Neste trabalho, foram utilizadas técnicas tradicionais de microbiologia de anaeróbios, como por exemplo, a caracterização morfológica em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência, além da aplicação de técnicas de biologia molecular. Em relação às últimas, foi empregada a técnica de PCR/DGGE para análise da diversidade de populações no biofilme proveniente dos reatores anaeróbios, no final de cada fase experimental. Na fase de alimentação com 14 mg/L de LAS e esgoto sintético modificado, após 313 dias de operação, foram retiradas amostras dos RAHLFs para caracterização celular empregando-se a técnica de seqüenciamento de fragmentos do gene do RNAr 16S.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição Geral

Inicialmente desenvolveu-se uma metodologia por HPLC para quantificar o surfactante em questão (LAS). Diferentes condições cromatográficas foram avaliadas e a melhor condição obtida foi usada para realizar as análises de validação. Testes de adsorção foram realizados com as espumas de poliuretano, sem biomassa imobilizada.

Ensaio com reatores em batelada foram realizados, usando lodo anaeróbio proveniente de reator UASB, usado no tratamento de dejetos de suinocultura, para verificar a influência do surfactante sobre o metabolismo dos microrganismos anaeróbios. Para tanto, foram utilizadas diferentes composições de substratos e concentrações de LAS.

Ensaio em reatores em batelada foram realizados para verificar a influência do LAS sobre os microrganismos anaeróbios em frascos de Duran. O inóculo usado foi o lodo de reator UASB empregado no tratamento de dejetos de suinocultura. Esses reatores foram mantidos sob agitação e temperatura controlada, dois substratos foram usados: meio mineral e esgoto sintético e diferentes concentrações de LAS.

Nos experimentos de degradação de LAS foram usados reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) preenchidos com espuma de poliuretano. Os reatores anaeróbios foram inoculados com lodos de origens distintas: (a) lodo anaeróbio proveniente de reator UASB usado no tratamento de esgoto sanitário da EESC-USP foi usado para inocular o RAHLF 1 (R1) e (b) lodo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura foi usado para inocular o RAHLF 2 (R2).

Os reatores foram monitorados por meio das seguintes análises: demanda química de oxigênio (DQO), ácidos voláteis totais (AVT), alcalinidade a bicarbonato

(AB), pH, metano e LAS. Amostras de biomassa foram retiradas e analisadas pelas técnicas tradicionais de microbiologia (microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência) e de biologia molecular, tais como, PCR/DGGE e seqüenciamento do fragmento do gene do RNAr 16S.

O Fluxograma experimental na Figura 4.1 apresenta as etapas desenvolvidas neste trabalho.

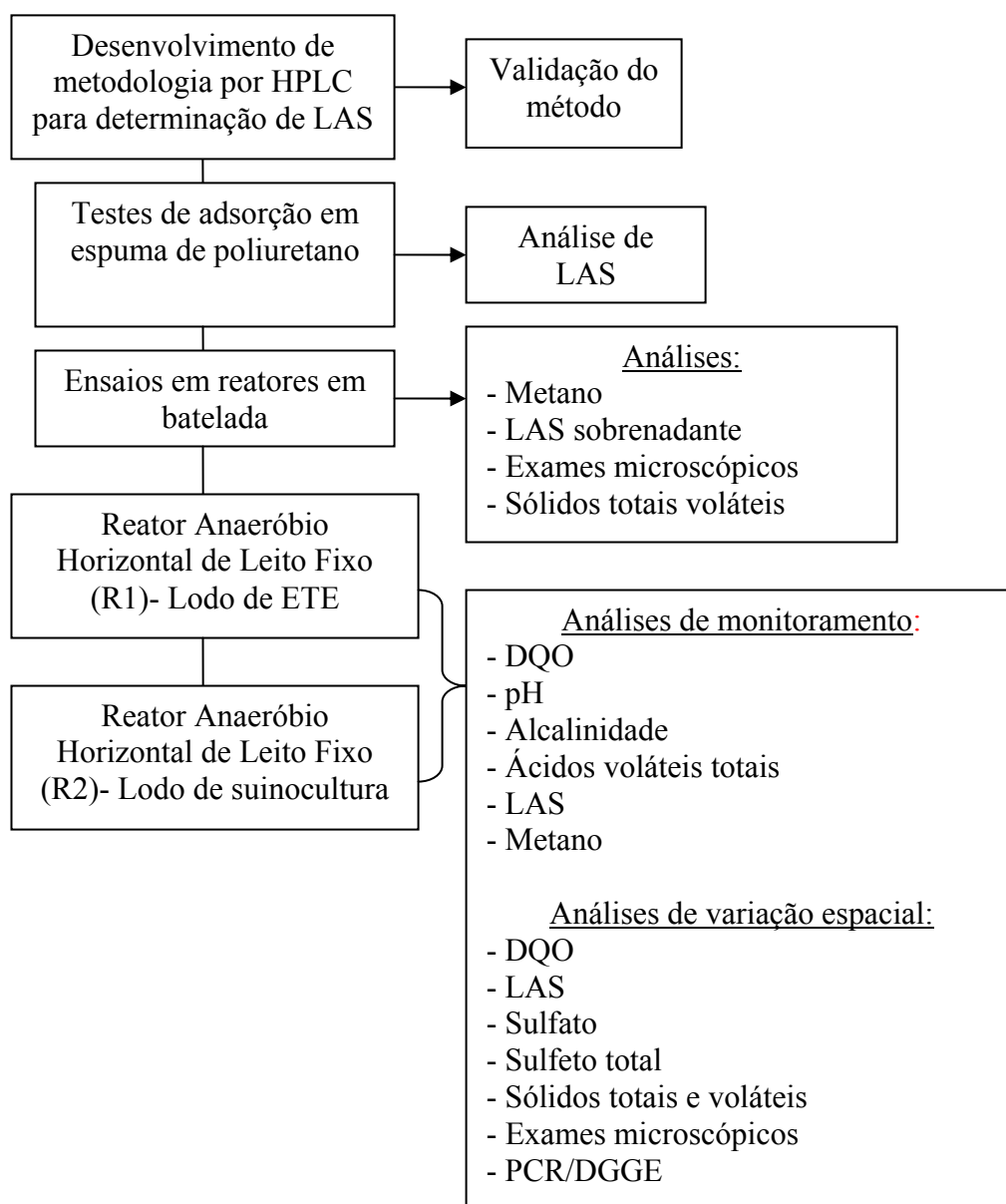


Figura 4.1 - Fluxograma experimental geral

4.2 Surfactante

O surfactante aniônico estudado neste trabalho foi o dodecilbenzeno sulfonado de sódio (Sigma), também conhecido como LAS comercial, com pureza de 80%. O restante (20%) corresponde a sulfato de sódio (15%) e impurezas orgânicas (5%) (HOUSE & FARR, 1989), provenientes da fabricação.

O dodecilbenzeno sulfonado de sódio (LAS comercial) é uma mistura de vários homólogos, com a predominância do dodecilbenzeno sulfonado, embora análises indiquem que C11 é o homólogo em maior quantidade nesse produto (OU et al., 1996).

4.3 Desenvolvimento de Metodologia para Quantificação do LAS

As análises por HPLC foram realizadas em sistema Shimadzu, equipado com bomba LC-10AD_{vp}, válvula FCV-10 AL_{vp}, forno CTO-10^A_{vp}, detector de fluorescência RF-10^A_{xl} e unidade controladora SCL-10^A_{vp}. O sistema foi controlado por microcomputador, através do programa Shimadzu Class-VP.

As diferentes condições cromatográficas avaliadas foram as seguintes: fases estacionárias (coluna C-18, C-12 e C-8), fases móveis (metanol/água; metanol/perclorato de sódio; acetonitrila/perclorato de sódio) sistemas de eluição (isocrática e com gradiente de eluição), detectores (Ultravioleta e de Fluorescência), temperaturas (32, 35 e 37°C) e velocidades do fluxo (0,5; 0,8; 1,0 e 1,5 mL/min) (Figura 4.2).

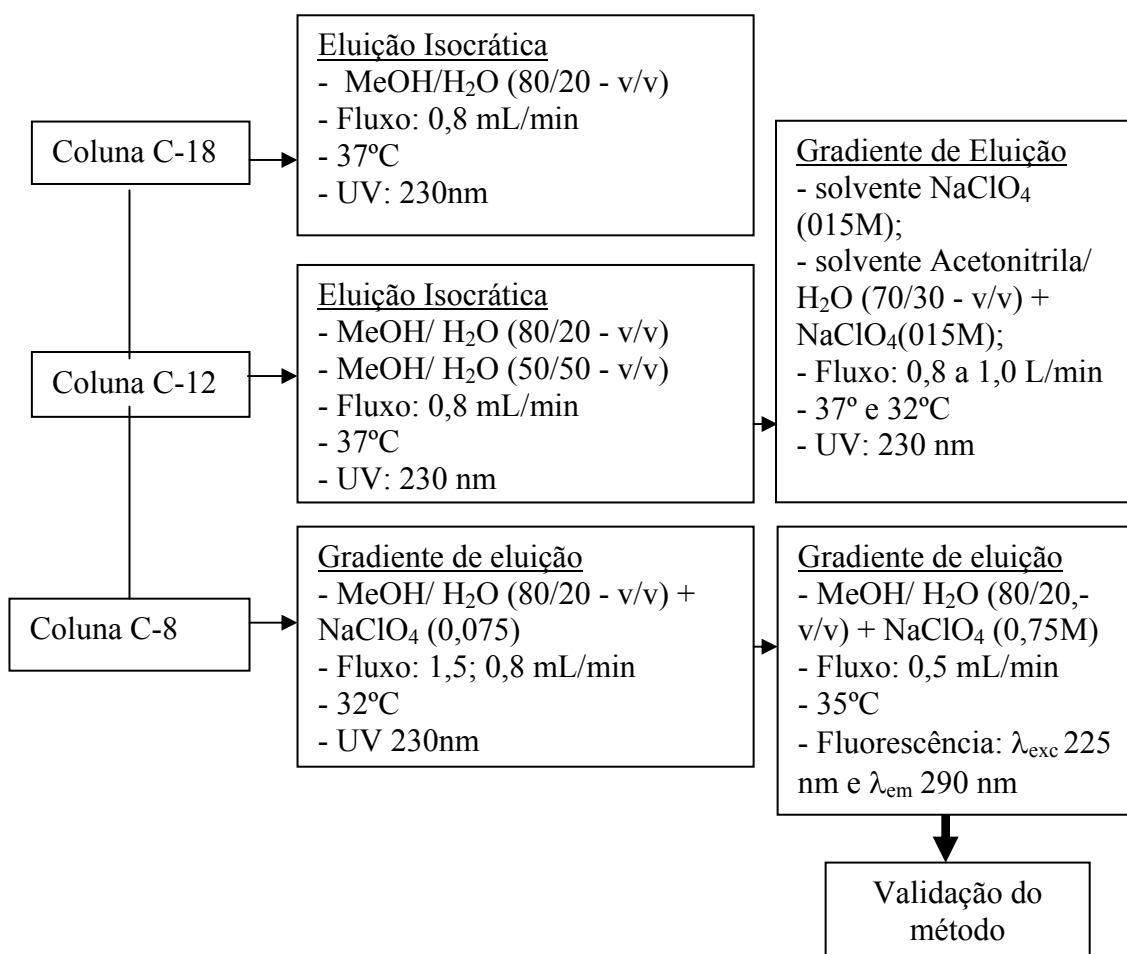


Figura 4.2 - Fluxograma das etapas de desenvolvimento da metodologia para determinação do LAS por HPLC

4.3.1 Condições Cromatográficas Usando Coluna C-18 como Fase Estacionária

A coluna C-18 da Shimadzu (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno) foi usada como uma das fases estacionárias no desenvolvimento da metodologia de determinação de LAS. Inicialmente, utilizou-se como fase móvel metanol e água ultrapurificada (MeOH/H₂O) (80/20 - v/v), com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura da coluna de 37°C e detector de UV a 230 nm.

Preparou-se solução de LAS em água ultrapurificada na concentração de 24 mg/L e injetou-se diretamente no cromatógrafo. O mesmo procedimento foi feito com solução de LAS acidificada com HCl (2,96 g/L) até atingir pH 4.

Seguindo recomendações da literatura (KIKUCHI et al., 1986; SÁEZ et al., 2000), avaliou-se a mesma concentração de LAS descrita acima, porém após a purificação da solução em fase sólida, usando coluna de troca iônica - SAX, de 3,0 mL (Supelco), a qual foi condicionada, antes de colocar a solução de LAS, da seguinte maneira::

- a) 2,0 mL de metanol;
- b) 2,0 mL de água ultrapurificada;
- c) 2,0 mL de solução NaCl 4,0 mg/L (pH 5,0), para simular o mesmo pH da amostra.

Em seguida, colocou-se 2,0 mL da solução de LAS (24 mg/L) e prosseguiu-se a extração, separadamente, com as seguintes eluentes:

- a) 2,0 mL de água ultra purificada;
- b) 2,0 mL de metanol/água (50/50 - v/v);
- c) 2,0 mL de metanol acidificado com 500 µL de HCl (2,96 g/L).

Após a obtenção de amostras para as três eluições, ou seja, água ultrapurificada, metanol/água e metanol acidificado, as mesmas foram analisadas em HPLC.

4.3.2 Condições Cromatográficas Usando a Coluna Synergi MAX-RP como Fase Estacionária

A segunda fase estacionária testada foi à coluna Synergi MAX-RP com porosidade de 4 µm, comprimento de 250 mm e diâmetro interno de 4,6 mm.

Soluções de LAS nas concentrações de 24 mg/L, 80 mg/L e 100 mg/L, preparadas em água ultrapurificada, foram introduzidas nas colunas de troca iônica - SAX, conforme descrito anteriormente. Apenas a fração eluída com metanol acidificado foi injetada no cromatógrafo, e as fases móveis usadas foram MeOH/H₂O (80/20 - v/v), e MeOH/H₂O (50/50 - v/v), fluxo de 0,8 mL/min, temperatura da coluna, de 37°C e detector de UV a 230 nm.

Ainda com essa fase estacionária foi avaliado o sistema de gradiente de eluição e eluentes, como descrito abaixo:

- a) solvente A: NaClO₄ (0,15 M) em água ultrapurificada;

b) solvente B: acetonitrila/H₂O (70/30 v/v) + NaClO₄ (0,15 M).

O fluxo passou de 0,8 para 1,0 mL/min e a temperatura da coluna de 37°C para 32 °C.

A solução de LAS com concentração de 50 mg/L em água ultrapurificada foi injetada diretamente no cromatógrafo e a mesma solução introduzida na coluna C-18, de 6,0 mL, previamente condicionada com 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de água ultrapurificada.

Posteriormente, colocou-se 2,0 mL de solução de LAS (50 mg/L) acidificada com solução de HCl (2,96 g/L) e também, 2,0 mL da solução de LAS sem acidificar, e prosseguiu-se a extração com 7,0 mL de metanol.

4.3.3 Condições Cromatográficas Usando a Coluna C-8 como Fase Estacionária

A terceira e última fase estacionária testada foi a coluna C-8 (Supelco), com porosidade de 5 µm, 15 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empregando-se as seguintes condições:

a) fase móvel: MeOH/ H₂O (80/20 - v/v) com NaClO₄ (0,075 M);

b) fluxos de 1,5 mL/min, 0,8 mL/min e 0,5 mL/min.

A temperatura da coluna foi mantida em 32°C e foram usados os seguintes detectores: (1) UV a 230 nm e (2) Fluorescência, com λ_{exc} 225 nm e λ_{em} 290 nm. Injetou-se diretamente solução de LAS (50 m/L), preparada em meio mineral (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Meio mineral

Componentes	Concentração (mg/L)
Água Ultrapurificada	q.s.q 1000 mL
K ₂ HPO ₄	5450
KH ₂ PO ₄	1200
MgSO ₄ .7H ₂ O	25
CaCl ₂ .2H ₂ O	15
FeSO ₄ .7H ₂ O	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	2
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,5

Fonte: modificado de STACKEBRANDT et al. (1999)

Nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9 estão apresentados os sistemas de gradiente de eluição avaliados usando temperatura da coluna a 35°C, fluxo de 0,5 mL/min e detector fluorescência, com λ_{exc} 225 nm e λ_{em} 290 nm. A seguir, encontram-se descritas as diferentes versões de gradientes de eluição que foram testadas, onde variou-se o tempo e a concentração dos solventes A e B:

- a) solvente A: solução de NaClO₄ (0,075 M) em água ultrapurificada;
- b) solvente B: MeOH puro.

Tabela 4.2 - Primeira versão do sistema de gradiente de eluição com coluna C-8

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	40	60
25	20	80
30	20	80
31	5	95
35	5	95
40	40	60

Tabela 4.3 - Segunda versão do sistema de gradiente de eluição com coluna C-8

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	40	60
10	20	80
30	5	95
34	5	95
38	40	60

Tabela 4.4 - Terceira versão do sistema de gradiente de eluição com coluna C-8

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	30	70
25	5	95
30	30	70
33	30	70

Tabela 4.5 - Quarta versão do sistema de gradiente de eluição com coluna C-8

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	20	80
20	5	95
25	20	80
28	20	80

Tabela 4.6 - Quinta versão do sistema de gradiente de eluição com coluna C-8

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	30	70
35	5	95
38	30	70
41	30	70

Tabela 4.7 - Sexta versão do sistema de gradiente de eluição com coluna C-8

Tempo (minutos)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	30	70
40	5	95
43	30	70
45	30	70

Tabela 4.8 - Sétima versão do sistema de gradiente de eluição com coluna C-8

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	30	70
35	10	90
37	30	70
39	30	70

Tabela 4.9 - Oitava versão de gradiente de eluição com coluna C-8

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	10	90
25	30	70
35	30	70
38	30	70

4.4 Determinação Cromatográfica do LAS

A metodologia para quantificação do LAS foi desenvolvida neste trabalho (Apêndice - Tabelas A1 e A2), como mencionado anteriormente. O padrão de LAS usado foi uma mistura de homólogos e isômeros, portanto era de se esperar cromatogramas com diversos picos (Apêndice - Figuras A1, A2, A3 e A4). A resolução dos picos foi de fundamental importância na elaboração da curva de calibração e na quantificação do surfactante. Desta maneira as amostras do afluente e efluente dos reatores foram analisadas seguindo as condições cromatográficas da Tabela 4.10 e o gradiente de eluição da Tabela 4.11.

Tabela 4.10 - Condições cromatográficas para quantificação do LAS comercial por HPLC

Condições	Descrição
Coluna	C-8 Supelco, 5 μ , 15 cm x 4,6 mm
Solvente A	Solução de NaClO ₄ 0,075 M em água ultrapurificada
Solvente B	MeOH puro
Fluxo	0,5 mL/min
Forno	35°C
detector	Fluorescência: λ_{exc} 225 nm e λ_{em} 290 nm

Tabela 4.11 - Sistema de gradiente de eluição

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	10	90
25	30	70
35	30	70
38	30	70
48	stop	stop

4.4.1 Validação do Método Cromatográfico

Para validar o método cromatográfico foram feitas duas curvas de calibração usando concentrações de 0,8 a 16 mg/L de LAS, em triplicata, com água ultrapurificada e esgoto sintético como solventes.

4.4.1.1 Linearidade

A linearidade foi calculada pela regressão linear da concentração (mg/L) de cada pico e a área cromatográfica correspondente.

4.4.1.2 Precisão

A precisão do método foi expressa como coeficiente de variação (C.V.), como descrito na equação 1, para os tempos de retenção (minutos) de cada pico.

$$C.V. (\%) = \frac{DP}{m\u00e9dia} \cdot 100 \quad (1)$$

Sendo:

C.V. = Coeficiente de Variação

DP = Desvio Padr\u00e3o

4.4.1.3 Limite de Detec\u00e7\u00e3o

O limite de detec\u00e7\u00e3o foi estabelecido para cada pico atrav\u00e9s das curvas de calibra\u00e7\u00e3o, de acordo com a equa\u00e7\u00e3o (2) desenvolvida por Miller & Miller (1984), como est\u00e1 descrita a seguir:

$$LD = \frac{(3 \cdot SE_b + b)}{m} \quad (2)$$

Sendo:

SE_b = erro padr\u00e3o do intercepto,

b = coeficiente linear,

m = coeficiente angular.

4.4.1.4 Repetibilidade

A repetibilidade do m\u00e9todo foi medida como coeficiente de varia\u00e7\u00e3o, estimado pelo tempo de reten\u00e7\u00e3o dos quatro hom\u00f3logos presentes no cromatograma da solu\u00e7\u00e3o de LAS de 14 mg/L, analisada nove vezes.

4.5 Extração do LAS Adsorvido no Lodo e nas Espumas de Poliuretano

4.5.1 Extração do LAS Adsorvido no Lodo

O protocolo de extração de LAS apresentado neste trabalho foi testado (em triplicata) quanto a sua eficiência. Para isso, adicionaram-se 50 mg/L de LAS no lodo anaeróbio proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de resíduos de suinocultura (Figura 4.3). Após homogeneização manual, a solução (LAS + meio mineral + lodo) foi centrifugada a 6000 rpm a 4°C por 10 minutos.

O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm e analisado por HPLC. O precipitado resultante da centrifugação foi levado à estufa a 105°C por 24 horas. Posteriormente, foram realizadas as extrações do LAS adsorvido no lodo biológico. O lodo previamente seco (1,0 g) foi submetido às seguintes etapas:

- a) adição de 50 mL de metanol;
- b) permanência de 30 minutos em banho de ultra-som, a 50°C, após homogeneização da solução;
- c) centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C;
- d) transferência do sobrenadante para béquer;
- e) adição de 50 mL de metanol ao precipitado da centrifugação;
- f) repetição das etapas (b), (c) e (d);
- g) adição de 50 mL de metanol;
- h) repetição das etapas (b), (c) e (d);
- i) adição de 20 mL de água ultrapurificada;
- j) repetidas etapas (b), (c) e (d), novamente;
- k) filtração do sobrenadante metanólico e aquoso em membrana de 0,22 µm;
- l) evaporação do extrato resultante da filtração em banho-maria (60°C) até o volume ser reduzido a 40 mL;
- m) transferência da solução resultante para uma coluna de troca iônica (SAX) para purificar a amostra de possíveis impurezas.

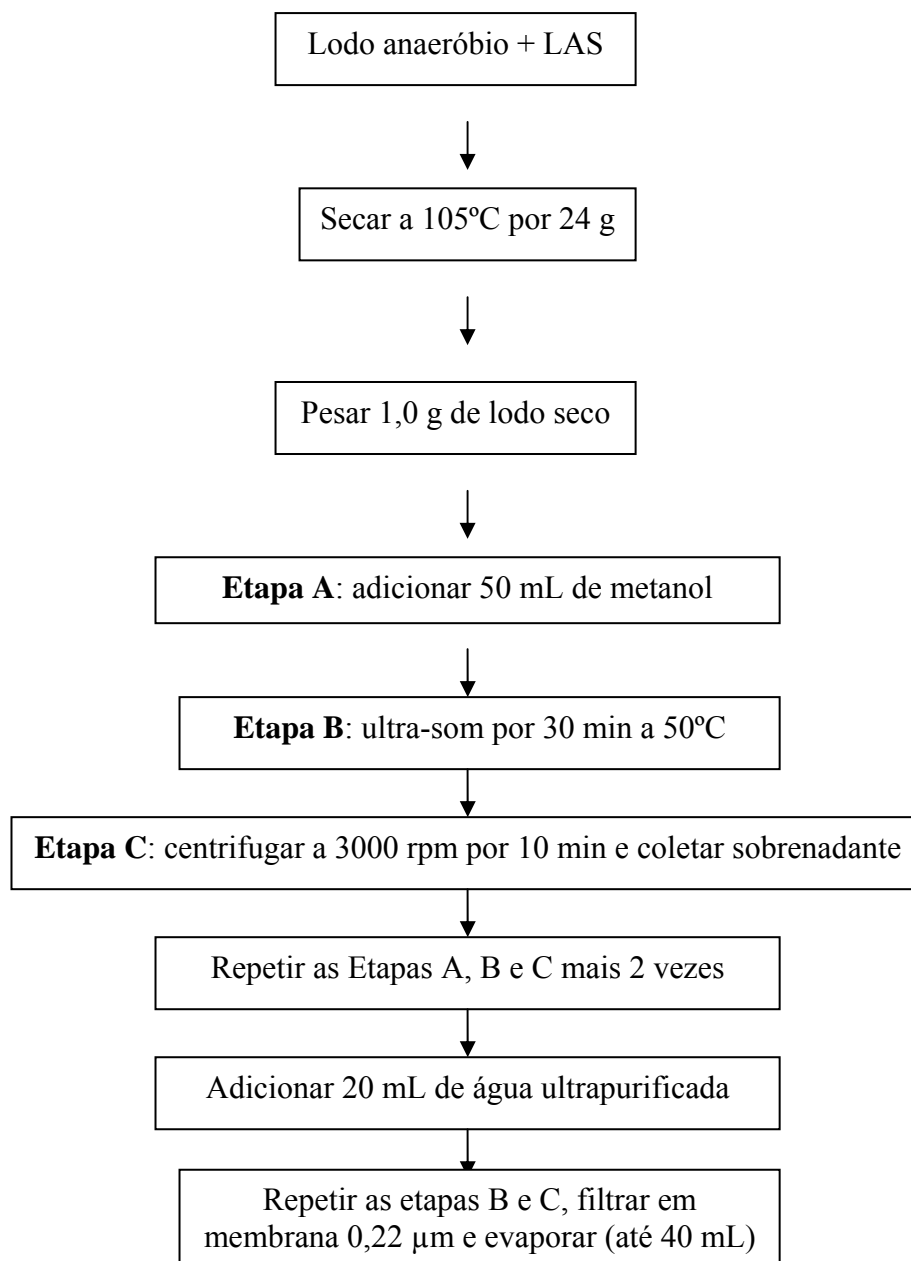


Figura 4.3 - Fluxograma das etapas de extração de LAS adsorvido no lodo

4.5.2 Extração do LAS Adsorvido nas Espumas de Poliuretano

No final da operação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo foram retiradas todas as espumas contendo biofilme. Esse material foi transferido para estufa a 105°C e amostras em triplicata de 1,0 g foram retiradas e submetidas ao protocolo de extração descrito no item 4.5.1. Algumas alterações no protocolo de

extração foram necessárias, como por exemplo, a etapa de centrifugação foi substituída por prensagem das espumas em peneiras.

4.5.3 Purificação e Concentração das Amostras para Extração do LAS

As amostras obtidas através do processo de extração descrita em 4.5.2 foram submetidas à purificação e, posteriormente, a concentração em colunas de fase sólida, C-18.

Para a purificação da amostra, usou-se a coluna de troca iônica SAX, a qual foi previamente condicionada, com 5 mL de hexano, 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapurificada, antes de introduzir as amostras contendo LAS. A solução proveniente da extração por ultra-som foi transferida para a coluna SAX previamente condicionada. A coluna foi lavada com 5 mL de metanol/água (35/65 - v/v) e essa fração foi desprezada. O surfactante foi eluído com 5 mL de HCl 4N em metanol e, em seguida, com 1,0 mL de metanol grau UV para HPLC. Coletou-se essas frações em balão de 50 mL e 150 µL de fenolftaleína (solução 1% em metanol) foi adicionada para posterior neutralização com NaOH 4N. A seguir, foi adicionado 25 mL de água ultrapurificada para completar o volume do balão volumétrico, transferindo-se esse conteúdo para coluna de fase sólida C-18.

Para o condicionamento da coluna C-18 foram adicionados 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapurificada.

As amostras provenientes das colunas SAX livre de impurezas indesejáveis foram transferidas para coluna C-18, previamente condicionada. O LAS retido nessa coluna foi extraído com 5 mL de metanol. Essa fração foi coletada em balão volumétrico de 10 mL e aferido com água ultrapurificada. Posteriormente, essa amostra foi filtrada em membrana de 0,22 µm e analisada por HPLC.

4.6 Testes de Adsorção de LAS em Espumas de Poliuretano

Os testes de adsorção realizados seguiram as etapas apresentadas no fluxograma da Figura 4.4.

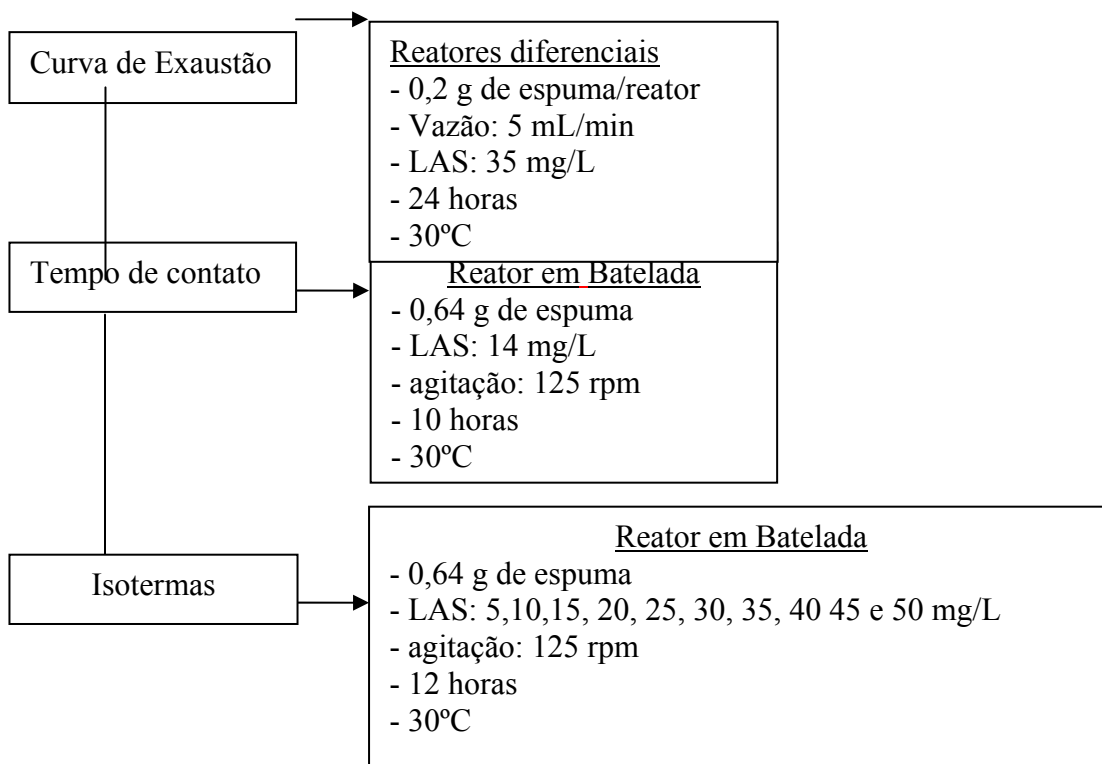


Figura 4.4 - Fluxograma dos testes de adsorção de LAS nas espumas de poliuretano

4.6.1. Curva de Exaustão

A curva de exaustão (duplicata) foi realizada em reatores diferenciais (Figura 4.5), para determinar o potencial adsorvente da espuma de poliuretano, material usado como suporte na imobilização de biomassa para o tratamento anaeróbio de LAS em RAHLF.

Os reatores foram confeccionados em vidro de boro-silicato, com diâmetro interno de 2,9 cm, preenchidos com cubos de espumas de poliuretano, com 5 mm de aresta. O volume total do reator foi de 15,8 cm³.

Os reatores foram alimentados constantemente com meio mineral (Tabela 4.1) contendo LAS (35 mg/L), como única fonte orgânica, em pH 7,0, e mantidos a 30°C, por 24 horas de operação. As concentrações de LAS no efluente foram quantificadas por HPLC.

A massa de LAS adsorvida durante este período foi calculada através da seguinte expressão:

$$mLAS = \sum Q \cdot (C_o - C_e) \cdot \Delta t \quad (3)$$

Sendo:

Q= vazão

Co= concentração de LAS afluente

Ce= concentração de LAS efluente

Δt = variação do tempo

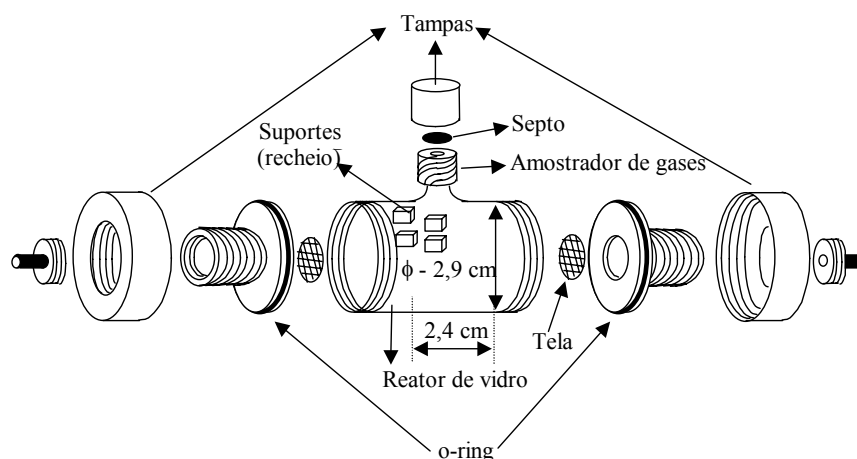


Figura 4.5 - Esquema do reator diferencial

Fonte: RIBEIRO (2001)

4.6.2 Tempo de Contato

Foram realizados experimentos (em triplicata) de adsorção para espuma de poliuretano, com a finalidade de acompanhar a quantidade de LAS adsorvida, em função do tempo, e determinar a saturação do suporte sem biomassa.

Para isso, massas conhecidas do suporte (cerca de 0,64 g de espuma seca) foram colocadas em frascos de Duran de 500 mL, contendo 200 mL de solução com a seguinte composição: 80 mg/L de sacarose, 500 mg/L de extrato de levedura, 400 mg/L de bicarbonato de sódio, 5 mL/L de solução de sais (Tabela 4.13) e 14mg/L de LAS.

Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 125 rpm a 30°C. Amostras da solução inicial, e imediatamente após entrar em contato com o suporte ($t = 0$), foram coletadas. No decorrer do tempo amostras foram coletas em 15

minutos; 30 minutos; 1 hora; 2,5 horas; 5 horas e 10 horas depois do início do experimento.

A variação das concentrações de LAS durante o experimento possibilitou calcular a quantidade de LAS adsorvida no suporte, ao longo do tempo e assim, conhecer o tempo de contato necessário para a saturação.

4.6.3 Isotermas

Após os ensaios de tempo de contato, novos experimentos de adsorção foram realizados para avaliar a saturação do suporte com a variação da relação massa de LAS adsorvida/massa de suporte. Neste caso, a mesma massa de suporte foi colocada em contato com esgoto sintético que apresentava diferentes concentrações de surfactante. Foram usadas concentrações de LAS próximas a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 45 e 50 mg/L em triplicata.

Semelhante aos ensaios anteriores, os suportes foram pesados (massa seca) e colocados em frascos de Duran de 500 mL. Após a adição de 200 mL da solução, os frascos foram mantidos sob agitação de 125 rpm e temperatura de 30°C.

Neste teste de isoterma, para diferentes concentrações de LAS, amostras da solução foram coletadas depois de 12 horas do início do ensaio, tempo suficiente para que ocorra a saturação das espumas.

4.7 Ensaios em Reator Anaeróbio em Batelada

4.7.1 Descrição dos reatores em Batelada

Frascos de Duran de 500 mL foram usados como reatores anaeróbios em batelada, sendo 250 mL de volume reacional e 250 mL destinados ao *headspace*. Os reatores foram operados em triplicata, para cada condição avaliada, e mantidos sob agitação de 130 rpm e temperatura de 30 ± 1 °C. Esses ensaios em batelada foram realizados com células em crescimento planctônico, sem adesão em material suporte.

4.7.2 Inóculo

Como inóculo, foi utilizado lodo granular proveniente de reator UASB, empregado no tratamento de dejetos de suinocultura, instalado no Departamento de Engenharia Rural, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Jaboticabal.

O lodo foi armazenado em câmara fria a 4°C. Antes de ser usado, o lodo foi centrifugado e depois homogeneizado em liquidificador. Em seguida, esse material foi transferido para recipiente de 1000 mL (frasco de Duran) e submetido à atmosfera de N₂ (100%), durante 15 minutos.

4.7.3 Ensaio Usando Meio Mineral com Diferentes Concentrações de LAS

Nesse ensaio o volume de inóculo usado foi 20% em volume reacional de 250 mL e *headspace* de preenchido com 250 mL de N₂/CO₂ (70/30%). O meio mineral usado foi descrito por Stackebrandt et al. (1999). Algumas modificações foram feitas na composição do meio, como pode ser observado na Tabela 4.1.

Na Figura 4.6 está apresentado o fluxograma descritivo das seguintes condições avaliadas: (1) ensaio A, controle - nessa condição, os reatores não receberam LAS; (2) ensaio B, 50 mg/L de LAS; (3) ensaio C, 100 mg/L de LAS; (4) ensaio D, 200 mg/L de LAS; (5) ensaio E, 50 mg/L de LAS e 350 mg/L de lactato de sódio e (6) ensaio F, 50 mg/L de LAS e 350 mg/L de glicose. Os reatores foram operados durante 55 dias.

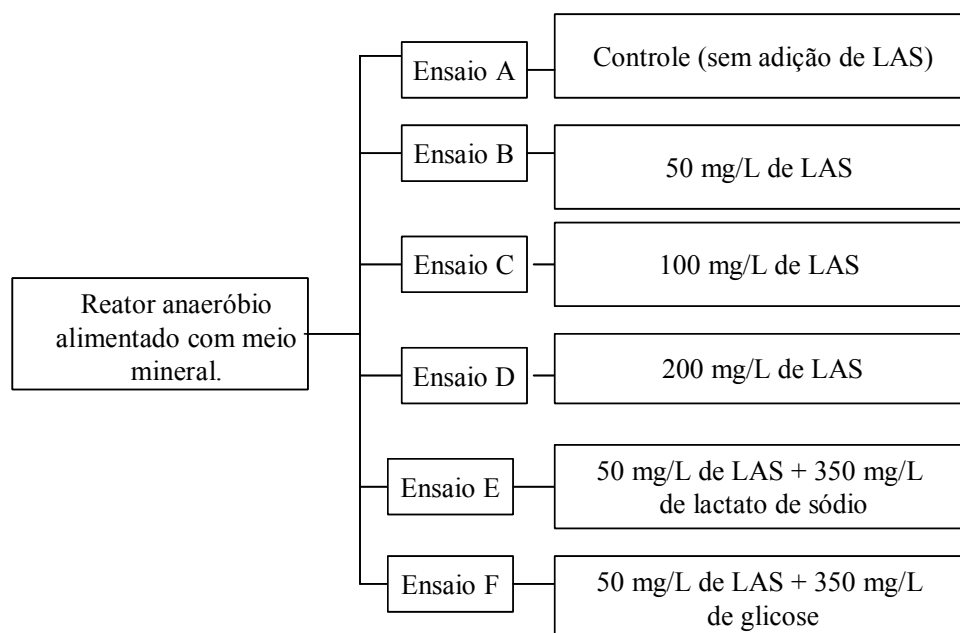


Figura 4.6 - Fluxograma dos ensaios em reatores em batelada com meio mineral e LAS

4.7.4 Ensaios Usando Esgoto Sintético e LAS

Nesse ensaio o volume de inóculo usado foi reduzido pela metade, ou seja, foram utilizados 10% de inóculo em volume reacional de 250 mL e *headspace* preenchido com 250 mL de N₂ (100%). Esgoto sintético formulado por Torres (1992) foi utilizado como base para a elaboração do meio nutricional. Algumas modificações foram necessárias como, por exemplo, a não inclusão de óleo e detergente, uma vez que a presença dos mesmos poderia prejudicar as análises de LAS (Tabela 4.12 e 4.13).

Todos os reatores foram inoculados e os ensaios foram realizados, como descritos no fluxograma da Figura 4.7: (1) controle com esgoto sintético, sem adição de LAS; (2) esgoto sintético e 50 mg/L de LAS; (3) esgoto sintético e ácidos orgânicos (Tabela 4.14); e (4) esgoto sintético, ácidos orgânicos e 50 mg/L de LAS.

Tabela 4.12 - Composição do esgoto sintético

Componentes	Concentração (mg/L)
Amido solúvel	230
Extrato de carne em pó	410
Sacarose	80
Bicarbonato de sódio	200
Solução de sais (Tabela 4.13)	5,0 mL

Fonte: modificado de Torres (1992)

Tabela 4.13 - Composição da solução de sais para esgoto sintético

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

Fonte: Torres (1992)

Tabela 4.14 - Ácidos orgânicos adicionados nos reatores em batelada

Ácidos orgânicos	Concentração (mM)
Acetato de sódio	10
Butirato de sódio	5
Propionato de sódio	5
Lactato de sódio	5
Formiato de sódio	10

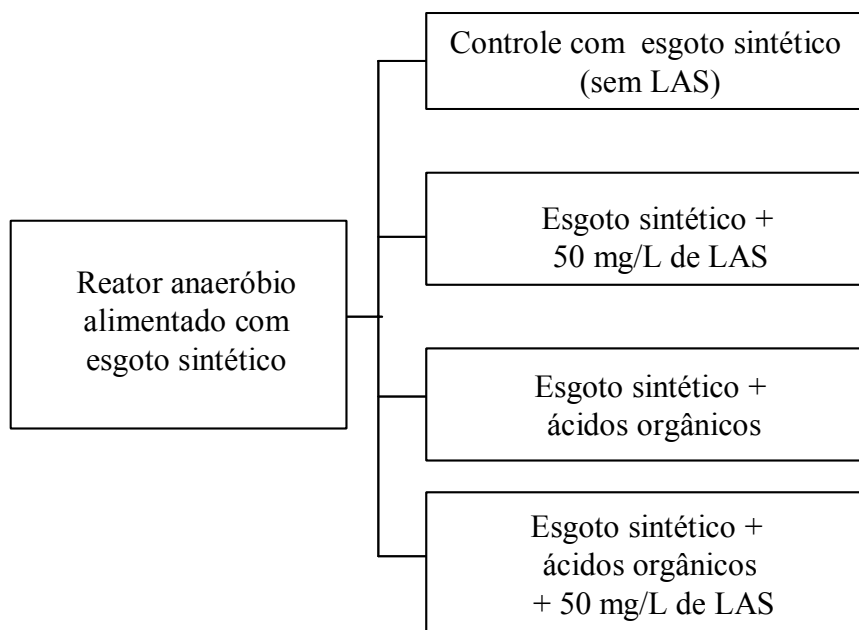


Figura 4.7 - Fluxograma dos ensaios em reatores anaeróbios em batelada alimentados com esgoto sintético

4. 8 Ensaio em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo

Foram utilizados dois reatores horizontais de leito fixo (RAHLF), preenchidos com espumas de poliuretano, inoculados com lodos distintos (Figura 4.8).

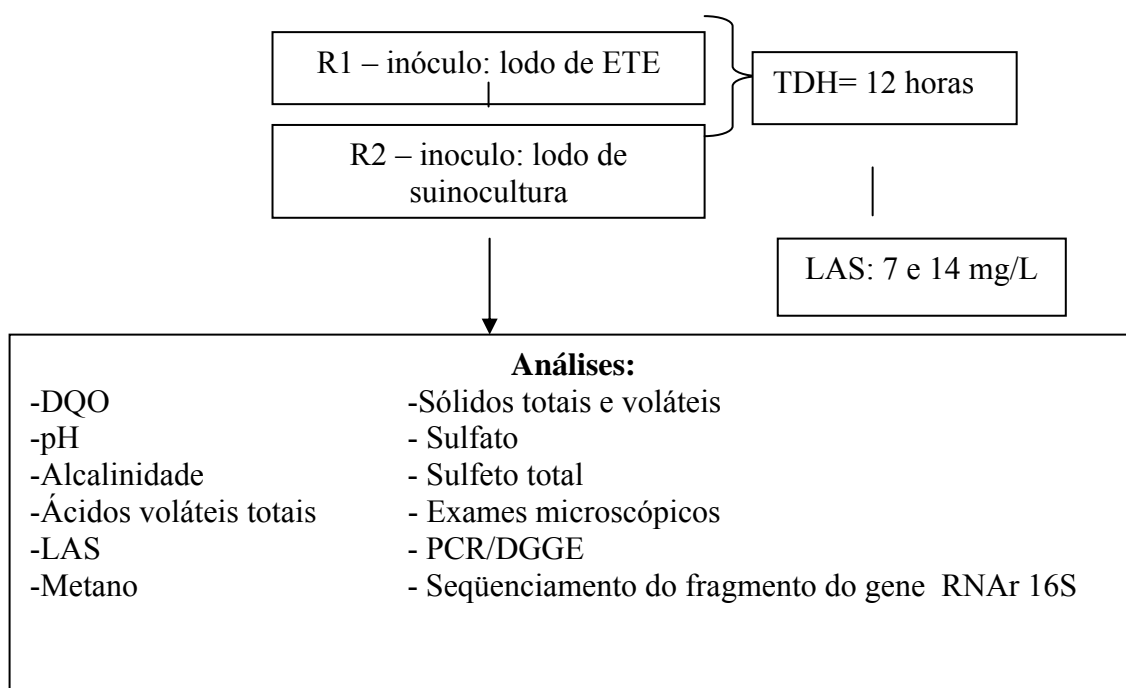


Figura 4.8 - Fluxograma da operação dos RAHLFs

4.8.1 Descrição do Reator Contínuo

Dois Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo (RAHLF) usados nesse experimento foram confeccionados em vidro boro-silicato com 1,0 m de comprimento (L) e 5,0 cm de diâmetro interno (D), com relação comprimento por diâmetro (L/D) de 20 e volume total de 2000 mL cada. Os reatores foram instalados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), em câmara de madeira, equipada com controladores de temperatura ($30 \pm 2^\circ\text{C}$).

Na parte superior do RAHLF foram colocadas tomadas para coleta e saída de gás. Ao longo do comprimento dos reatores foram instalados cinco pontos de coleta, colocados em posições correspondentes a L/D de 1, 5, 10, 14, 19 (Figura 4.9), por onde as amostras líquidas e de biomassa imobilizada foram coletadas.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado aos reatores foi de 12 horas, baseado no volume útil de 800 mL. A vazão efluente foi de 0,66 mL/h, e medida diariamente para garantir o TDH.

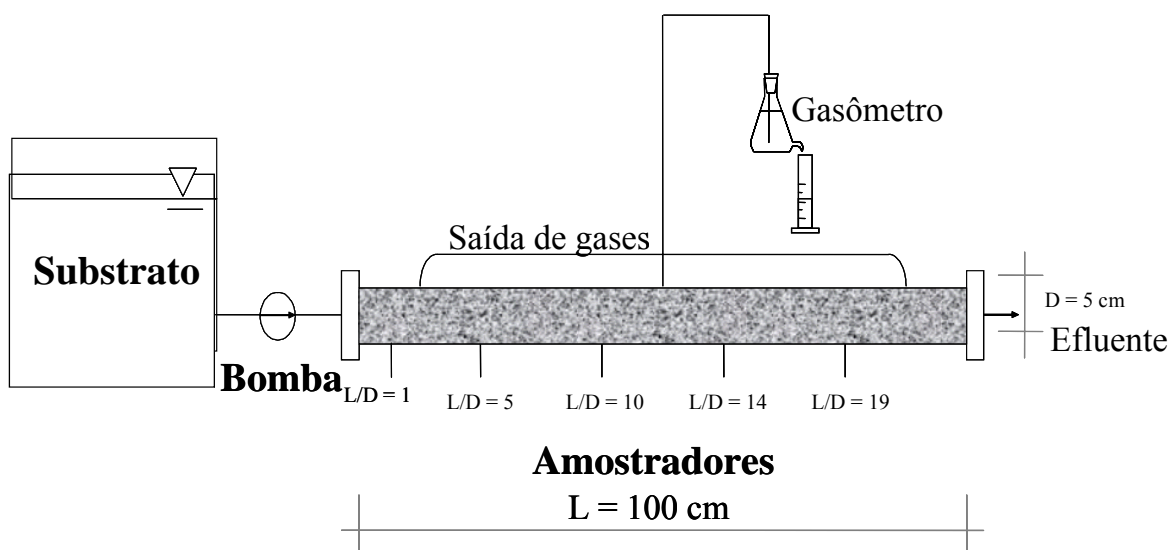


Figura 4.9 - Esquema do reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada

4.8.2 Suporte para Imobilização do Lodo Anaeróbico

Para a imobilização dos microrganismos foram usados cubos de espuma de poliuretano, com 5 mm de aresta e densidade aparente de 23 kg/m^3 , resultando na porosidade do leito de 40%.

4.8.3 Inoculação dos reatores

O reator 1 (R1) foi inoculado com lodo anaeróbico proveniente de reator UASB usado no tratamento de esgoto sanitário da Universidade de São Paulo, Campus de São Carlos (ETE-EESC-USP), imobilizado em espumas de poliuretano. O reator 2 (R2) foi inoculado com lodo de reator UASB, usado no tratamento de dejetos de suinocultura (Unesp de Jaboticabal-SP).

A imobilização da biomassa nas espumas de poliuretano foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Zaiat et al. (1994).

4.8.4 Preparação e Composição do Esgoto Sintético

O esgoto sintético foi armazenado em frasco de Duran de 5,0 L, mantido sob refrigeração. O esgoto sintético (Tabela 4.15) foi preparado da seguinte maneira:

- a) a solução estoque de LAS foi mantida sob refrigeração;
- b) a solução de sais (Tabela 4.13) foi preparada, previamente, e mantida em frasco âmbar, sob refrigeração. Para preparar 5,0 L de esgoto sintético foram utilizados 25 mL dessa solução;
- c) os demais componentes do esgoto sintético foram pesados, semanalmente, e mantidos em frascos tampados sem umidade e temperatura ambiente;
- d) o amido e extrato de carne foram dissolvidos, separadamente, em água de abastecimento (80 mL) aquecidos até fervura;
- e) No frasco de alimentação foi adaptada bexiga de borracha preenchida com N₂ (100%), para manter a anaerobiose.

Alterações na composição do esgoto sintético foram realizadas para minimizar a produção de material gelatinoso nos primeiros trechos dos reatores e também para melhorar a eficiência na remoção de LAS. Essas mudanças dividiram a operação dos reatores em etapas, como pode ser observado nas Tabelas 4.16 e 4.17.

Tabela 4.15 - Composição do esgoto sintético

Composição	Concentração (mg/L)
Amido solúvel	230
Extrato de carne em pó	410
Sacarose	80
Bicarbonato de sódio	400
Solução de sais (Tabela 4.13)	5,0 mL

Fonte: modificado de Torres (1992)

Tabela 4.16 - Etapas de operação do reator R1

Etapas	Período (dias)	COV (gDQO/L.d)	Concentração de LAS (mg/L)	Características
I	1 a 27	0,6	0	Alimentação com esgoto sintético
II	28 a 52	0,6	7	Adição de LAS
III	53 a 144	0,6	14	Aumento da concentração de LAS no afluente
IV	145 a 313	0,5	14	Retirada do amido da alimentação. Extrato de carne substituído por extrato de levedura (500 mg/L)

COV = carga orgânica volumétrica

Tabela 4.17 - Etapas de operação do reator R2

Etapas	Período (dias)	COV (gDQO/L.d)	Concentração de LAS (mg/L)	Características
I	1 a 27	0,6	0	Alimentação com esgoto sintético
II	28 a 52	0,6	7	Adição de LAS
III	53 a 144	0,6	14	Aumento da concentração de LAS no afluente
IV	145 a 244	0,5	14	Retirada do amido da alimentação
V	245 a 313	0	14	Alimentação somente com LAS

COV = carga orgânica volumétrica

4.9 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas

Amostras do afluente e efluente dos reatores foram coletadas e analisadas seguindo a frequência e métodos descritos na Tabela 4.18

As variações espaciais foram realizadas no final de cada etapa operacional. As amostras da fase líquida foram coletadas nos pontos de amostragens, na seguinte ordem: (L/D) 20 (efluente), 19, 14, 10, 5, 1 e 0 (afluente). Entre um ponto e outro da coleta aguardou-se, aproximadamente, 30 minutos.

Tabela 4.18 - Frequência das análises realizadas nos reatores R1 e R2

Parâmetro	Método	Frequência das análises	Referência Bibliográfica
pH (unidade)	Potenciométrico	2 x semana	-
DQO bruta e filtrada (mg/L)	Espectrofotométrico	2 x semana e Perfil	APHA (1998)
Metano ($\mu\text{mol/L}$)	Cromatográfico (GC)	2 x semana	-
Ácidos Voláteis Totais (mgHAc/L)	Titulométrico	2 x semana	DILLALO & ALBERTSON (1961)
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	Titulométrico	2 x semana	DILLALO & ALBERTSON (1961) modificado por RIPLEY et al. (1986)
LAS (mg/L)	Cromatográfico (HPLC)	2 x semana e Perfil	-
Sulfato (mg/L)	Espectrofotométrico	Perfil	APHA (1998)
Sulfeto (mg/L)	Espectrofotométrico	Perfil	APHA (1998)
Ácidos voláteis (mg/L)	Cromatográfico (GC)	Perfil	MORAES et al. (2001)
Vazão (mL/h)	Volumétrico	diariamente	-

4.10 Balanços de Massa do LAS

No decorrer da operação foram realizados balanços de massa sem considerar a adsorção. O cálculo foi feito com base na somatória das massas de LAS aplicadas nos reatores e as recuperadas nos efluentes.

No final da operação dos reatores foram realizadas extrações do LAS adsorvido na biomassa imobilizada para realização do balanço de massa global. Amostras em triplicata de espuma de poliuretano com biofilme foram desidratadas a 105°C e submetidas a lavagens sucessivas com metanol em ultra-som. O material extraído foi purificado em coluna de troca iônica (SAX) e concentrado em coluna C-18, para posterior quantificação por HPLC.

4.11 Exames Microscópicos

Finas camadas de ágar (2%) foram colocadas sobre lâminas de vidro, previamente, limpas com álcool. Após a solidificação do ágar, amostras foram adicionadas, recobrando-as com lamínulas.

Foram analisadas as seguintes amostras microbianas: (a) culturas planctônicas provenientes dos reatores em batelada, retirada com auxílio de seringa de insulina de 1 mL, previamente submetida a lavagem por 3 vezes com N₂ (100%) e (b) espumas de poliuretano dos RAHLFs, coletadas nos pontos de amostragem com auxílio de pinça de metal. Nesse último caso, o material suporte foi transferido para frascos de vidro apropriados, contendo pérolas de vidro e submetido à atmosfera de N₂ (100%) durante 5 minutos. Os frascos foram selados com tampas de butila e lacres de alumínio. Posteriormente, foi realizada agitação manual em ângulo de 45°, durante 20 minutos, para o desprendimento da biomassa da espuma. Aproximadamente, 30 campos foram observados em microscópio Leica de contraste de fase e fluorescência, acoplado à câmera Optronics, com captura de imagem e software Image-Pro Plus. Exame por microscopia eletrônica de varredura também foi realizado e as amostras foram preparadas de acordo com a metodologia adaptada por Araújo (1994), para biofilmes microbianos.

4.12 Análises da Diversidade Microbiana

A avaliação da diversidade microbiana presente nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo foi realizada usando a técnica de PCR/DGGE (Figura 4.10). As amostras de espumas de poliuretano foram coletadas nos pontos de amostragem, para cada etapa de operação. O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de Melvin & Hobson (1994).

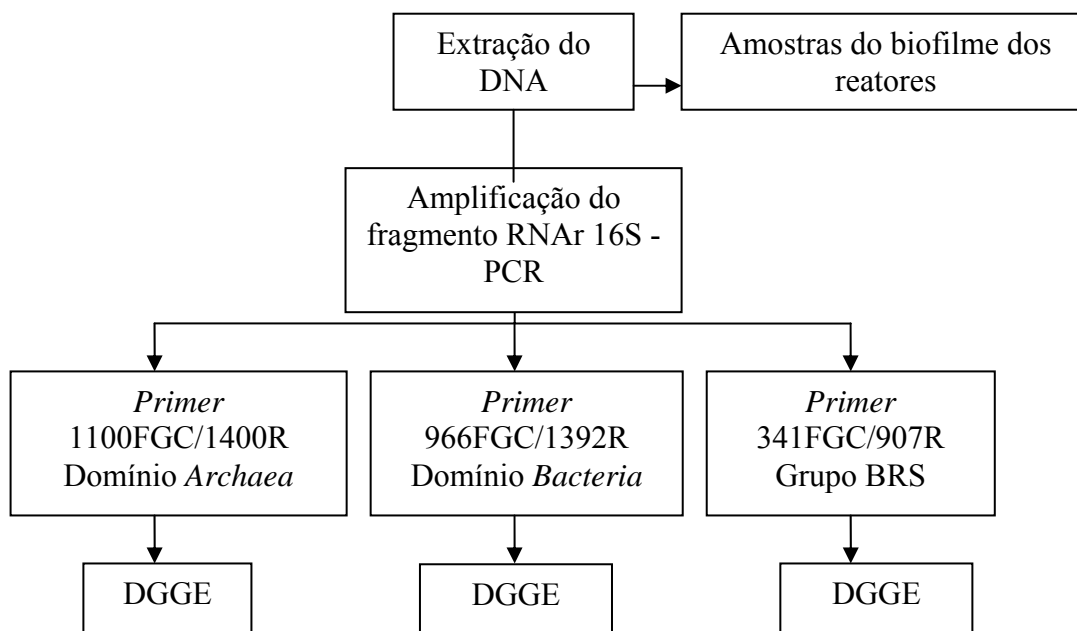


Figura 4.10 - Fluxograma da análise da estrutura da comunidade microbiana presente nas diferentes etapas de operação dos RAHLFs usando PCR/DGGE

4.12.1 Amplificação por PCR

Na amplificação dos fragmentos do RNAr 16S foram utilizados *primers* específicos (Tabela 4.19) para os Domínios *Archaea* (KUDO et al., 1997) e *Bacteria* (NIELSEN et al., 1999), e para o grupo das bactérias redutoras do íon sulfato (BRS) (NAKAGAWA et al., 2001). Nas análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram usados microrganismos-controle (Tabela 4.20). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).

Na reação de amplificação do fragmento do RNAr 16S dos microrganismos dos Domínio *Bacteria*, *Archaea* e grupo BRS foram usadas as seguintes soluções: 0,5 µL de Taq DNA polymerase (5U/µL); 5 µL de tampão PCR 10X; 1,5 µL de MgCl₂ (50mM); 5 µL de dNTP (2 mM); 1µL de “*primer forward*” (100 pmol) e 1 µL do “*primer reverse*” (100 pmol) e 2 µL de DNA extraído. O aparelho utilizado nessa técnica foi o termociclador “Gene Amp. PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn).

As condições usadas na programação do aparelho para amplificação do fragmento de RNAr 16S estão descritas na Tabela 4.21

Tabela 4.19 - *Primers* usados na PCR

Microrganismos	Primers e seqüência (5' - 3')	Referência Bibliográfica
Domínio <i>Archaea</i>	1100 FGC (5' – AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG – 3'). 1400R (5' – CGC CCG CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG – 3')	KUDO et al. (1997)
Domínio <i>Bacteria</i>	968 FGC (5' – AAC CGC GAA GAA CCT TAC – 3') 1392 R (5' – AACG GGC GGT GTG TAC – 3') GC clamp (5'- CGC CCG CCG GGG CGC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG – 3')	NIELSEN et al. (1999)
Grupo BRS	341FGC (5' – CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') 907 R (5' – CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3') CG clamp (5' – CCG CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC – 3')	NAKAGAWA et al. (2001)

Tabela 4.20 - Microrganismos-controle positivos no PCR

Microrganismos	Controle Positivo
Domínio <i>Archaea</i>	DSM 668 – HS- <i>Halobacterium salinarum</i> ATCC 43241 – <i>Methanosarcina barkeri</i>
Domínio <i>Bacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 183 – <i>Allochromatium vinosun</i>
Grupo BRS	ATCC 23193 – <i>Desulfotomaculum ruminis</i>

Tabela 4.21 - Programação do termociclador para amplificação dos fragmentos do RNAr 16S

Microrganismos	Nº de ciclos	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Resf.
Domínio <i>Archaea</i>	35	94°C 1,30 min	94°C 0,30 min	55°C 0,30 min	72°C 1,30 min	94°C 3,0 min	4°C
Domínio <i>Bacteria</i>	35	94°C 5 min	94°C 1,30 min	38°C 45s	72°C 1 min	72°C 5 min	4°C
Grupo BRS	10	94°C	94°C 1,30 min	62°C 1 min	72°C 1,30 min		
	25	1,30 min	94°C 1,30 min	57°C 1 min		72°C 5 min	4°C

4.12.2 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

O DGGE é uma técnica que permite a separação dos fragmentos de RNA de mesmo tamanho, porém com seqüências de nucleotídeos diferentes. A separação desses fragmentos ocorre de acordo com o grau de desnaturação da dupla hélice de DNA, sob a ação do gel de poliacrilamida, com gradiente crescente dos agentes desnaturantes (formamida e uréia).

Para o grupo das BRS e Domínio *Bacteria* foram usadas concentrações de 30% e 60% do gel de gradiente desnaturante (gel acrilamida - 40%; solução 50X de TAE -Tris Ácido Acético EDTA; formamida e uréia), enquanto para o Domínio *Archaea* os valores foram de 40% e 60%. Os géis foram preparados com 111 µL de APS (persulfato de amônia-10%); 11 µL de temed (tetrametiletlenodiamina). Após a solidificação do gel (1 hora), as placas contendo o gel foram colocadas em suporte apropriado e levado a cuba de DGGE. Nesta cuba foram adicionados 7L de água destilada e 140 mL de TAE 50X. A temperatura de “corrida” do gel foi constante (65°C), voltagem de 175 Volts, com duração de 16 horas. O gel foi retirado da cuba e corado com brometo de etídio por 20 minutos e depois transferido para o fotodocumentador Eagle Eye TM III (Stratagene) acoplado ao computador e software Eagle Slight UV para visualização das bandas, sob exposição à UV de 254 nm.

4.13 Caracterização da Comunidade de Bactérias Presentes nos RAHLFs

4.13.1 Extração de DNA Genômico Total

Amostras de biofilme foram retiradas no final da operação dos reatores e submetidas a dois protocolos diferentes de extração do DNA (MELVIN & HOBSON, 1994; VAN ELSAS, 1995), com a finalidade de obter boa representação dos microrganismos presentes nas amostras (Anexo 1 e 2).

Antes de proceder à lise celular, foi realizada recuperação prévia da biomassa aderida na espuma de poliuretano. Transferiu-se 10 a 15 cubos de espuma para tubos Falcon (15 mL), adicionou-se 5 mL de tampão PBS 1X e agitou-se manualmente (repetiu-se 3 vezes). Centrifugou-se a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo a biomassa foi mantido em gelo até o início do protocolo de extração.

Os DNAs obtidos dos protocolos de extração foram visualizados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio e quantificados através de comparação com o padrão de concentração DNA do fago *Lambda*. As amostras de DNA obtidas com cada protocolo foram combinadas antes de proceder as etapas subseqüentes do seqüenciamento do fragmento de RNAr 16S.

4.13.2. Amplificação do RNAr 16S

Fragmentos do RNA ribossomal 16S foram obtidos pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente das amostras. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) usados para a reação de PCR foram p27F e p1100R, homólogos às extremidades conservadas do gene RNAr 16S de bactérias. Para as reações de PCR foram usados 0,4 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs (GE Health Care), 2 Unidades de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico).

O programa para amplificação do gene RNAr 16S seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 10 ciclos de 1 minutos de desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento, começando com 69°C e diminuindo 0,5°C por ciclo e 3 minutos a 72°C para extensão; seguido de mais 10 ciclos de 1 minuto de

desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento a 63°C e 3 minutos a 72°C para extensão. Para cada amostra foram feitas 10 réplicas da reação de PCR.

4.13.3 Clonagem em Vetor pGEM T Easy

Bibliotecas de gene RNAr 16S foram construídas para cada amostra da biomassa presente no final da operação dos reatores (R1 e R2). As réplicas da reação de PCR foram combinadas, a solução final foi purificada em coluna *GFX PCR DNA* e *Gel Band Purification Kit*, (GE Health Care) e concentrada em *speed vac* 5301 Eppendorf, A-2-VC rotor. Os fragmentos purificados foram ligados em vetor pGEM-T (pGEM-T Easy Vector System, Promega), segundo especificações do fabricante, e transformados em *Escherichia coli* JM 109. As células transformadas foram plaqueadas em meio LA (Luria Bertni) contendo 100 µg/mL de ampicilina, 80 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranoside (XGal) e 0,5 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranoside (IPTG). As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 16h. Aproximadamente 100 clones foram selecionados de cada reator para seqüenciamento.

4.13.4 Amplificação do inserto (gene RNAr 16S)

Os clones foram incubados em meio Circle Grow, contendo ampicilina (100 µg/mL) e mantidos a 37°C, com agitação (100 rpm) por 24h. Reações de amplificação usando os *primers* universais M13f (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') e M13r (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3') foram feitas a fim de se obter o fragmento do gene RNAr 16S inserido no vetor para posterior seqüenciamento automatizado.

A reação de amplificação seguiu as seguintes especificações: 1-2 µL da cultura do clone; 0,4 µM de cada *primer*, 0,2 mM da mistura de dNTPs (GE Health Care); 2 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 1X tampão da enzima (Taq Polymerase) (Invitrogen) e 1,5 mM MgCl₂. O programa de amplificação foi realizado como descrito a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94°C, 20 segundos para anelamento a 60°C, e 1,5

minuto de extensão a 72°C. As amplificações foram feitas em termociclador iCycler thermal cycler (Biorad®).

Produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 0,8% a fim de confirmar o tamanho do fragmento esperado.

4.13.5 Seqüenciamento do gene RNAr 16S

Os fragmentos amplificados foram purificados com *kit* GFX 96 PCR Purification (GE Healthcare) e seqüenciado em seqüenciador automático *MegaBace DNA Analysis System 1000* (GE Health Care), usando *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* para MegaBace, de acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* usados para seqüenciamento foram T7 (5'-GTA ATA GGA GTG AGT ATA GGG C-3'), M13r (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3') e 782r (posição 782r do gene RNAr 16S de *Escherichia coli*) (5'-ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT-3').

4.13.6 Análise Filogenética

As seqüências parciais de RNAr 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparados com as seqüências de RNAr 16S de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foram selecionadas as seqüências de organismos relacionados à seqüência dos organismos desconhecido para realização das análises filogenéticas. As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o método Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987) utilizando o programa MEGA versão 2.1 (KUMAR et al., 2001) As seqüências foram aparadas quanto à qualidade usando procedimento de Telles & Silva, (2001) modificado para processar genes RNAr, como descrito a seguir: seqüências de vetor plasmidial e regiões com baixa qualidade na seqüência (qualidade média abaixo de 20), de acordo com Phred scores (EWING et al., 1998) ao 3'- e 5'- finais do gene RNAr 16S suplementares foram removidos. Assim,

somente seqüências de alta qualidade foram usadas nas análises. Seqüências com menos de 500 pares de bases foram excluídas das análises subseqüentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do Alquilbenzeno Linear Sulfonado

O método mais empregado para determinação de surfactante aniônico é o MBAS (substâncias ativas ao azul de metileno), porém esse método não é específico para LAS. Outros métodos podem ser empregados, tais como, cromatografia gasosa (CG) e líquida (HPLC), entretanto, para análise em CG, é necessário a derivatização prévia das amostras. Neste trabalho optou-se por desenvolver metodologia para determinação de LAS por HPLC, uma vez que a solução padrão é constituída de mistura de homólogos e, dessa forma, é possível observá-los separadamente.

A primeira análise por HPLC foi realizada com 24 mg/L de LAS solubilizados, separadamente, em água ultrapurificada e acidificada com ácido clorídrico (2,96 g/L) usando como fase estacionária a coluna C-18. Estas soluções de LAS foram analisadas no cromatógrafo, usando como fase móvel metanol/água (MeOH/H₂O) (80/20 - v/v). Usou-se detector de UV, com comprimento de onda de 230 nm, como indicado por Ou et al. (1996) e Angelidaki et al. (2000). Porém os cromatogramas obtidos não apresentaram boas resoluções. Optou-se por purificar a solução de LAS em coluna de troca iônica (SAX) previamente condicionada. Somente a fração eluída em metanol acidificado apresentou sinais cromatográficos com vários picos juntos, sem resolução, com tempo de retenção de 5 minutos.

Matthijs & De Henau (1987) usaram a coluna SAX para concentrar amostras de LAS em água, sedimentos e lodos. O eluído da coluna SAX foi introduzido na coluna de fase sólida C-18. Os picos obtidos também não apresentaram definição adequada, mas os autores empregaram padrões de homólogos, auxiliando na identificação dos mesmos.

A coluna de troca iônica (SAX) foi empregada por outros pesquisadores, tais como Mc Avoy et al. (1997) e Prats et al. (2000) para concentrar amostras diluídas

de LAS provenientes de água superficial, sedimento, solo e lodo biológico. Os autores usaram metanol acidificado para eluir o LAS adsorvido e submeteram o surfactante a purificação e concentração em coluna SAX, obtendo resultados satisfatório.

Posteriormente, nos testes cromatográficos, a fase estacionária C-18 foi substituída pela coluna Synergi (C-12), com detector de UV. A fase móvel foi a mesma usada anteriormente, ou seja, MeOH/H₂O (80/20 - v/v). A solução de LAS de 24 mg/L em água ultrapurificada foi analisada. O cromatograma apresentou alguns picos sem definição, com tempo de retenção entre 5 a 10 minutos. Os resultados obtidos não foram satisfatórios. Desse modo, optou-se por utilizar, novamente, a coluna de troca iônica (SAX) e a coluna de fase sólida (C-18) para concentrar e purificar a amostra, visando a obtenção de picos cromatográficos com resoluções melhores..

Amostras de LAS, nas concentrações de 24 mg/L, 80 mg/L e 100 mg/L, solubilizadas em água ultrapurificada, foram introduzidas na coluna SAX e eluídas, individualmente, com MeOH acidificado e analisadas no cromatógrafo. Desta vez, a fase móvel utilizada foi MeOH/H₂O (50/50 - v/v). Nenhum sinal foi observado nos cromatogramas. Portanto, a coluna SAX foi substituída pela coluna C-18. Foram preparadas duas soluções de LAS de 24 mg/L, sendo uma delas solubilizada em água ultrapurificada e a outra acidificada com ácido clorídrico (HCl). Ambas as soluções foram introduzidas na coluna C-18 e eluídas, separadamente, com metanol puro. Esse procedimento não foi adequado, uma vez que, os cromatogramas apresentaram vários picos, não definidos. O mesmo procedimento com resultados semelhantes foi obtido por Holt et al. (1995).

Ainda, utilizando a mesma fase estacionária (coluna cromatográfica C-12), foi testado sistema de gradiente de eluição com acetonitrila/água (70/30 - v/v) e perclorato de sódio (0,15 M) como eluentes. Entretanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios.

Como não foram obtidos bons resultados para a separação dos componentes do LAS nas fases estacionárias (colunas cromatográficas C-18 e C-12), resolveu-se testar a coluna C-8. Di Corcia et al. (1991) utilizaram a fase estacionária C-8 para separar os homólogos do LAS, com detector de fluorescência, com fase móvel

MeO/H₂O (80/20 -v/v) e 0,1 mol/L de perclorato de sódio, com eluição isocrática e fluxo de 1,5 mL/min.

Algumas alterações foram feitas na metodologia utilizada por Di Corcia et al. (1991). Por exemplo, foram testados os seguintes detectores: UV (230 nm) e de fluorescência (excitação 225 nm e emissão 290 nm), como sugerido por Ferrer et al. (1996) e León et al. (2000). Primeiramente, a fase móvel usada foi MeOH/H₂O (80/20 - v/v), sem perclorato de sódio e foram testados os seguintes fluxos: 1,5 mL/min e 0,8 mL/min. Em ambos os fluxos avaliados foram observados vários grupos de picos ao longo dos cromatogramas.

O fluxo foi alterado para 0,5 mL/min, com detector de UV, a 230 nm. Neste teste foram observados 5 picos, sendo o primeiro e quinto, com áreas menores em relação aos demais. Com o detector de fluorescência obteve-se um cromatograma com 4 picos, razoavelmente bem definidos. A partir desses resultados, utilizou-se fluxo de 0,5 mL/min e coluna C-8 como fase estacionária.

Como Di Corcia et al. (1991) obtiveram cromatogramas com picos bem definidos adicionando perclorato de sódio à fase móvel, procedeu-se também a adição desse sal. As proporções de metanol e água foram às mesmas descritas anteriormente, ou seja, MeOH/H₂O (80/20 - v/v), acrescentando-se 0,075 M de perclorato de sódio à fase aquosa. Os cromatogramas obtidos nessas condições apresentaram melhor separação entre os picos.

A utilização do perclorato de sódio, na fase móvel, auxilia a retenção do LAS na fase estacionária, em função do aumento da força iônica. Antes de ser adicionado o perclorato de sódio, os picos saíam ao redor de 5 minutos e, após a sua utilização esse tempo foi prolongado. Além do sódio, outros cátions, podem ser usados na fase móvel, como por exemplo, magnésio e bário, porém o sódio é o mais adequado (CHEN & PIETRZYK, 1994).

Foram considerados 5 picos principais com o detector UV, sendo que o primeiro e o último apareceram com áreas menores (Figura 5.1).

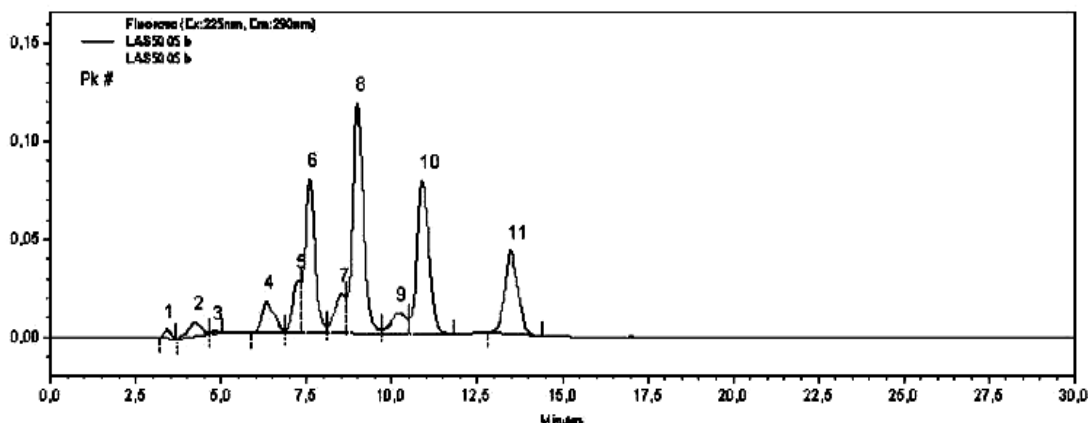


Figura 5.1 - Cromatograma da solução de LAS em fase estacionária (coluna C-8), eluição isocrática com MeOH/H₂O e perclorato de sódio (0,075 M), fluxo de 0,5 mL/min, detector UV a 230 nm e temperatura de 32°C.

Com o intuito de melhorar a resolução dos picos, a mesma fase móvel (MeOH/H₂O) foi testada em sistema de gradiente de eluição, com detector de fluorescência, temperatura de 35°C e fluxo de 0,5 mL/min. Vários pesquisadores usaram o sistema de gradiente de eluição na quantificação do LAS (MARCOMINI et al., 1987; LÉON et al., 2000).

Oito versões para o gradiente de eluição foram testadas. As primeiras versões não foram capazes de separar adequadamente os picos, sendo que algumas os aproximaram, e outras os tornaram mais largos. A 8^a versão foi a que propiciou melhor separação e resolução de quatro picos (Tabela 4.8). O cromatograma produzido a partir desta programação de gradiente forneceu quatro picos principais, os quais quase completamente resolvidos (Figura 5.2). O uso de sistema de gradiente de eluição melhorou a separação dos homólogos presentes na solução de LAS, como foi observado por Matthijs & De Henau (1987).

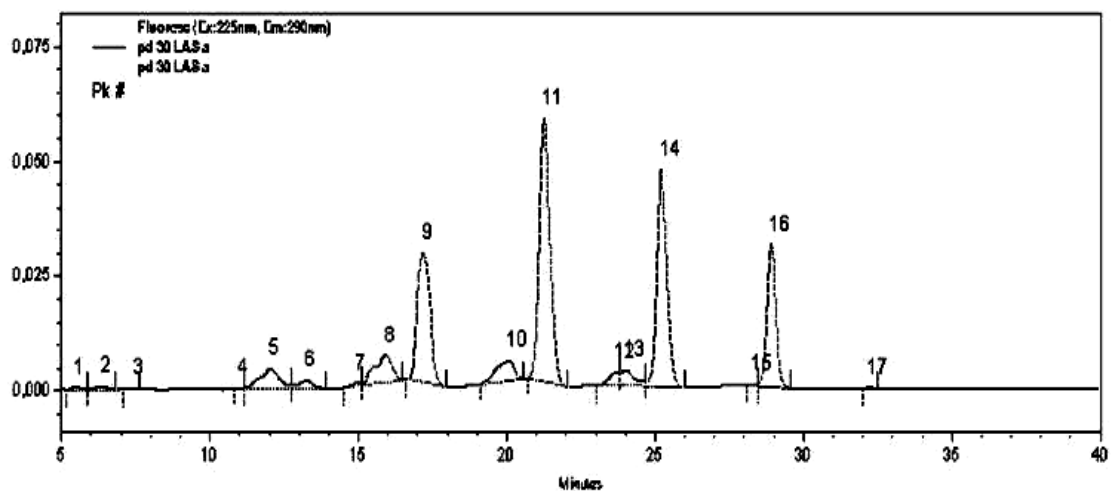


Figura 5.2 - Cromatograma da solução de LAS em fase estacionária (coluna C-8), gradiente de eluição com MeOH/H₂O e perclorato de sódio (0,075 M), fluxo de 0,5 mL/min, detector de fluorescência λ_{exc} 225 nm e λ_{em} 290 nm e temperatura de 35°C

Neste trabalho, os resultados experimentais indicaram que a utilização da fase estacionária (coluna C-8) foi adequada para obtenção de picos bem definidos referentes aos homólogos do LAS. Marcomini et al. (1987) e Di Corcia et al (1991) usaram a fase estacionária (coluna C-8) acoplada a pré-coluna. No entanto, outros trabalhos da literatura utilizaram como fase estacionária a coluna C-18 (MATTHIJS & DE HENAU, 1987; HOLT et al., 1995; FERRER et al., 1996; OU et al., 1996; KÜCHLER & SCHNAAK, 1997; CAVALLI et al., 2000; PRATS et al., 2000; SANZ et al., 2000; HOLMSTRUP & KROGH, 2002).

A resolução dos picos é muito importante, uma vez que, o padrão de LAS (dodecilbenzeno sulfonado de sódio – LAS comercial) possui homólogos da cadeia alquílica e isômeros de posição do anel aromático, o que causa grande dificuldade para a sua quantificação. Para quantificá-lo preparou-se curva de calibração com LAS nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 20 mg/L (Apêndice A – Tabela A1).

As distribuições dos picos do LAS foram as seguintes: 18% para o pico 1; 36% para o pico 2; 28% para o pico 3 e 18% para o pico 4. Di Corcia et al. (1991) mediram as áreas dos picos dos cromatogramas e utilizando padrões para cada

homólogo encontraram as seguintes porcentagens: 12,8%, 41,8%, 36,1% e 9,3%, respectivamente, para os homólogos C10, C11, C12, C13. Segundo Marcomini et al. (1993), os homólogos do LAS são eluídos de acordo com o tamanho da cadeia alquílica. Portanto, provavelmente, o primeiro pico obtido neste trabalho pode ser relacionado ao homólogo de menor número de átomos de carbono. Entretanto, para confirmar essa hipótese, seria necessário realizar análise com detector de massa, com a finalidade de identificar cada homólogo da cadeia alquílica. Infelizmente, essa análise não foi possível de ser realizada neste trabalho.

5.2. Validação do Método Cromatográfico para Determinação do LAS

O método cromatográfico foi validado através de sua linearidade, repetibilidade, precisão, limite de detecção e recuperação, utilizando fase estacionária (coluna C-8), gradiente de eluição com MeOH/H₂O e perclorato de sódio (0,075 M), fluxo de 0,5 mL/min, detector de fluorescência λ_{exc} 225 nm e λ_{em} 290 nm e temperatura de 35°C. Nas Tabelas 5.1 e 5.2 estão sumarizados os dados de regressão linear para as curvas de calibração e cálculo do limite de detecção para os quatro picos. As curvas de calibração foram lineares, tanto para as soluções preparadas em água, quanto para preparadas em esgoto sintético. Todas as curvas de calibração dos picos apresentaram coeficiente de correlação maiores ou iguais a 0,98.

A precisão do método foi avaliada pelo tempo de retenção dos padrões de LAS usados na curva de calibração, com o coeficiente de variação menor que 1% para os padrões em água e 4% para os padrões em esgoto sintético (Tabela 5.3).

Tabela 5.1 - Curva de calibração, linearidade e limite de detecção para solução padrão de LAS em água

Picos	Regressão Linear	R ²	Varição de Concentração (mg/L)	Limite de Detecção (mg/L)
1	$y = 128790x + 18492$	0,9848	0,09 – 2,89	0,43
2	$y = 137009x + 1862,4$	0,9976	0,23 – 5,74	0,01
3	$y = 136430x + 2988,3$	0,9969	0,23 – 4,46	0,02
4	$y = 135326x + 4774,7$	0,9966	0,23 – 2,89	0,03

Tabela 5.2 - Curva de calibração, linearidade e limite de detecção para solução padrão de LAS em esgoto sintético

Picos	Regressão Linear	R²	Varição de Concentração (mg/L)	Limite de Detecção (mg/L)
1	$y = 124124x + 5290,4$	0,9834	0,13 – 3,05	0,37
2	$y = 124814x + 9251,5$	0,9837	0,24 – 5,94	0,69
3	$y = 123521x + 12134$	0,9840	0,21 – 4,34	0,54
4	$y = 121164x + 12875$	0,9800	0,23 – 2,65	0,42

Tabela 5.3 - Precisão do método cromatográfico calculado usando o tempo de retenção (n= 3 para cada pico)

Picos	Tempo de Retenção (min)	C. V. (%)	Tempo de Retenção (min)	C. V. (%)
	Água		Esgoto Sintético	
1	14,15±0,09	0,66	14,14±0,21	1,52
2	17,51±0,08	0,46	17,51±0,19	1,09
3	20,61±0,07	0,38	20,61±0,19	0,95
4	23,40±0,06	0,28	23,55±0,74	3,17

(C. V.) = coeficiente de variação

A repetibilidade do método (Tabela 5.4) foi estimada pelo coeficiente de variação obtido para os diferentes tempos de retenção (minutos), de cada pico. Esse parâmetro foi calculado através de 9 injeções da mesma solução em dias diferentes. A variação nos tempos de retenção foi menor que 2%, tanto para os padrões em água como em esgoto sintético.

Tabela 5.4 - Repetibilidade do tempo de retenção para 14 mg LAS/L em esgoto sintético (n=9)

Picos	Tempo de Retenção (minutos)	C. V. (%)
1	14,1±0,2	1,46
2	17,4±0,2	1,09
3	20,5±0,18	0,87
4	23,3±0,17	0,74

(C. V.) = coeficiente de variação

O método apresentou baixos limites de detecção (mg/L) baseados na curva de calibração. Os limites de detecção obtidos para solução de LAS em água foram 0,43 mg/L; 0,01 mg/L, 0,02 mg/L e 0,03 mg/L para os picos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Para os padrões de LAS em esgoto sintético, os limites de detecção para cada pico foram maiores e iguais a 0,37 mg/L; 0,69 mg/L; 0,54 mg/L e 0,42 mg/L, respectivamente.

Os dados de recuperação (Tabela 5.5) para cada homólogo individual presente nos padrões apresentaram poucas diferenças e a recuperação observada foi maior que 98%, em esgoto sintético.

Tabela 5.5 - Recuperação dos homólogos do LAS em esgoto sintético

Homólogos do LAS	Recuperação (%)
Pico 1	98±15
Pico 2	101±23
Pico 3	100±20
Pico 4	99±27

5.3. Adsorção de LAS em Espumas de Poliuretano

5.3.1. Curva de Exaustão

A curva de exaustão de LAS em espumas de poliuretano foi realizada com o objetivo de avaliar o potencial adsorptivo desse material usado como suporte de imobilização de biomassa. Foi possível definir a relação LAS adsorvido/grama de espuma. Essa relação só pode ser aplicada em condições abióticas, uma vez que a adsorção ocorre por meio de interações eletrostáticas. O crescimento de

microrganismos aderidos ao suporte poderá modificar as características superficiais desse material.

Segundo Pacik et al. (1990), a utilização de espumas de poliuretano como suporte para imobilização de microrganismos foi motivada pelas características do material, tais como, porosidade interna elevada e difícil degradação biológica.

Para estabelecer a curva de exaustão, foram usados reatores diferenciais (RIBEIRO, 2001) preenchidos com 0,2 g de espumas de poliuretano, alimentados, de forma contínua com meio mineral (Tabela 4.11), contendo 35 mg/L de LAS e vazão de 5 mL/min. O efluente desses reatores foi monitorado durante 24 horas, e, após 9 horas de experimento as concentrações de LAS no efluente e afluente praticamente igualaram-se e mantiveram-se constantes (Tabela 5.6 e Figura 5.3), a 35 mg/L. Pôde-se observar que a adsorção foi maior nas primeiras horas do experimento.

A massa de LAS adsorvida foi calculada utilizando a expressão 3 (item 4.6.1); ou seja, somando-se a massa de LAS adsorvida durante 24 horas de alimentação, obteve-se a massa total de 5,076 mg. Dessa maneira, dividindo-se a massa total de LAS adsorvida (4,15 mg) pela quantidade de espuma (0,2 g), obteve-se a relação LAS/espuma de 20,75 mg/g (Tabela 5.6 e Figura 5.3).

Tabela 5.6 - Dados obtidos na curva de adsorção do LAS em espumas de poliuretano em reatores diferenciais

Tempo (horas)	Volume de tratado (L)	Ce (mg/L)	Q.(Co-Ce). Δt	mg LAS/g espuma
2	0,6	25,6	1,41	7,05
4	1,2	25,7	1,58	7,90
6	1,6	30,1	0,73	3,68
9	2,7	33,6	0,14	0,70
13	3,9	32,0	0,22	1,12
22	6,6	35,0	0	0
24	7,2	34,6	0,06	0

Ce= concentração efluente

Co = concentração afluente

Q = vazão

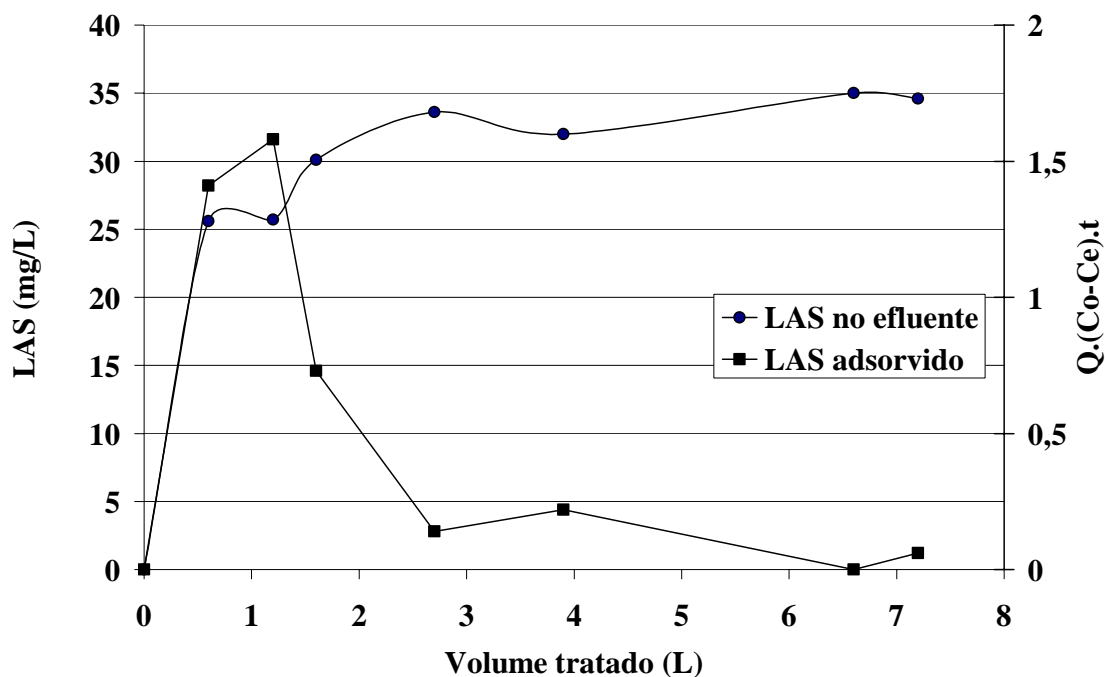


Figura 5.3 - Concentrações de LAS no efluente dos reatores diferenciais e massa adsorvidas na espuma de poliuretano

5.3.2 Tempo de Contato para Saturação das Espumas

A determinação do tempo de contato foi realizada antes do ensaio de isoterma, com a finalidade de estabelecer o tempo necessário para ocorrer o equilíbrio entre a adsorção e dessorção do LAS nas espumas de poliuretano. O ensaio de tempo de contato foi feito em sistema de batelada em triplicata e a concentração de LAS na fase líquida foi acompanhada até saturação das espumas. Para isso, foram usados, aproximadamente 0,64 g de espuma de poliuretano e 14 mg/L de LAS.

A Figura 5.4 mostra que no início do ensaio houve adsorção do LAS nas espumas posterior equilíbrio. A massa de LAS adsorvida permaneceu constante, a 2 mg podendo-se concluir que foi atingida a saturação. Dessa maneira, foi possível obter a relação massa de LAS adsorvida/massa de suporte que foi de 17 mgLAS/g de espuma de poliuretano (Apêndice - Tabela B2), já nos reatores diferenciais a relação foi de 20,75 gLAS/g espuma. Esta diferença pode ser atribuída as diferentes águas residuárias usadas nesses ensaios.

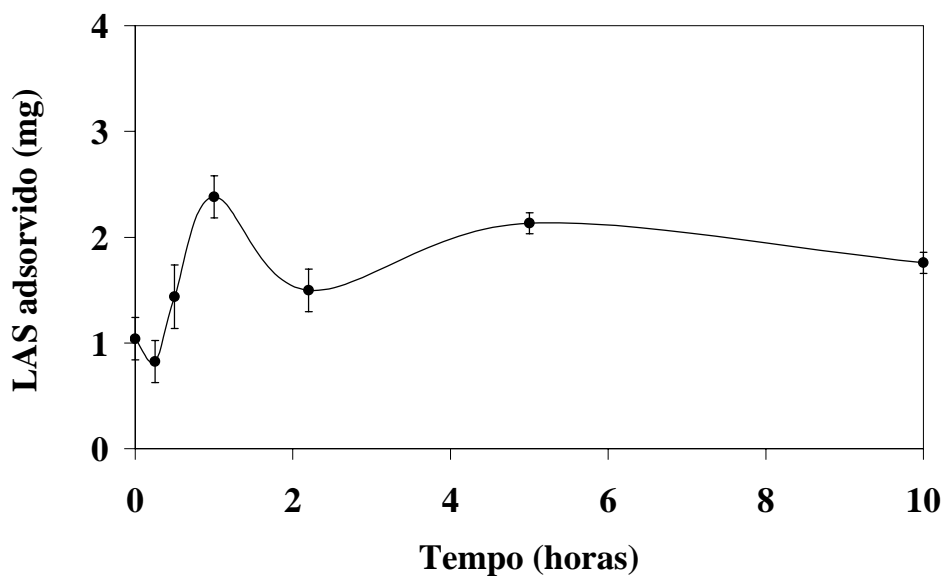


Figura 5.4 - Adsorção de LAS na espuma de poliuretano em função do tempo de contato

5.3.3 Isoterma de Adsorção

Após a determinação do tempo de contato necessário para a saturação das espumas, foram realizados ensaios com o objetivo de avaliar a saturação com a variação da relação massa de LAS adsorvida/massa de suporte. Para isso, a mesma massa de suporte foi colocada em contato com 9 diferentes concentrações de LAS (5, 10, 15, 20, 25, 35, 40, 45 e 50 mg/L) e massa de suporte entre 0,64 e 0,65g.

Amostras da fase líquida foram coletadas após 12 horas do início do ensaio, e as concentrações de LAS no equilíbrio (C_e) foram analisadas. Foi possível calcular, por diferença, a quantidade de LAS adsorvida nos suportes em função de sua concentração inicial na solução, conforme apresentado na Figura 5.5.

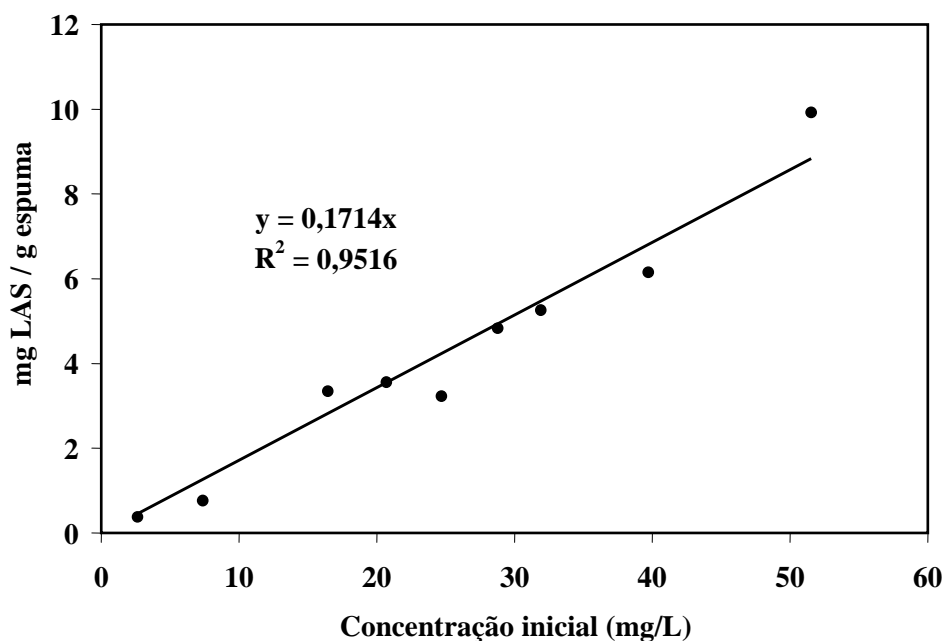


Figura 5.5 - Variação da relação de massa de LAS adsorvida por massa de espuma em função da concentração inicial do surfactante

A massa de LAS adsorvida na espuma aumentou proporcionalmente em relação às crescentes concentrações de LAS (Figura 5.5). Por exemplo, para concentrações iniciais de LAS iguais a 25 e 50 mg/L, a massa adsorvida/g de espuma foram de 3,23 e 9,92, respectivamente (Apêndice B – Tabela B1).

Fytianos et al. (1998) trabalharam com isotermas de adsorção de LAS em sedimentos marinhos e constataram que o equilíbrio em 4 horas.

Garcia et al. (2000) avaliaram a adsorção do LAS em lodos ativados provenientes de estações de tratamento de esgoto em Barcelona (Espanha). Para realização desse estudo, foi necessária a adição de formaldeído para evitar a degradação do surfactante. A dureza da água variou de 0 a 1000 mg/L de CaCO_3 e os testes tiveram duração de 3 horas, a temperatura de 25°C. A concentração de LAS na fase aquosa foi constante, enquanto variaram a quantidade de lodo de 200 a 2000 mg/L. Nos testes de dessorção, foram adicionados três vezes 100 mL de água ao lodo proveniente dos testes de adsorção. Após 24 horas de duração de cada experimento. Baseados nos resultados obtidos, os autores concluíram que o equilíbrio entre a adsorção e a dessorção foi de 3 horas. Segundo os autores, a quantidade de LAS

adsorvido pode ser maior quando há favorecimento das características de hidrofobicidade dos homólogos da cadeia alquílica (C10 e C14). Dessa maneira, a adsorção do LAS em lodo ativado ocorreu por mecanismos de hidrofobicidade, e o lodo pareceu atuar como agente adsorvente.

Garcia et al. (2002) sugeriram que os homólogos do LAS são adsorvidos, tanto em sedimentos, quanto, na biomassa, devido ao favorecimento das interações hidrofóbicas. Com o aumento da cadeia alquílica, a hidrofobicidade da molécula também aumenta e a carga negativa do grupo sulfonado (grupo hidrofílico) oferece ligeiro impacto nestas interações de hidrofobicidade.

Neste trabalho os pontos tenderam a uma reta, com coeficiente angular de 0,17 e coeficiente de correlação (R^2) de 0,95. Entretanto, os dados obtidos neste ensaio não foram ajustados adequadamente às isothermas de Freundlich ou Lagmuir (CASTELLAN, 1988). Por outro lado, o melhor ajuste foi obtido para a isoterma de adsorção linear proposta por Giles et al. (1960). A linearidade demonstra que o número de sítios para adsorção permaneceu constante, ou seja, quanto maior a concentração de LAS, maior a quantidade de espuma necessária para a sua adsorção. Caso contrário o fenômeno de dessorção começaria a prevalecer em função da saturação dos sítios no material suporte. Isotherma de adsorção linear foi observada por Brucha et al. (2005) utilizando PCP (pentaclorofenol) em espumas de poliuretano como material suporte.

5.4 Avaliação do Protocolo de Extração do LAS Adsorvido em Lodo Biológico

A eficiência do protocolo de extração do LAS foi realizada em triplicata apenas com lodo proveniente de reator UASB, utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Adicionaram-se 50 mg/L de solução de LAS em meio mineral e detectou-se 7,8 mg LAS/L na fase aquosa e o restante, aproximadamente 42,2 mg LAS/L ficou retido no lodo, logo após a adição do LAS.

Através dos sólidos totais foi determinada a concentração máxima de LAS em termos de mg LAS/g ST, cujo valor foi de 8,44 mg LAS/g ST. Utilizando-se protocolo descrito no item 4.5.1, obteve-se os seguintes valores: (a) 3,6 mg LAS/g ST no extrato metanólico eluído da coluna de troca iônica (SAX) e (b) 6,9 mg LAS/g ST na fração eluída com metanol da coluna de fase sólida (C-18). Os valores

experimentais representaram 43% e 82% de eficiência de extração, respectivamente. Dessa maneira, verificou-se que o emprego das colunas (SAX e C-18) foi essencial para purificar e concentrar as amostras da extração do LAS adsorvido no lodo anaeróbio.

Valores de 85 a 92% de eficiência de extração do LAS adsorvido em solos foram obtidos por Di Corcia et al. (1994) com a utilização de sistema de refluxo (Soxhlet), usando 80 mL de metanol por 8 horas. O extrato metanólico foi evaporado até reduzir seu volume a 1 mL e depois foi transferido para coluna de fase sólida (SPE), preenchida com 0,5 g de carbono grafitizado.

Várias metodologias são usadas para extração do LAS adsorvido em superfícies sólidas. Matthijs & De Henau (1987) utilizaram, para extração de LAS em sedimento, lodo e solo, o protocolo que consistiu em submeter às amostras contaminadas à extração, sob refluxo (Soxhlet), utilizando 150 mL de metanol por 2 horas. O metanol contendo LAS foi removido da fase sólida por centrifugação e o precipitado formado, lavado duas vezes com 50 mL de metanol a 60°C. Dessa maneira, esses pesquisadores utilizaram 250 mL de metanol para cada amostra analisada. A solução metanólica foi evaporada sob N₂ (100%) até 100 mL e transferida para coluna de troca iônica (SAX).

5.5 Avaliação da Influência do LAS sobre os Microrganismos Anaeróbios

5.5.1. Reatores em Batelada Alimentados com Meio Mineral e LAS

O lodo anaeróbio proveniente de reator UASB, usado no tratamento de dejetos de suinocultura, foi utilizado como inóculo nos ensaios em batelada com células planctônicas. Esse lodo possui ampla diversidade de morfologias microbianas. Por meio de exames microscópicos foi possível constatar a predominância de bacilos isolados, em pares, em cadeias formando filamentos, na forma delgada, ovalada e curva. Cocos, filamentos septados e filamentos longos também estiveram presentes na biomassa anaeróbia. Entre as arqueias metanogênicas foi observada a presença de morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp., bacilos e cocos fluorescentes (Figura 5.6).

Esses ensaios em batelada foram realizados para avaliar a atividade microbiana na presença de concentrações crescentes de LAS. A avaliação da atividade metanogênica foi determinada pela concentração de metano, a partir do substrato adicionado.

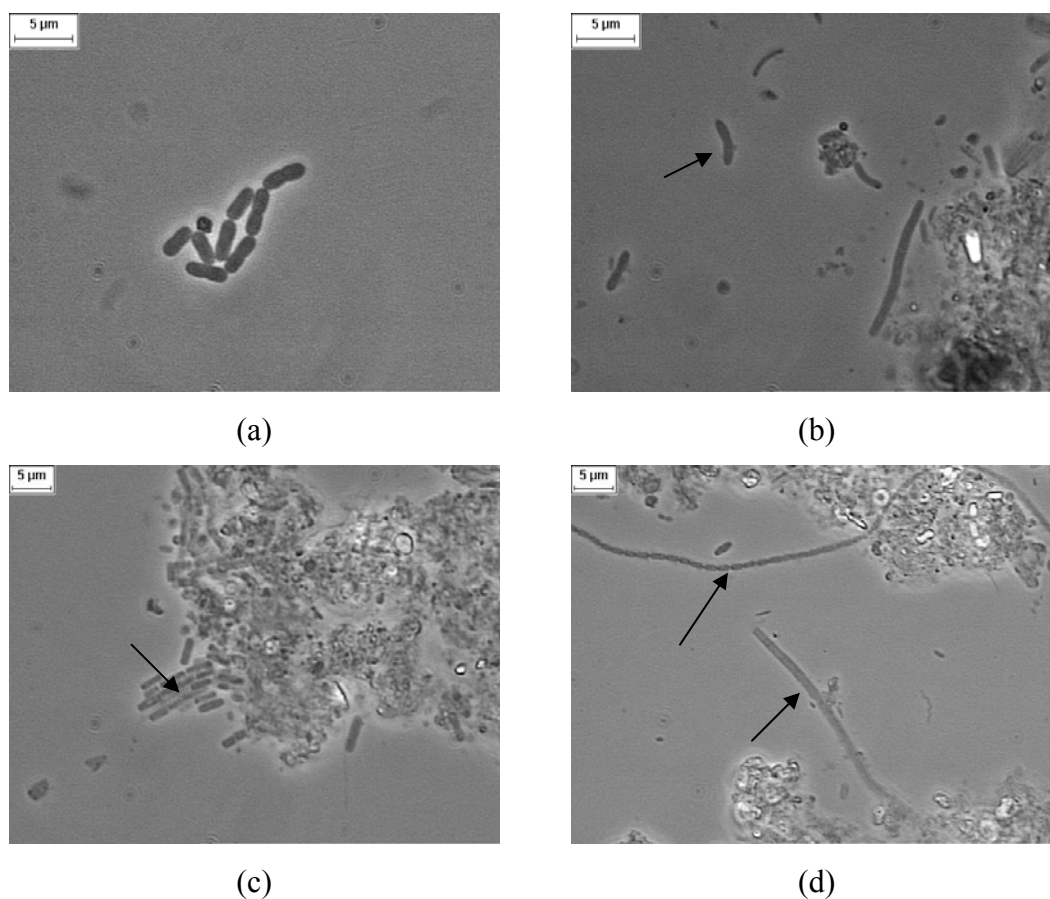


Figura 5.6 - Morfologias observadas em microscopia óptica de contraste de fase do lodo granular do reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura: (a) bacilos, (b) bacilos curvos (c) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp.,(d) bacilos em cadeia e filamento

As concentrações de LAS monitoradas na fase líquida permitiram constatar que logo após a sua adição nos reatores em batelada, foram adsorvidos aproximadamente, 90% de LAS no lodo anaeróbico. Portanto, ocorreu aumento da concentração de LAS na fase sólida e, conseqüentemente, diminuição na fase líquida. Nos demais intervalos de amostragens, as concentrações de LAS na fase líquida não foram alteradas. Esse mesmo comportamento foi observado nos experimentos de

Garcia et al. (2005), em reatores em batelada. Segundo esses autores, a adsorção do LAS no lodo diminui a fração disponível para degradação.

Nesses experimentos, em batelada com células planctônicas, não foram realizadas extrações de LAS adsorvido no lodo dos reatores. Portanto, nenhuma inferência sobre degradação pode ser feita. Provavelmente, o LAS ficou adsorvido no lodo anaeróbio, e o crescimento em suspensão ou planctônico não favoreceu o desenvolvimento de consórcios e interações microbianas e o estabelecimento de biofilmes, os quais podem ser responsáveis pela degradação do surfactante. A adsorção desse composto no material suporte, associada à adesão microbiana, e estabelecimento de biofilme maduro, são fenômenos que diferenciam amplamente o tratamento dos compostos tóxicos em reatores de leito fixo, em relação aqueles de crescimento suspenso.

Análises freqüentes do biogás realizadas revelaram que em relação ao controle, a presença de LAS não interferiu na concentração de metano em função do tempo de operação (Tabela 5.7). Nos primeiros 3 dias, os reatores alimentados com glicose e lactato de sódio apresentaram concentrações de metano de aproximadamente 6,0 $\mu\text{mol/L}$, enquanto no reator controle (sem LAS), esse valor foi de 2,6 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 5.7). Após o consumo dos substratos orgânicos, facilmente biodegradáveis, as concentrações de metano desses reatores mantiveram-se estáveis, em torno de 12 $\mu\text{mol/L}$ a 13,6 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 5.8). As concentrações de metano observadas nos reatores alimentados com LAS, independente da concentração adicionada, apresentaram valores semelhantes aos verificados, no reator controle. Nenhum efeito inibitório do LAS foi observado sobre os microrganismos anaeróbios (Tabela 5.7 e Figura 5.7).

Tabela 5.7 - Valores médios da concentração de metano no biogás dos reatores em batelada alimentados com meio mineral em função do tempo

Período (d)	Ensaio A (Controle – sem LAS)	Ensaio B (50mg LAS/L)	Ensaio C (100mg LAS/L)	Ensaio D (200mg LAS/L)	Ensaio E (50 mgLAS/L + 350 mg lactato/L)	Ensaio F (50 mg LAS/L + 350 mg glicose/L)
Metano ($\mu\text{mol/L}$)						
1 a 3	2,6 \pm 0,8	3,8 \pm 0,6	3,6 \pm 0,6	4,9 \pm 0,8	6,2 \pm 1,7	6,8 \pm 1,5
4 a 11	5,1 \pm 0,7	6,4 \pm 0,7	6,1 \pm 1,0	8,4 \pm 0,7	8,6 \pm 0,4	9,0 \pm 0,7
12 a 21	8,8 \pm 0,8	9,7 \pm 1,4	8,7 \pm 1,7	12,6 \pm 2,3	11,1 \pm 2,0	12,3 \pm 2,0
22 a 34	10,2 \pm 0,4	13,0 \pm 1,2	14,0 \pm 2,3	15,8 \pm 2,9	12,0 \pm 1,0	13,6 \pm 1,1
35 a 55	15,1 \pm 2,1	16,1 \pm 1,7	15,7 \pm 1,6	16,7 \pm 2,0	12,9 \pm 2,0	13,0 \pm 3,0

As adições de co-substratos (lactato e glicose) estimularam o aumento na concentração de metano, até o 21º dia de operação, devido a formação de compostos intermediários favoráveis ao crescimento das arqueias metanogênicas. Depois desse período, as concentrações de metano equipararam-se às dos demais reatores (Tabela 5.7 e Figura 5.8).

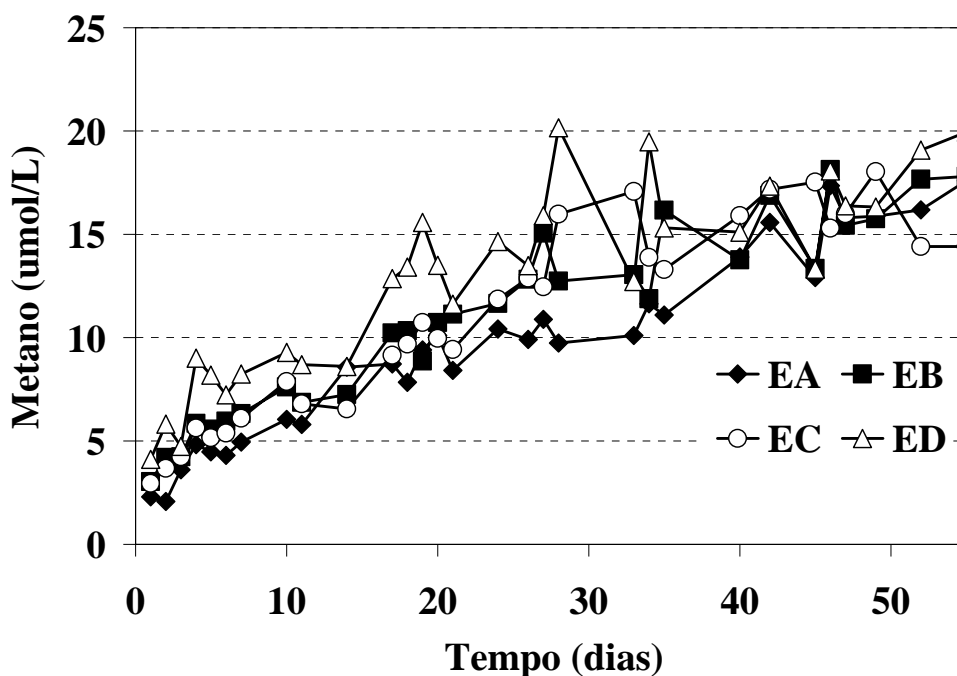


Figura 5.7 - Variação temporal de metano nos reatores anaeróbios em batelada alimentados com meio mineral e LAS. EA – controle; EB- 50 mgLAS/L; EC – 100 mgLAS/L; ED – 200 mgLAS/L.

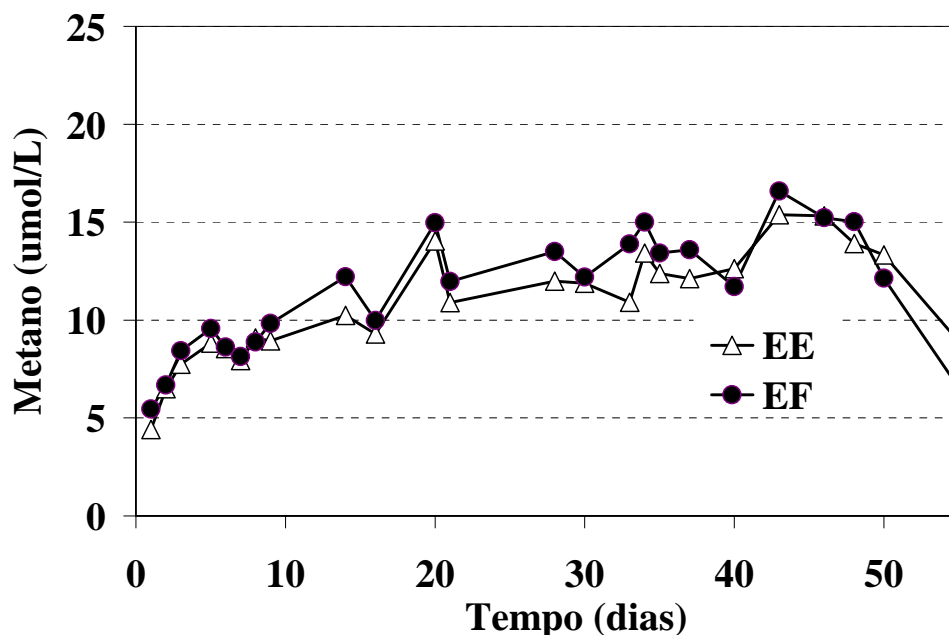


Figura 5.8 - Variação temporal de metano nos reatores anaeróbios em batelada alimentados com meio mineral, co-substratos e LAS. EF – 50 mgLAS/L + 350 mgLactato/L; EE – 50 mgLAS/350 mg glicose/L

Nos ensaios realizados por Garcia-Morales et al. (2001), com lodo termofílico (55°C) proveniente de reator anaeróbico, usado no tratamento de vinhaça de vinho, a atividade metanogênica foi reduzida quando a concentração de LAS foi aumentada de 10 para 50 mg/L. Nesses experimentos a produção de biogás foi levemente menor nos reatores contendo homólogos de LAS, com 10 (C10) e 12 (C12) átomos de carbono, quando comparada, com a produção de biogás, por endogenia no reator controle. Entretanto, reatores que receberam homólogos C14 apresentaram maior produção de metano que os reatores controle. Nenhuma indicação de degradabilidade foi observada pelas análises específicas de quantificação de LAS. Segundo Garcia et al (2005), a adição do homólogo C14 nos sistemas anaeróbios talvez aumente a biodisponibilidade de outros compostos orgânicos adsorvidos no lodo, favorecendo sua degradação e, conseqüentemente, propiciando aumento na concentração de metano. Nesse trabalho foi observado

aumento na concentração de metano, provavelmente, não devido à degradação da molécula do surfactante, mas a biodisponibilidade de outros compostos.

Análises de sólidos totais voláteis (STV) realizadas no início e final da operação não indicaram crescimento de microrganismos, quando comparados à concentração de sólidos adicionados aos reatores (Tabela 5.8). Provavelmente, isso ocorreu devido ao tempo de operação, e particularmente, à exaustão de nutrientes. Dessa forma, outros ensaios em reatores em batelada foram realizados utilizando concentração de lodo e tempo de operação menores.

Tabela 5.8 - Concentrações de sólidos totais voláteis nos reatores anaeróbios em batelada, após 55 dias de operação, com diferentes concentrações de LAS

Ensaio	STV (g/L)
Inóculo	6,5±0,3
Ensaio A (Controle – Sem LAS)	7,2±0,2
Ensaio B (50mg/L de LAS)	7,2±0,1
Ensaio C (100 mg/L de LAS)	7,3±0,1
Ensaio D (200 mg/L de LAS)	6,6±0,2
Ensaio E (350mg/L de lactato de sódio e 50mg/L de LAS)	7,6±0,2
Ensaio F (350mg/L de glicose e 50 mg/L de LAS)	6,7±0,1

Os microrganismos dos reatores controle, mesmo sem receber fontes orgânicas, foram capazes de produzir metano. Provavelmente, essa produção de metano ocorreu através do metabolismo microbiano endógeno ou por substratos presentes no lodo, ou ainda pela liberação de compostos orgânicos por morte celular.

Nas análises microscópicas, foram observadas alterações na diversidade microbiana, bem como, na frequência de certas morfologias. Morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. predominaram nos reatores controle (Tabela 5.9). No entanto, na biomassa dos reatores submetidos a 50 mg/L, 100 mg/L e 200 mg/L de LAS, (Figuras 5.9) predominaram cocos e bacilos. Verificou-se, que morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. diminuíram com o aumento da concentração de LAS. A utilização de co-substratos (lactato e glicose) favoreceu a diversidade

morfológica (Figura 5.9), entretanto, os bacilos continuaram a predominar na biomassa desses reatores.

As arqueias metanogênicas, em geral, são mais sensíveis a mudanças ambientais e à presença de compostos tóxicos ou inibitórios, em relação às bactérias acidogênicas. Porém, a população acidogênica pode sofrer inibição pelo acúmulo de ácidos voláteis ou H_2 , substratos utilizados pela população metanogênica. Por essas razões, inibição da população metanogênica produz, em curto período de tempo, a inibição da população acidogênica causando desequilíbrio do sistema (GARCIA-MORALES et al., 2001). Segundo esses autores, a inibição pelo LAS, pode estar associada aos seguintes fatores: (1) o efeito do LAS é direto, ou seja, tanto para as metanogênicas como para as acidogênicas; (2) devido ao desequilíbrio na interação sintrófica das diferentes populações anaeróbias. Observaram que em concentrações mais elevadas de LAS (50 mg/L), em sistemas termofílicos, causou desaceleração progressiva no consumo do LAS, sugerindo que deve ser feita uma adaptação dos microrganismos ao referido surfactante, de modo a minimizar seu efeito inibitório.

Tabela 5.9 - Caracterização morfológica da biomassa dos reatores em batelada

Morfologias	Ensaio A Controle (sem LAS)	Ensaio B - 50mgLAS/L	Ensaio C 100mgLAS/L	Ensaio D 200mgLAS/L	Ensaio E 50mgLAS/L + 350 mg lactato/L	Ensaio F 50mgLAS/L +350 mg glicose/L
BACTÉRIAS						
Bacilos	+++	++++	++++	++	++++	++++
Bacilos curvos	++	++	-	-	-	+
Cocos	+++	+++	++++	+++	+	+
Filamento delgado	++	+	+	++	-	++
Filamento longo	+	-	+	++	+	++
Filamento septado	+	+	-	+	++	++
ARQUEIAS METANOGÊNICAS						
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++	+++	++	++	++	++

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

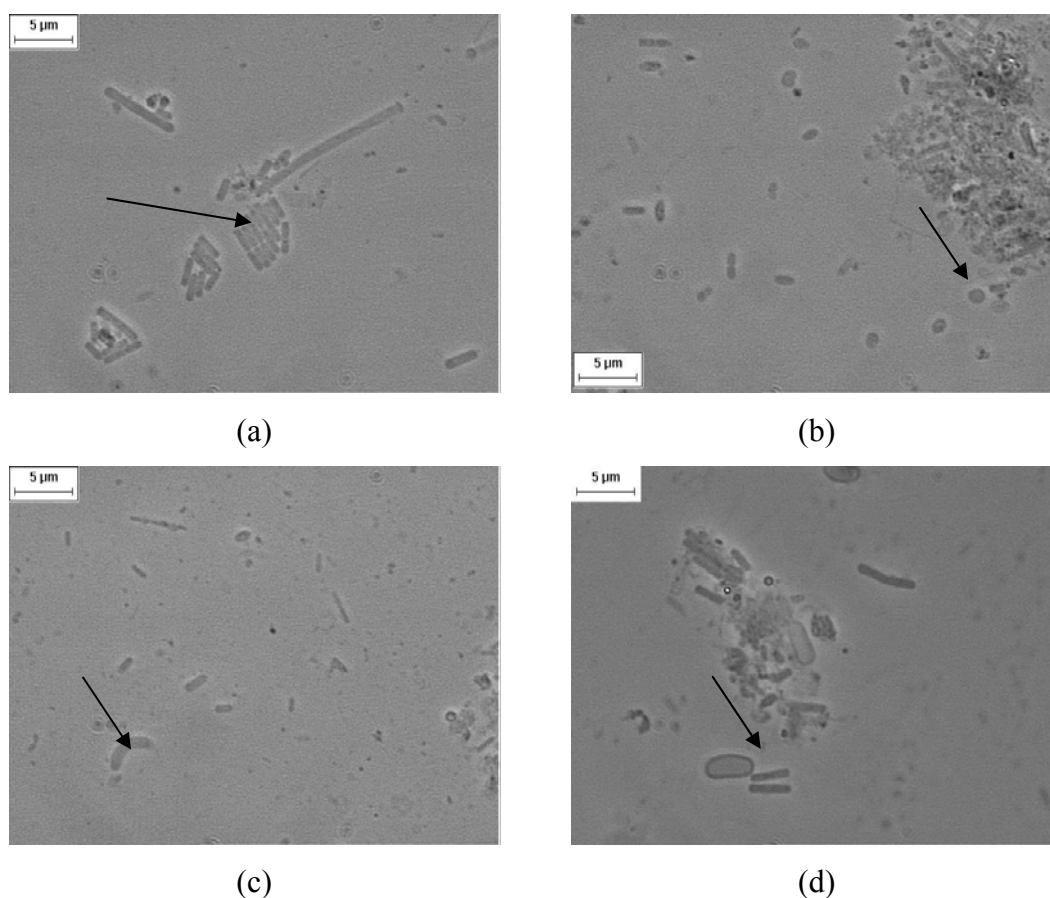


Figura 5.9 - Morfologias observadas em microscopia óptica de contraste de fase das amostras dos reatores em batelada alimentados com meio mineral: (a) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. (b) cocos, (c) bacilos curvos e (d) bacilos

5.5.2 Reatores em Batelada Alimentados com Esgoto Sintético, Ácidos Orgânicos e LAS

Nessa fase experimental foram realizados ensaios com reatores em batelada alimentados com esgoto sintético e ácido orgânicos, com o objetivo de avaliar a influência do LAS sobre os organismos anaeróbios. O esgoto sintético foi usado posteriormente como substrato na alimentação dos reatores anaeróbios de leito fixo.

Os ácidos orgânicos (acético, butírico, propiônico, láctico e fórmico) adicionados aos reatores proporcionaram a formação de substratos intermediários, os quais favoreceram o crescimento das arqueias metanogênicas e, conseqüentemente, maiores concentrações de metano no biogás (Tabela 5.10). No entanto, a presença de 50 mg/L de LAS não alterou a concentração de metano (Figura 5.10).

Provavelmente, o LAS não inibiu a atividade das bactérias acidogênicas nem das arqueias metanogênicas. Os reatores alimentados com o esgoto sintético com e sem LAS apresentaram concentrações de metano de 11,8 e 14,3 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, após 45 dias de operação.

Tabela 5.10 - Valores médios das concentrações de metano no biogás dos reatores alimentados com esgoto sintético

Período (d)	Esgoto sintético	Esgoto sintético + 50 mg/L de LAS	Esgoto sintético + ácidos orgânicos	Esgoto sintético + ácidos orgânicos + 50 mg/L de LAS
metano ($\mu\text{mol/L}$)				
1 a 3	7,9 \pm 1,6	8,1 \pm 0,85	30,8 \pm 10	29,1 \pm 10
4 a 9	9,7 \pm 1,6	10,9 \pm 1,3	29,5 \pm 5,9	33,7 \pm 7,0
11 a 33	10,6 \pm 1,9	10,5 \pm 0,8	20,0 \pm 0,8	22,2 \pm 2,0
34 a 45	14,3 \pm 3,9	11,8 \pm 0,8	18,5 \pm 2,5	19,9 \pm 3,5

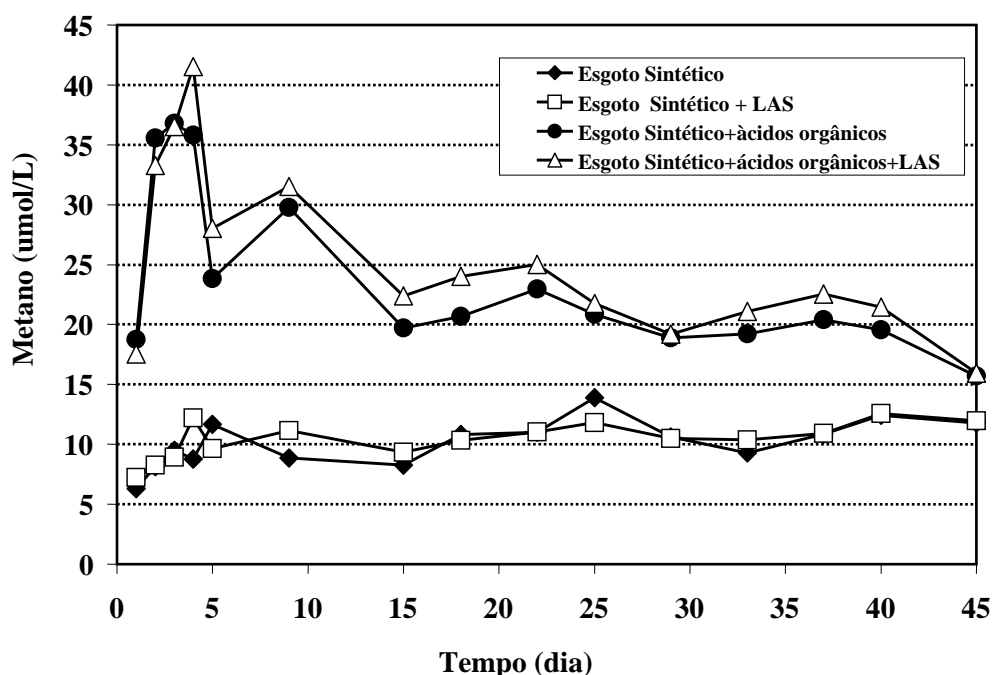


Figura 5.10 - Variação temporal do metano nos reatores em batelada alimentados com esgoto sintético

Na tentativa de observar a influência do surfactante na remoção de matéria orgânica, pôde-se notar que os reatores apresentaram comportamento semelhante, na

presença e ausência de LAS. A remoção de matéria orgânica (expressa em DQO) nos reatores com esgoto sintético e LAS foi de 70%, enquanto, nos reatores com ácidos orgânicos e LAS, atingiu valores de 88% (Tabela 5.11).

A concentração de STV no início dos ensaios foi de 5,0 g/L. Depois de 45 dias, novas análises de STV foram realizadas e observou-se novamente que não houve crescimento microbiano (Tabela 5.12), provavelmente devido a falta de nutrientes excesso de biomassa. O esgoto sintético é um meio de cultura rico em nutrientes, mas mesmo assim pode ter ocorrido escassez nutricional com o decorrer do tempo. A morte celular por influência do LAS foi descartada, uma vez que, as concentrações de sólido nos reatores controle e alimentados com ácidos orgânicos, foram também ligeiramente inferiores à concentração inoculada.

Tabela 5.11 - Valores de DQO filtrada e eficiência de remoção nos reatores em batelada, alimentos com esgoto sintético

Ensaio	DQO (mg/L)		Eficiência de Remoção (%)
	Inicial	Final	
Esgoto sintético	527	123	76,5
Esgoto sintético + LAS	576	173	69,9
Esgoto sintético + ácidos orgânicos	2340	237	89,8
Esgoto sintéticos + ácidos orgânicos + LAS	2523	289	88,5

Tabela 5.12 - Concentrações de sólidos totais voláteis do lodo dos reatores anaeróbios em batelada alimentados com esgoto sintético, após 45 dias de operação

Ensaio	STV (g/L)	Massa (g STV)
Inóculo	5,0±0,5	2,5
Esgoto sintético	4,2±0,4	2,1
Esgoto sintético+ácidos orgânicos	3,9±0,1	1,95
Esgoto sintético + ácidos orgânicos + LAS	3,9±0,1	1,95

A presença de LAS alterou a diversidade das morfologias microbianas. Reatores alimentados somente com esgoto sintético apresentaram maior diversidade

de morfologias microbianas, com predominância de *Methanosaeta* sp. Na presença de LAS, essas morfologias foram pouco observadas. A adição de ácidos orgânicos favoreceu o predomínio de bacilos curvos (Figura 5.11).

Mesmo não sendo observado o predomínio de morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. (Tabela 5.13) houve produção de metano. Outros microrganismos metanogênicos podem ter sido responsáveis pela presença de metano no biogás. Dessa forma, o LAS não pode ser considerado inibidor das arqueias metanogênicas.

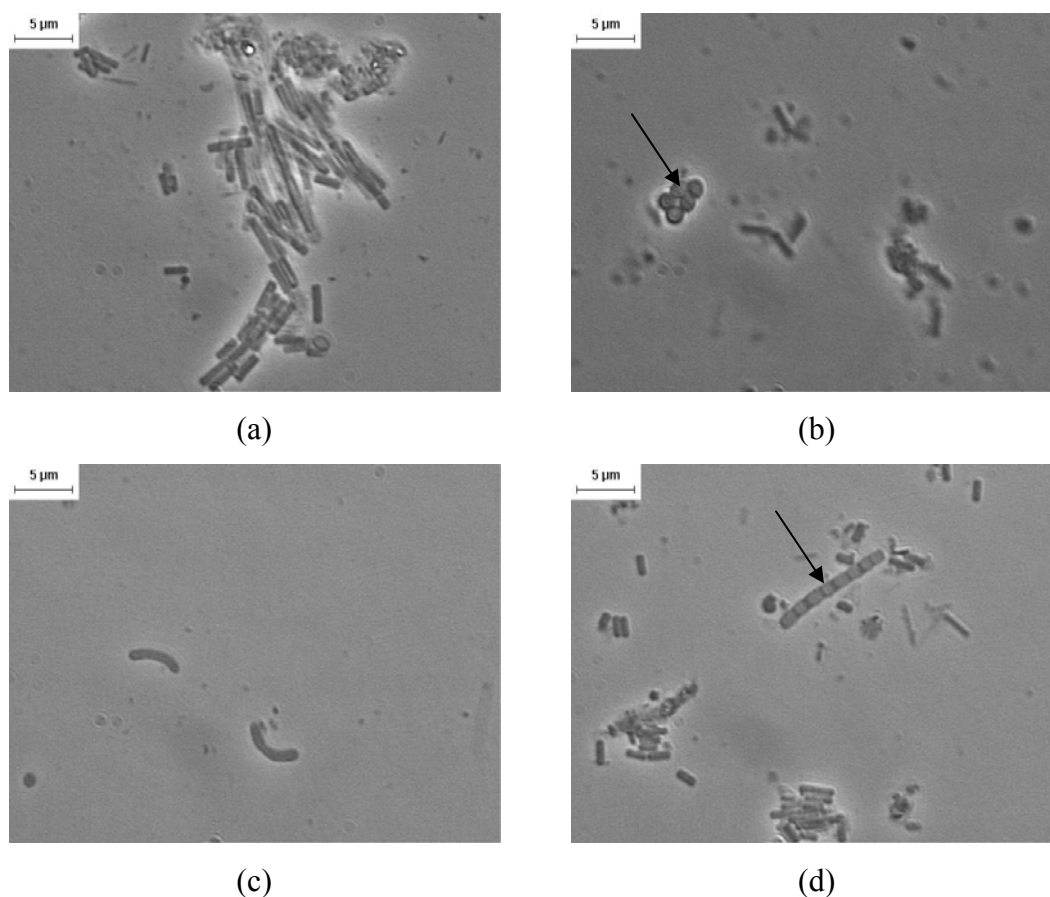


Figura 5.11 - Morfologias observadas em microscopia óptica de contraste de fase das amostras dos reatores em batelada alimentados com esgoto sintético: (a) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp, (b) cocos, (c) bacilos curvos, (d) filamento septado

Tabela 5.13 - Caracterização morfológica da biomassa presente nos reatores em batelada alimentos com esgoto sintético

Morfologias	Esgoto sintético	Esgoto sintético + LAS	Esgoto sintético + ácidos orgânicos	Esgoto sintético + ácidos orgânicos + LAS
BACTÉRIAS				
Bacilos	++	++++	++	++++
Bacilos curvos	+	-	++++	+
Cocos	+	+	++	++
Filamento delgado	+	++	+	+
Filamento longo	-	-	-	-
Filamento septado	+	-	+	++
ARQUÉIAS METANOGENÉICAS				
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++	++	++	++

(++++) predominantes; (++++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

As concentrações de LAS avaliadas no presente trabalho estavam abaixo da concentração micelar crítica (CMC - 264 mg/L), uma vez que, em reatores em batelada, os surfactantes podem formar micelas, e dessa maneira, sua degradação torna-se, ainda, mais lenta. Surfactantes em fase micelar podem apresentar menor velocidade de degradação do que as moléculas monoméricas. A estrutura das micelas em solução aquosa é esférica, ficando em seu interior o grupo hidrofóbico e no exterior o grupo hidrofílico. A degradação de surfactantes em concentrações acima da CMC é um obstáculo a ser vencido em pesquisas futuras (ZHANG et al., 1999).

5.6 Avaliação do Desempenho dos Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo no Tratamento do LAS

A operação dos reatores R1 e R2 foi dividida em etapas, de acordo com alterações na composição do esgoto sintético. Nas Figuras 5.12 e 5.13 estão apresentados fluxogramas experimentais de operação dos reatores com as diferentes etapas e análises realizadas.

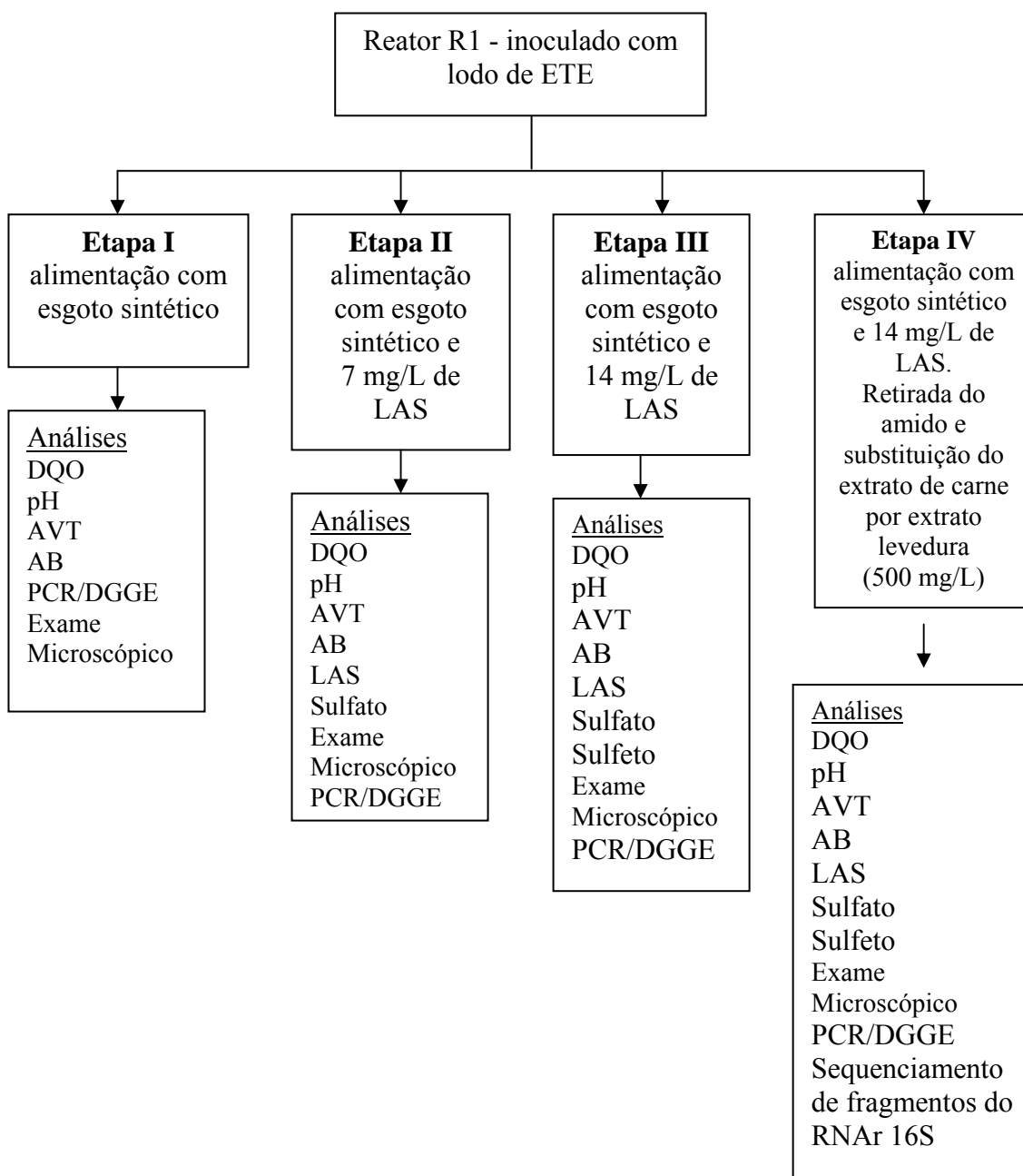


Figura 5.12 - Fluxograma experimental das etapas de operação do reator R1

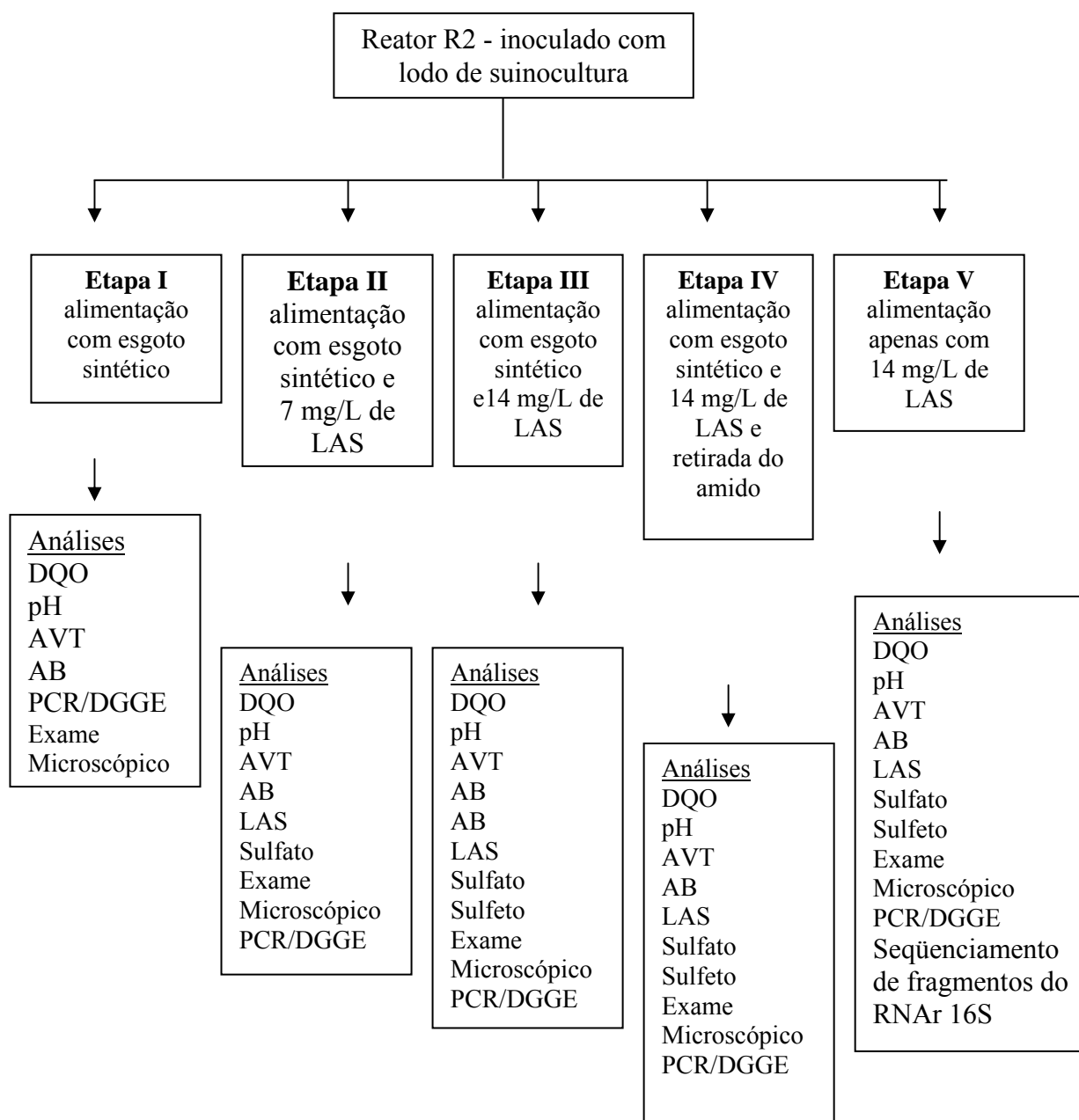


Figura 5.13 - Fluxograma experimental de operação do reator R2

Na primeira etapa operacional, o substrato era esterilizado em autoclave, mas esse procedimento foi suspenso, uma vez que ocorreu alteração no valor do pH de 7,0 para 9,0. Dessa maneira optou-se por esterilizar somente os frascos e as mangueiras usadas na alimentação do reator. Com esse procedimento, o pH do esgoto sintético permaneceu ao redor de 7,7, a alcalinidade a bicarbonato a 130 mg CaCO_3/L , e DQO filtrada em 745 mg/L. Porém, após adição do LAS, a concentração

de ácidos voláteis aumentou e, conseqüentemente reduziu a concentração de alcalinidade a bicarbonato. Como medida para minimizar esse problema aumentou-se a concentração de bicarbonato de sódio. Nesse período, os frascos de alimentação eram mantidos fora da câmara dos reatores, à temperatura média de 24°C. Como tais procedimentos não foram suficientes para minimizar a acidificação do substrato, os frascos de alimentação passaram a ser mantidos sob refrigeração, a 4°C.

No período de utilização do afluente não refrigerado a concentração de LAS permaneceu inalterada no frasco de alimentação durante 48 horas.

Nas Tabelas 5.14 e 5.15 estão apresentados as médias e desvios-padrão das análises de monitoramento (pH, DQO bruta e filtrada, ácidos voláteis totais, alcalinidade a bicarbonato, metano e LAS) realizadas durante as diferentes etapas de operação dos reatores (R1 e R2), bem como as eficiências de remoção de DQO e LAS. Os dados de monitoramentos estão apresentados no Apêndice D.

Tabela 5.14 - Valores dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos obtidos durante a operação do reator R1

Etapas	Amostra	Parâmetros						
		pH	DQOb (mg/L)	DQOf (mg/L)	AB (mgCaCO ₃ /L)	AVT (mgHAc/L)	CH ₄ (μmol/L)	LAS (mg/L)
I (1 a 27 dias) n= 5	Afluente	7,7 ±0,09	793±31	766±28	132±11			
	Efluente	8,02 ±0,19	74±6	58±10	303±20	14±3	11±3	
	E (%)		90±1	93±2				
II (28 a 52 dias) n= 5	Afluente	7,2 ±0,42	772±38	706±37	117±48			7,0±1
	Efluente	8,12 ±0,30	68±12	49±3	301±46	10±2	12±3	1,8±1,7
	E (%)		91±2	93±1				75±24
III (53 a 68 dias) n=4	Afluente	6,7 ±0,05	761±33	711±78	93±16			13±0,5
	Efluente	8,1 ±0,14	57±20	52±22	390±66	10±3	12±2	4±1
	E (%)		92±3	93±5				69±12
----- Após colmatação -----								
III (69 a 144 dias) n=11	Afluente	7,8 ±0,2	800±31	779±28	204±10			14±1
	Efluente	7,0 ±0,43	489±98	456±97	222±73	151±29	4±2	12±2
	E (%)		40±12	41±14				20±9
IV (145 a 313 dias) n=21	Afluente	7,3 ±0,44	591±85	552±108	230±35			13±1
	Efluente	7,4 ±0,29	109±62	91±51	268±103	33±9	4±2	8±2
	E (%)		82±9	84±7				37±14

E = eficiência

DQOb = demanda química de oxigênio bruta

DQOf = demanda química de oxigênio filtrada

AB = alcalinidade à bicarbonato

AVT = ácidos voláteis totais

Tabela 5.15 - Valores dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos obtidos durante a operação do reator R2

Etapas	Amostra	Parâmetros						
		pH	DQOb (mg/L)	DQOf (mg/L)	AB (mgCaCO ₃ / L)	AVT (mgHAc/ L)	CH ₄ (μmol/ L)	LAS (mg/L)
I (1 a 27 dias) n=5	Afluente	7,7±0,12	779±21	733±12	134±12			
	Efluente	8,16±0,15	49±8	43±9	323±8	17±4	13±4	
	E (%)		93±2	94±2				
II (28 a 52 dias) n= 5	Afluente	7,34±0,55	798±36	747±49	86±55			7,6±0,6
	Efluente	8,04±0,26	58±18	47±16	308±51	12±1,6	9,23±5	3±1,6
	E (%)		92±2	93±3				75±10
III (53 a 68 dias) n=4	Afluente	6,95±0,31	743±51	680±84	92±24			14±1
	Efluente	8,02±0,09	46±10	37±14	339±38	13±3	18±1	4±2
	E (%)		94±2	94±3				68±14
III (69 a 144 dias) n=11	Afluente	7,81±0,20	749±60	732±55	205±14			14±1
	Efluente	7,17±0,32	290±97	264±99	300±35	56±22	12±6	11±2
	E (%)		61±13	64±12				21±9
IV (145 a 244 dias) n=20	Afluente	7,39±0,31	598±43	576±35	200±10			14±2
	Efluente	7,28±0,30	171±21	144±32	348±33	24±7	9±5	9±2
	E (%)		77±7	79±6				35±12
V (245 a 313 dias) n= 7	Afluente	7,47±0,53	50±7	41±9	199±23			14±1
	Efluente	7,41±0,24	38±16	28±10	221±88	24±8		7±5
	E (%)		27±23	35±18				55 a 91

E = eficiência

DQOb = demanda química de oxigênio bruta

DQOf = demanda química de oxigênio filtrada

AB = alcalinidade à bicarbonato

AVT = ácidos voláteis totais

Nessa etapa (Etapa I), os reatores foram alimentados com esgoto sintético contendo proteínas (extrato de carne), carboidratos (amido e sacarose) e sais minerais.

Os parâmetros avaliados nos efluentes dos reatores indicaram que os sistemas atingiram regime permanente aparente em aproximadamente 20 dias de operação. Essa etapa foi encerrada no 27º dia de operação, com eficiência de remoção de matéria orgânica maior que 90%, em ambos os reatores. Nesse mesmo período, os reatores R1 e R2 apresentaram respectivamente, alcalinidade de 303 ± 20 mg/L e 323 ± 8 mg/L; reduzida concentração de ácidos voláteis com valores de 14 ± 3 mgHac/L e 17 ± 4 mgHac/L e concentração de metano de 11 ± 3 $\mu\text{mol/L}$ e 13 ± 4 $\mu\text{mol/L}$. Para ambos os reatores o valor médio de pH efluente (pH 8,0) foi ligeiramente maior que o afluente (pH 7,7). Ocorreu formação de material gelatinoso esbranquiçado, que começou a acumular nos primeiros trechos dos reatores.

No 27º dia de operação, foram realizadas análises de DQO filtrada ao longo dos reatores. Nas Figuras 5.14 e 5.15 estão apresentados os valores da variação espacial da DQO filtrada. Na posição L/D de 14, as eficiências de remoção de matéria orgânica foram de 90% e 94% para os reatores R1 e R2, respectivamente.

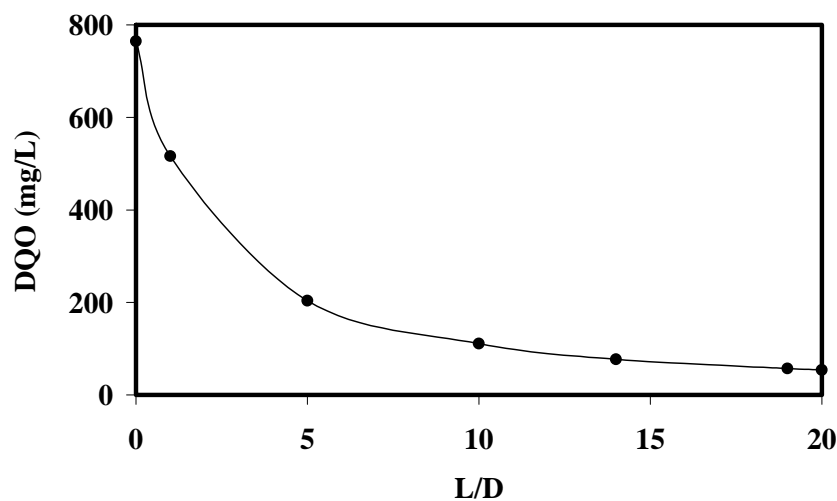


Figura 5.14 - Variação espacial dos valores de DQO na primeira etapa de operação do reator R1

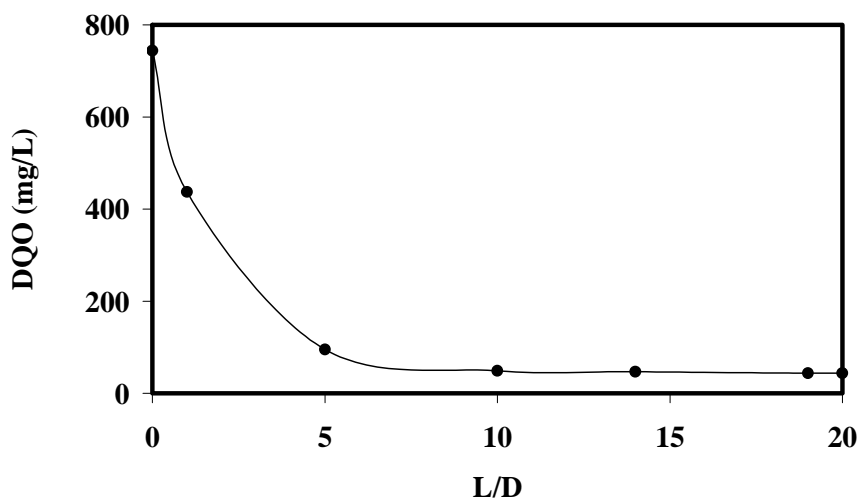


Figura 5.15 - Variação espacial dos valores de DQO na primeira etapa de operação do reator R2

Em relação aos ácidos voláteis, foram detectados somente o ácido acético e ácido propiônico. No reator R1 as concentrações de ácido acético foram mais elevadas e iguais a 97 mg/L ($L/D=1$) e 59 mg/L ($L/D=5$) (Figura 5.16). Concentrações de ácido acético menores foram observadas no reator R2 (Figura 5.17), e iguais a 64 mg/L ($L/D=1$) e 34,5 mg/L ($L/D=5$). Ácido propiônico foi detectado em concentrações mais elevadas na posição $L/D=1$, sendo 49,3 mg/L no reator R1 e de 29,5 mg/L no reator R2. Porém, no último trecho ($L/D=19$) dos reatores as concentrações desses ácidos (acético e propiônico) estiveram abaixo dos limites de detecção das curvas de calibração.

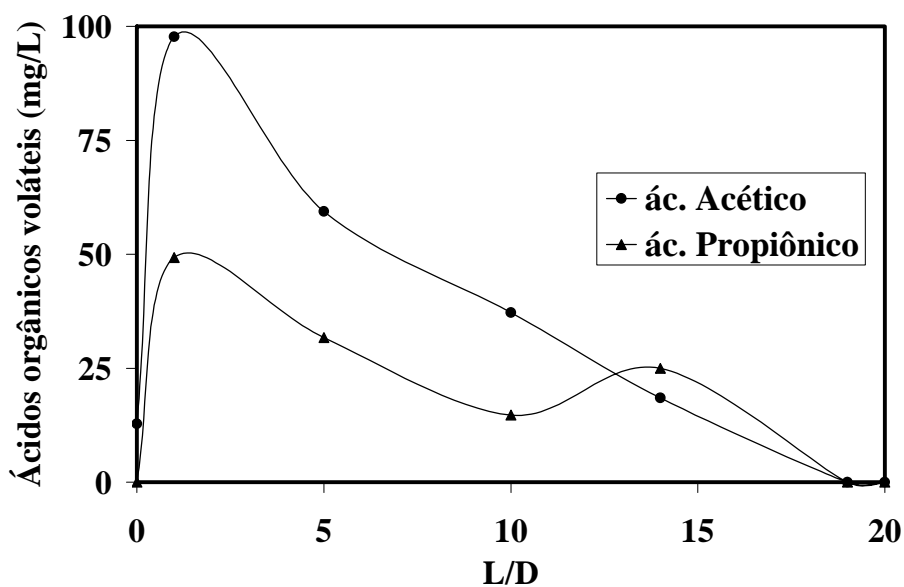


Figura 5.16 - Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico na primeira etapa de operação do reator R1

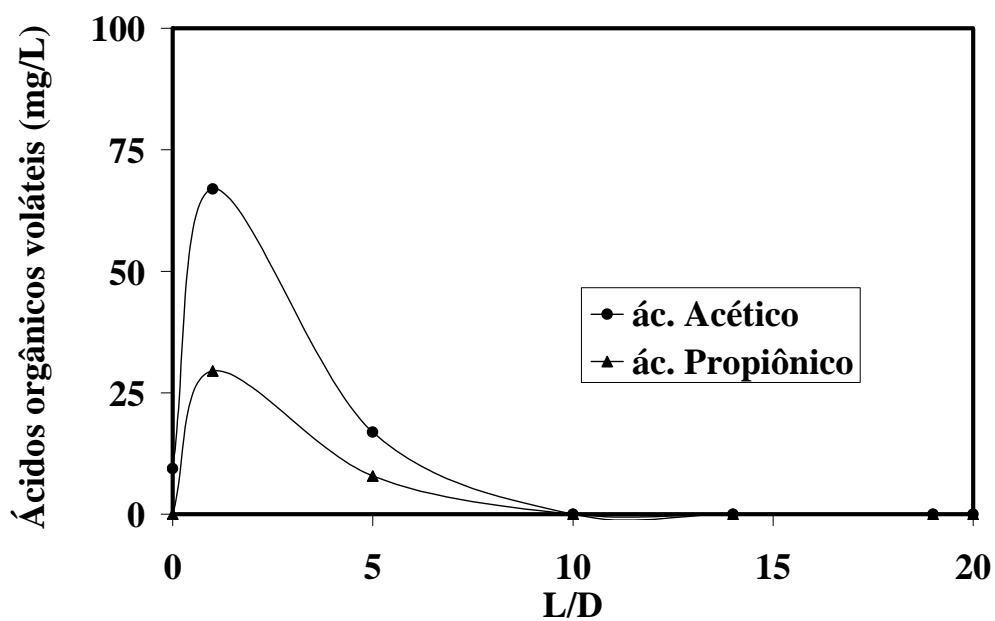


Figura 5.17 - Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico na primeira etapa de operação do reator R2

A escolha da concentração inicial de LAS adicionada na composição do esgoto sintético foi de 7 mg/L. Esse valor foi baseado na concentração média de 9

mg/L obtida na época de estiagem, no esgoto sanitário da ETE – EESC - USP de São Carlos.

A duração da etapa II (28 a 52 dias) foi de 24 dias, e 7 mg/L de LAS não causaram desequilíbrio nos sistemas: a matéria orgânica (DQO filtrada) efluente foi de 49 ± 3 mg/L e 47 ± 13 mg/L e a eficiência de remoção de 93% para os dois reatores. A alcalinidade a bicarbonato continuou sendo gerada em concentrações de 301 ± 46 mg/L (R1) e 308 ± 51 mg/L (R2), e as concentrações de ácidos voláteis totais foram de 10 ± 2 mg/L para o reator R1 e de $12 \pm 1,6$ mg/L para o reator R2 (Tabela 5.14 e 5.15).

Logo após adição de 7 mg/L de LAS observou-se concentrações nos efluentes de 4,6 mg/L e 2,7 mg/L, para os reatores R1 e R2, respectivamente. Portanto, a eficiência de remoção de LAS foi de 34% para o reator R1 e 61% para o reator R2. Porém essa remoção foi atribuída a ação conjunta do processo de adsorção e degradação (Tabela 5.14 e 5.15).

A concentração de metano no biogás, com valor médio de 12 ± 3 $\mu\text{mol/L}$ e $9,2 \pm 5$ $\mu\text{mol/L}$ após a adição do LAS passou para 11 ± 3 $\mu\text{mol/L}$ e 13 ± 4 $\mu\text{mol/L}$ para os reatores R1 e R2, (Tabela 5.14 e 5.15), respectivamente.

Análises espaciais foram realizadas no 53º dia de operação. Os valores obtidos para a remoção da matéria orgânica (DQO), ao longo dos reatores foram iguais às variações espaciais descritas anteriormente; ou seja, de 90 e 94%, respectivamente. Isso comprova que o LAS não influenciou na degradação dos compostos orgânicos presentes na composição do esgoto sintético.

Além de DQO (Figuras 5.18 e 5.19) foram analisadas variações espaciais de ácidos orgânicos, sulfato e LAS. O comportamento da matéria orgânica (DQO) ao longo dos reatores foi igual aos perfis anteriores (Figura 5.14 e 5.15).

Ácido acético e ácido propiônico foram detectados nos primeiros trechos dos reatores ($L/D=1$ e 5), em concentrações menores que 75 mg/L, no reator R1 (Figura 5.20) e, menores que 50 mg/L, no reator R2 (Figura 5.21). Provavelmente, esses ácidos foram produzidos por algumas bactérias e, concomitantemente usados por outras no consórcio microbiano estabelecido no biofilme.

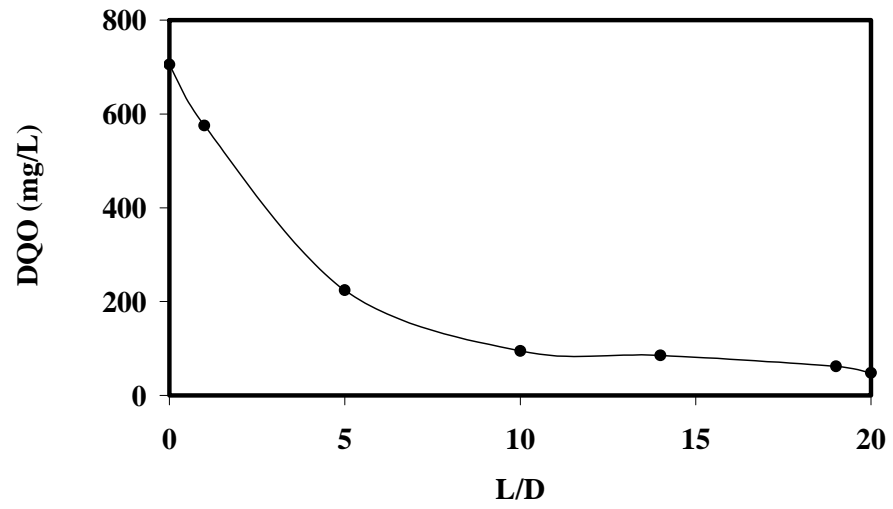


Figura 5.18 - Variação espacial da DQO na segunda etapa de operação do reator R1

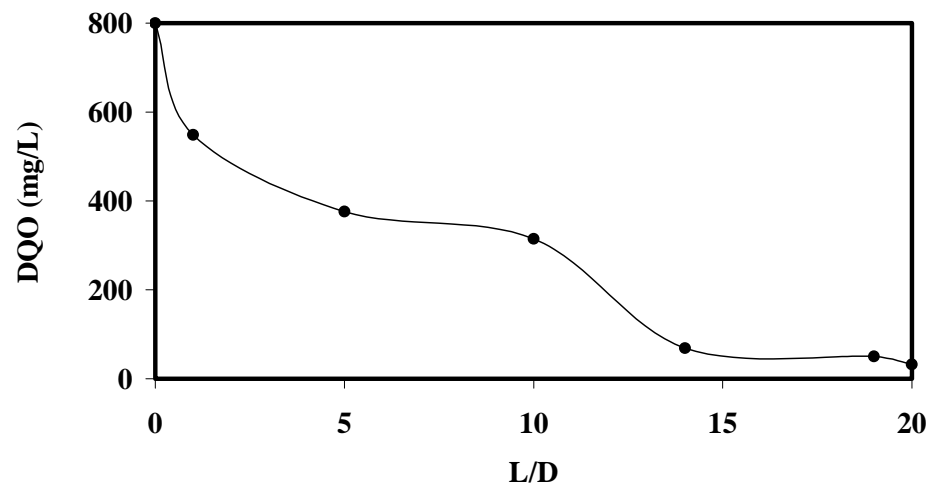


Figura 5.19 - Variação espacial da DQO na segunda etapa de operação do reator R2

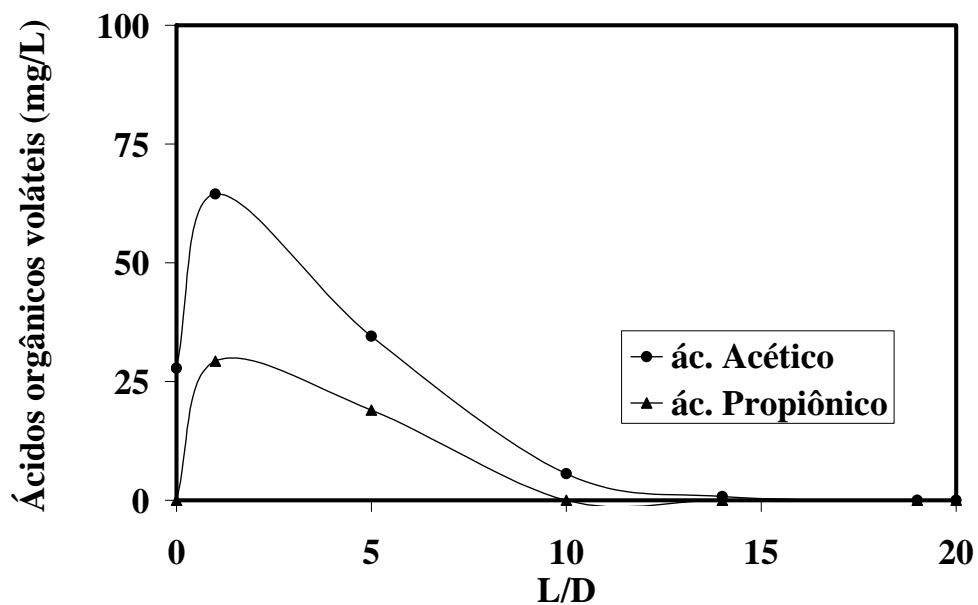


Figura 5.20 - Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico na segunda etapa de operação do reator R1

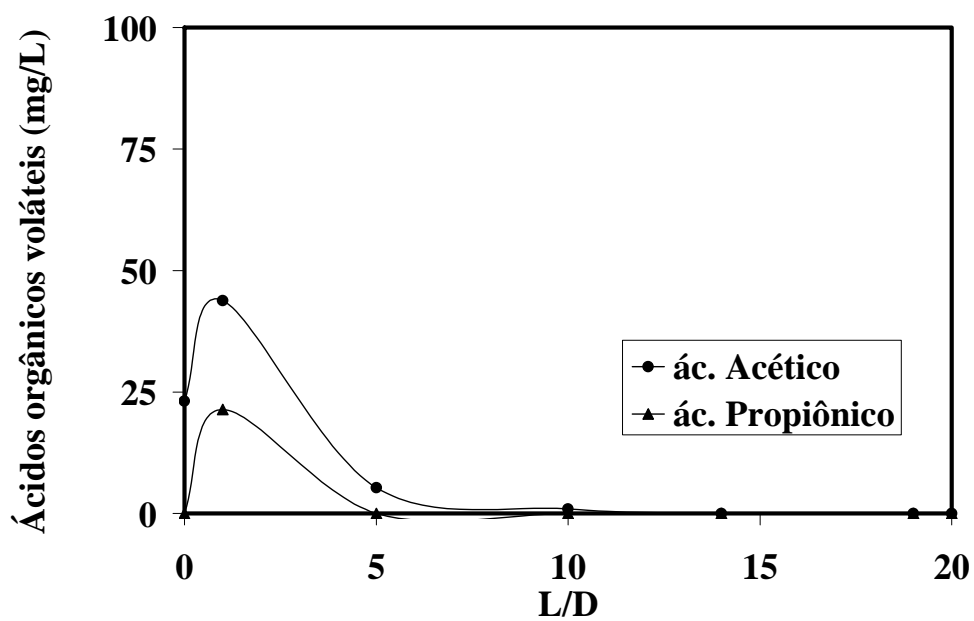


Figura 5.21 - Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico na segunda etapa de operação do reator R2

As concentrações de sulfato nos afluentes dos reatores foram de 8 e 11 mg/L nos reatores R1 e R2, respectivamente. Provavelmente, o sulfato afluente foi proveniente principalmente do extrato de carne. As concentrações de sulfato foram maiores nos primeiros trechos (L/D 1 e 5) dos reatores (Figura 5.22 e 5.23), passando de 11 mg/L (afluente) para 16 mg/L (L/D=1) no reator R1, e de 8 mg/L (afluente) para 17 mg/L (L/D=1) no reator R2. A concentração no efluente do reator R1 foi de 2 mg/L, enquanto, no reator R2, ficou abaixo do limite de detecção do método (Apêndice E). Dessa forma, as bactérias presentes no biofilme dos reatores realizaram redução assimilativa e desassimilativa de sulfato.

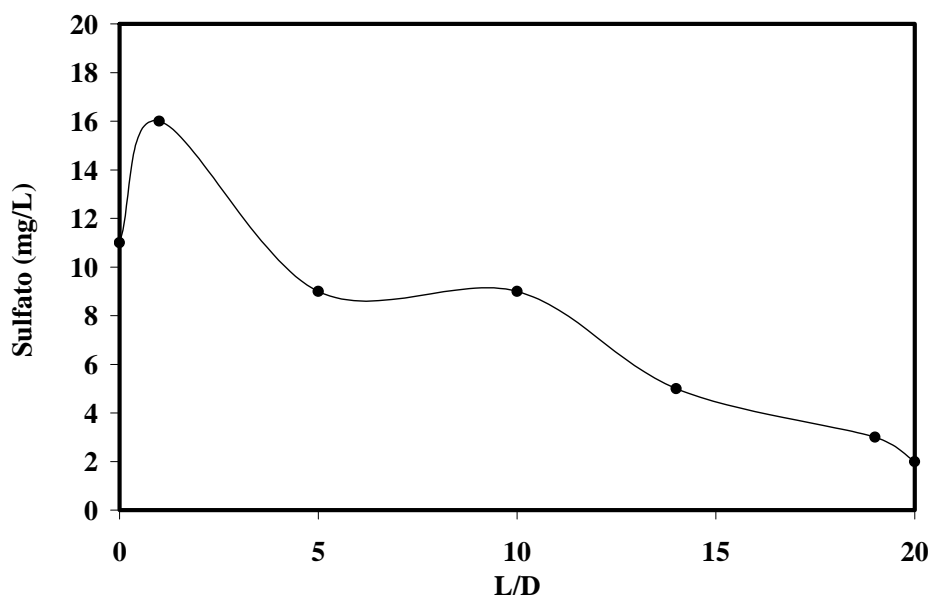


Figura 5.22 - Variação espacial dos valores de sulfato na segunda etapa de operação do reator R1

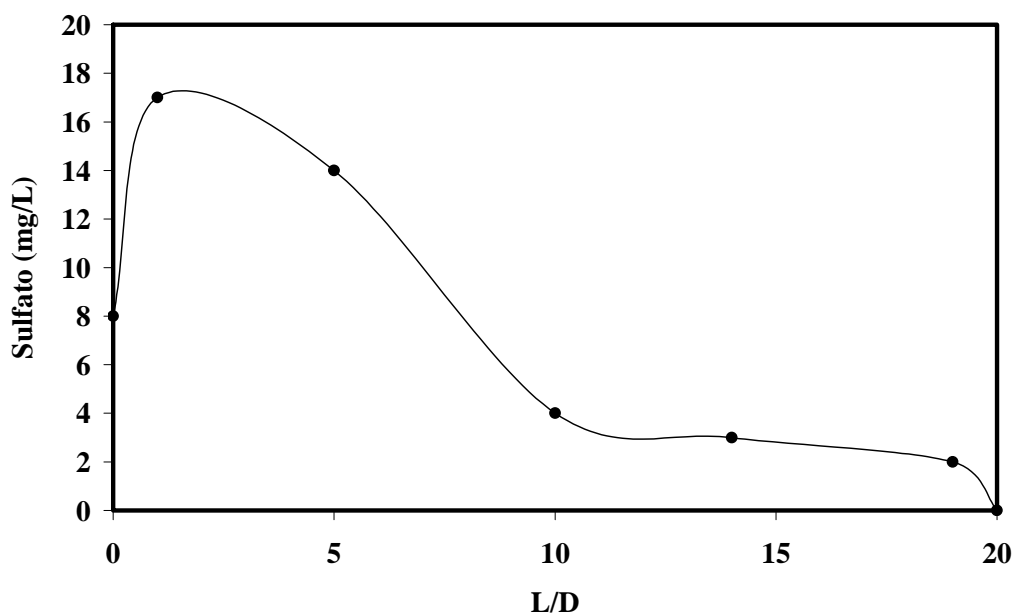


Figura 5.23 - Variação espacial dos valores de sulfato na segunda etapa de operação do reator R2

A remoção de LAS ocorreu, principalmente, no primeiro trecho ($L/D=1$) dos reatores (Figura 5.24 e 5.25).

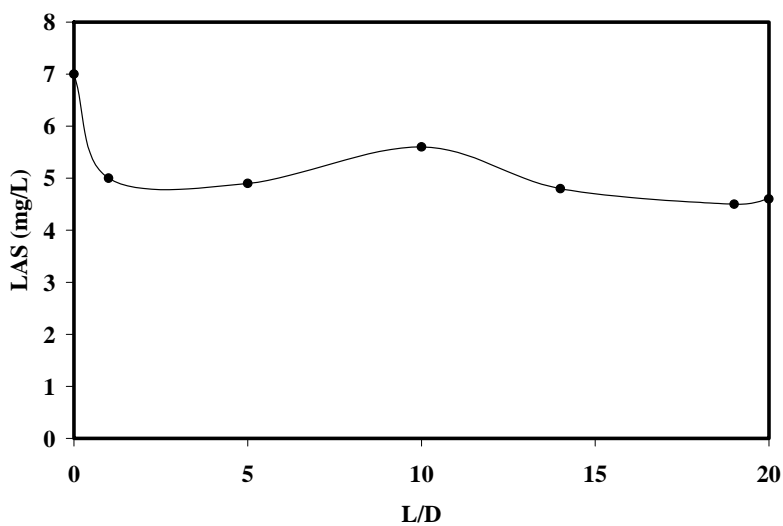


Figura 5.24 - Variação espacial das concentrações de LAS na segunda etapa de operação do reator R1

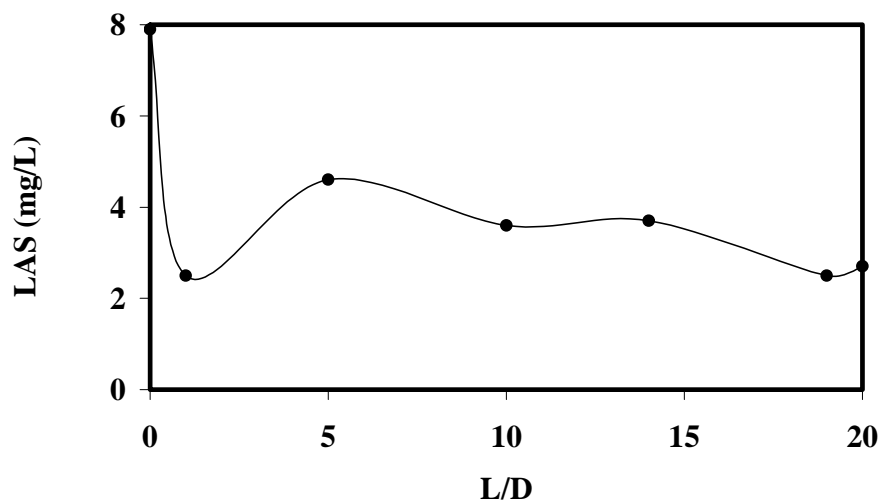


Figura 5.25 - Variação espacial das concentrações de LAS na segunda etapa de operação do reator R2

No 53º dia de operação (Etapa III), a concentração de LAS no afluente foi elevada para 14 mg/L, para acelerar o seu processo de saturação no material suporte (espumas de poliuretano com biofilme).

Com 70 dias de operação (Etapa III), o material gelatinoso esbranquiçado rico em microrganismos, que vinha sendo produzido nos primeiros trechos dos reatores (L/D =1 e 5), causou a colmatação dos leitos e, conseqüente arraste das espumas de poliuretano com biofilme. O leito do reator R1 ficou mais obstruído que o do reator R2, e ocorreu deslocamento do leito de aproximadamente 10 cm ao longo do comprimento dos reatores. O material gelatinoso foi drenado na posição L/D=1, e os leitos foram devolvidos aos seus lugares. Essa interferência promoveu desequilíbrio dos sistemas: a DQO filtrada efluente do reator R1, que antes era de 52 ± 22 mg/L, atingiu 456 ± 97 mg/L; no reator R2 esses valores foram de 37 ± 14 mg/L para 264 ± 99 mg/L. Com o desequilíbrio, os valores de alcalinidade a bicarbonato também foram alterados de 390 ± 66 mg/L para 222 ± 73 mg/L, no reator R1 e de 339 ± 38 mg/L para 300 ± 35 mg/L, no reator R2. A concentração de ácidos nos efluentes, no reator R1 elevou-se de 10 ± 3 mg/L para 151 ± 29 mg/L e, no reator R2, de 13 ± 3 mgHac/L para 56 ± 22 mgHac/L. Essas alterações na alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis nos efluentes comprovam que o reator R1 foi mais prejudicado pela colmatação do que o

reator R2. O pH do efluente também foi alterado de pH8 (antes da colmatção) para aproximadamente pH 7 (após colmatção), em ambos os reatores.

As espumas de poliuretano recobertas por biofilme dos reatores ficaram saturadas aos 108 dias de operação, quando as concentrações de LAS afluentes e efluentes dos reatores ficaram iguais a 14 mg/L. Esse mesmo comportamento foi observado na curva de exaustão realizada nos reatores diferenciais, sem biomassa, onde após 9 horas de ensaio, a concentração de LAS efluente igualou-se ao afluente, a 35 mg/L. Portanto, considerou-se que a partir desse momento iniciou-se a degradação de LAS nos reatores de leito fixo (RAHLF). Esse mesmo comportamento foi observado nos experimentos realizados por Lobner et al. (2005) que avaliaram a adsorção de 10 mg/L de LAS em reator UASB. Os autores observaram que, após 115 dias de operação, a adsorção cessou, ocorrendo convergência entre as concentrações de LAS afluente e efluente.

Duas variações espaciais foram realizadas nessa etapa (Etapa III), sendo a primeira, antes da colmatção, aos 68 dias de operação e a segunda, após a colmatção, aos 144 dias de operação. Variações espaciais de DQO (filtrada) nos reatores R1 e R2 (Figuras 5.26 e 5.27) mostraram que depois da colmatção dos leitos, os sistemas não consumiram matéria orgânica. Essa elevada concentração de matéria orgânica ao longo dos reatores pode ser atribuída ao acúmulo de ácidos orgânicos gerados.

Na Figura 5.28 pode ser observada a variação espacial de ácidos no primeiro perfil realizado na etapa III para o reator R1. A maior concentração de ácido acético encontrada foi de 156,7 mg/L (L/D=1) e propiônico de 57,1 mg/L (L/D=1), sendo consumidos ao longo do reator. Depois da colmatção novo perfil foi realizado, e a concentração de ácido acético atingiu 268 mg/L (L/D=10) e propiônico de 126 mg/L (L/D=10) e presença de ácido isobutírico (Figura 5.28).

Nas variações espaciais do reator R2 a concentração de ácido acético foi de 82,7 mg/L (L/D=1) e propiônico de 30 mg/L (L/D=1) no primeiro perfil da etapa III (Figura 5.29). Similar ao reator R1, as concentrações também foram maiores após a colmatção, o ácido acético atingiu valor de 152,7 mg/L e o ácido propiônico de 129,7 mg/L.

No segundo perfil realizado nessa terceira etapa, ácidos butírico e isovalérico foram observados, ao longo dos reatores (Figuras 5.30 e 5.31), provavelmente devido ao desequilíbrio dos sistemas.

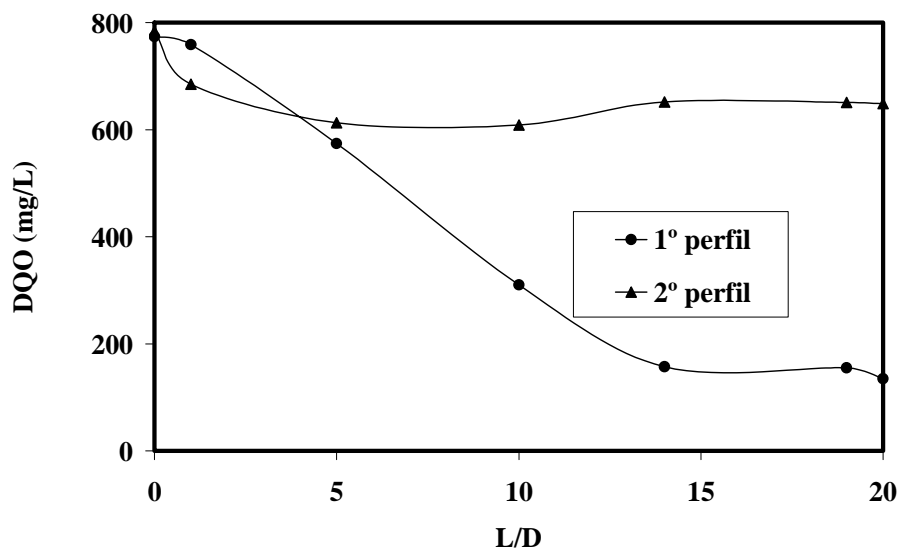


Figura 5.26 - Variação espacial dos valores de DQO na terceira etapa de operação do reator R1. 1º perfil antes da colmatação do leito e 2º perfil após colmatação do leito.

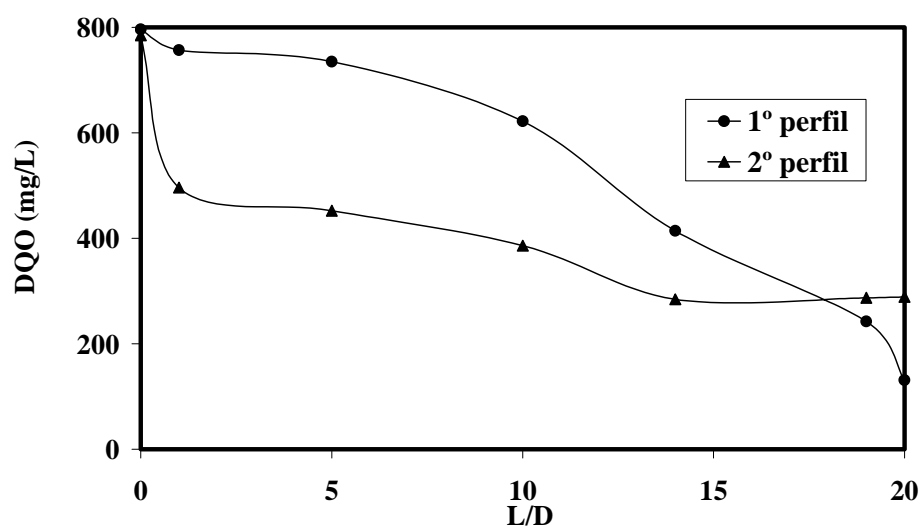


Figura 5.27 - Variação espacial dos valores de DQO na terceira etapa de operação do reator R2

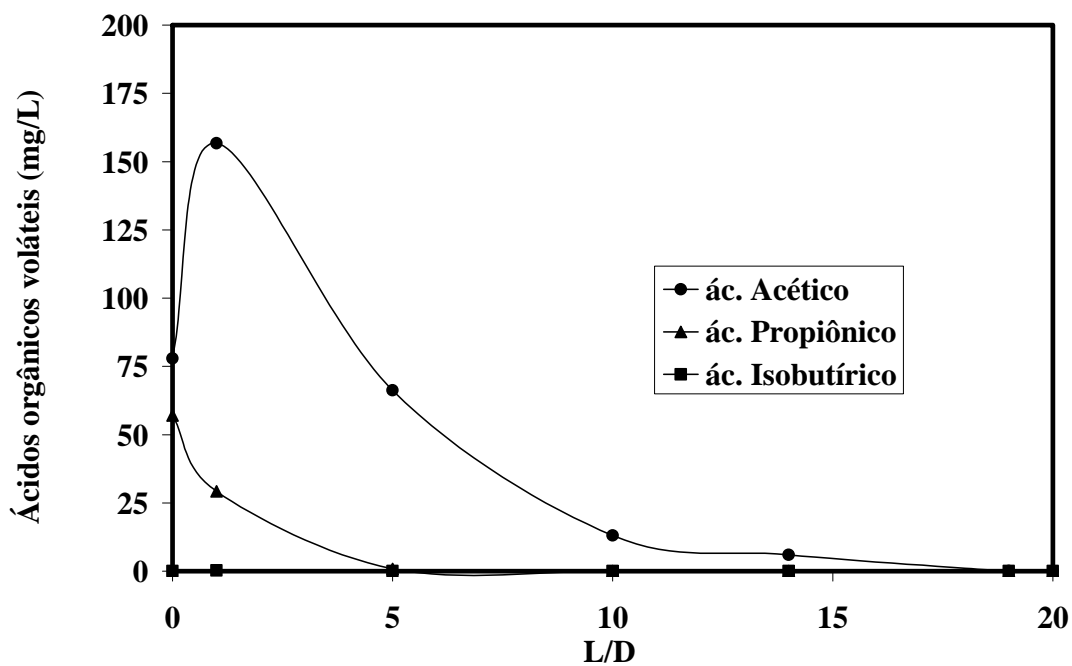


Figura 5.28 - Variação espacial dos valores de ácidos acético, ácido propiônico e ácido isobutírico no primeiro perfil da terceira etapa da operação do R1

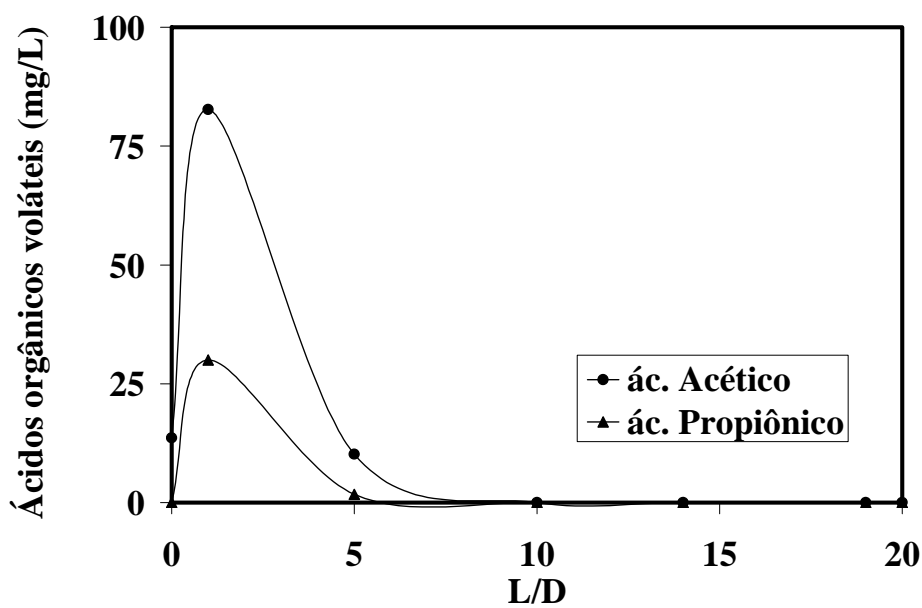


Figura 5.29 - Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico no primeiro perfil da terceira etapa da operação do reator R2

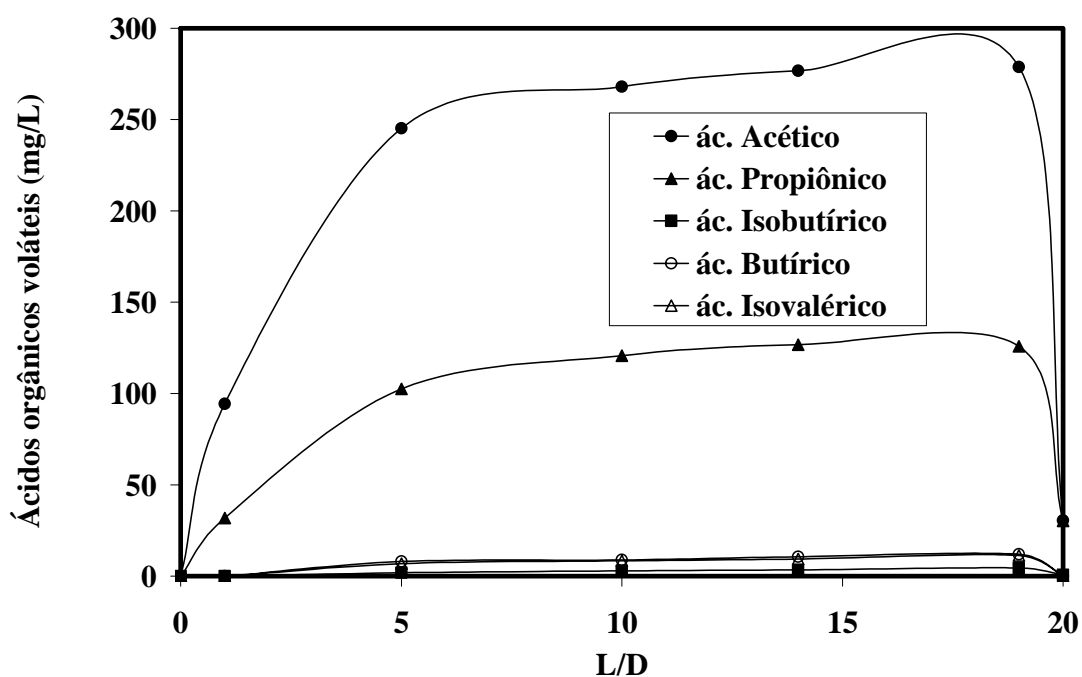


Figura 5.30 - Variação espacial dos valores de ácidos orgânicos no segundo perfil da terceira etapa da operação do R1

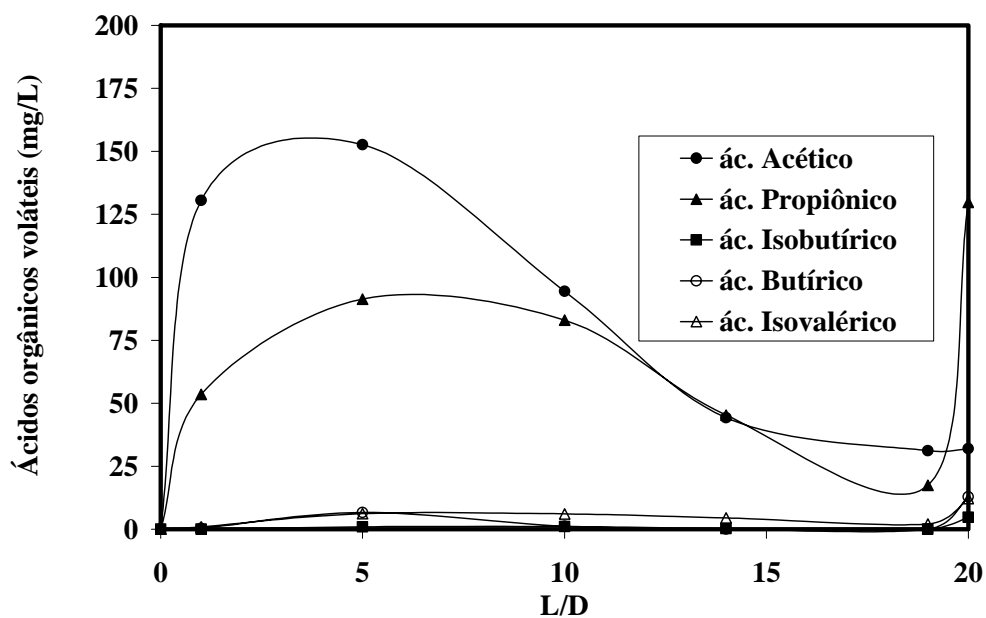


Figura 5.31 - Variação espacial dos valores de ácidos orgânicos voláteis no segundo perfil da terceira etapa da operação do reator R2

A concentração de LAS no efluente do reator R1 era de 11,8 mg/L, na primeira variação espacial da etapa III e passou para 8,7 mg/L, no segundo perfil (Figura 5.32). No reator R2 a concentração de LAS era de 10,9 mg/L e diminuiu para 9,9 mg/L (Figura 5.33). Essa redução na concentração de LAS efluente aumentou a eficiência de remoção de 21% para 38%, no reator R1, e de 27 para 29%, no reator R2.

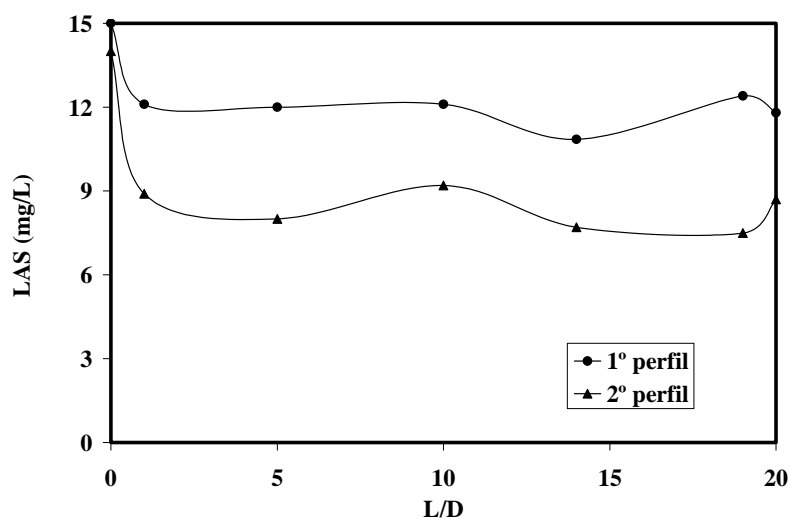


Figura. 5.32 - Variação espacial dos valores de LAS na terceira etapa de operação do reator R1. 1º perfil antes da colmatção e 2º perfil após colmatção

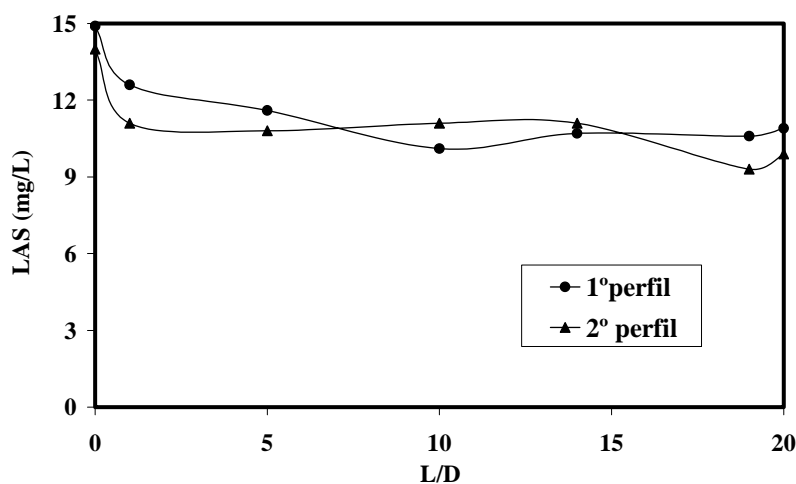


Figura. 5.33 - Variação espacial dos valores de LAS na terceira etapa de operação do reator R2

Tanto no reator R1, quanto no reator R2, remoções de sulfato foram observadas no primeiro perfil da etapa III. Na primeira variação espacial o valor de sulfato afluente foi de 7 mg/L, enquanto no efluente foram observados 2 mg/L. Porém na segunda variação espacial essa concentração elevou-se para 14 mg/L. Esse comportamento foi observado no reator R1 e R2. Após o entupimento, as concentrações de sulfato efluentes foram maiores que as observadas nos afluentes (Figuras 5.34 e 5.35). Esse aumento na concentração de sulfato não alterou a produção de sulfeto (Figura 5.36 e 5.37), cujos valores foram inferiores a 3 mg/L nos dois reatores (Apêndice E). Esse incremento de sulfato no efluente dos reatores pode ser uma indicação da degradação do LAS, com produção de sulfato, biomassa, CO₂ e água, provavelmente ocorreu devido à dessulfonação do anel aromático presente na molécula do surfactante.

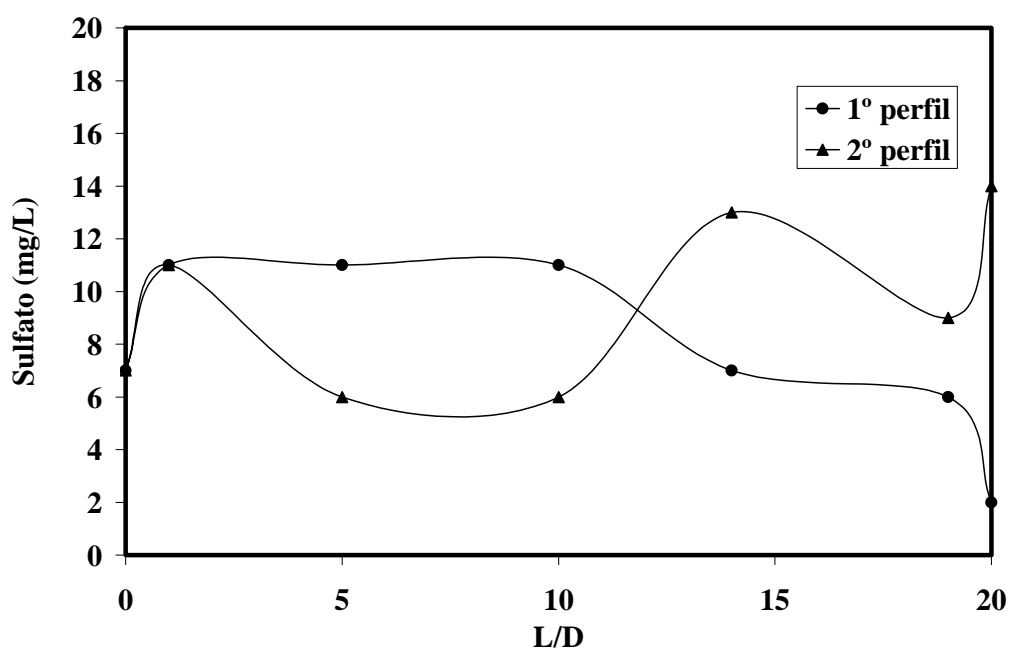


Figura 5.34 - Variação espacial dos valores de sulfato na terceira etapa de operação do reator R1

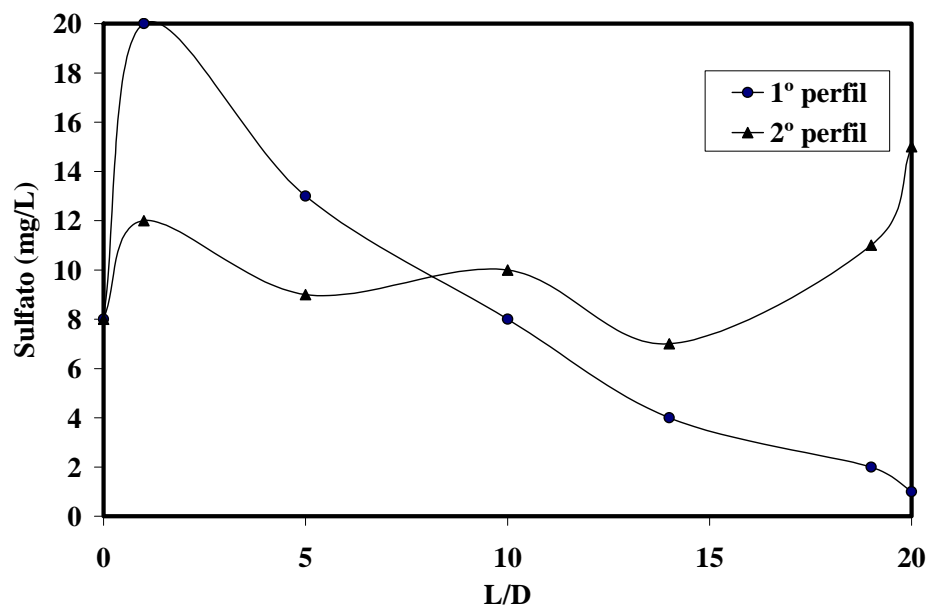


Figura 5.35 - Variação espacial dos valores de sulfato na terceira etapa de operação do reator R2

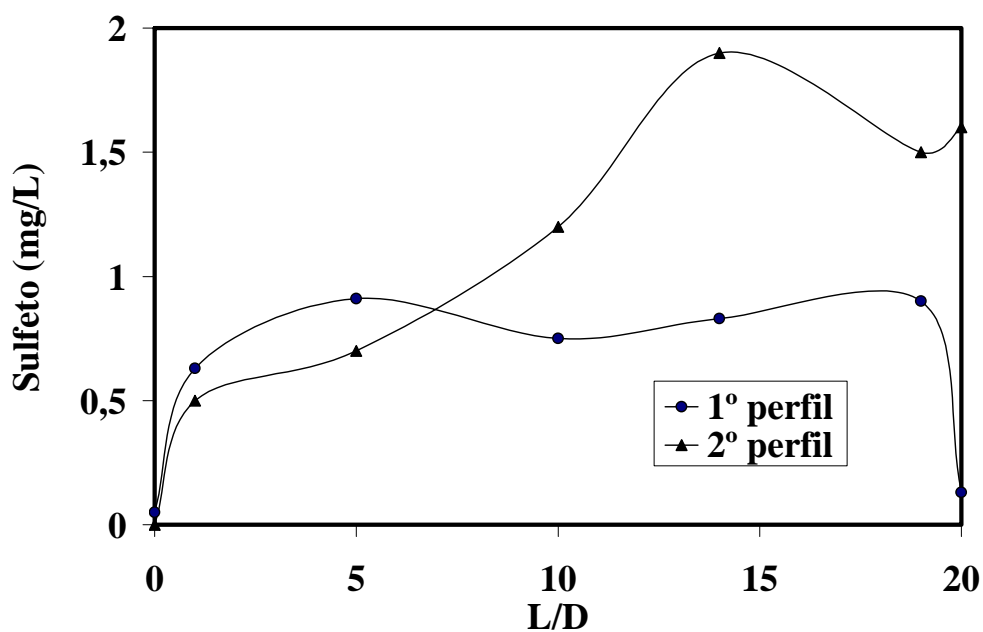


Figura 5.36 - Variação espacial dos valores de sulfeto na terceira etapa de operação do reator R1

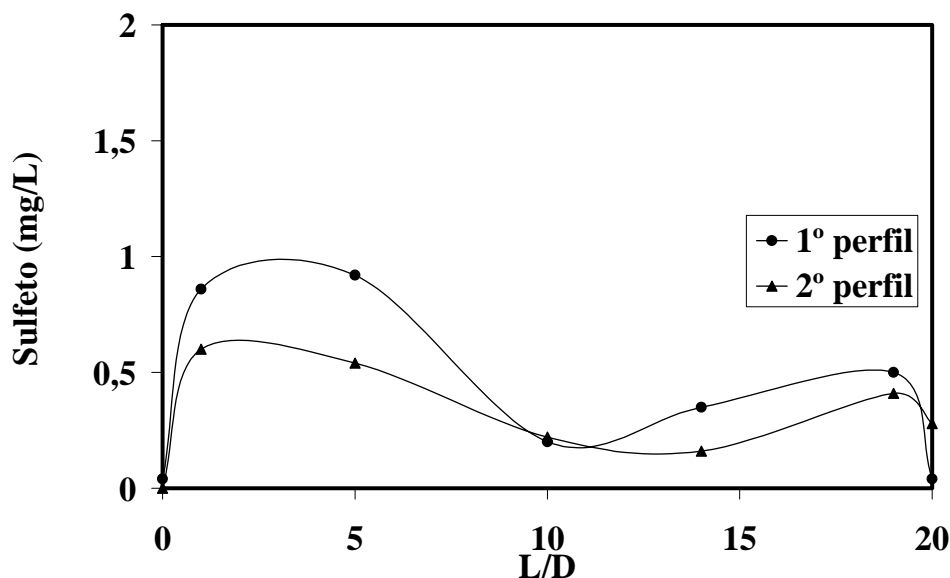


Figura 5.37 - Variação espacial dos valores de sulfeto na terceira etapa de operação do reator R2

Na tentativa de melhorar a eficiência de remoção de LAS e redução da produção de material gelatinoso nos primeiros trechos dos reatores, o amido foi retirado da composição do esgoto sintético afluente dos reatores. Além disso, na alimentação de reator R1 o extrato de carne foi substituído por extrato de levedura (500 mg/L). O extrato de levedura é rico em vitaminas do complexo B e usado com sucesso nos processos de degradação anaeróbia de compostos tóxicos (MAINTINGUER et al., 2004). A ausência do amido minimizou a produção de material gelatinoso nos reatores, em aproximadamente 10 dias após sua retirada da alimentação.

Com essas mudanças deu-se início à quarta etapa (Etapa IV) de operação (145 a 313 dias). No reator R1, a adição de extrato de levedura e ausência de amido favoreceu o consumo de matéria orgânica de 456 ± 97 mg/L para 91 ± 51 mg/L, geração de alcalinidade (222 ± 35 mg/L a 268 ± 123 mg/L) e redução na concentração de ácidos voláteis (151 ± 29 mgHac/L para 33 ± 9 mgHac/L). A eficiência de remoção de matéria orgânica (DQO filtrada) aumentou de $41 \pm 14\%$ para $84 \pm 7\%$.

A eficiência de remoção de LAS também foi favorecida com as alterações na composição do esgoto sintético. A remoção média de LAS elevou-se de $20 \pm 9\%$, na

terceira etapa (144 dias de operação), para $37\pm 14\%$ na etapa IV (313 dias de operação). Este reator atingiu estabilidade na remoção de LAS (50%) aos 247 dias, com efluente contendo aproximadamente 7 mg/L.

Para o reator R2 (Etapa IV), o amido foi retirado da alimentação, porém o extrato de carne continuou sendo adicionado. A remoção de matéria orgânica foi próxima a $79\pm 6\%$, e a DQO filtrada foi, em média, de 576 ± 35 mg/L no afluente e 144 ± 32 mg/L no efluente. A alcalinidade a bicarbonato passou de 300 ± 35 mg/L para 348 ± 33 mg/L e a concentração de ácidos voláteis de 56 ± 22 mgHac/L para 24 ± 7 mgHac/L. A concentração média de LAS efluente de 11 ± 2 mg/L passou para 9 ± 2 mg/L, resultando em eficiência de remoção média de $35\pm 12\%$ com 244 dias de operação. Este reator atingiu estabilidade na remoção de LAS aos 200 dias, com efluente contendo aproximadamente 7 mg/L.

As variações espaciais de DQO e LAS, no reator R1, praticamente permaneceram iguais apesar de 112 dias de diferença entre as variações espaciais no leito dos reatores (Figura 5.38). Aos 200 dias de operação do reator R1 a concentração de ácido acético e ácido propiônico no efluente foram de 40,8 e 15,2 mg/L, respectivamente, sendo que no 312º dia, as concentrações desses ácidos estiveram abaixo do limite de detecção do método (Figuras 5.39 e 5.40). A eficiência de remoção de LAS (Figura 5.41) permaneceu em 50% para concentração afluente de 7 mg/L.

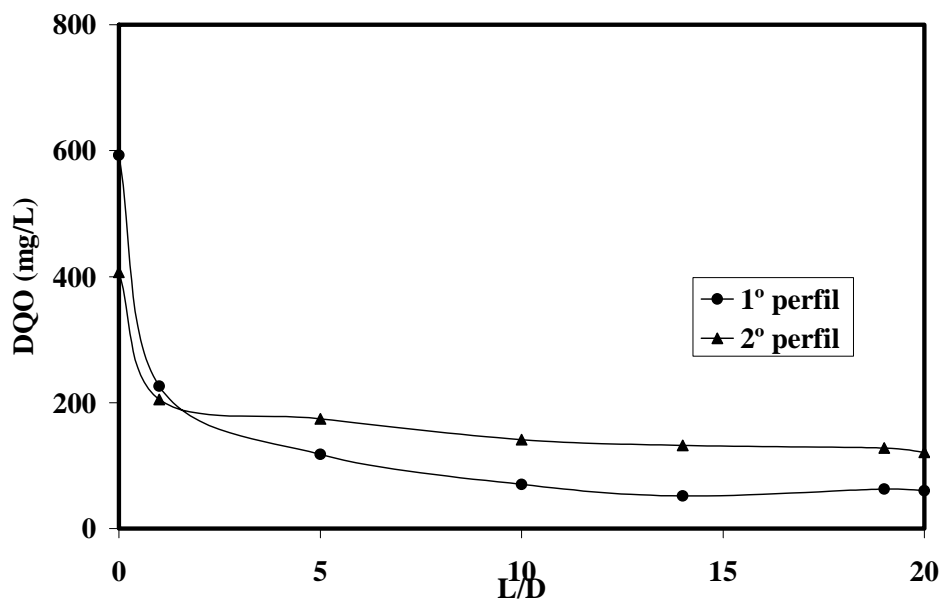


Figura 5.38 - Variação espacial dos valores de DQO na quarta etapa de operação do R1

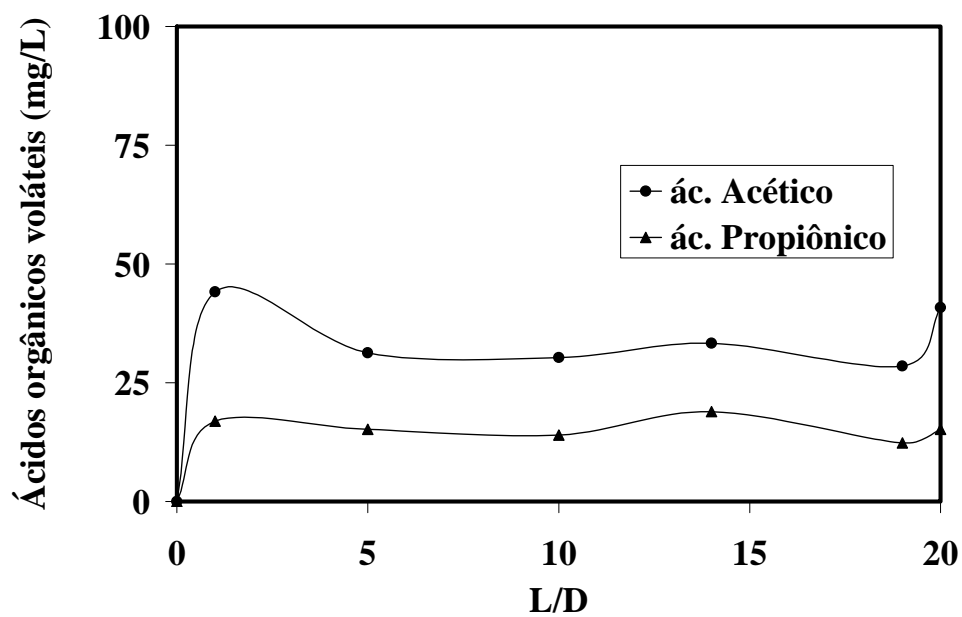


Figura 5.39 - Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico no primeiro perfil da quarta etapa de operação do R1

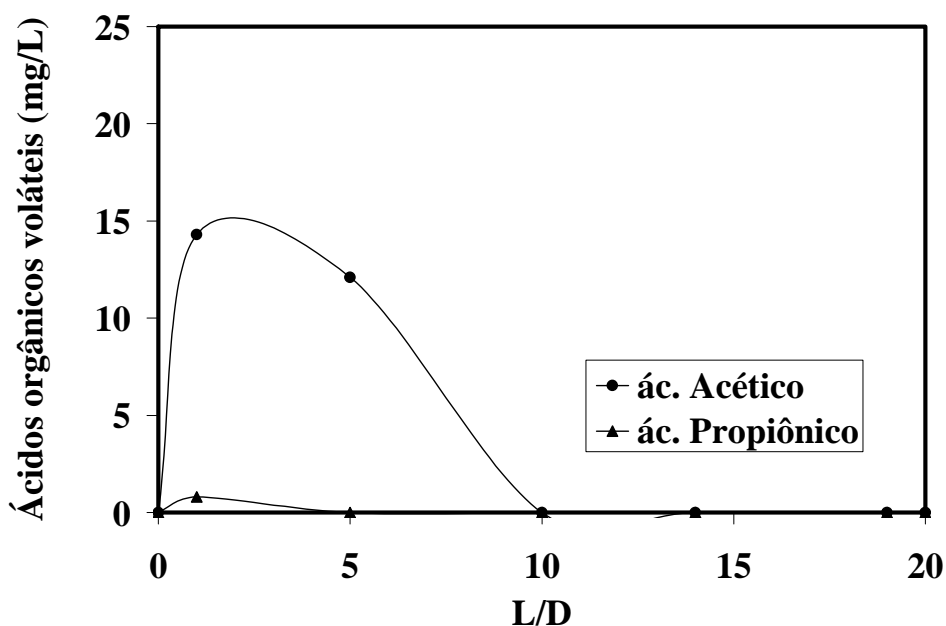


Figura 5.40 - Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico no segundo perfil da quarta etapa de operação do R1

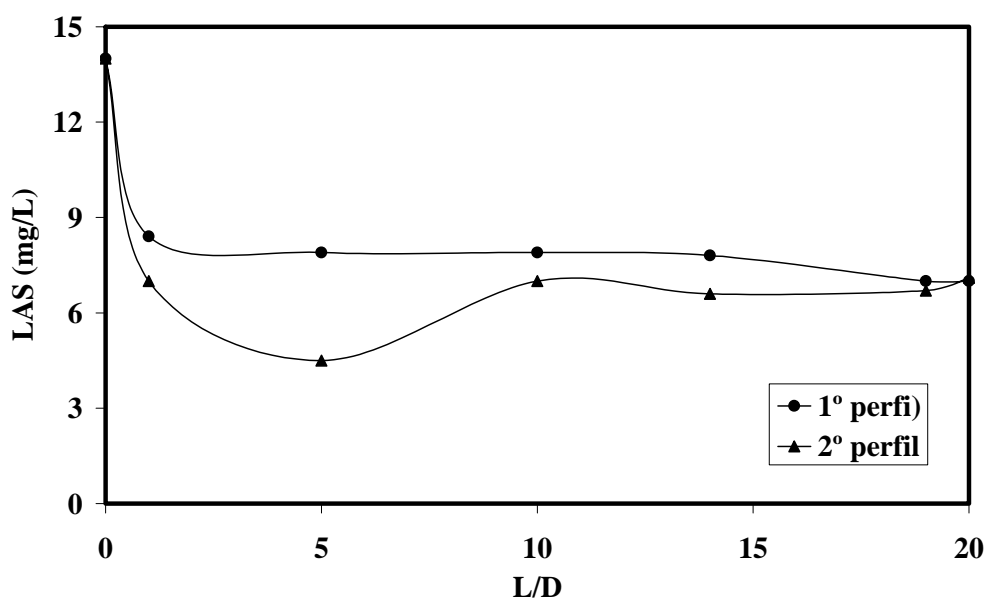


Figura 5.41 - Variação espacial dos valores de LAS na quarta etapa de operação do reator R1

As análises de variações espaciais do reator R2 ocorreram com 254 dias de operação. Esse reator, na etapa anterior (Etapa III), apresentou DQO no efluente de 264 ± 99 mg/L, passou a 144 ± 32 mg/L (Figura 5.42). Nessa etapa, foram detectados

ácidos acético na concentração de 50,6 mg/L (L/D=1) e ácido propiônico de 25,9 mg/L (L/D=5), sendo essas concentrações menores que as observadas na etapa anterior (Figura 5.43) quanto ao LAS, foi observada redução somente na posição L/D=1 e ao longo do reator a concentração de surfactante permaneceu constante em 7 mg/L (Figura 5.44).

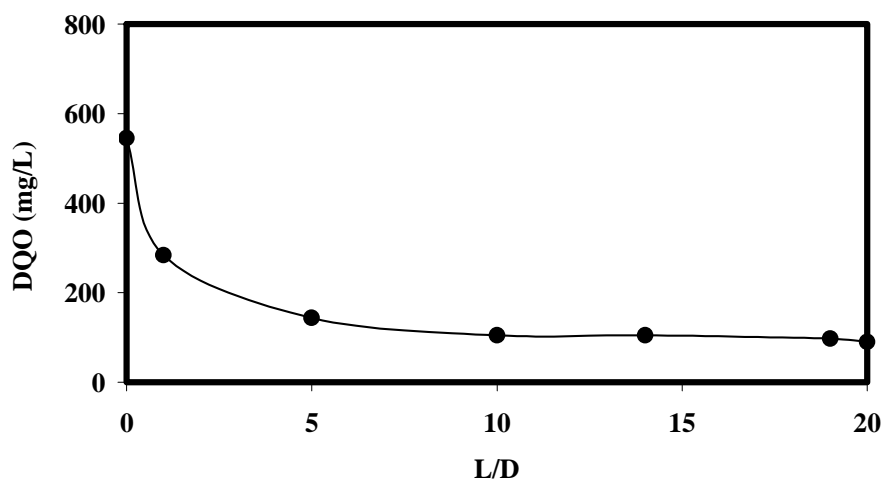


Figura 5.42 - Variação espacial dos valores de DQO na quarta etapa de operação do reator R2

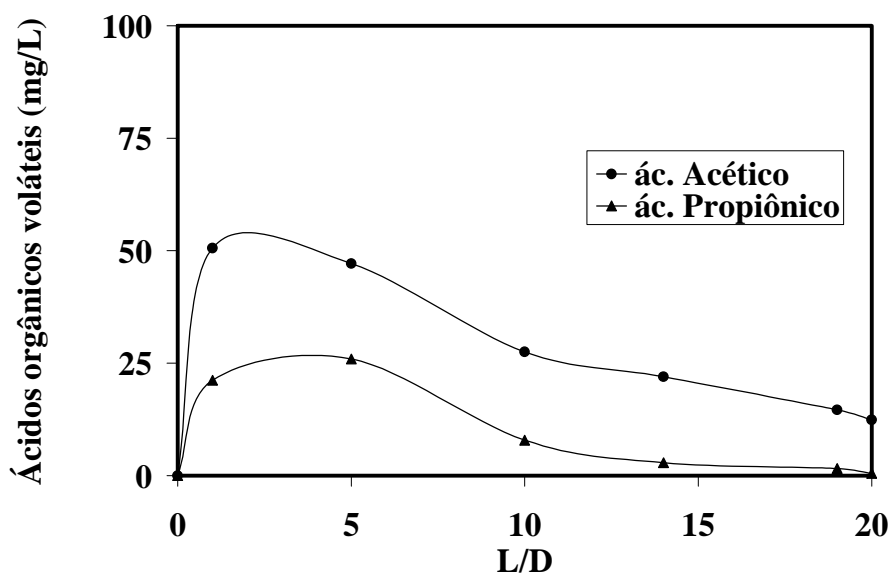


Figura 5.43 - Variação espacial dos valores de ácido acético e ácido propiônico da quarta etapa de operação do R2

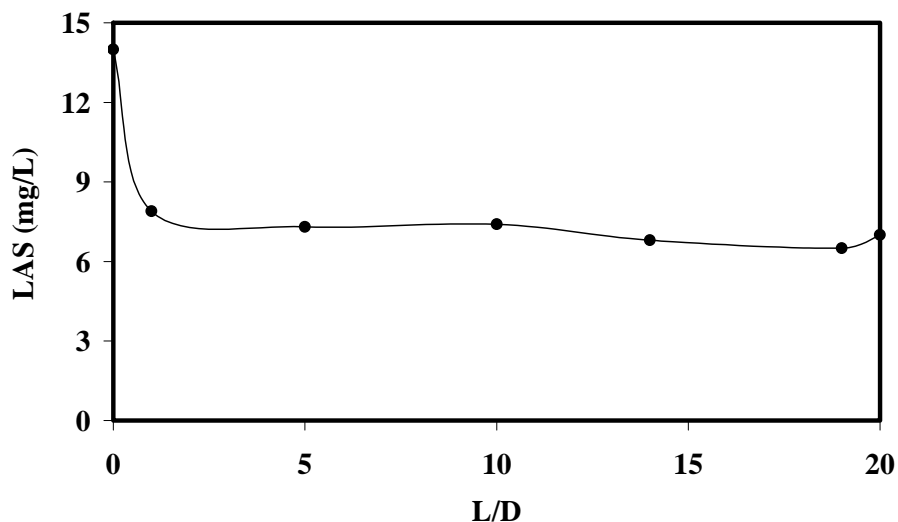


Figura 5.44 - Variação espacial dos valores de LAS na quarta etapa de operação do reator R2

Amostras dos efluentes dos reatores foram analisadas por cromatografia gasosa com a finalidade de detectar possíveis intermediários da degradação do LAS. Tolueno e benzeno foram detectados em concentrações próximas a 20 $\mu\text{g/L}$. Provavelmente, esses compostos foram originados da ruptura da ligação do anel aromático com a cadeia alquílica.

Os experimentos para avaliar a degradação anaeróbia de LAS são todos conduzidos por longos períodos de tempo (TDH = 15 dias e 250 dias de operação), sendo, a maioria, realizada em batelada (SANZ et al., 1999; PRATS et al., 2000) ou em reatores UASB (ANGELIDAKI et al., 2000; HAAGENSEN et al., 2002). Além disso, são raras as informações sobre a identificação dos metabólitos da degradação. Somente, em condições termofílicas foram identificados os ácidos benzenossulfônico e benzaldeído no efluente de reator anaeróbio UASB, tratando 2 mg/L de LAS, com TDH de 12 horas (MONGENSEN & AHRING, 2002).

Nessa etapa (etapa IV) a concentração de sulfato afluente ao reator R1 permaneceu próxima a 10 mg/L, enquanto, no afluente do reator R2 esse valor foi de 5 mg/L, provavelmente o extrato de levedura continha sulfato. Os reatores apresentaram comportamento distinto em relação ao sulfato (Figura 5.45 e 5.46), no reator R1 ocorreu redução de sulfato; ou seja, as concentrações foram de 1 mg/L e 14 mg/L no efluente e afluente, respectivamente. Porém, no reator R2, esse valor foi de

15 mg/L no efluente. Esse aumento na concentração de sulfato no reator R2 provavelmente ocorreu devido à dessulfonação do anel aromático presente na molécula de LAS, e sulfito foi oxidado a sulfato, uma vez que nenhuma fonte de sulfato foi adicionada aos reatores, e a alimentação consistia de solução de sais, bicarbonato, extrato de carne e surfactante. Os microrganismos presentes no biofilme, provavelmente, utilizaram sulfato tanto para assimilação quanto para redução desassimilativa.

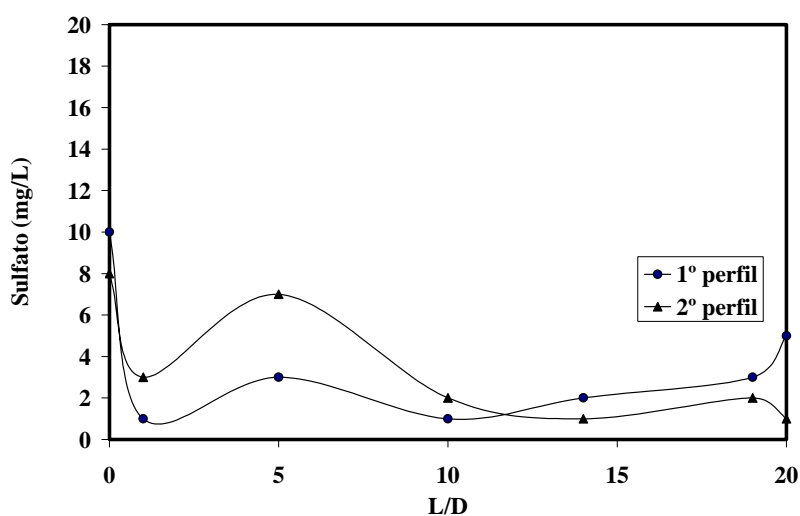


Figura 5.45 - Variação espacial dos valores de sulfato na quarta etapa de operação do reator R1

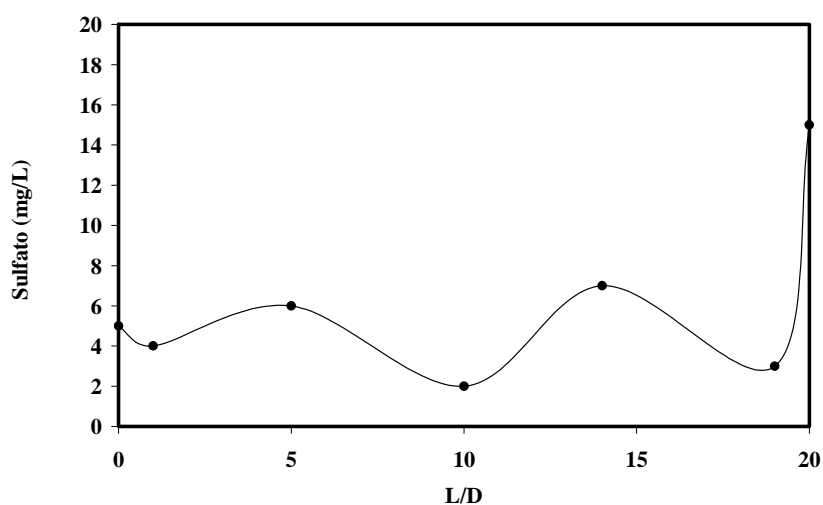


Figura 5. 46 - Variação espacial dos valores de sulfato na quarta etapa de operação do reator R2

Algumas bactérias redutoras de sulfato não oxidam acetato, mas ganham energia para o crescimento unicamente pelo desproporcionamento do tiosulfato a sulfato e sulfeto. O acetato é usado somente como fonte de carbono para síntese celular (BAK & PFENNING, 1987). A presença de doadores de elétrons orgânicos e tiosulfato e sulfito, *Desulfovibrio sulfodismutans* inicialmente desproporcionou os compostos de enxofre e então oxidou os substratos orgânicos com formação de sulfato, a partir do tiosulfato ou sulfito. O desproporcionamento do tiosulfato e sulfito ocorrem de acordo com as seguintes equações:



Portanto, as oscilações nos valores de sulfato podem ser originárias das seguintes considerações: (1) proveniente da oxidação direta do sulfito da molécula de LAS, (2) proveniente da desproporcionamento biológico do sulfito, uma vez que foram identificadas bactérias semelhantes à *Desulfovibrio* no biofilme dos reatores, (3) e fundamentalmente devido a distribuição heterogênea da biomassa no leito do reator capaz de utilizar o sulfato para redução assimilativa e desassimilativa.

Por outro lado, as concentrações de sulfeto (Figura 5.47 e 5.48) apresentaram valores menores que 2 mg/L ao longo dos reatores R1 e R2. Provavelmente, o sulfeto proveniente da redução do sulfato foi utilizado por bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. e *Chromatium* sp. como constatadas no sequenciamento do RNAr 16S e exames microscópicos, respectivamente.

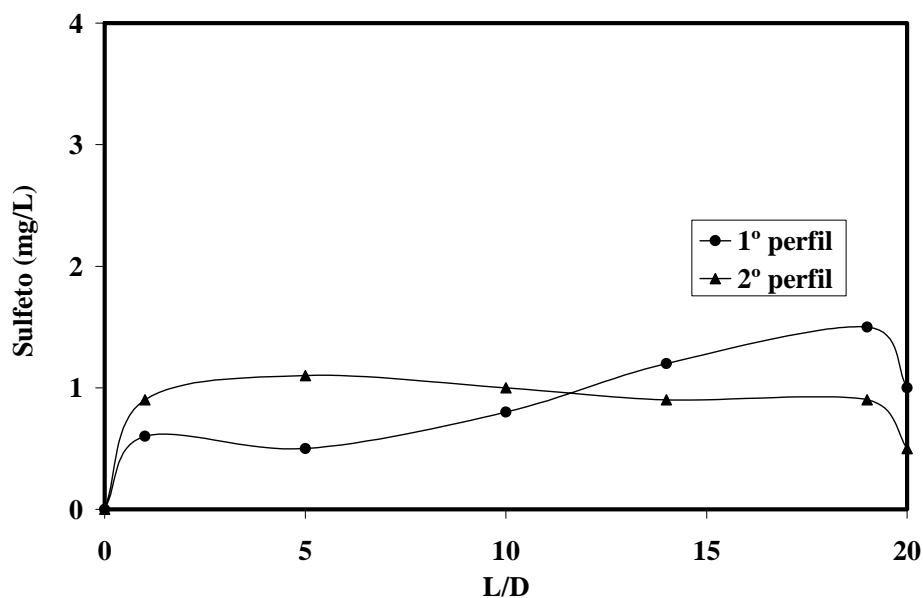


Figura 5.47 - Variação espacial dos valores de sulfeto na quarta etapa de operação do reator R1

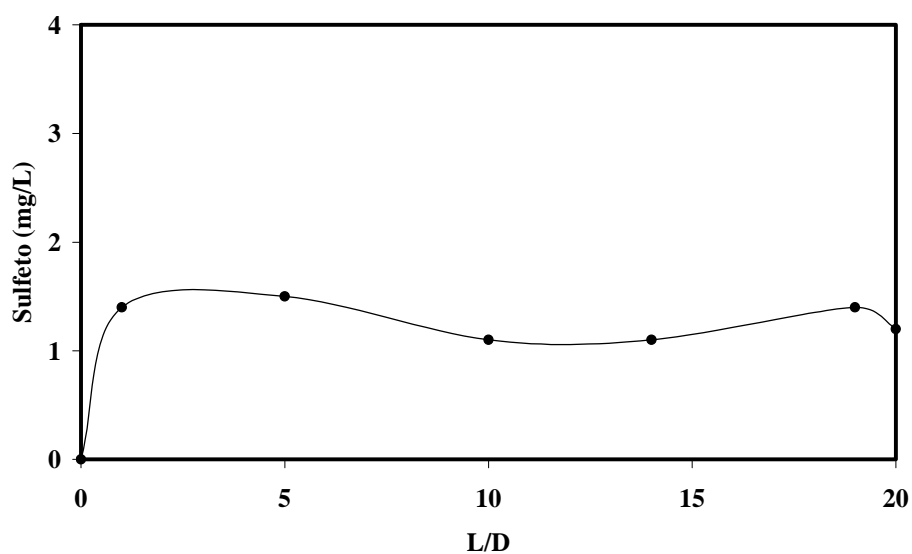


Figura 5.48 - Variação espacial dos valores de sulfeto na quarta etapa de operação do reator R2

A quinta etapa (Etapa V) de operação (255 a 313 dias) somente foi realizada no reator R2, onde as fontes orgânicas, sacarose e extrato de carne, considerados co-substratos, foram retiradas da alimentação. Essa etapa foi iniciada aos 255 dias de

operação e finalizada com 313 dias; ou seja, 58 dias de alimentação nessas condições. A presença de 14 mg/L de LAS, única fonte orgânica reduziu a DQO afluente para valores de aproximadamente 41 ± 9 mg/L, impossibilitando a utilização da determinação de DQO pela metodologia empregada. O pH e a alcalinidade afluente foram mantidos pela adição de bicarbonato de sódio e os valores foram iguais a $7,47 \pm 0,53$ e 199 ± 23 mg CaCO_3/L , respectivamente. Os valores de alcalinidade e ácidos no efluente foram de 221 ± 88 mg/L e 24 ± 8 mgHac/L, respectivamente. A concentração de metano no biogás cessou logo após a retirada das fontes de carbono adicionais. As concentrações de ácidos orgânicos apresentarem-se abaixo do limite de detecção do método cromatográfico.

Nessas condições, a remoção de LAS variou de 55 a 91%, e na análise de variação espacial ao longo do leito do reator R2, a remoção foi de 86%, com 1,9 mg/L do surfactante no efluente (Figura 5.49).

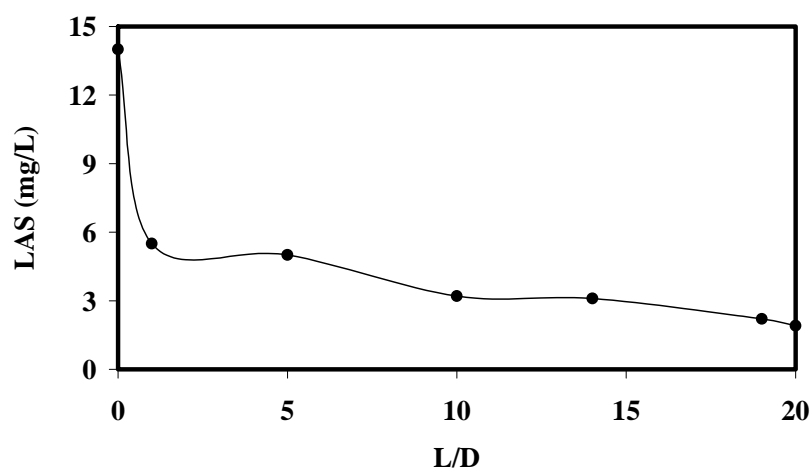


Figura 5.49 - Variação espacial dos valores de LAS realizado na quinta etapa de operação do reator R2

A concentração de sulfato afluente foi de 1 mg/L, sendo proveniente do LAS. Na fabricação do surfactante pode haver um residual de sulfato resultante do processo de sulfonação do anel aromático, no entanto o método empregado para medir sulfato não detecta o grupo sulfito da molécula. Essa concentração de sulfato de 1 mg/L passou para 47 mg/L na posição $L/D=10$ (Figura 5.50), nessa mesma

posição, a remoção de LAS foi de 77% (figura 5.49). Porém não houve incremento na concentração de sulfeto. Na posição L/D=14, a degradação de LAS permaneceu inalterada e, sulfato foi totalmente consumido, mas a concentração de sulfeto não foi alterada. Em concentrações reduzidas, sulfato é suficiente apenas para que ocorra a redução assimilativa e, portanto, sulfeto não é gerado (Figura 5.51). Todavia, o sulfeto pode ter sido produzido e, imediatamente consumido por outros microrganismos. Na posição L/D=19 a degradação de LAS atingiu 84% e a concentração de sulfato voltou a aumentar, atingindo 16 mg/L. Nessa etapa foram observadas, também, bactérias semelhantes a *Chromatium* sp., que utilizam sulfeto de hidrogênio no crescimento fototrófico, incorporando enxofre elementar no interior da célula, e o sulfeto e o enxofre são oxidados a sulfato. Tais bactérias realizam fotossíntese anoxigênica em condições fotoautotróficas ou fotoheterotróficas, todavia, as exigências relacionadas a quantidade e qualidade de luz são menores do que as mencionadas na literatura; uma vez que essas células são observadas constantemente em reatores anaeróbios sem luz direta incidente.

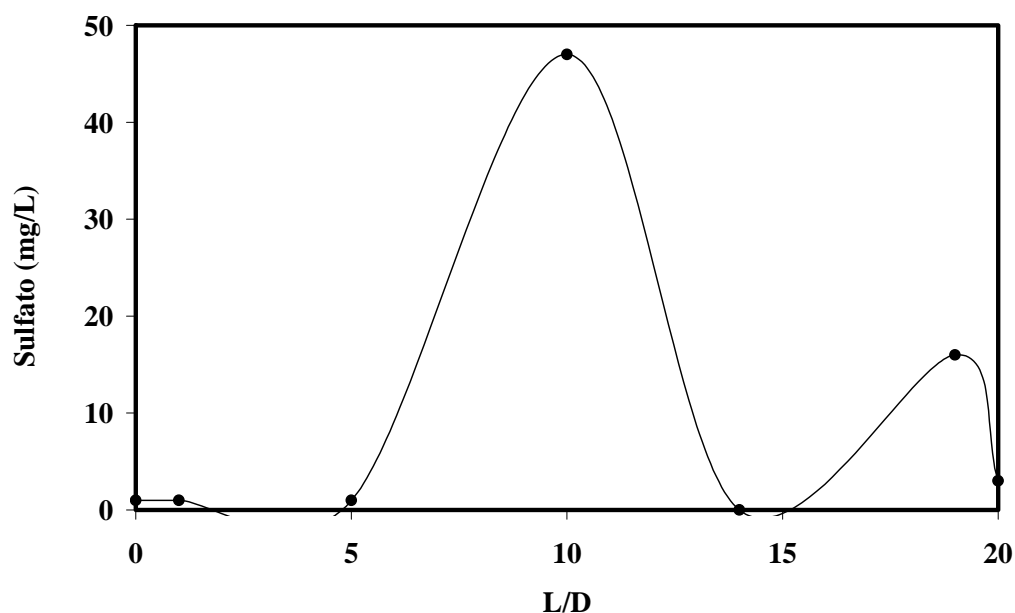


Figura 5.50 - Variação espacial dos valores de sulfato na quinta etapa de operação do reator R2

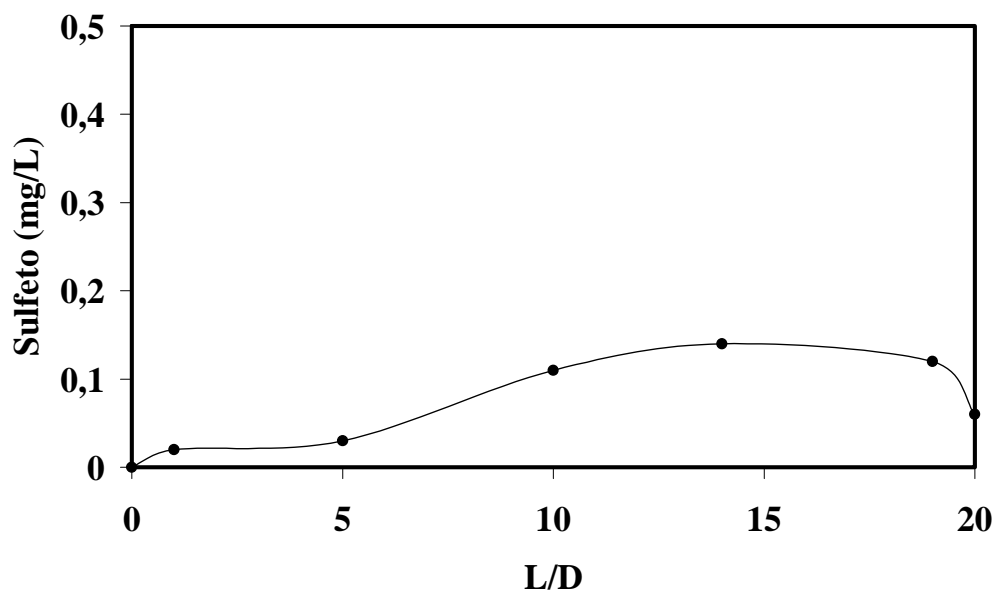


Figura 5.51 - Variação espacial dos valores de sulfeto na quinta etapa de operação do reator R2

Cordon et al. (1968) observaram que, em sistemas de lodos ativados (escala de bancada), ocorreu liberação de sulfato proveniente do grupo sulfonado do LAS, após 21 dias de operação, correspondendo a 89% da quantidade teórica de LAS adicionado ao reator. Resultados similares foram obtidos por Pecenic et al. (1984) usando LAS com enxofre marcado.

Segundo Perales et al. (2003), alguns pesquisadores observaram que a partir da liberação de sulfato, proveniente da ruptura do anel aromático e, conseqüente dessulfonação são os estágios finais da rota de degradação do LAS.

As reações de dessulfonação em condições anaeróbias passaram a ser conhecidas após 1994 (DENGER et al., 1996). A dessulfonação envolve assimilação do enxofre seguido da dissimilação (redução) associada com a respiração anaeróbia (LIE et al., 1996).

Os sulfonados podem ser metabolizados como fonte de carbono, energia e enxofre pelas bactérias aeróbias. Estudos mais recentes demonstraram que enxofre dos sulfonados pode ser assimilado também pelas bactérias anaeróbias. *Clostridium pasteurianum* foi capaz de assimilar enxofre de diferentes grupos sulfonados em condições fermentativas, mas não utilizou o sulfonado como fonte de nutrientes. O

enxofre do sulfato é mais facilmente usado que o enxofre do grupo sulfonado (CHIEN et al., 1995).

LAS foi dessulfonado sob condições anóxicas sob carência de enxofre (DENGER & COOK, 1999), pela linhagem RZLAS, que, após seqüenciada, foi identificada como *Clostridium* sp. Essa bactéria cresceu exponencialmente na presença de LAS como fonte de enxofre. *Clostridium* spp. catalisaram a reação de dessulfonação do LAS, mas não foi detectado nenhum produto de dessulfonação.

Lie et al (1996) examinaram a capacidade de várias bactérias redutoras de sulfato em utilizarem sulfonados como aceptores de elétrons na respiração anaeróbia. Observaram que *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfomicrobium baculatus* e *Desulfobacterium autotrophicans* foram capazes de crescer com sulfonados como fontes de enxofre. *Pseudomona putida* também cresceu com sulfonados aromáticos como fonte de enxofre (KERTESZ et al., 1994).

Na ausência de sulfato algumas culturas bacterianas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, produzem proteínas extracelulares induzidas pela ausência dessa fonte de enxofre. Segundo Denger et al (1996) *Clostridium* sp. EV4 produz enzima arilssulfatase em resposta à falta de sulfato.

Nos experimentos com *Pseudomonas putida* realizados por Kertesz et al. (1996), nenhuma reação de dessulfonação foi observada na presença de sulfato, mas alcanos sulfonados foram convertidos na presença de metionina a ácidos carboxílicos, ésteres de aril- ou alquil- sulfatos ou ciclamato.

Nas Figuras 5.52 e 5.53 estão apresentadas as concentrações de LAS durante os monitoramentos dos reatores R1 e R2, respectivamente. Pôde-se observar que a concentração de LAS permaneceu constante a 7 mg/L na etapa IV de operação. No entanto no reator R2, com alimentação constituída somente de LAS, a concentração de LAS no efluente diminuiu até atingir concentrações próximas a 1 mg/L. Dessa maneira as eficiências de remoção no reator R1 manteve-se em 50% (Figura 5.54), e no reator R2, no último dia de monitoramento atingiu 91% de eficiência de remoção (Figura 5.55)

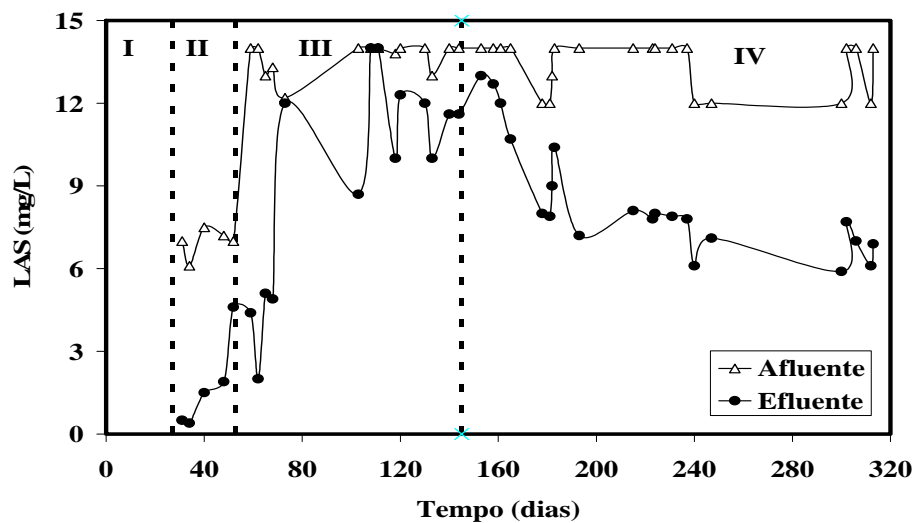


Figura 5.52 - Variação temporal dos valores de LAS na operação do reator R1

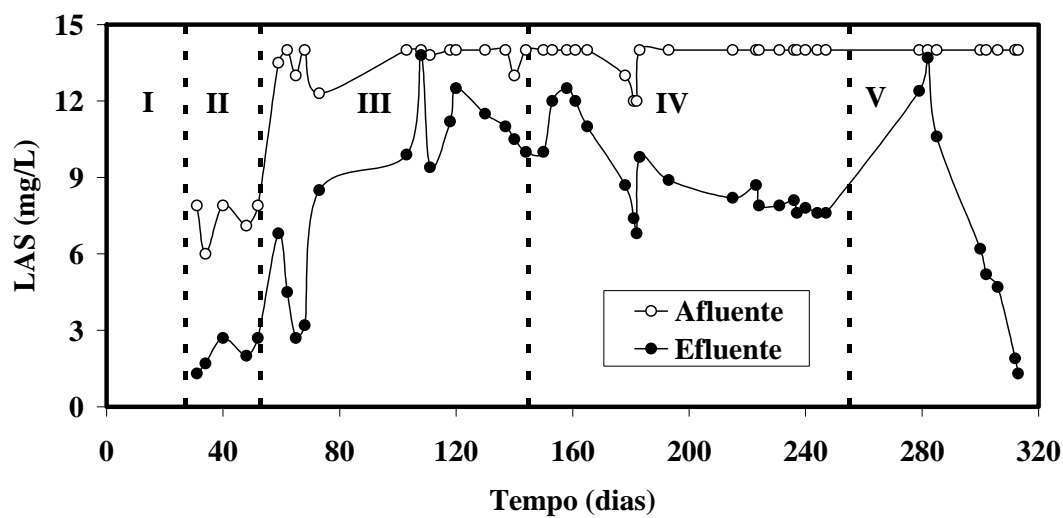


Figura 5.53 - Variação temporal dos valores de LAS na operação do reator R2

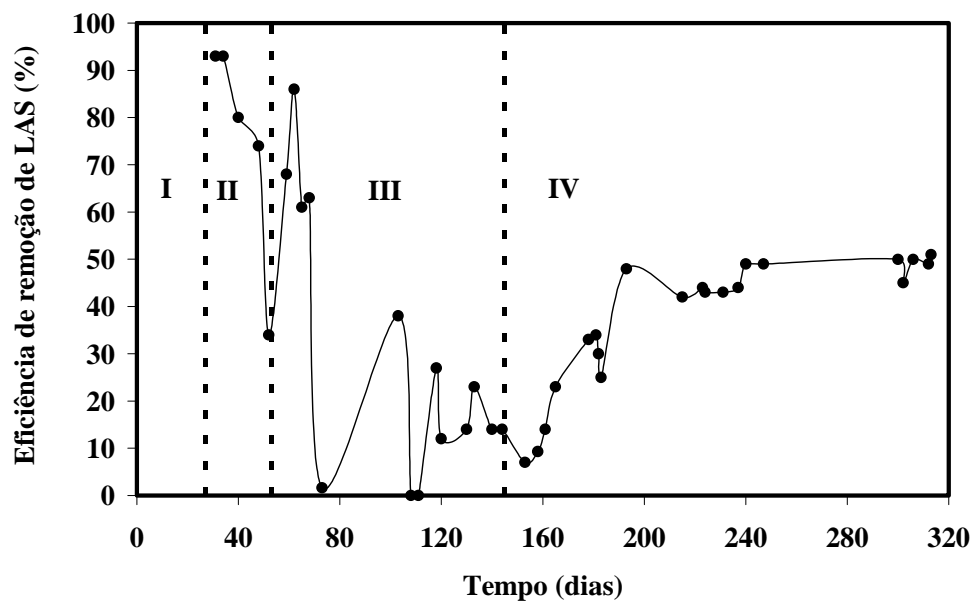


Figura 5.54 - Eficiência de remoção de LAS durante a operação do reator R1

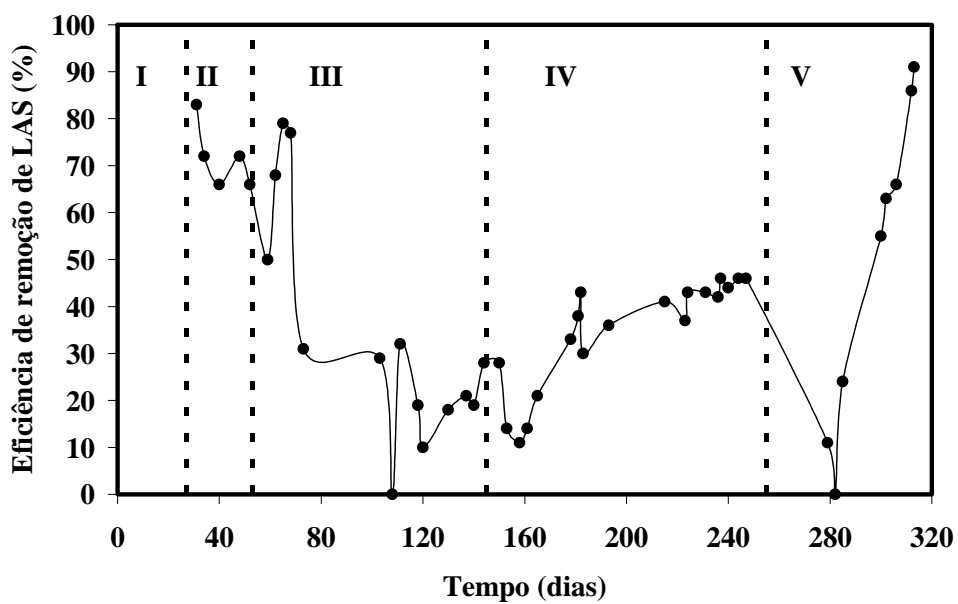


Figura 5.55 - Eficiência de remoção de LAS durante a operação do reator R2

Quanto à matéria orgânica expressa em DQO bruta e filtrada, os valores efluentes foram sempre menores que os afluentes, no entanto com o desequilíbrio dos

sistemas houve incremento na concentração efluente dos reatores (Figura 5.56, 5.57, 5.58 e 5.59). No entanto, com o tempo os sistemas voltaram à estabilidade e a matéria orgânica foi consumida. Os reatores não tiveram arraste significativo de sólidos, como pode ser observado nas eficiências de remoção de DQO bruta e filtrada apresentadas nas Figuras 5.59 e 5.60 para os reatores R1 e R2 respectivamente.

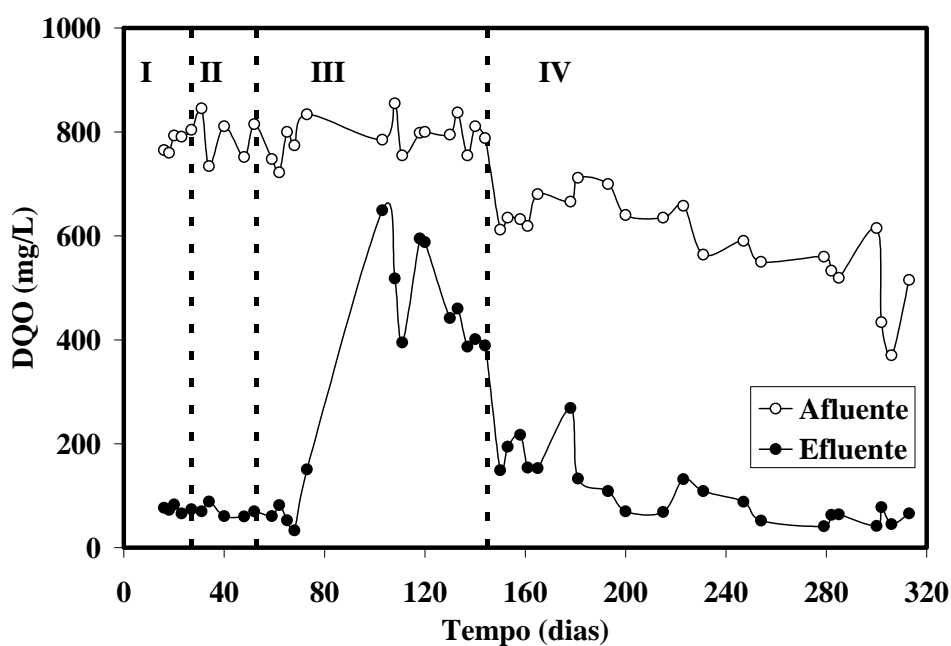


Figura 5. 56 - Variação temporal dos valores de DQO bruta durante a operação do reator R1

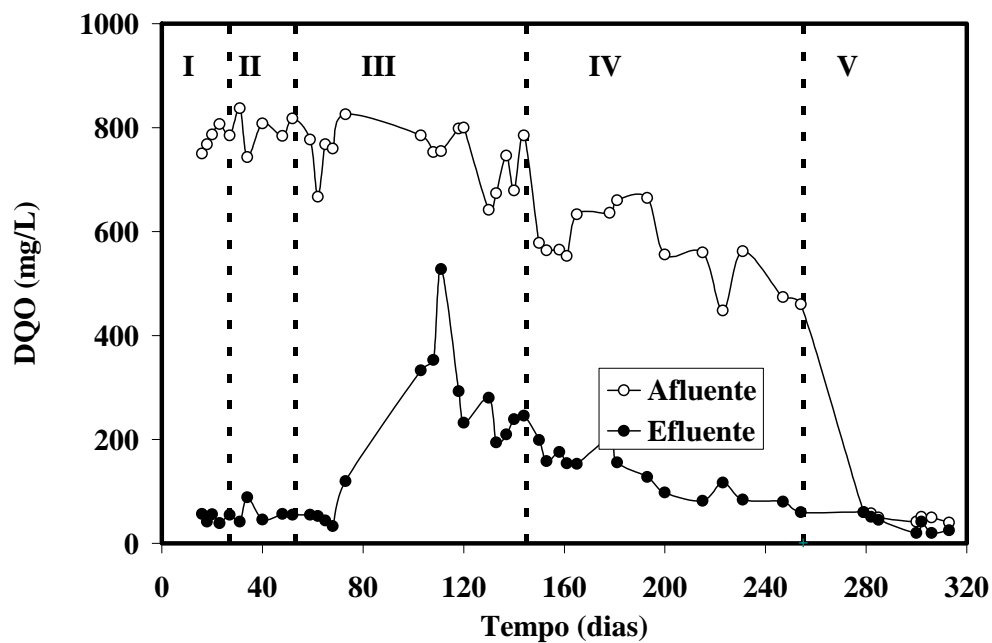


Figura 5.57 - Variação temporal dos valores de DQO bruta durante a operação do reator R2

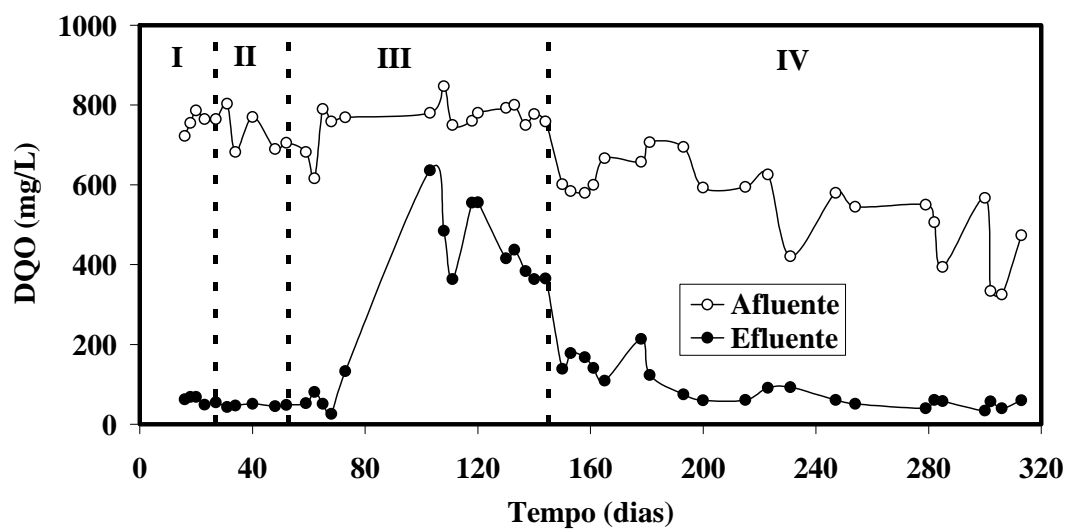


Figura 5. 58 - Variação temporal dos valores de DQO filtrada durante a operação do reator R1

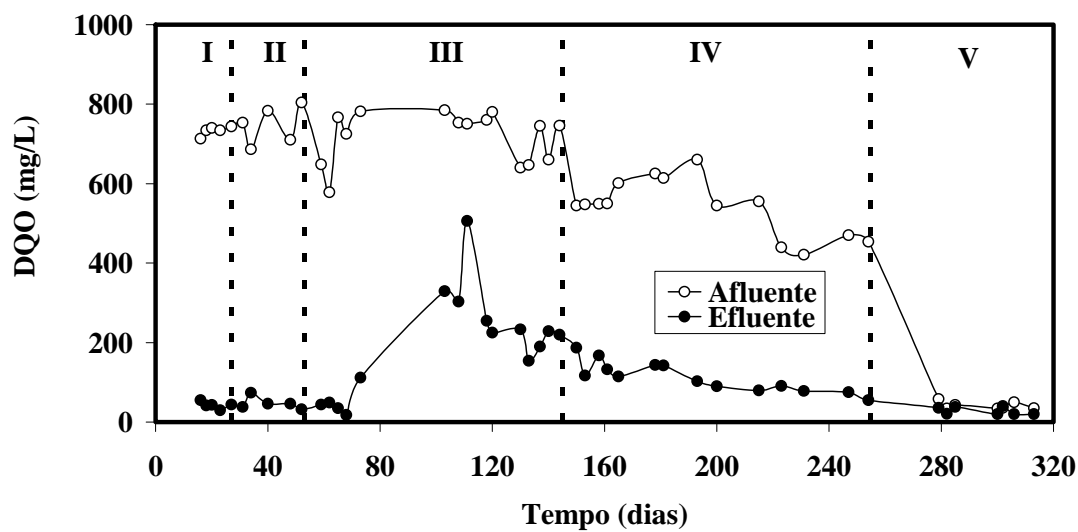


Figura 5.59 - Variação temporal dos valores de DQO filtrada durante a operação do reator R2

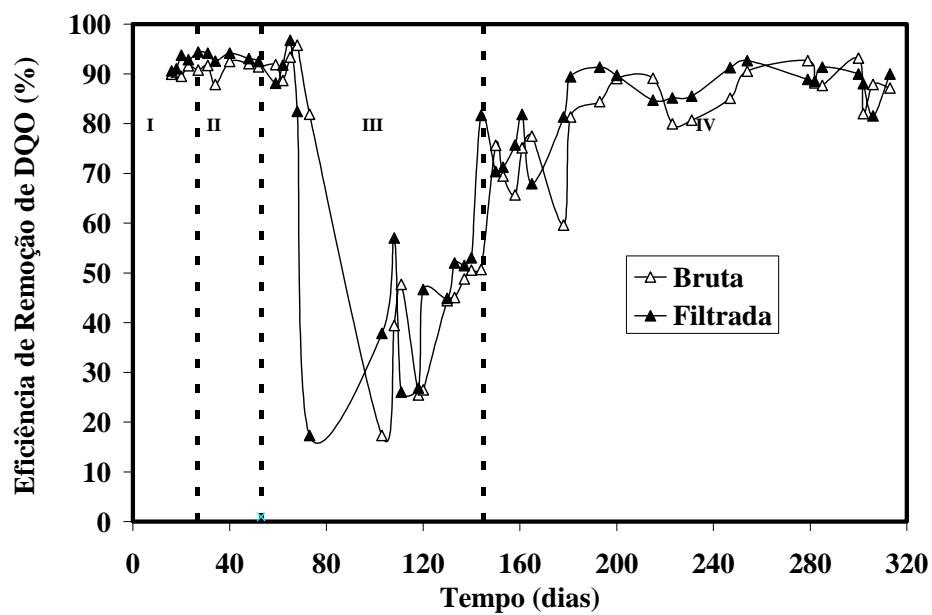


Figura 5.60 - Eficiência de remoção de DQO bruta e filtrada durante a operação do reator R1

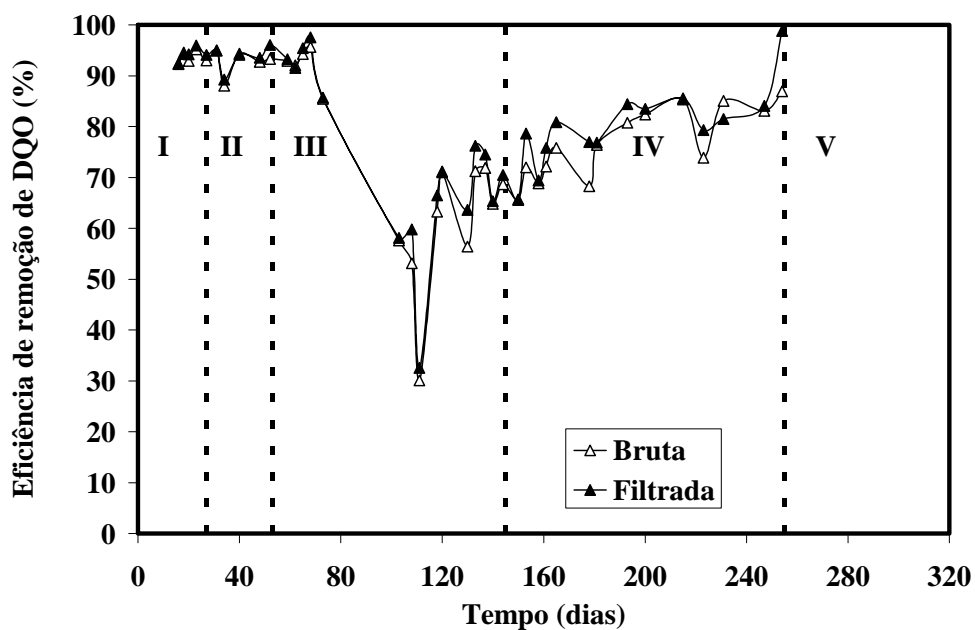


Figura 5.61 - Eficiência de remoção de DQO bruta e filtrada durante a operação do reator R2

A alcalinidade a bicarbonato foi gerada durante a operação dos reatores, sendo sempre maior no efluente do que no afluente. No entanto concentrações menores de alcalinidade no efluente foram observadas quando ocorreu a colmatção no leito (Figura 5.62 e 5.63).

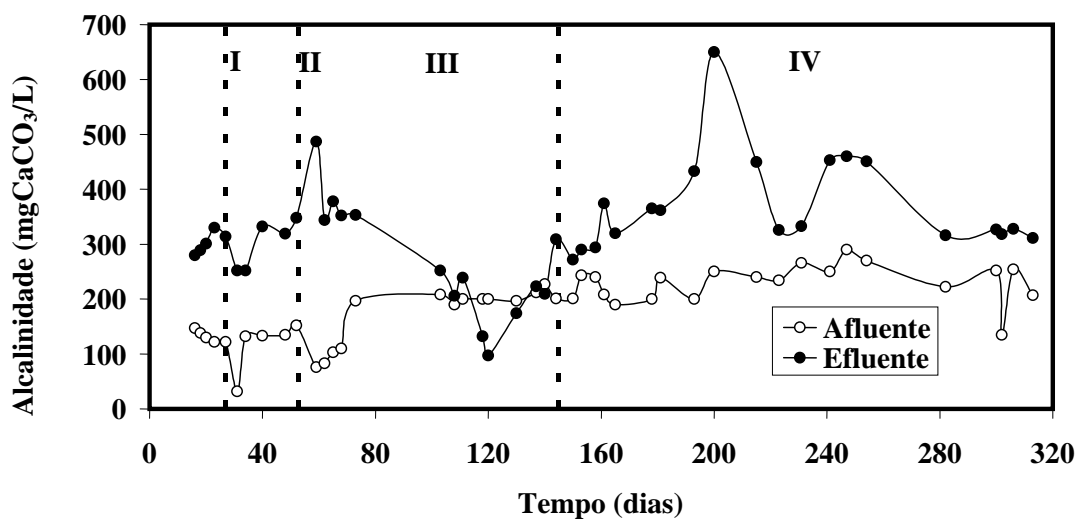


Figura 5.62 - Variação temporal dos valores de alcalinidade a bicarbonato durante a operação do reator R1

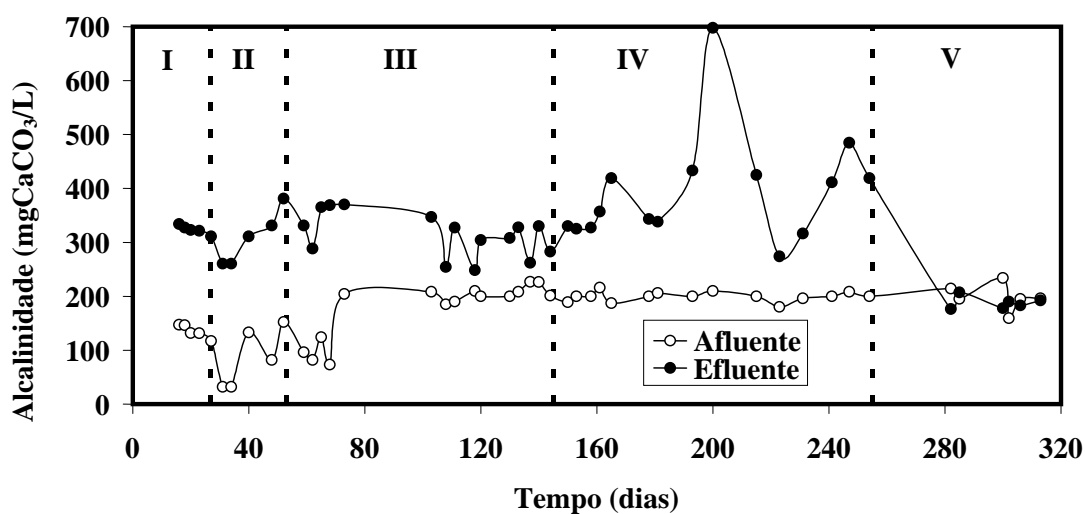


Figura 5.63 - Variação temporal dos valores de alcalinidade a bicarbonato durante a operação do reator R2

Os reatores apresentaram baixas produções de ácidos voláteis, sendo que no reator R1 esses ácidos atingiram índices mais elevados na etapa III (desequilíbrio) acarretando aumento na concentração de matéria orgânica (Figura 5.64). No reator R2 esse desequilíbrio na concentração de ácidos foi menos acentuado como pode ser observado na Figura 5.65.

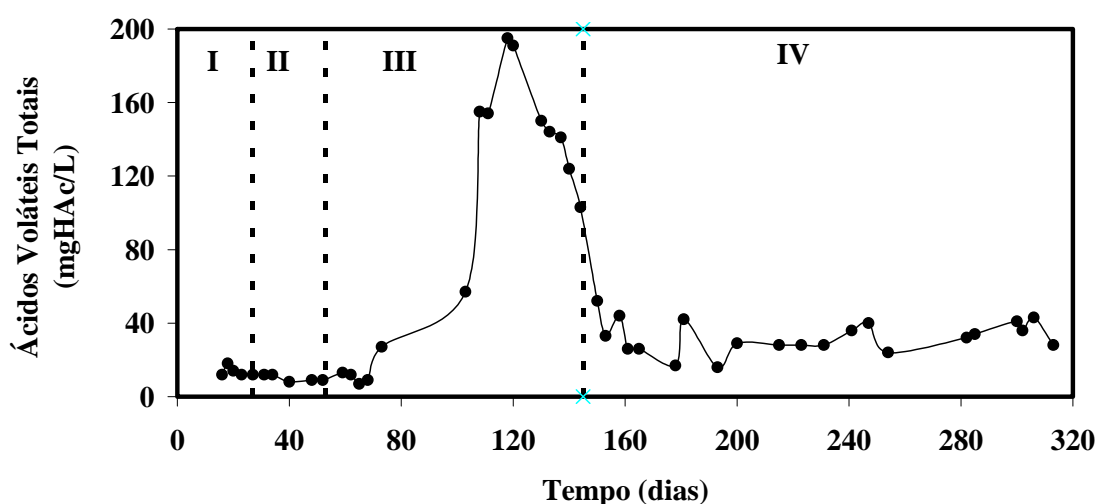


Figura 5.64 - Variação temporal dos valores de ácidos voláteis totais no efluente durante a operação do reator R1

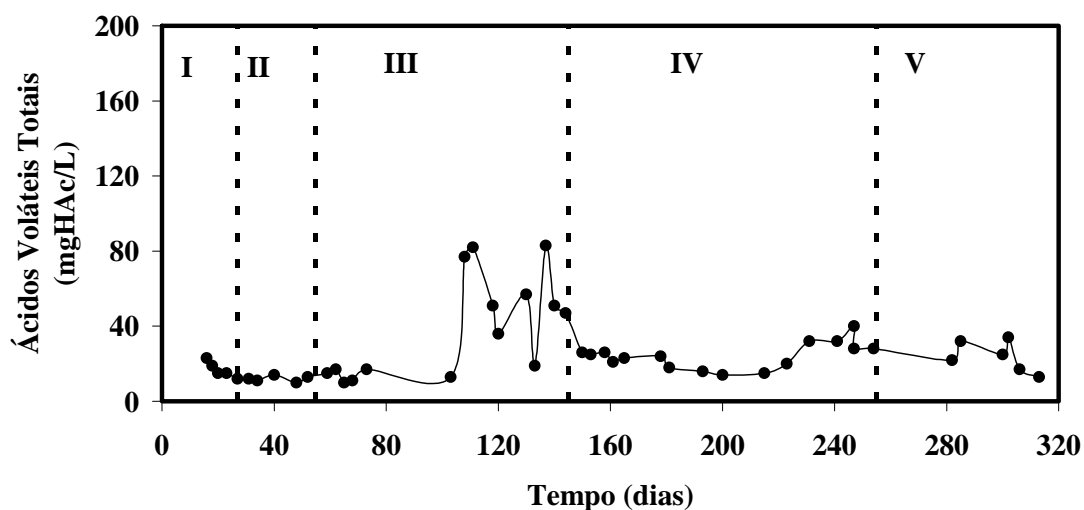


Figura 5.65 - Variação temporal dos valores de ácidos voláteis totais no efluente durante a operação do reator R2

Amostras de espumas foram retiradas ao longo do reator para determinação das concentrações de STV. Os reatores R1 e R2 apresentaram concentrações de 0,25 gSTV/g espuma, e 0,41 g STV/g espuma, respectivamente, após 144 dias de operação (Etapa III). A concentração de STV no reator R1 aumentou de 0,25 para 0,29 gSTV/g espuma, com 313 dias de operação na quarta etapa. No entanto, a biomassa no reator R2 apresentou ligeira redução de 0,41 para 0,39 g STV/g espuma (Figura 5.66) com 245 dias de operação. Essa redução na concentração de STV no reator R2 deve ter ocorrido devido à ausência de amido (Etapa IV) na composição do esgoto sintético. Porém no reator R1 o extrato de levedura (Etapa IV) supriu essa deficiência nutricional. A ausência de fontes de carbono na alimentação do reator R2 (Etapa V) inviabilizou o crescimento da biomassa e, conseqüentemente a concentração de STV (Figura 5.65) diminuiu de 0,39 gSTV/g espuma para 0,23 gSTV/g espuma. Por outro lado, essa ausência favoreceu o consumo do LAS como fonte de carbono e, provavelmente, como fonte de enxofre para as bactérias redutoras de sulfato presentes na biomassa.

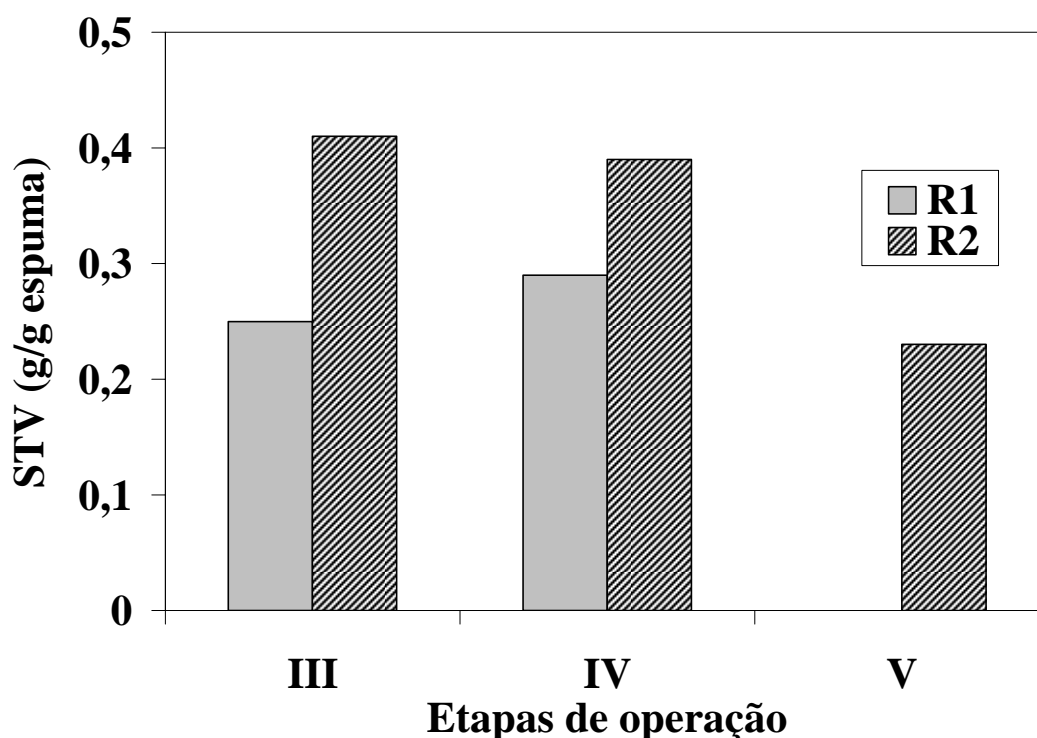


Figura 5.66 - Valores de sólidos totais voláteis nos reatores para as diferentes etapas de operação

5.6.1 Balanço de massa de LAS

A massa aproximada de LAS aplicada nos reatores R1 e R2 até o 108º dia de operação (durante a Etapa III) foi de 1382 mg e 1408 mg, respectivamente. A massa de LAS efluente foi de 816 mg e 771mg e, as eficiências de remoção de 41% e 45%, respectivamente. As remoções foram atribuídas à ação conjunta dos fenômenos de adsorção, na espuma de poliuretano e biofilme, além da degradação microbiana.

A massa de LAS aplicada ao reator R1 a partir do 109º dia (durante a Etapa III) até o final da operação (313 dias – Etapa IV) foi de 4400 mg, sendo 2800 g a massa descartada no efluente, resultando conseqüentemente, em 36% de remoção. Considerando o balanço de massa global, isto é, do primeiro dia de adição de 7 ± 1 mg/L LAS (28 dias de operação do RAHLF – Etapa II) até o último dia de operação (313 dias – Etapa IV), a massa de LAS aplicada no reator foi de 5782 mg, sendo 3616 mg descartados no efluente e 165 mg adsorvidas no biofilme. Assim, o resultado da degradação foi de 35% de eficiência (Tabela 5.16).

Tabela 5.16 – Balanço de Massa de LAS no reator R1

Período (dias)	Massa de LAS aplicada (mg)	Massa de LAS no efluente (mg)	Massa de LAS adsorvida (mg)	Remoção (%)
28 a 108°	1382	816		41
109 a 313°	4400	2800		37
28 a 313°	5782	3616	165	35

Para o reator R2, a massa de LAS aplicada a partir do 109° dia (durante a Etapa III), até o final da etapa IV (247° dia) foi de 3100 mg, e a remanescente no efluente, de 2100 mg, resultando em 32% de degradação. Na ausência de co-substratos (Etapa V – 245° a 313° dias) a massa de LAS aplicada ao reator foi de 1500 mg, sendo 900 mg presentes no efluente e, conseqüentemente atingindo 38% de degradação. Esse aumento na eficiência de degradação de 32% para 38% pode ser interpretado como possível utilização de LAS como principal substrato. Porém, no balanço de massa global foram adicionados 6008 mg de LAS, sendo recuperado 3771 mg no efluente e 177 mg adsorvidos no biofilme, resultando em 34% de degradação (Tabela 5.17).

Tabela 5.17 – Balanço de Massa de LAS no reator R2

Período (dias)	Massa de LAS aplicada (mg)	Massa de LAS no efluente (mg)	Massa de LAS adsorvida (mg)	Remoção (%)
28 a 108°	1408	771		45
109 a 254°	3100	2100		32
255 a 313°	1500	900		
28 a 313°	6008	3771	177	34

Portanto, ambos inóculos usados foram capazes de degradar LAS. Diferenças nas porcentagens de degradação foram atribuídas às mudanças operacionais distintas, embora com valores de degradação extremamente próximos.

Almendariz *et al.* (2001) observaram degradação de LAS de 41% após 250 dias de operação, para concentrações iniciais de 20 e 50 mg/L, em reatores UASB compartimentado acidogênico/metanogênico.

Sanz *et al.* (2003) observaram eficiência de degradação na faixa de 64 a 85% de LAS, para concentrações iniciais de 4 a 5mg/L, em reatores UASB inoculados com lodo granular proveniente de reator UASB usado no tratamento de efluentes de fábrica de açúcar de beterraba. Na ausência de co-substratos as porcentagens de degradação foram maiores. Segundo os autores, o surfactante pode ter sido usado como fonte de carbono e de energia pelas bactérias.

Lobner *et al.* (2005) estudaram a degradação anaeróbia de 10 mg/L de LAS em reatores UASB, operados em condições mesofílicas (37°C) e termofílicas (55°C). O inóculo usado foi uma mistura de lodo granular proveniente de fábrica de lactato e lodo digerido de sistema de tratamento de esgoto. Os reatores foram operados por 267 dias com TDH de 2 dias. As remoções de LAS atingiram 40 e 80%, em condições mesofílicas e termofílicas, respectivamente.

Neste trabalho, sob condições mesofílicas (30°C) a degradação de LAS nos reatores anaeróbios horizontais com espuma de poliuretano inoculados com lodo de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura e lodo de reator UASB usado no tratamento de esgoto sanitário foi de 34% e 35%, após 313 dias de operação, para concentração afluente de 14 mg/L de LAS.

5.7 Análise da Comunidade Microbiana

A diversidade microbiana foi monitorada por exames microscópicos e técnicas de biologia molecular (PCR/DGGE) de amostras do biofilme provenientes dos reatores R1 e R2. Nessa fase é importante lembrar que os reatores R1 e R2 foram inoculados com lodo anaeróbio de diferentes origens, ou seja, biomassa proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de esgoto sanitário e de dejetos de suinocultura, respectivamente. Os exames microbiológicos revelaram a existência de estratificação morfológica ao longo do comprimento dos reatores.

Filamentos longos e delgados, seguido de bacilos, bacilos curvos e cocos (Figura 5.67) predominaram no reator R1 (Tabela 5.18). Morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. foram pouco observadas, e presentes somente no primeiro trecho do reator (L/D=1).

No reator R2, bacilos foram predominantes (Tabela 5.19). A presença de *Methanosaeta* sp. foi mais marcante nos últimos trechos, e essa população deve ter

consumido o ácido acético produzido no início do reator. Os bacilos curvos também estiveram presentes, mas somente nos dois primeiros trechos (L/D= 1 e 5). Cocos isolados e em cadeia tiveram presenças significativas na biomassa anaeróbia, principalmente na posição L/D=1 e 5 (Figura 5.68).

Com o distanciamento da entrada do afluente, a diversidade microbiana foi reduzida em ambos aos reatores, provavelmente devido à restrição de nutrientes.

Tabela 5.18 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 durante a primeira etapa de alimentação com esgoto sintético

Morfologias	FREQÜÊNCIA L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	+++	+	+	+	++++
Bacilos curvos	+++	++++	+	-	-
Cocobacilos	++	-	-	-	-
Cocos	+++	+++	-	-	-
Espirilos	-	-	-	-	-
Filamento delgado e longo	++++	+++	++++	++	-
Filamento septado	-	-	-	-	-
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGÊNICAS					
Bacilos fluorescentes	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	+	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

Tabela 5.19 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 durante a primeira etapa de alimentação com esgoto sintético

Morfologias	FREQÜÊNCIA L/D				
	1	5	10	14	19

BACTÉRIAS					
Bacilos	+++	++++	+++	+++	+++
Bacilos curvos	+++	++	-	-	-
Cocobacilos	+	+	++	-	-
Cocos	+++	+	++++	-	++
Espirilos	-	-	-	-	-
Filamento delgado e longo	+++	+++	++	-	++
Filamento septado	-	-	+	-	-
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGÊNICAS					
Bacilos fluorescentes	++	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	+	++	+++	++
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

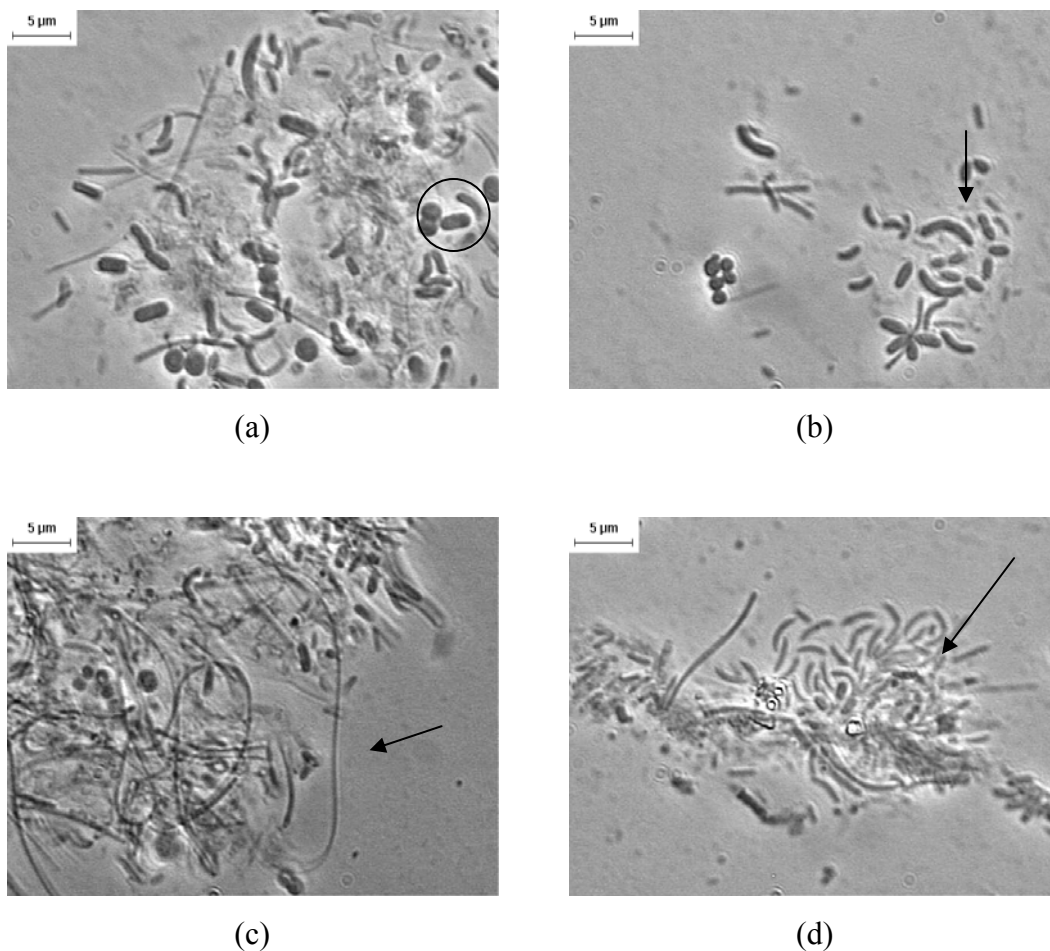


Figura 5.67 - Microscopia óptica de contraste de fase de morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na primeira etapa de operação do reator R1 alimentado com esgoto sintético: (a) diplococos, (b) bacilos curvos, (c) filamentos delgados e longos e (d) bacilos curvos

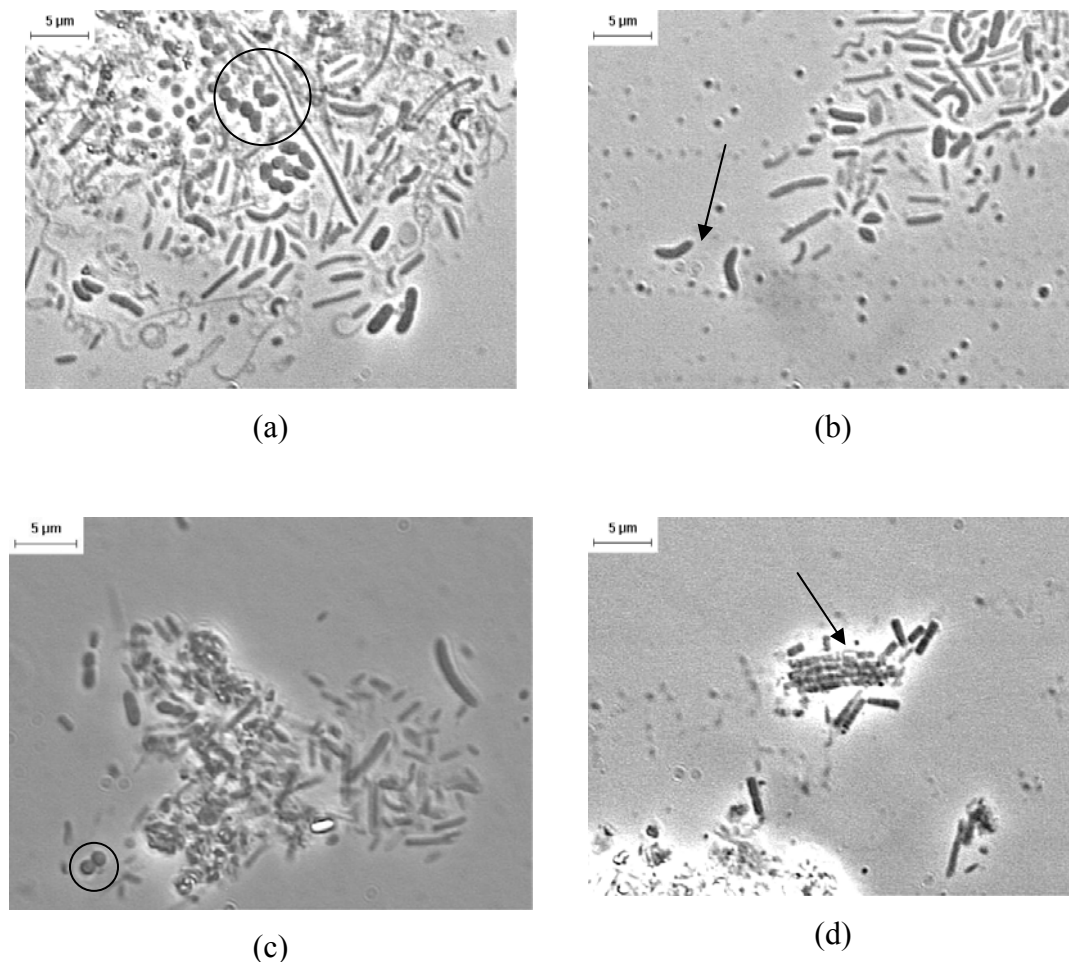


Figura 5.68 - Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano, na primeira etapa de operação do reator R2, alimentado com esgoto sintético: (a) cocos, cocobacilos, bacilos e filamento (b) bacilos e bacilos curvos, (c) cocos (d) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp.

Quando os reatores foram alimentados com esgoto sintético e 7 mg/L de LAS (53 dias de operação), no final da etapa II, as predominâncias das morfologias encontradas nas biomassas foram alteradas nos reatores. Os filamentos delgados e longos antes predominantes no reator R1 foram substituídos por bacilos curvos e bacilos. Os bacilos curvos sugerem morfologias relacionadas às bactérias redutoras de sulfato (Figura 5.69). Microscopia eletrônica de varredura foi realizada com amostras das espumas de poliuretano para constatar as morfologias presentes no

biofilme (Figura 5.70), porém a presença de material gelatinoso dificultou a visualização. Os bacilos curvos foram predominantes nos primeiros trechos (L/D= 1 e 5) do reator R2, enquanto, no restante (L/D =10, 14 e 19) os cocos foram os mais favorecidos (Tabela 5.20 e Figura 5.71 e 5.72).

Tabela 5.20 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 durante a segunda etapa de operação com esgoto sintético e LAS (7 mg/L)

Morfológicas	FREQUÊNCIA				
	L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	++	++++	+++-	+++-	-
Bacilos curvos	++++	+++	++++	++++	-
Cocobacilos	+++	+++	++	-	-
Cocos	-	-	-	-	-
Espirilos	+	+	+	+	+
Filamento delgado e longo	++	-	-	-	-
Filamento septado	+	-	-	-	++
Espirilos	++	++	-	-	-
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGENICAS					
Bacilos fluorescentes	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

Tabela 5.21 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 durante a segunda etapa de operação com esgoto sintético e LAS (7 mg/L)

Morfologias	FREQÜÊNCIA L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	+	++	-	-	-
Bacilos curvos	++++	++++	+++	++	-
Cocobacilos	+++	+	+	+	-
Cocos	+++	++	+++	++++	+++
Espirilos	-	-	-	-	-
Filamento delgado e longo	-	+	-	-	-
Filamento septado	-	-	-	-	-
Espirilo	-	-	-	-	-
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGÊNICAS					
Bacilos fluorescentes	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp	-	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

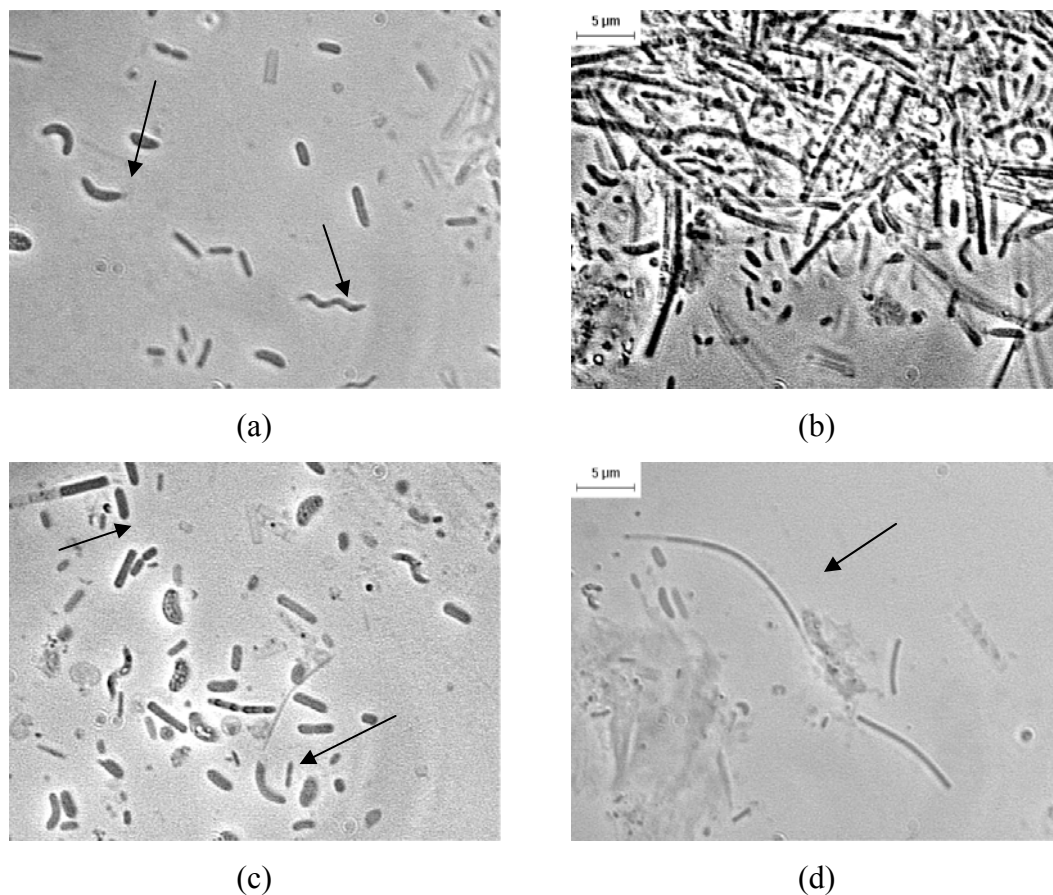


Figura 5.69 - Microscopia óptica de contraste de fase de morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na segunda etapa de operação do reator R1, alimentado com esgoto sintético e LAS (7 mg/L): (a) bacilos, bacilos curvos e espirilo, (b) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp., (c) bacilos e bacilos curvos e (d) filamentos

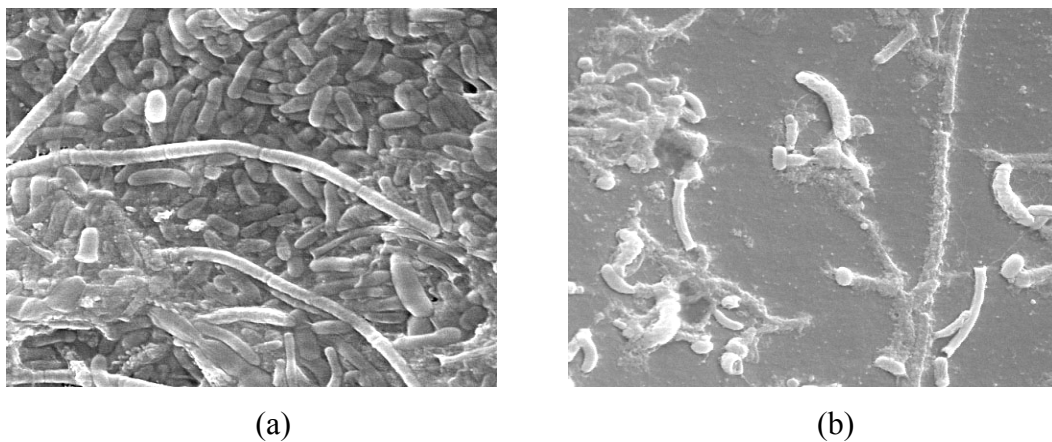


Figura 5.70 - Microscopia eletrônica de varredura (5000x) das amostras do biofilme do reator R1, na segunda etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (7 mg/L): (a) bacilos e (b) bacilos curvos

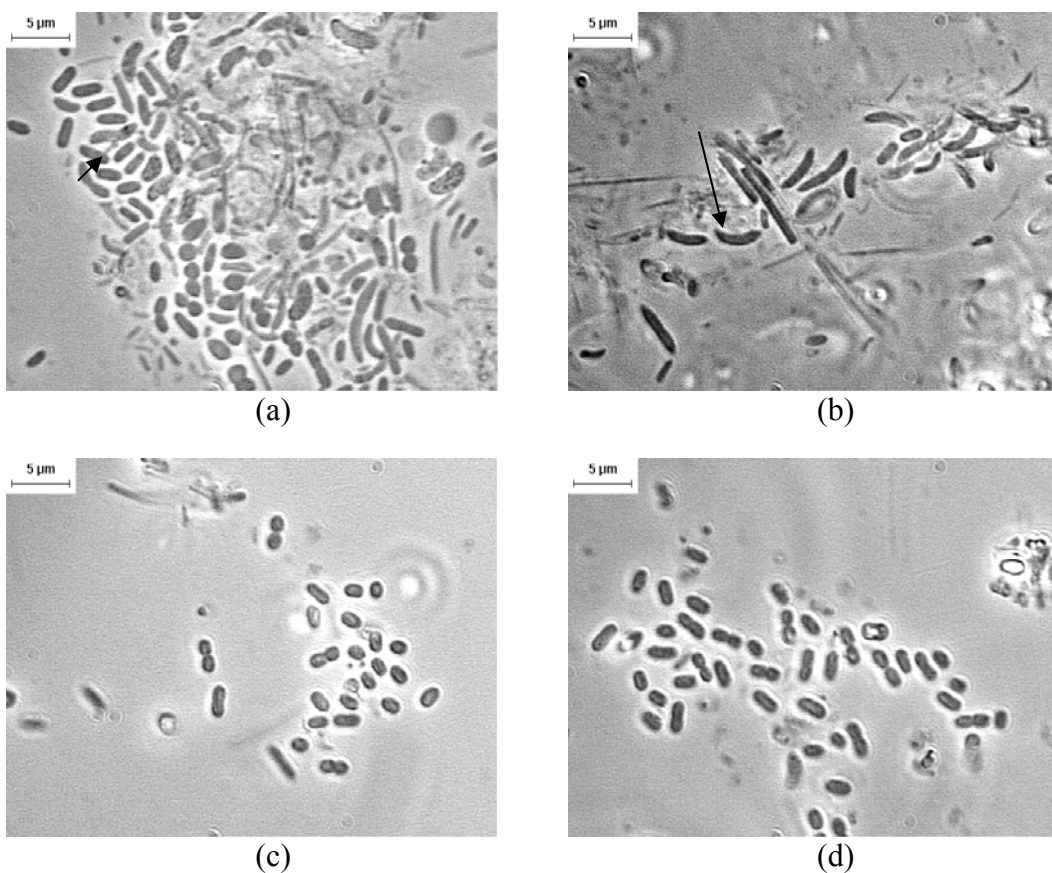


Figura 5.71 - Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano, na segunda etapa de operação do reator R2, alimentado com esgoto sintético e LAS (7 mg/L): (a)

bacilos, filamentos delgados e cocos, (b) bacilos curvos, (c) e (d) bacilos e cocobacilos

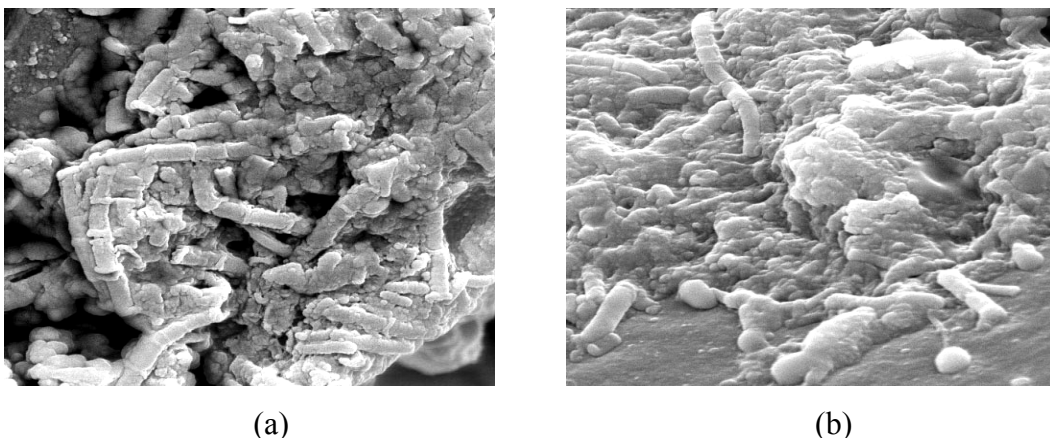


Figura 5.72 - Microscopia eletrônica de varredura (5000x) das amostras do biofilme do reator R2, na segunda etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (7 mg/L): (a) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp., (b) bacilos e cocos

Logo nos primeiros dias de alimentação dos reatores com esgoto sintético e LAS (14 mg/L), etapa III, a predominância das morfologias microbianas não foi alterada. Os bacilos curvos continuaram a predominar no reator R1, seguido por bacilos e cocos fluorescentes, com presenças significativas nesse período (Tabela 5.22 e Figura 5.73). No reator R2 também foram observados bacilos fluorescentes, mas as morfologias predominantes nessa etapa foram cocobacilos e bacilos curvos (Tabela 5.22, Figura 5.74).

No final dessa etapa, após colmatção dos leitos, bacilos e cocos fluorescentes não foram mais observados. (Tabela 5.22 e Tabela 5.23) nos reatores. Porém, a presença de espirilos foi constatada ao longo do reator R1. No reator R2 foram observadas morfologias semelhantes a *Methanosarcina* sp. (Tabela 5.24 e Tabela 5.25). Essa mudança na predominância das morfologias pode ser atribuída ao desequilíbrio dos reatores e ao longo tempo de exposição da biomassa ao LAS; ou seja, por período de 144 dias.

Tabela 5.22. Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 durante o primeiro perfil da terceira etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (14 mg/L), sem amido

Morfologias	FREQUÊNCIA				
	L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	+++	+++	++	+	+
Bacilos curvos	++++	++++	++	++	+++
Cocobacilos	+++	+++	++	++	-
Cocos	+++	-	-	-	-
Filamento delgado e longo	++	++	+	+	-
Filamento septado	+	++	+++	++	-
Espirilos	-	-		-	-
Chromatium sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGÊNICAS					
Bacilos fluorescentes	+++	+++	+++	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-		-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

Tabela 5.23 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 no segundo perfil da terceira etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (14 mg/L)

Morfologias	FREQUÊNCIA				
	L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	-	-	-	-	++
Bacilos curvos	+++	+++	-	++++	++
Cocobacilos	++++	++++	++++	-	++++
Cocos	-	-	-	-	-
Filamento delgado e longo	++	+	-	-	-
Filamento septado	+	+	-		-
Espirilos	-	++	+++	+++-	+++
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGENÉICAS					
Bacilos fluorescentes	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-		-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

Tabela 5.24 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 no primeiro perfil da terceira etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (14 mg/L)

Morfologias	FREQUÊNCIA				
	L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	+	++++	++	+-	+++
Bacilos curvos	+++	+	++	+++	++++
Cocobacilos	++++	+++	++	++++	-
Cocos	-	-	++++	-	-
Filamento delgado e longo	+	-	-	-	-
Filamento septado	+	-	-	++	-
Espirilos	-	-	+	+	+
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGÊNICAS					
Bacilos fluorescentes	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.			+		

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

Tabela 5.25 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 no segundo perfil da terceira etapa de alimentação com esgoto sintético e LAS (14 mg/L)

Morfologias	FREQUÊNCIA				
	L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	-	-	-	++++	-
Bacilos curvos	++++	+++	-	+++	+++
Cocobacilos	+++	++++	-	++	++++
Cocos	-	-	-	-	+
Filamento delgado e longo	-	-	-	-	-
Filamento septado	-	-	++	-	++
Espirilos	-	++	+++	+++	+++
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGÊNICAS					
Bacilos fluorescentes	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	+	-	+++	-

(++++) predominantes; (++++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

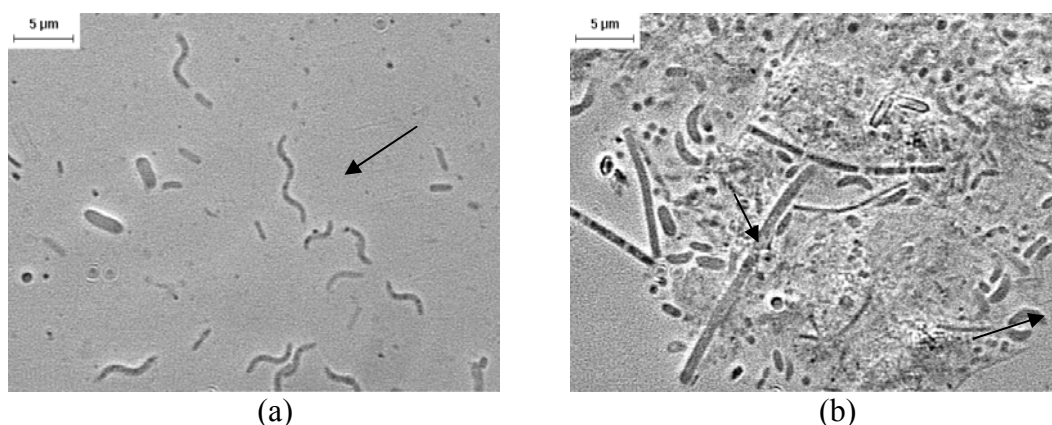


Figura 5.73 - Microscopia óptica de contraste de fase de morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na terceira etapa de operação do reator R1 alimentado com esgoto sintético e LAS (14 mg/L): (a) espirilos e bacilos, (b) bacilos, filamentos, bacilos curvos e morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp.

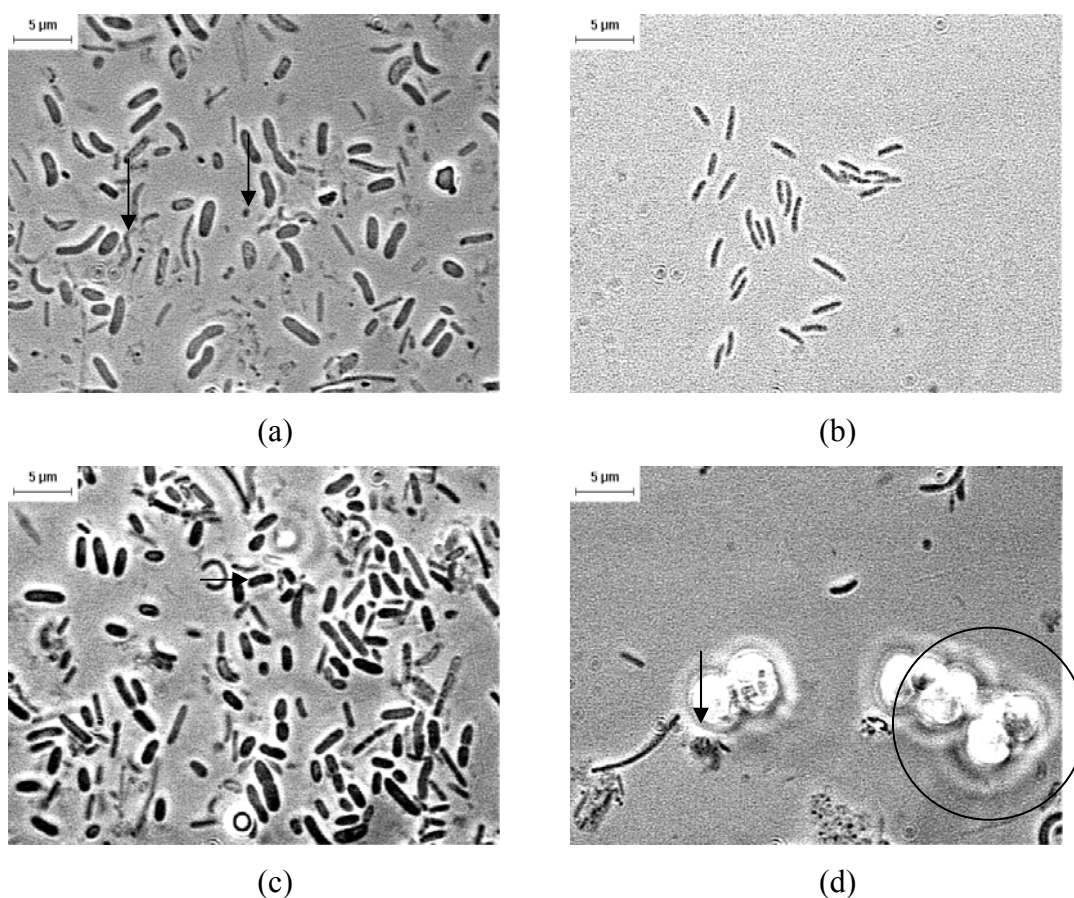


Figura 5.74 - Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na terceira etapa de operação do reator R2 alimentado com esgoto sintético e LAS (14 mg/L): (a) bacilos e bacilos curvos, (b) bacilos, (c) bacilos e cocobacilos (d) bacilos curvos, morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp. e filamento delgado

Na etapa IV de operação do reator R1, a substituição do extrato de carne por extrato de levedura e a ausência do amido na composição do esgoto sintético, além da presença de 14 mg/L de LAS favoreceram o predomínio de morfologias semelhantes a *Methanosarcina* sp. e bacilos curvos (Figura 5.75). Morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. não foram observadas no final dessa etapa de operação. Entretanto, foram observadas outras morfologias relacionadas as arqueias metanogênicas, como por exemplo, bacilos e cocos fluorescentes, provavelmente responsáveis pela produção de metano (Tabela 5.26 e 5.27).

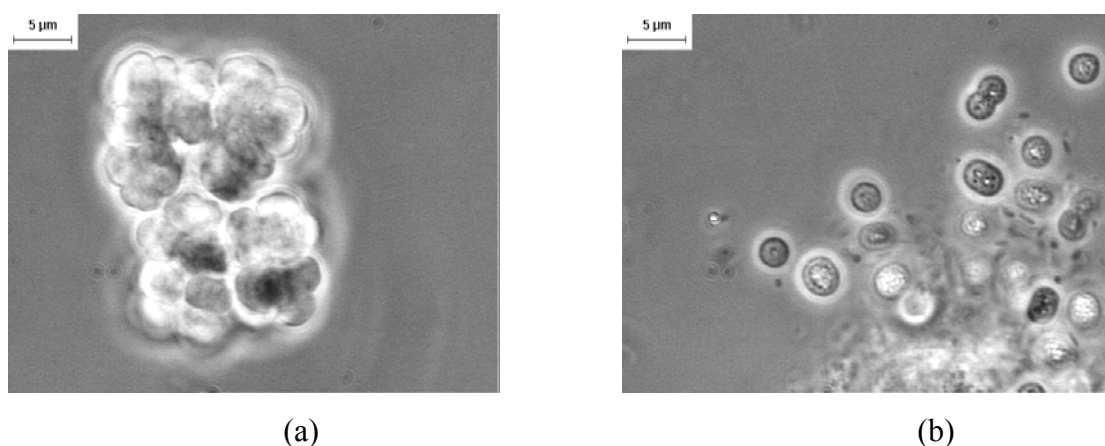


Figura 5.75 - Microscopia óptica de contraste de fase de morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano no final de operação do reator R1, alimentado com esgoto sintético, extrato de levedura e LAS (14 mg/L), sem amido: (a) *Methanosarcina* sp. (b) bactérias fototróficas semelhantes a *Chromatium* sp.

Tabela 5.26 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 no primeiro perfil da quarta etapa de alimentação com esgoto sintético, extrato de levedura e LAS (14 mg/L), sem amido

Morfologias	FREQUÊNCIA				
	L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	+	+	+++	+++	-
Bacilos curvos	++++	++++	++	+	-
Cocobacilos	+++	++	+	++	+
Cocos					
Filamento delgado e longo	++	++	+	+	-
Filamento septado	-	+	+	+	+
Espirilos	-	-	-	-	-
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	++	++
ARQUÉIAS METANOGÊNICAS					
Bacilos fluorescentes	+++				
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	++++	++++	++++	++++	+

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados.

Tabela 5.27 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R1 no segundo perfil da quarta etapa de alimentação com esgoto sintético, extrato de levedura e LAS (14 mg/L), sem amido

Morfologias	FREQUÊNCIA				
	L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	+	+	++	++	+
Bacilos curvos	++++	+++	+++	++++	+
Cocobacilos	+++	++	+	++	+
Cocos	-	+++	++	+++	+
Filamento delgado e longo	-	++	+	++	-
Filamento septado	-	++	+	++	+
Espirilos	+	++	-	-	-
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	++	++
ARQUÉIAS METANOGENICAS					
Bacilos fluorescentes	-	+++		++	
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	+	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	++++	++++	+++	+++	+

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

Para o reator R2, a ausência de amido na composição afluyente, na etapa IV, auxiliou na predominância de bacilos curvos e bacilos fluorescentes (Tabela 5.26). Todavia, *Methanosarcina* sp continuaram a ser observadas no biofilme deste reator (Figura 5.76).

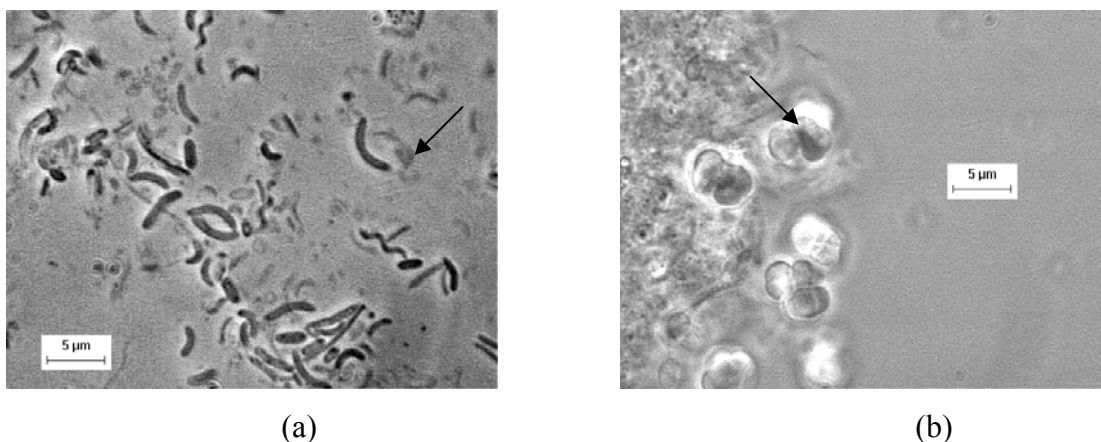


Figura 5.76 - Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano na quarta etapa de operação do reator R2 alimentado com esgoto sintético, extrato de carne e LAS (14 mg/L), sem amido: (a) bacilos curvos, espirilos e bacilos, (b) morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp.

Tabela 5.28 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 durante a quarta etapa de alimentação com esgoto sintético, extrato de carne e LAS (14 mg/L), sem amido

Morfologias	FREQUÊNCIA L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	-	++	++	+	-
Bacilos curvos	++++	++++	++++	+++	++++
Cocobacilos	+++			-	++
Cocos	-		+++	-	+
Filamento delgado e longo	+	-	-	+	-
Filamento septado	-	++	-	-	+
Espirilos	++	-	-	-	-
<i>Chromatium</i> sp.	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGÊNICAS					
Bacilos fluorescentes	+++	+++	+++	+++	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	++	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

Na etapa V de alimentação do reator R2 apenas com LAS como fonte orgânica, ocorreu redução na diversidade microbiana (Tabela 5.29). Mas, apesar da escassez nutricional, os bacilos curvos (Figura 5.77) permaneceram predominantes na biomassa.

Tabela 5.29 - Caracterização morfológica da biomassa do reator R2 durante a quinta etapa de alimentação com LAS (14 mg/L)

Morfologias	FREQUÊNCIA				
	L/D				
	1	5	10	14	19
BACTÉRIAS					
Bacilos	-	-	+	-	-
Bacilos curvos	++++	++	+++	++	-
Cocobacilos	++	++	-	++	-
Cocos	++	-	++	-	+++
Filamento delgado e longo	++	-	-	-	-
Filamento septado	++	-	++	-	+++
Espirilos	-	-	-	-	-
ARQUÉIAS METANOGENICAS					
Bacilos fluorescentes	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Methanosarcina</i> sp	++	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros;

(-) não foram observados

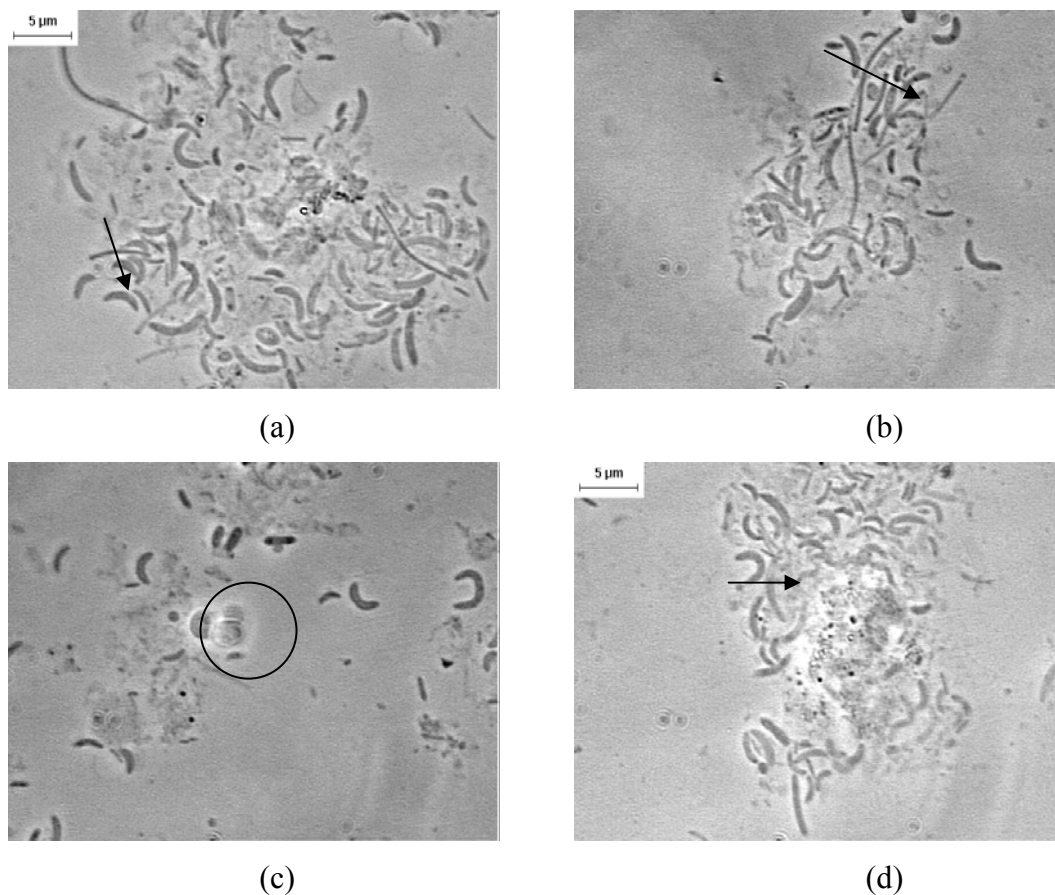


Figura 5.77 - Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas presentes nas espumas de poliuretano, na quinta etapa de operação do reator R2 alimentado com LAS (14 mg/L): (a) bacilos curvos, (b) filamento delgado (c) morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp. (d) bacilos curvos

Amostras colonizadas de espuma foram coletadas ao longo dos reatores e analisadas por PCR/DGGE para avaliar a estrutura da comunidade microbiana frente às alterações operacionais. Considerou-se que cada banda no gel de DGGE representou uma população microbiana.

Mudanças nas populações microbianas foram observadas nos dois reatores, quando comparadas com os padrões de bandas presentes nos inóculos. Essas alterações podem ser atribuídas ao tempo de operação e à exposição ao surfactante.

As Figuras 5.78a e 5.78b apresentam os géis de DGGE para o Domínio *Bacteria* dos reatores R1 e R2, respectivamente. No padrão de bandas do reator R1

pode-se notar que a adição de 7 mg/L de LAS intensificou algumas populações representadas pelas bandas Eub B e Eub C. Entretanto, quando a concentração do surfactante foi aumentada para 14 mg/L outras populações foram favorecidas, destacando-se principalmente, Eub E e Eub F. As populações representadas pelas bandas Eub B, Eub E e Eub F permaneceram no sistema mesmo quando o amido foi retirado da alimentação e extrato de carne foi substituído por extrato de levedura. Todavia, a banda Eub D só apareceu nesta fase.

No reator R2, foi observado comportamento semelhante ao reator R1: a diversidade de populações microbiana aumentou ao longo das etapas de operação e novas bandas (Eub G) apareceram com o decorrer do tempo (Figura 5. 78b).

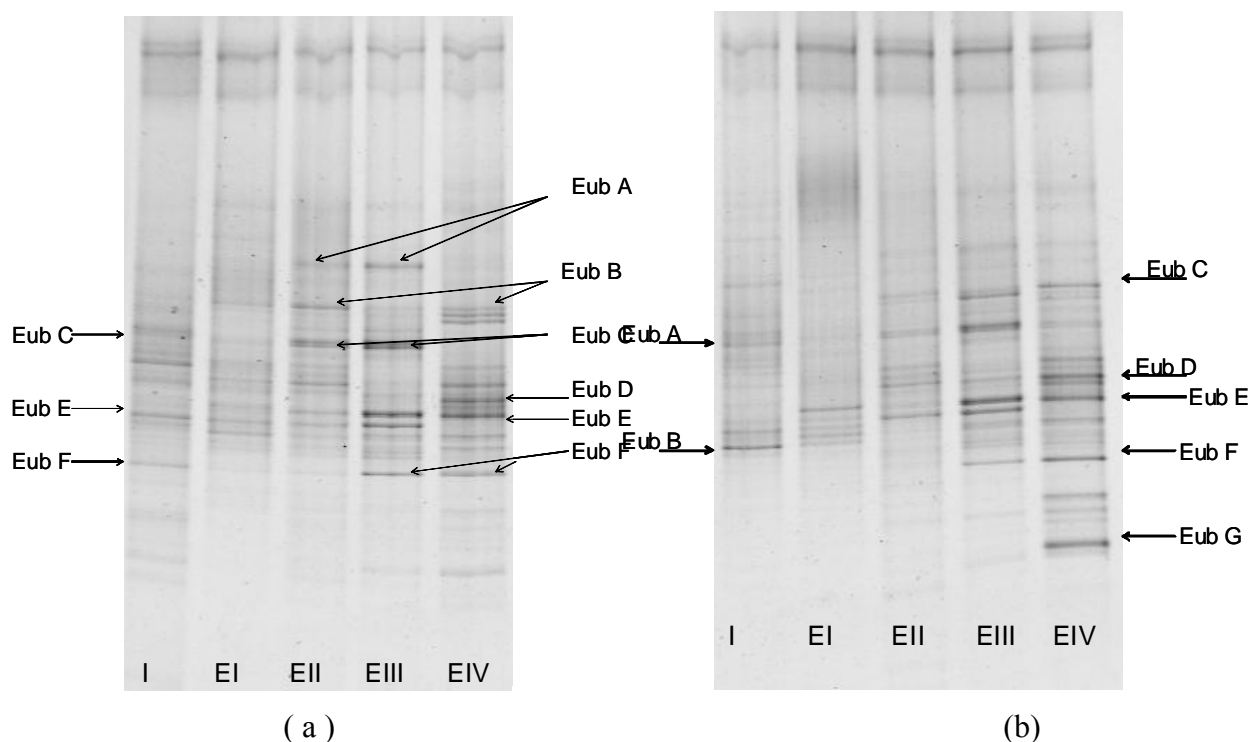


Figura 5.78 - Géis de DGGE das amostras do biofilme nas diferentes etapas de operação dos reatores utilizando *primers* para Domínio *Bacteria*: (a) R1 e (b) R2 (gradiente de 30-60%)

Em relação às bactérias do grupo BRS (Figura 5.79a e 5.79b) algumas populações foram desfavorecidas quando LAS foi adicionado, por exemplo, as representadas pelas bandas Brs I e Brs D, no reator R1. As bandas Brs A, Brs B, Brs

C Brs F, Brs G presentes na Figura 5.79a foram enriquecidas após a retirada de amido e substituição do extrato de carne pelo de levedura. Ainda nesta quarta etapa, novas bandas surgiram, tais como, aa bandas Brs L e Brs J (Figura 5.79a).

No reator R2, microrganismos pertencentes ao grupo das BRS, presentes no inóculo, foram mantidos ao longo da operação, representados pelas bandas Brs A, Brs B e BrsC. No final da quarta etapa foi observado o predomínio das bandas BrsB, Brs C, Brs D e Brs E. As bandas Brs D e Brs E foram favorecidas nas etapas III e IV, quando o reator era alimentado com 14 mg/L de LAS. É provável que essas bandas representem as populações de bacilos curvos de diferentes tamanhos observados nos exames de microscopia óptica de contraste de fase (Figura 5.79b).

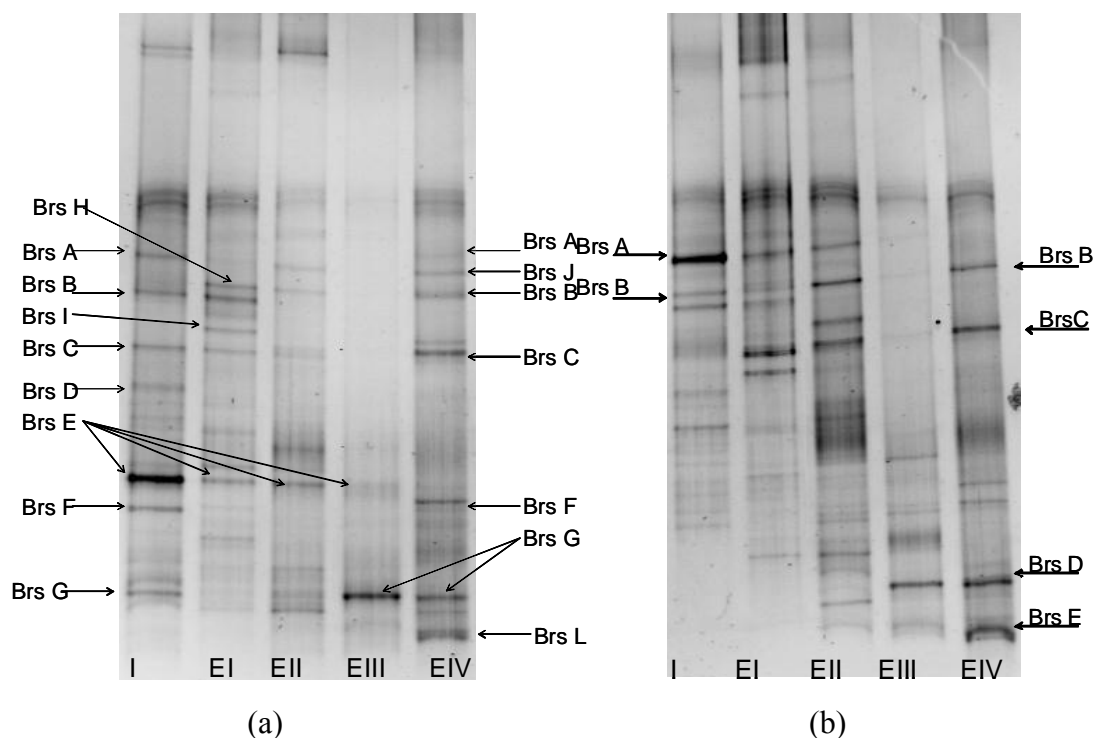


Figura 5.79 - Géis de DGGE das amostras do biofilme nas diferentes etapas de operação dos reatores utilizando *primers* para o grupo das BRS: (a) R1 e (b) R2 (gradiente de 30-60%)

As populações pertencentes ao Domínio *Archaea* (Figura 5.80a e 5.80b) apresentaram maiores alterações em sua diversidade. Pode-se observar que algumas populações presentes no inóculo do reator R1 foram favorecidas ao longo da

operação. Por outro lado, outras populações desapareceram, provavelmente, em função das condições nutricionais do sistema.

O inóculo do reator R1 apresentou 6 bandas predominantes. Logo na primeira etapa, houve redução na diversidade genética dos microrganismos do Domínio *Archaea*. Com a adição de LAS (segunda e terceira etapa), ArcC, Arc E e ArF permaneceram no sistema. Na quarta etapa (EIV), com a retirada do amido da composição nutricional afluyente, a seleção populacional foi significativa. Somente, as população representadas pelas bandas Arc D, Arc E e Arc F form mantidas, provavelmente, estejam relacionadas à *Methanosarcina* sp.e bacilos fluorescentes observados nos exames microscópicos.

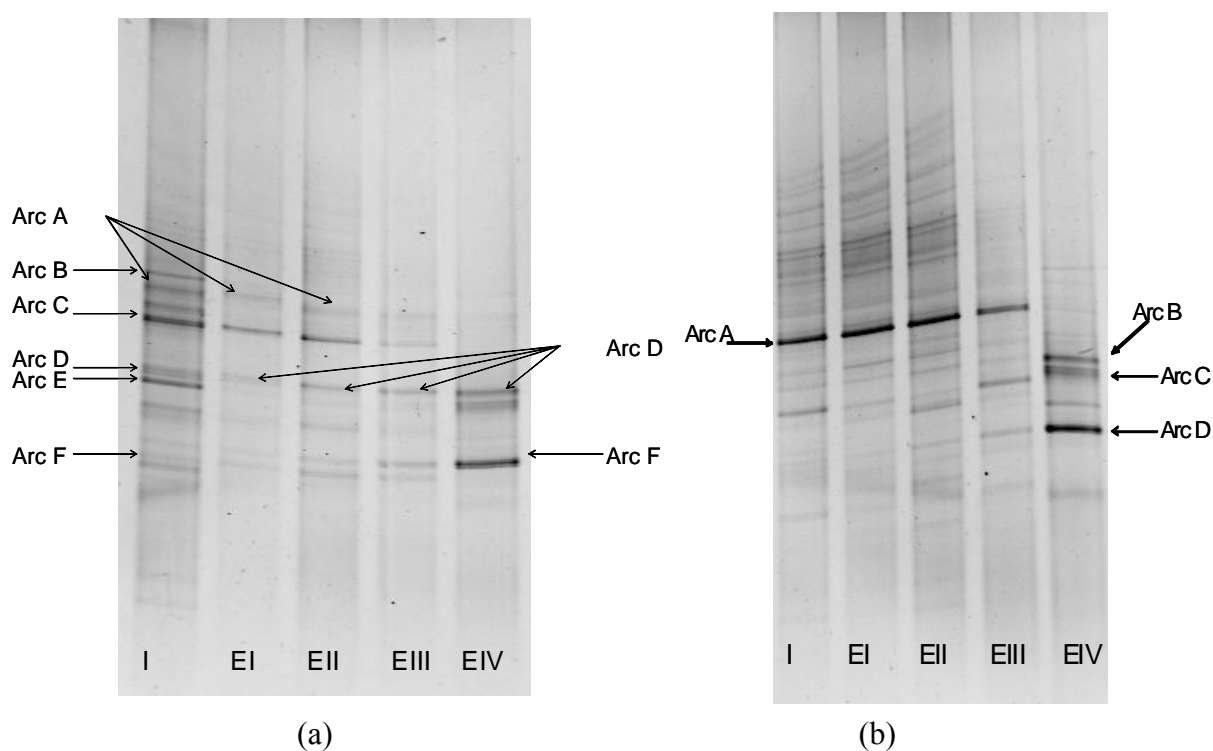


Figura 5.80 - Géis de DGGE nas diferentes etapas de operação dos reatores utilizando *primers* para o Domínio *Archaea*: (a) R1 e (b) R2 (gradiente de 40-60%)

5.8 Análise de seqüenciamento do fragmento do RNAr 16S

Amostras da biomassa imobilizada em espuma de poliuretano foram retiradas no final da operação dos reatores. A alimentação do reator R1, nessa fase (etapa IV), era constituída de extrato de levedura, sacarose, sais, bicarbonato de sódio e 14 mg/L de LAS. No reator R2, a alimentação na última fase (etapa V), consistiu somente de 14 mg/L de LAS, solução de sais e bicarbonato de sódio.

Como mencionado no capítulo referente à metodologia, a biomassa foi retirada do suporte, submetida à extração do DNA, reação de PCR, clonagem e, posterior, seqüenciamento do fragmento do RNAr 16S, para identificação dos microrganismos relacionados ao Domínio *Bacteria*. As arqueias metanogênicas (Domínio *Archaea*) não foram identificadas por seqüenciamento, uma vez que essas células não utilizam diretamente o LAS e, além disso, os exames de microscopia óptica de fluorescência permitiram a constatação das principais morfologias que constituíam o biofilme dos reatores anaeróbios contemplando, portanto, a caracterização microbiana deste trabalho.

Para as amostras do reator R1 (inoculado com lodo de ETE) foram obtidos 53 clones contendo o inserto do gene RNAr 16S. As seqüências foram analisadas na rotina BLAST do Genbank. Desse total, 43 clones foram relacionados ao Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales, mais especificamente as seguintes espécies: *Clostridium* sp., *Clostridium aminobutyricum*, *Phascolarctobacterium faecium*, *Aminiphilus restrictus*, *Synergistes jonesii*, *Aminomonas paucivorans*, *Ruminococcus gnavus*, *Anaerovibrio burkinabensis*, *Aminobacterium colombiense*, *Anaerovorax odorimutans*, *Sporomusa sphaeroides*, *Sporomusa aerovorans*, *Sporomusa malonica*, *Anaeromusa acidaminophila*, *Acetonema longum*, *Acidaminococcus* sp., *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, *Thermanaerovibrio velox* e *Thermosinus carboxydivorans*, *Soehngenia saccharolytica* e *Deferribacteres* sp.

Os outros 10 clones foram relacionados ao filo Proteobacteria, a maioria pertencente à classe Alfa-Proteobacteria, mais especificamente aos seguintes microrganismos: *Pleomorphomonas oryzae*, *Azospirillum doebereineriae*, *Bacterium*, *Methylocystis* sp., *Methylosinus* sp., *Beijerinckia indica*, *Beijerinckia derxii*, *Ensifer adhaerens*, *Desulfohalobium retbaense* e bactérias não cultivadas.

As bactérias pertencentes ao filo Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales, foram relacionadas a diferentes gêneros, entre eles, *Clostridium*. As bactérias desse gênero são Gram positivas, formadoras de esporos, com ou sem mobilidade celular; e comumente encontrada no solo, lodos anaeróbios, sedimentos marinhos, fezes de animais, trato intestinal do homem e outros vertebrados. Realizam metabolismo desassimilativo de redução de sulfato, além de produzirem ácidos orgânicos e álcoois a partir de carboidratos ou peptona (BERGEY, 1986; KAKSOWEN et al., 2004).

Os clones seqüenciados apresentaram similaridade de 93 a 100% com *Clostridium* sp. e 93% com *Clostridium aminobutyricum*. Na última fase de operação (Etapa IV) do reator R1, com certeza a composição nutricional favoreceu o crescimento de tais células, uma vez que havia disponibilidade de carboidratos, aminoácidos (extrato de levedura) e sulfato proveniente da oxidação do sulfito liberado no rompimento do anel aromático da molécula de LAS. Além do mais, Denger et al. (1996) isolaram *Clostridium* sp. EV4SPB, em meio nutricional contendo [2-(4- sulfofenil) butirato] e *Clostridium* sp. EV4, na presença de fenil sulfonado, *p*-benzeno-sulfonado e naftaleno-2,6-dissulfonado. Segundo os autores, as células isoladas foram capazes de utilizar todos esses compostos.

Muitos clones seqüenciados foram relacionados com bactérias que utilizam extrato de levedura. Como por exemplo *Synergistes jonesii* (90–100%), *Aminiphilus restrictus* (89–100%), *Acidominococcus* sp. (91%), *Aminomonas paucivorans* (87 - 98%). Na composição nutricional afluyente do reator R1, provavelmente a presença de extrato de levedura (500 mg/L) favoreceu o crescimento de células relacionadas a essas espécies. Considerando a utilização de aminoácidos, ácidos graxos e outros ácidos orgânicos, quatro clones foram relacionados ao gênero *Sporomusa* (93 a 100%) Todas as espécies desse gênero usam hidrogênio (H₂) e dióxido de carbono (CO₂) como substrato para crescimento. O produto final da fermentação é acetato, mas butirato e propionato podem ser gerados, no entanto essas bactérias não reduzem sulfato. (BIEBL et al, 2000; BOGA et al., 2002).

Também foram encontrados clones relacionados a bactérias moderadamente termófilas, especificamente ao gênero *Thermanaerovibrio*. Destaca-se, contudo que os reatores foram mantidos em temperatura mesofílica, ou seja, de 30±2°C.

Provavelmente, esse gênero possui representantes cujo crescimento ótimo seja na faixa moderadamente termófila, isto é, pode estar presente em ambientes com temperatura abaixo desse valor ótimo, como é o caso do reator R1. Sob tais aspectos, as células não apresentam crescimento intenso, a manutenção celular foi favorecida pelas condições nutricionais do sistema. Os clones apresentaram similaridade de 94% com *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, e 89 a 92% com *T. velox*. Black (1999) menciona, por exemplo, que *Bacillus stearothermophilus*, usualmente considerado termófilo obrigatório, apresenta velocidade de crescimento elevada em temperatura de 65°C a 75°C. No entanto, pode crescer em menores velocidades quando a temperatura apresentar valores inferiores a 30°C.

Essas bactérias pertencentes ao gênero *Thermanaerovibrio* e *Thermosinus*, ambos gêneros crescem na presença de extrato de levedura, glicose, frutose, acetato, sacarose. Os produtos da fermentação no crescimento em glicose são acetato, lactato, hidrogênio, dióxido de carbono e etanol. Reduz enxofre elementar a sulfeto de hidrogênio (H₂S), no crescimento organotrófico com glicose ou peptídeos como fonte de carbono e energia. Na presença de enxofre, foram capazes de crescer em condições litotróficas, com hidrogênio molecular e 0,1g/L de extrato de levedura como fonte de carbono. Sulfato, tiosulfato, nitrato, ferro (III) e sulfito não foram reduzidos e não estimularam o crescimento (ZAVARZINA et al., 2000, SOKOLOVA et al., 2004).

A provável presença dessas células no reator R1 pode estar relacionada ao metabolismo organotrófico, uma vez que as fontes de enxofre disponíveis eram sulfito, sulfato e sulfeto, os quais não favorecem o crescimento dessas bactérias.

Similaridades de 89 a 94% foram obtidas para clones relacionados a *Anaerovorax odorimutans* as quais utilizam aminobutirato e hidroxibutirato como substrato para crescimento (MATTHIES et al., 2000). Embora, esses compostos não tenham sido constatados nas amostras dos reatores anaeróbios, provavelmente, foram produzidos por metabolismo fermentativo e utilizados pelos microrganismos semelhantes aos mencionados anteriormente.

Ruminococcus gnavus (RIEU-LESME et al., 1996), também pertencente ao filo Firmicutes, foi relacionada a dois clones com similaridade de 94%. Essa espécie apresenta-se na forma de cocos em cadeias ou pares Gram positivos, anaeróbios

estritos, não formadores de esporos. Normalmente, é encontrada no trato digestivo dos seres humanos (HATA & SMITH, 2004), utilizam carboidratos e produzem ácidos, etanol, CO₂ e H₂. A presença de células no biofilme do reator R1, semelhantes a essa espécie justifica-se, uma vez que foi utilizado como inóculo lodo anaeróbio de reator UASB utilizado no tratamento de esgoto sanitário do Campus da EESC-USP.

Outro clone foi relacionado ao filo Firmicutes e espécie *Anaerovibrio burkinabensis*, com similaridade entre 83 a 94% (STROMPL et al., 1999). Fermentam lactato, ribose e frutose e produzem acetato, propionato, CO₂ e traços de H₂. Em todas as etapas de operação do R1 foi detectado o ácido acético e ácido propiônico. Especificamente, na etapa IV, com 200 e 312 dias de operação os valores oscilaram na faixa de 44,1 a 14,3 mg/L para o ácido acético e 18,9 a 0,8 mg/L para o ácido propiônico, respectivamente.

A Figura 5. 81 apresenta a árvore filogenética construída para apenas 26 clones relacionados à classe Clostridia. Isso ocorreu, pois os *primers* usados no seqüenciamento não se anelaram à região de homologia de maneira uniforme para todos os clones. Para uma parte dos clones obteve-se seqüência de aproximadamente 1000 pares de base (pb), enquanto para outra parte foi obtida seqüência de cerca de 400- 600 pb da região anterior do 16S, e, por último, para uma outra porção dos clones, uma seqüência correspondente ao terço final do 16S. Portanto, quando todos os clones foram alinhados com o programa Clustal X (THOMPSON, 1994), não foi possível encontrar uma região de tamanho adequado para a análise filogenética que fosse comum para todos. Os 26 clones selecionados permitiram alinhamento de aproximadamente 400 -500pb, sendo que os 17 clones restantes apresentaram seqüências similares aos clones incluídos na árvore filogenética e, portanto, não representam novas unidades taxonômicas operacionais (UTOs) na amostra do reator R1.

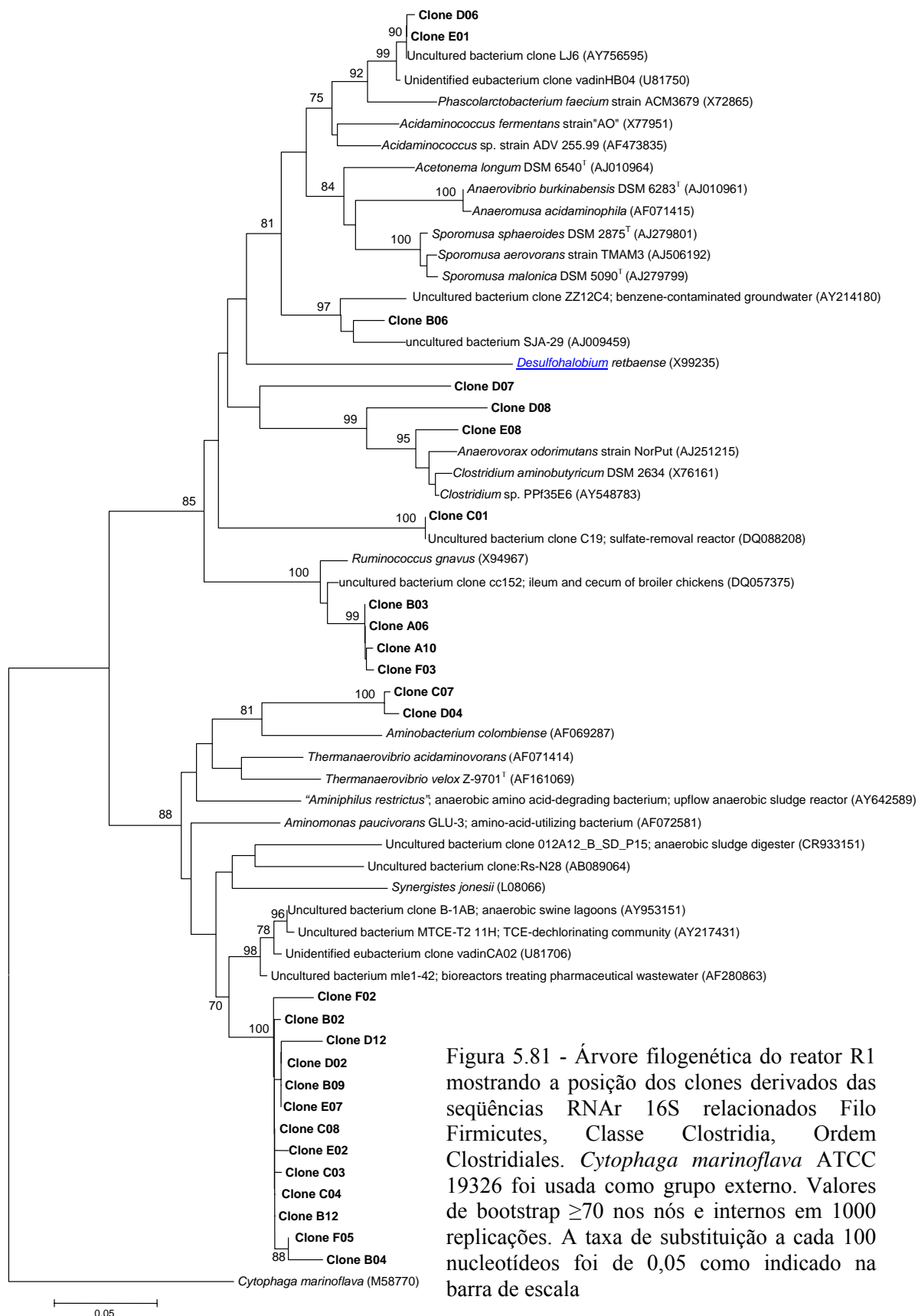


Figura 5.81 - Árvore filogenética do reator R1 mostrando a posição dos clones derivados das seqüências RNAr 16S relacionados Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales. *Cytophaga marinoflava* ATCC 19326 foi usada como grupo externo. Valores de bootstrap ≥ 70 nos nós e internos em 1000 replicações. A taxa de substituição a cada 100 nucleotídeos foi de 0,05 como indicado na barra de escala

Os clones relacionados ao filo Proteobacteria, classe Alfa-Proteobacteria apresentaram elevado índice de similaridade. Ao filo Proteobacteria constitui o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas. Os clones foram relacionados em 96-99% e 97% de similaridade as espécies *Pleomorphomonas oryzae* (XIE & YOKOTA, 2005) e *Azospirillum doebereinae*, respectivamente.

Azospirillum doebereinae são bactérias fototróficas fixadoras de nitrogênio em condições micro-aeróbias, quando esse elemento é limitante. Algumas espécies podem utilizar certos açúcares em condições anaeróbias, e utilizam H₂ como doador de elétrons. Crescem em sais de ácidos orgânicos, como, malato, succinato, lactato e piruvato (ECKERT et al., 2001). Sua presença na biomassa do reator deve ter sido favorecida pela presença de sacarose e bactérias cujos produtos da fermentação é H₂ e CO₂, presença desse microrganismos foi constatada em microscopia óptica.

Outro clone foi relacionado ao gênero *Bacterium* (WATANABE et al., 1999) com 97% de similaridade. Essas bactérias foram encontradas em sistemas de lodos ativados alimentados com fenol como fonte de carbono. No reator R1, não foi detectada a presença de fenol, porém, tolueno e benzeno foram observados em concentrações próximas a 20 µg/L. Como mencionado anteriormente, esses compostos foram originados da ruptura da ligação do anel aromático com a cadeia alquílica e, provavelmente serviram de substrato orgânico para o crescimento de tais células, uma vez que as concentrações detectadas foram mínimas.

Como salientado anteriormente, na última etapa de operação do reator R1 foi observado o predomínio de *Methanosarcina* sp., além da presença de bacilos fluorescentes e *Methanosaeta* sp. ao longo do reator. Nessa etapa, a concentração de metano oscilou entre 1,7 a 8,9 mmol/L. Provavelmente, essas concentrações favoreceram a presença de bactérias metanotróficas, uma vez que, dois clones analisados apresentaram 94% de similaridade com as espécies *Methylocystis* sp. e *Methylosinus* sp., as quais crescem em baixas concentrações de metano (KNIEF & DUNFIELD, 2005).

Um mesmo clone do filo Proteobacteria foi relacionado a duas espécies do gênero *Beijerinckia*, ambas com 93% de similaridade: *B. indica* e *B. dextrii*. Fixam nitrogênio molecular em condições aeróbias e micro-aeróbias, as bactérias desse gênero podem produzir massa altamente viscosa semitransparente em função das

condições nutricionais. Substratos orgânicos como glicose, frutose e sacarose são oxidadas a dióxido de carbono e ácido acético. O provável crescimento de tais células no reator R1 pode ser associado à presença de sacarose, a qual com certeza estimulou a formação de polímeros orgânicos no biofilme.

Muitos clones seqüenciados foram relacionados a bactérias não cultivadas presentes em lagoas anaeróbias de tratamento de resíduo de suinocultura. As demais bactérias encontradas foram de digestor anaeróbio de lodo (GODON et al., 2005); reatores anaeróbios para remoção de sulfato; bactérias presentes em águas contaminadas com benzeno e triclorobenzeno (WINTZINGERODE et al., 1999); bactérias não identificadas presentes em reatores de leite fluidizado alimentado com vinhaça da fabricação de vinhos (GODON et al., 1997); bactérias não cultivadas presentes em biorreatores usados no tratamento de efluentes da indústria farmacêutica (LAPARA et al., 2000); bactérias presentes no trato digestivo humano (ECKURG et al., 2005) e etc .

A Figura 5.82 corresponde à árvore filogenética construída com os clones do reator R1, relacionados a filo Proteobacteria. Desses, apenas 7 foram incluídos na árvore, em virtude do alinhamento não ser perfeito para todos os clones, sendo os 3 clones restantes similares a outros representados na árvore.

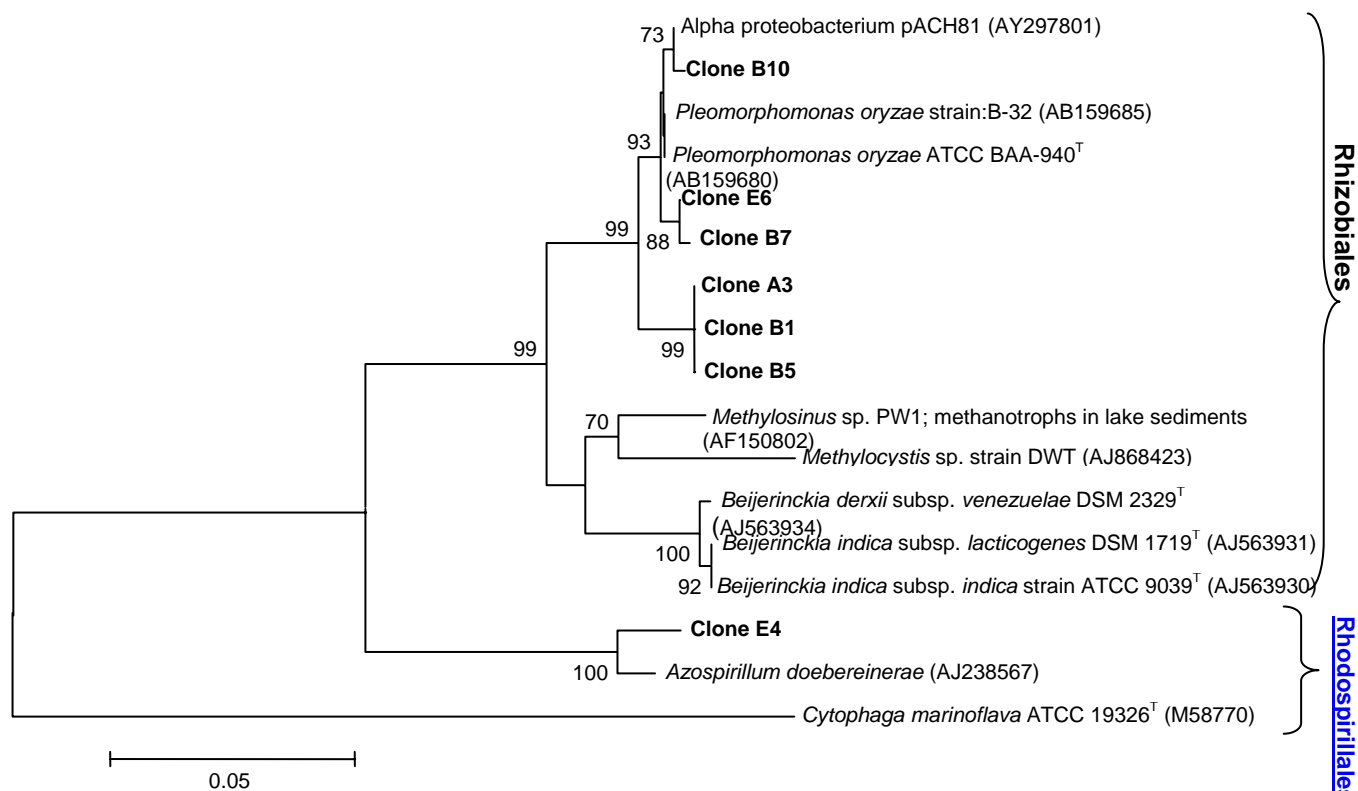


Figura 5.82. Árvore filogenética do reator R1 mostrando a posição dos clones derivados das seqüências do RNAr 16S relacionados a Filo Proteobacteria, classe [Alpha](#); Ordem Rhizobiales e [Rhodospirillales](#). *Cytophaga marinoflava* ATCC 19326 foi usada como grupo externo. Valores de bootstrap ≥ 73 nos nós e internos em 1000 replicações. A taxa de substituição a cada 100 nucleotídeos foi de 0,05 como indicado na barra de escala

Para as amostras do reator R2, inoculado com lodo anaeróbio proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura, foram obtidos 63 clones contendo o inserto do gene RNAr 16S, os quais foram seqüenciados e analisados na rotina BLAST do Genbank. Desse total, 51 foram relacionados ao filo Firmicutes, mais especificamente à classe Clostridia, ordem Clostridiales. Os outros 12 clones foram relacionados ao filo Proteobacteria e distribuídos da seguinte maneira: 9 clones relacionados a Alfa-proteobacteria, 2 clones a Delta-proteobacteria e apenas um clone a Beta-proteobacteria. Os resultados obtidos na rotina BLAST do Genbank, para cada clone, encontram-se descritos na Tabela 5.29.

É importante lembrar que para as amostras do reator R1 (inóculo da ETE) foram obtidos 53 clones, sendo 43 relacionados ao filo Firmicutes e 10 ao filo Proteobacteria, mais especificamente a classe Alpha.

No reator R2, dos 51 clones pertencentes ao filo Firmicutes, classe Clostridia, 25 clones foram relacionados ao gênero *Clostridium* (Tabela 5.29); o qual compreende 146 espécies descritas (COLLINS et al., 1994). Muitos clones apresentaram similaridade entre 88 a 99% com 25 espécies diferentes de *Clostridium*. A maioria das espécies desse gênero produz amônia, sulfeto de hidrogênio, e elevada quantidade de H₂. Além disso, fixam nitrogênio atmosférico, fermentam carboidratos e produz acetato, butirato, etanol. Tais células podem ser encontradas em fezes humanas e bovinas, solos e sedimentos.

Desse modo, é importante destacar que o reator R2 apresentou, desde a etapa III, com 144 dias de operação, valores de ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico e ácido isovalérico. Todavia, as maiores concentrações foram observadas para os ácidos acético e propiônico com valores na faixa de 152,7 mg/L e 129,7 mg/L, respectivamente. Os valores para os demais ácidos estiveram na faixa de 0,97 a 12,8 mg/L. Esses ácidos foram utilizados por outras bactérias presentes no biofilme anaeróbio, principalmente, na última etapa (etapa V) de alimentação do reator somente com LAS, solução de sais e bicarbonato.

A presença de hidrogênio e ácido acético favoreceu a predominância de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (bacilos fluorescentes) e acetocláticas (*Methanosarcina* sp.), principalmente na quarta etapa de operação do reator (Etapa IV). Portanto, embora a caracterização filogenética tenha sido realizada, somente na última etapa de operação do reator R2 (Etapa V), provavelmente, a comunidade microbiana já havia sido estabelecida desde as etapas anteriores de alimentação propiciando o estabelecimento de relações de cooperação e, mesmo de competição no biofilme.

A maioria dos clones foi relacionada com a espécie *Clostridium* sp. (KAKOSONEN et al., 2004), encontrada em reator de leiteo fluidizado redutor de sulfato utilizado no tratamento de água residuária contendo metais. É importante salientar novamente, que as amostras do reator R2 utilizadas para o seqüenciamento foram obtidas na etapa V, quando o sistema foi alimentado com 14 mg/L de LAS,

solução de sais e bicarbonato de sódio, por período de 58 dias. Desse modo, a possível presença de bactérias semelhantes às descritas, anteriormente, justifica-se pela provável utilização do LAS como fonte de carbono ou de outros substratos orgânicos presentes no biofilme, além da redução do sulfato proveniente da oxidação do sulfito.

Destaca-se, também, que na etapa V os valores de sulfato oscilaram ao longo do comprimento do reator R2. As concentrações foram de 1 mg/L na posição L/D de 0, 1 e 5; enquanto na posição L/D igual a 10 e 19, os valores foram iguais a 47 mg/L e 16 mg/L, respectivamente. Portanto, considerando que as células de *Clostridium* tenham utilizado o sulfato (na redução assimilativa ou desassimilativa) proveniente da oxidação do sulfito do anel aromático da molécula de LAS, provavelmente a sua distribuição no leito do reator não tenha sido uniforme e, talvez relacionada com a maior disponibilidade nutricional nos primeiros trechos do reator. Os valores de sulfato oscilaram na faixa entre 0,02 a 0,14 mg/L ao longo do leito do reator.

O sulfato e sulfeto observados foram mínimos, principalmente quando comparados com concentrações presentes em águas residuárias, cujos valores, principalmente para sulfato podem atingir até 1000 mg/L (SILVA, 2005). Nas condições de operação do reator R2, a redução assimilativa e desassimilativa de compostos de enxofre ocorreram, mas o metabolismo predominante foi a fermentação, possibilitando a formação de ácidos orgânicos, os quais foram usados, como doadores de elétrons para redução e assimilação de compostos de enxofre pelo consórcio microbiano.

Clones foram relacionados a *Clostridium glycolicum* (CHAMKLIN et al., 2001), (97 a 99%) isolada de solo, lama, fezes bovinas e humanas; *C sardiniense* (WANG et al., 2005) (93%) isolada de solos, água e fezes humanas, produzem amônia e elevada; *C. butyricum* (89 a 99%) isolada de solos, sedimentos marinhos e rios, fezes humanas e de animais, e digestores anaeróbios empregados no tratamento de resíduos de frutas e vegetais; *C. tertium* (STACKEBRANDT et al., 1999) (95 e 96%) isolada de fezes humanas, e do trato intestinal de bezerros. Caracterizam-se como aerotolerantes, produzem amônia, sendo a redução dissimilativa de nitrato mais favorecida que assimilativa.

Outros clones observados no reator R2 (Etapa V), também foram encontrados no biofilme do reator R1 (Etapa IV) e relacionados, principalmente, com as seguintes espécies: *Aminomonas paucivorans* (BAENA et al., 1999a) (86 a 98%), *Aminobacterium colombiense* (88 a 92%), *Synergiste jonesii* (ALLISON et al., 1992) (86 a 93%), *Thermaanaerovibrio acidominovans* (BAENA et al 1999b) (84 a 91%), *Defirribacteres sp.* (89-92%) e *Aminiphilus restrictus* (88 a 98%), além do *Clostridium*.

Foram obtidos clones relacionados com *Anaerobaculum thermotermum* (REES et al., 1997) (92%) e *Aminobacterium mobile* (BAENA et al., 2000) (87%), essas espécies somente foram observados no reator R2. *Anaerobaculum thermotermum* foi isolada de reservatório de petróleo, caracterizam-se pela redução de enxofre, tiosulfato a sulfeto de hidrogênio; sulfato, sulfito e nitrato não são reduzidos. *Aminobacterium mobile* foi isolada de lagoas anaeróbias utilizadas no tratamento de efluentes de laticínio, bactéria desse gênero foram observadas no reator R1.

Alguns clones pertencentes à classe Clostridia foram relacionados com *Flexistipes sp.* (PASTER et al., 2001) (88 a 92%) bactéria presente na placa bacteriana e na cavidade oral humana, e *Firmicutes oral* (MUNSON et al., 2002) (89-92%) bactérias encontradas na microflora oral responsáveis por infecções.

A Figura 5.83 corresponde a árvore filogenética construída com 34 clones relacionados à classe Clostridia, os quais permitiram alinhamento com aproximadamente 500 pb no programa CLUSTAL X. Pode-se considerar que os demais clones (17 clones) também estão representados na árvore filogenética, uma vez que são similares aos clones incluídos na análise.

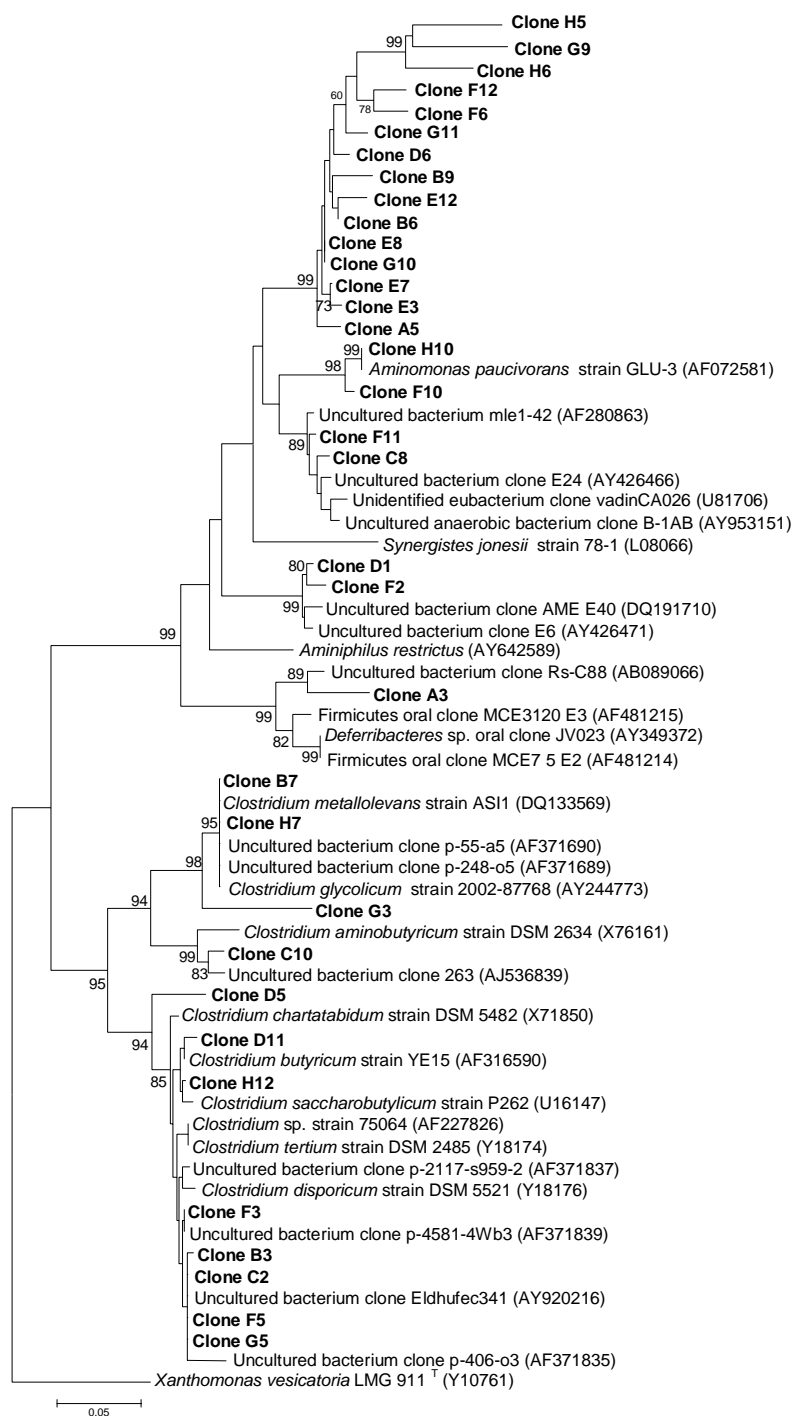


Figura 5.83 - Árvore filogenética do reator R2 mostrando a posição dos clones derivados das seqüências do RNAr 16S relacionados Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales. *Xanthomonas vesicatoria* foi usada como grupo externo. Valores de bootstrap ≥ 78 nos nós e internos em 1000 replicações. A taxa de substituição a cada 100 nucleotídeos foi de 0,05 como indicado na barra de escala

Em relação ao filo Proteobacteria, classe Alfa-Proteobacteria, foram seqüenciados clones relacionados a 14 gêneros, os quais com exceção de *Bacterium*, todos os demais foram diferentes daqueles verificados no reator R1.

Oito espécies pertencentes ao gênero *Caulobacter* (ABRAHAM et al., 1999) (93 a 98%) foram observadas no seqüenciamento. Essas células podem ser encontradas em solos e corpos d'água na forma de bacilos, vibriões ou fusiformes, crescem em meio com extrato de levedura e peptona. Além disso, não formam ácidos ou gases a partir de açúcares, usam oxigênio como aceptor final de elétrons e podem reduzir nitrato a nitrito. Provavelmente, a presença de esses microrganismos no reator anaeróbio justifica-se pela presença de extrato de carne na fase anterior (Etapa IV) de operação. Embora as concentrações de oxigênio não foram analisadas, o reator manteve-se em condições anaeróbias, uma vez que foi observada a presença de arqueias metanogênicas em todas as fases de operação, as quais na sua maioria são anaeróbias estritas. Desse modo, a possível explicação da presença de *Caulobacter* seja relacionada ao crescimento sob condições facultativas e, principalmente nos primeiros trechos do reator, onde possivelmente traços de oxigênio poderiam estar presentes.

Foi observado um clone relacionado à bactéria fototrófica *Azorhizobium caulinodans* (97 a 98%) fixam N₂ em condições micro-aeróbias, entre os açúcares, somente a glicose é oxidada, lactato e succinato são os substratos preferenciais. Essa espécie cresce com ácidos propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e capróico. Provavelmente, o crescimento dessas células tenha sido favorecido pelos ácidos orgânicos produzidos em todas as etapas de operação, no entanto detectados principalmente na terceira etapa de operação do reator R2.

Somente, um clone seqüenciado foi incluído na classe Beta-Proteobacteria. Esse clone foi relacionado a duas espécies distintas, *Comamonas* sp.(98%) e *Variovorax paradoxus* (BAEK et al., 2003) (96%), bactérias que reduzem nitrato e são capazes de degradar fenol. Foram isoladas de ambientes naturais contaminados com fenol sob baixas concentrações de O₂.

Comamonas são bacilos curvos delgados, raramente oxidam carboidratos, crescem bem em meio contendo ácidos orgânicos, aminoácidos e peptona.

Comamonas terrigena N3H, immobilizada em espuma de poliuretano foram usadas por Roig et al (1998) na degradação de surfactantes aniônicos.

A classe Delta-Proteobacteria reúne as bactérias redutoras de sulfato. Os clones sequenciados relacionados a essa classe apresentaram similaridade com espécies do gênero *Syntrophobacter* (TANAKA et al., 2000) (92-95%) e *Syntrophobacter wolinii* (HARMEN et al., 1993) (95%). Essas células foram isoladas de lodo de digestores anaeróbios, caracterizam-se principalmente pela redução desassimilativa de sulfato. Além disso, o crescimento é favorecido em co-cultura com *Desulfovibrio*. Oxidam propionato, a acetato, H₂ e CO₂ e requerem a presença de organismos consumidores de H₂. A presença de bacilos hidrogenotróficos foi constatada por meio de microscopia óptica e foram observados clones relacionados a diferentes espécies de *Desulfovibrio*.

Tartakovsky et al. (2001) identificaram a presença de *Syntrophobacter/Syntrophomonas* spp. em reatores anaeróbios alimentados com pentaclorofenol e glicose. No entanto, a presença dessas células foi associada ao consumo de benzoato e dos ácidos orgânicos produzidos como intermediários da degradação anaeróbia. Essas bactérias podem ter usado o anel aromático presente na molécula do LAS.

Outro gênero importante pertencente à classe Delta-Proteobacteria foi *Desulfovibrio* (87 a 90%). São bactérias redutoras de sulfato (BRS), estritamente anaeróbias e reduzem sulfato, sulfito e tiosulfato a H₂S. Os principais doadores de elétrons são H₂, lactato, etanol, malato e fumarato. Algumas espécies podem utilizar açúcar, glicerol ou aminoácidos. Substratos orgânicos são oxidados incompletamente a acetato. Em alguns casos, acetato e outros substratos são oxidados completamente a CO₂, a presença de extrato de levedura estimula o crescimento. Estão presentes em águas anóxicas, sedimentos marinhos e intestinos de animais. Em relação as BRS, Lie et al. (1999) isolaram *Desulforhopalus singaporensis*, em meio enriquecido com 10 mM de 2-amino etano sulfonado como fonte de carbono, nitrogênio e energia. A fermentação dessa substância resultou na produção final de acetato, amônia e sulfeto.

Menores similaridades foram observadas para *Desulfohalobium* (85%) e *Pelobacter carbinolicus* (LOVLEY et al., 1995) (87%). Essas espécies usam etileno glicol como substrato principal e produzem acetato e etanol. São encontradas em

águas salgadas anóxicas, apresentam metabolismo fermentativo, o Fé (III) e enxofre (S^0) servem comumente como aceptores finais de elétrons.

Entre as bactérias pertencentes ao grupo mixobactéria, alguns clones foram relacionados com *Cystobacter ferrugines* (WU et al., 2005) (86%), *Mellitangium boletus* (86%) e *M. alboraceum* (86%) (SPROER et al., 1999) e *Chondromyces* (SPROER et al., 1999) (86%). Os mixósporos são encontrados em solos, e podem ser curtos ou moderadamente longos, produzem corpo de frutificação que são resistentes à dessecação. O meio de cultivo não está claramente definido, mas são cultivados em condições contendo proteínas enzimaticamente hidrolizadas. As mixobactérias são aeróbias, mesófilicas e requerem pH neutro, quimiorganotróficas e capazes de decompor diferentes macromoléculas.

Mesmo apresentando similaridade com bactérias cultivadas, a maioria dos clones foi relacionada com bactérias não cultivadas. Segundo a descrição do GenBank, essas bactérias foram relacionadas com a microbiota do trato intestinal de suínos (LESER et al., 2002); bactérias presentes em lagoas anaeróbias de suinocultura; presentes em fezes humanas (HOLD et al., 2002); comunidades microbianas de biorreator mesofílicos e termofílicos tratando resíduos da indústria farmacêutica (LAPARA et al., 2000); digestor anaeróbio, reator de leite fluidizado alimentado com vinhaça (resíduo da fabricação de vinho) (GODON et al. 1997); biofilme de reator de pré-tratamento de água potável; comunidade de biorreator, em escala plena, tratando resíduo da indústria de papel (ROEST et al., 2005). As similaridades com células não cultiváveis podem ser justificadas, pois no reator R2 foi utilizado inóculo proveniente de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura.

A Figura 5.84 corresponde à árvore filogenética construída com 9 clones relacionados ao filo Proteobacteria, sendo 7 clones Alfa-Proteobacteria e 2 clones representantes da classe Delta-Proteobacteria. Para a construção da árvore foram usadas aproximadamente 500 pb das seqüências alinhadas. O clone R2AD4, relacionado à classe Beta-Proteobacteria, não está representado na árvore uma vez não foi possível realizar o alinhamento de sua seqüência, com as demais seqüências obtidas.

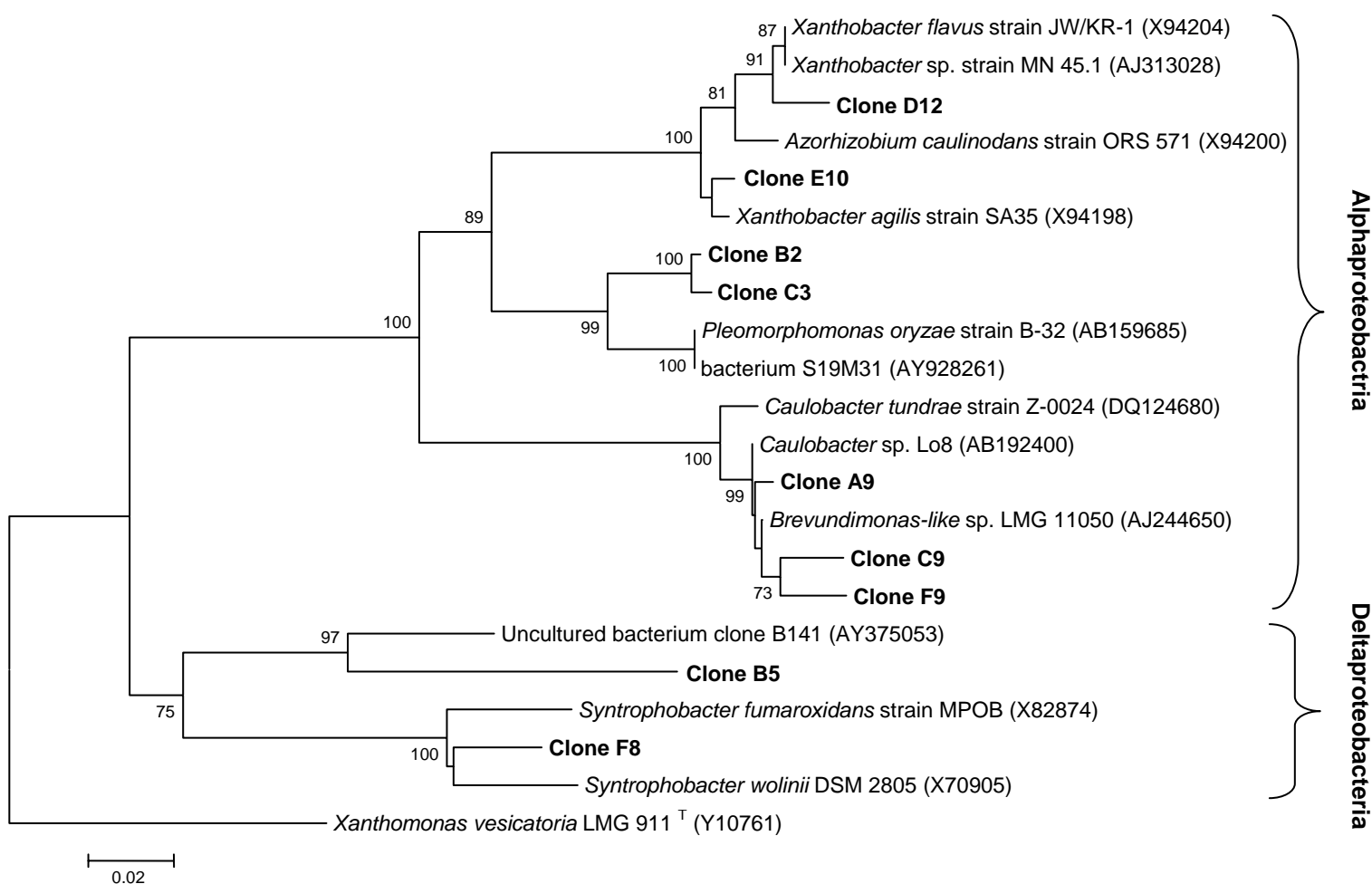


Figura 5.84 - Árvore filogenética do reator R2 mostrando a posição dos clones derivados das seqüências do RNAr 16S relacionados Filo Proteobacteria, Classe Alfa-Proteobacteria e Delta-Proteobacteria. *Xanthomonas vesicatoria* foi usada como grupo externo. Valores de bootstrap ≥ 73 nos nós e internos em 1000 replicações. A taxa de substituição a cada 100 nucleotídeos foi de 0,05 como indicado na barra de escala

Fernandes *et al* (1999) constataram que a estabilidade do reator anaeróbio, avaliado através das variáveis químicas, não se refletia na estrutura microbiana. Essa variação na diversidade microbiana pode ser importante para a estabilidade do reator. Walker (1995) sugere que a flexibilidade metabólica de um reator está diretamente relacionada com a diversidade e a estrutura da comunidade microbiana. A flexibilidade metabólica é um recurso que o reator possui contra flutuações nas

concentrações e composições de águas residuárias afluentes. Provavelmente, nos reatores anaeróbios, é na diversidade dos microrganismos em menor densidade populacional, aparentemente sem importância funcional, que se encontra a flexibilidade metabólica que previne potenciais perturbações ao sistema (CHINALIA et al., 2004).

Comparando-se os resultados de Biologia Molecular observou-se que a diversidade de populações observada na análise de DGGE para o Domínio *Bacteria* e grupo das BRS pode ser relacionada com os diferentes gêneros e espécies obtidas nos resultados do seqüenciamento. Os exames microscópicos podem ser considerados como ferramenta para análise dessa diversidade, uma vez que mostraram ampla diversidade de morfologias. As morfologias predominantes como, por exemplo, bacilos curvos também foram encontrados na descrição das espécies encontradas pelo seqüenciamento.

6. CONCLUSÕES

Entre as diversas condições cromatográficas avaliadas para determinar LAS por HPLC, a que apresentou melhores resultados foi com a fase estacionária – coluna C8, gradiente de eluição com metanol, e solução aquosa de perclorato de sódio.

Por meio de ensaios em reatores em batelada, alimentados com meio mineral e fontes de carbono (glicose e lactato) e esgoto sintético, observou-se que o LAS não influenciou no metabolismo dos microrganismos anaeróbios, pois não foram constatadas alterações nas concentrações de metano no biogás.

O material suporte usado nos experimentos em reatores contínuos foi espuma de poliuretano, material com potencial adsorativo ao LAS de 20,75 mgLAS/g de espuma, estabelecido pela curva de exaustão.

O LAS apresentou isoterma de adsorção linear com espumas de poliuretano

O surfactante alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) foi removido e degradado em reator anaeróbio de leito fixo, sem alterar a eficiência na remoção de matéria orgânica.

O balanço de massa mostrou que inóculos utilizados foram capazes de degradar LAS. No reator R1, inoculado com lodo de ETE, a degradação foi de 35%. No reator R2, inoculado com o lodo de suinocultura, a eficiência de degradação foi de 34%. Porém, a ausência de co-substratos, à qual o R2 foi submetido, realçou a degradação de LAS em 38%, com TDH de 12 horas, para concentração afluyente de 14 mg/L de LAS. Aproximadamente 7% do total de LAS adicionado no afluyente dos reatores ficaram adsorvidos na espuma de poliuretano.

A técnica PCR/DGGE, aplicada na avaliação da comunidade microbiana presente nos reatores, indicou que os microrganismos do Domínio *Archaea* foram mais sensíveis ao surfactante, que os microrganismos do Domínio *Bacteria*. Durante a operação foram observados bacilos fluorescentes e *Methanosarcina* sp. Morfologias semelhantes a *Methanosepta* sp. foram pouco observadas. Mesmo em

baixas concentrações de sulfato, os microrganismos do grupo BRS predominaram nos biofilmes dos reatores, provavelmente utilizando o grupo sulfonado da molécula de LAS como fonte de enxofre.

Por meio das análises das seqüências do fragmento do gene RNAr 16S, foi possível constatar que a maioria dos clones provenientes de amostras de ambos reatores foram relacionados com o filo Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales. As bactérias pertencentes a essa classe, provavelmente, foram as responsáveis pela degradação do LAS, em ambos os reatores.

Os exames microscópicos e a técnica molecular PCR/DGGE também puderam ser usados de maneira satisfatória como ferramenta de análise microbiana. A ampla diversidade de bandas nos géis de DGGE e a presença dominante de bacilos curvos observados em microscopia vêm corroborar com os resultados obtidos no seqüenciamento do fragmento do gene RNAr 16S.

7. RECOMENDAÇÕES

Com base na experiência adquirida durante este trabalho pode-se recomendar:

- Emprego de outras configurações de biorreatores, usando células imobilizadas em diferentes matérias suportes;
- Avaliar diferentes fontes de inóculo e favorecer o crescimento de bactérias da classe Clostridia, como alternativa para melhorar o desempenho dos reatores na degradação do LAS;
- Otimizar o tempo de detenção hidráulica usado na operação do reator;
- Identificar os produtos intermediários da degradação anaeróbia do LAS e correlacioná-los com os microrganismos presentes;
- Avaliar o emprego de diferentes co-substratos para melhorar a eficiência do tratamento do surfactante;
- Empregar técnicas de biologia molecular para caracterizar a população microbiana presente em diferentes configurações de reatores;
- Utilizar detergente comercial como fonte de LAS na água residuária afluyente.

ANEXO 1

Extração de DNA

Protocolo 1 – MELVIN & HOBSON (1994)

- Lavar o *pellet* com PBS (NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, KH₂PO₄ 0,24 g, Na₂HPO₄ 1,44 g, água q.s.p. 1000 mL, pH 7,4);
- Centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm e ressuspender o precipitado em 1,0 mL de tampão TESC pH 8,3 (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; NaCl 0,1 mM);
- Congelar a amostra a -70°C por 2 horas;
- Descongelar a amostra, centrifugar por 2 minutos, descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 300 µL de tampão TESC;
- Adicionar 5 µL de DMSO a esse volume e manter a amostra por 1 minuto à temperatura ambiente;
- Misturar a amostra usando vórtex por 3 a 5 minutos;
- Adicionar 500 µL de guanidina tiocianato 5M e, em seguida, 500 µL de clorofórmio: álcool iso-amílico (24:1, v/v);
- Agitar, manualmente com intensidade, e centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos;
- Recuperar a fase aquosa e adicionar 30 µL de acetato de sódio 3M pH 5,0 – 6,0 (alternativamente usar acetato de amônio);
- Misturar o conteúdo e dividir esse volume em dois tubos;
- Precipitar o DNA adicionando em 2,5 volumes de etanol absoluto;
- Centrifugar a amostra a 3000 rpm por 10 minutos e lavar o DNA com 300 µL de etanol 70% invertendo-se o tubo várias vezes;
- Centrifugar rapidamente e descartar o sobrenadante;
- Ressuspender o *pellet* em 50 a 100 µL de água ultrapurificada esterilizada (ou tampão TE pH 8,0).

ANEXO 2

Protocolo 2 – VAN ELSAS & SMALLA (1995)

- Ressuspender a biomassa em 600 μ L de tampão fosfato de sódio 120 mM, pH 8,0 adicionado de 4 mg de lisozima;
- Incubar a 37°C por 30 minutos misturando o conteúdo do tubo a cada 5 minutos e, em seguida, transferir para banho de gelo;
- Adicionar 45 μ L de SDS 20%, misturar bem e incubar em gelo por 30 minutos;
- Adicionar 0,7 g de pérolas de vidro (0,1mm);
- Agitar 3 vezes em *Mini-Beadbeater* (Biospec products) a 3800 rpm por 90 segundos, mantendo os tubos em banho de gelo nos intervalos entre as agitações e manter em banho de gelo;
- Adicionar igual volume de fenol saturado com Tris-HCl pH 8,0 e misturar bem, manualmente (sem vórtex). Centrifugar a 12000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente;
- Transferir a fase aquosa para novo tubo e extrair com igual volume de clorofórmio: álcool iso-amílico 24:1 (se precisar, repetir esse passo);
- Transferir a fase aquosa para novo tubo, adicionar 0,1 mL de NaCl 5M e 2 mL de etanol absoluto gelado;
- Incubar *overnight* a -20°C ou por 20 minutos a -80°C;
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com etanol 70% gelado;
- Secar o *pellet* e ressuspender em 40 a 50 μ L de água ultrapurificada (ou tampão TE pH 8,0).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, A. M. A.; SRORR, T. (1998). Biodegradation of anionic surfactants in the presence of organic contaminants. *Water Res.*, v. 32, p. 944-947.
- ABRAHAM, W. R.; STROMPL, C.; MEYER, H.; LINDHOLST, S.; MOORE, E. R.; CHRIST, R.; VANCANNEYT, M.; TINDALL, B. J.; BENNASAR, A.; SMIT, J.; TESAR, M. (1999). Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Pindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 49, p. 1053-1073.
- ADACHI, A.; KAMIDE, M.; KAWAFUNE, R.; MIKI, N.; KOBAYASHI, T. (1990). Removal efficiency of anionic and nonionic surfactants from chemical wastewater by a treatment plant using activated carbon adsorption and coagulation precipitation processes. *Environ. Technol.*, v.11, p.133-141.
- ALLISON, M. J.; MAYBERRY, W. R.; McSWEENEY, C. S.; STAHL, D. A. (1992). *Synergistes jonesii*, gen. nov., sp. nov. a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Syst Appl. Microbiol.*, v. 15, p. 522-529.
- ALMENDARIZ, F. J.; MERÁZ, M.; SOBERÓN, G.; MONROY, O. (2001). Degradation of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugment UIT a *Pseudomonas aeruginosa* (M113) strain. *Water Science Technology*, v. 44, p. 183-188.
- AMANN, R. J.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v. 59, p. 143-169.
- ANGELIDAKI, L.; HAAGENSEN, F.; AHRING, B. K. (2000). Anaerobic transformation of LAS in continuous stirred tank reactors treating sewage sludge. *The Cler Review*, v. 6, p. 32- 38.
- ARAÚJO, J. C. (1994). *Acompanhamento da evolução do biofilme e caracterização química e biológica em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário sintético*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994.
- BAEK, S. H.; KIM, K. H.; VIN, C. R.; JEON, C. O.; KIM, K. K.; LEE, S. T. (2003). Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and reducing nitrate under low-oxygen conditions. *Curr. Microbiol.*, v. 47, p. 462-466.
- BAENA, S.; FARDEAU, M. L.; LABAT, M.; OLLIVIER, B.; THOMAS, P.; GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C.(1998). *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge. *Anaerobe*, v. 4, p. 241-250.

BAENA, S.; FARDEAU, M. L.; LABAT, M.; OLLIVIER, B.; THOMAS, P.; GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C. (1999a). *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 49, p. 975-982.

BAENA, S.; FARDEAU, M. L.; LABAT, M.; WOO, T. H. OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. (1999b). Phylogenetic relationships of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, '*Selenomonas acidaminophila*' and *Eubacterium acidaminophilum*, as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov., comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 49, p. 969-974.

BAENA S.; FARDEAU, M. L.; LABAT, M.; OLLIVER, B.; GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. (2000). *Aminobacterium mobile* sp. nov., a new anaerobic amino-acid-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 259-264.

BAK, F.; PFENNING, N. (1987). Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation inorganic sulfur compounds. *Arch. Microbiol.*, v. 147, p. 184-189.

BANERJI, S. K.; WEI, S. M.; BAJPAI, R. J. (1993). Pentachlorophenol interactions with soil. *Water Air Soil Pollut.*, v. 69, p. 149-164.

BARAN, J. R.; POPE, G. A.; WADE, W. H.; WEERASOORLYA, V.; YAPA, A. (1994). Microemulsion formation with chlorinated hydrocarbons of differing polarity. *Environ. Sci. Technol.*, v. 28, p. 1361-1367.

BARBIERI, E.; NGAN, P. V.; GOMES, V. (2000). Efeito do LAS-C12 no metabolismo de rotina de tainhas em função da temperatura em três salinidades. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; et al. *Ecotoxicologia Perspectivas para o século XXI*. Editora Rima, São Carlos, SP. p.293-308.

BASAR, C. A.; KARAGUNDUZ, A.; CAKICI, A.; KESKINLER, B. (2004). Removal of surfactants by powered activated carbon and microfiltration. *Water Research*, v. 38, p. 2117-2124.

BELTRAN, J. H.; TORREGROSA, J.; DOMINGUES, J. R.; GARCIA, J. (2000) Treatment of black-olive wastewater by ozonation and aerobic biological degradation. *Water Research*, v. 34, p. 3515-3522.

BENSON, D.A. et al. (2002). GenBank. *Nucleic Acids Res.*, v 30, p.17-20.

BERGEY, D. H. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

BERNA, J. L.; MORENO, A.; PRATS, D.; RUIZ, F.; VAZQUEZ, B.; ZARZO, D. (1993). LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: ecological implications. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.12, p. 1599-1608.

BERNA, J. L. (2000). The misuse of anaerobic biodegradation criteria in regulatory affairs of surfactants. *The Cler Reviews*, v. 6, p. 18-21.

BERNA, J. L.; CAVALLI, L.; GUIDNER, A.; BATTERSBY, N.; FLETCHER, R.; SCHOWANEK, D.; STEBER, J. (2000). Assessment of the environmental relevance of anaerobic biodegradation of surfactant. *The Cler Review*, v.6, p. 4-17.

BIEBL, H.; SCHWAB-HANISH, S.; SPRÖER, C.; LÜNSDORF, H. (2000). *Propionisporoa vibrioides*, no. gen., nov. sp. a new gram-negative spore-forming anaerobic that ferments sugar alcohols. *Arch. Microbiol.*, v. 174, p. 239-247.

BIEBL, H.; SPROER, C. (2002). Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 25, p. 491-497.

BLACK, J. G. (1999). *Microbiology – Principles and Explorations*. Fourth Edition, John Wiley & Sons, INC, 1999, 786p.

BOGA, H. I.; LUDWIG, W.; BRUNE, A. (2002). *Sporomusa aerovorans* sp. nov., an oxygen-reducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 53, p. 1397-1404.

BOLAÑOS, M. L. R. (2001). *Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas*. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BOLLER, M (1993). Removal of organic matter by physicochemical mechanisms in wastewater treatment plants. *Water Science Technology*, v. 27, p. 167-183.

BORSATO, D.; GALÃO, O. F.; Moreira, I. (1999). *Detergentes naturais e sintéticos*. Londrina. Editora UEL. 131p.

BRODA, D. M.; SAUL, D. J.; LAWSON, P.A.; BELL, R. G.; MURGRAVE, D. R. (2000). *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophilic causing spoilage of vacuum-packed meat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 107-118.

BRUCHA, G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SAIA, F. T.; DAMASCENO, L. H. S.; VAZOLLER, R. F. (2005). Mechanisms for removing pentachlorophenol present in synthetic wastewater in anaerobic fixed bed reactors. In VIII Taller y Simposio Latino Americano sobre Digestion Anaerobia. Punta Del Este , Uruguay, p. 561.

BRUNNER, P. H.; CAPRI, S.; MARCOMINI, A.; GIGER, W. (1988). Occurrence and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono y diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Water Research*, v. 22, p. 1465-1472.

BURRIS, D. R.; ANTWRORTH, C. P. (1992). In situ modification of an aquifer material by a cationic surfactant to enhance retardation of organic contaminants. *J. Contam. Hidrol.*, v. 10, p. 325-338.

CABRAL, A. K. A. (1995). *Caracterização hidrodinâmica de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo*. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CASES, I.; DE LORENZO, V. (2002). The grammar of (micro) biological diversity. *Environ. Microbiol.*, v. 4, p. 338-348.

CASTELLAN, G. (1988). *Fundamentos de Físico-Química*. Rio de Janeiro, 527 p.

CAVALLI, L.; CASSANI, G.; MARASCHIN, C. (1996). Structural elucidation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) biodegradation intermediates. *The Cler Review*, v. 2, p. 4- 3.

CAVALLI, L.; CASSANI, G.; PRAVETTONI, S.; NUCCI, G.; LAZZARIN, M.; ZATTA, A.; VIGANO, L. (2000). Surfactants in sediments. *The Cler Review*, v. 6, p. 100- 11.

CAVALLI, L.; GELLERA, A.; LANDONE, A. (1993). LAS removal and biodegradation in a wastewater treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.12, p. 1777-1788.

CAVALLI, L.; VALTORTA, L. (1999). Surfactants in sludge-amended soil. *The Cler Review*, v. 5, p. 4-3.

CEPIS – Centro Panamericano de Ingeniería Sanitária e Ciências Del Ambiente. www.cepis.ops-oms.orh

CETESB (1992). Água do mar – Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816. Norma Técnica L5, 250, 20p. Cetesb, São Paulo.

CHAMKLIN, M.; LABAT, M.; PATEL, B. K.; GARCIA, J. L. (2001). Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 2049-2054.

CHEN, S.; PIETRZYK, D. J. (1994). Reversed phase liquid chromatographic separation of linear alkylbenzenesulfonates. Effect of mobile phase ionic strength. *Journal of Chromatography A*, v. 671, p.73-82.

CHIEN, C. C.; LEADBETTER, E. R.; GODCHAUX, W. (1995). Sulfonate-sulfur can be assimilated for fermentative growth. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 129, p. 189-193.

CHINALIA, F. A.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; THIEMANN, O. (2004). Seqüenciamento de DNA ribossomal como técnica molecular para caracterização microbiana em reatores anaeróbios. In *III Seminário*

do Projeto Temático Fapesp “ Desenvolvimento, análise, aprimoramento e otimização de reatores para tratamento de águas residuárias”. Escola de Engenharia Mauau. São Caetano do Sul, p. 354-361.

CHURAEV, N. V. (2000). Progress in the studies of surface forces. *Colloid J.*, v. 62, p. 517-525.

COLLINS, M. D.; LAWSON, P. A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J. J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J. A. E (1994). The phylogeny of genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 44, p. 812-826.

COOK, A. M.; HRSAK, D. (2000). The complete degradation of LAS is becoming better understood with pure cultures of bacteria. *The Cler Review.*, v. 6, p. 46-53.

COOPER, D. M.; SWANSON, D. L.; BARNS, S. M.; GEBHAR, C. J. (1997). Comparison of the 16S ribosomal DNA sequences from the intracellular agents of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 47, p. 635-639.

CORDON, T.; MAURER, E.; NUÑEZ-PONZOA, M.; STIRTON, A. (1968). Metabolism of some anionic tallow-based detergents by sewage microorganisms. *Applied Microbiology*, v. 16, p. 48-52.

CSERHÁTI, T.; FORGÁES, E.; OROS, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, v. 28, p. 337-348.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z. (1997). *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001

De NARDI, I. R. (2002). *Degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

DENGER, K.; COOK, A. M. (1997) Assimilation of sulphur from alkyl and arylsulfonates by *Clostridium* spp. *Archives of Microbiology*, v. 167, p. 177-181.

DENGER, K.; COOK, A.M. (1999). Linear alkylbenzenesulphonate (LAS) bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulphur. *J. Appl. Microbiol.*, v. 86, p. 65-168.

DENGER, K.; KERTESZ, M. A.; VOCK, E. H.; SCHON, R.; MÄGLI, A.; COOK, A. M. (1996). Anaerobic desulfonation of 4-tolylsulfonate and 2-(4sulfophenyl) butyrate by a *Clostridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 1526-1530.

DI CORCIA, A.; MARCHETTI, M.; SAMPERI, R.; MARCOMINI, A. (1991). Liquid chromatographic determination of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous environmental samples. *Anal. Chem.*, v.63, p. 1179-1182.

DI CORCIA, A.; SAMPERI, R.; BELLIONI, A.; MARCOMINI, A.; ZANETTE, M.; LENR, K.; CAVALLI, L.(1994). LAS piloty study at the "Roma-Nord" sewage treatment plant and in the Tiber River. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, v.71, p. 467-475.

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

DORIGO, U.; VOLATIER, L.; HUMBERT, J. F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, v.39, p. 2207-2218.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4 grass miscanthus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p.17-26.

ECKURG, P. B.; BIK., E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. F.; RELMAN, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, v.308, p. 1635-1638

EICHHORN, P.; RODRIGUEZ, S. V.; BAUMANN, W.; KNEPPER, T. P. (2002). Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their metabolites in drinking waters. *The Science of the Total Environmental*, v. 284, p. 123-134.

ELSGAARD, L.; POJANA, G.; MIRAVAL, T.; ERIKSEN, J.; MARCOMINI, A. (2003). Biodegradation of linear alkylbenzene sulphonates in sulfate-leached soil mesocosms. *Chemosphere*, v. 50, p. 929-937.

ESUMI, K.; SAKAGAMI, K.; KUNIYASU, S.; NAGATA, Y.; SAKAI, K.; TORIGOE, K. (2000). Simultaneous adsorption of sugar-persubstituted poly(amidoamine) dendrimers and anionic surfactants at the alumina/aqueous solution interface. *Langmuir*, v. 16, p. 10264-10268.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M., GREEN P. (1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* v. 8, p.175-185.

FEDERLE, T. W.; SCHWAB, R. S. (1992). Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a laundromat wastewater pond. *Wat. Res.*, v. 25, p. 123-127.

FEIJTEL, T.; VITS, H.; MURRAY-SMITH, R.; van WIJK, R.; KOCH, V.; SCHRÖDER, F. E.; BIRCH, R.; BERGE, W. (1996). Fate of LAS in activated

sludge wastewater treatment plants: a model verification study. *Chemosphere*, v. 32, p. 1413-1426

FEITKENHAUER, H.; MEYER, U. (2002). Anaerobic digestion of alcohol sulfate (anionic surfactant) rich wastewater-batch experiments. Part I: influence of the surfactant concentration. *Bioresopurce Technology*, v. 82, p. 443-453.

FERNANDES, A., HUANG, S.; SESTON, S.; XING, J.; HICKEY, R.; CRIDDLE, C.; TIEDJE, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 3697-3704.

FERRER, J.; MORENO, L.I.; BERNA, J. L. (2002). Influence of inoculum source and bioavailability on the rate of anaerobic biodegradation of LAS homologues. In: *VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia*, 2002, México, Anais, p. 277-284.

FERRER, N.; GÓMEZ, P., ROURA, M.; BAUCCELLS, M. (1996). Quantification of dodecylbenzenesulfonate and tripolyphosphates in soil commercial samples of detergents. *Vibrational Spectroscopy*, v. 10, p. 229-237.

FIGGE, K.; SCHÖBERL, P. (1989). LAS and the application of sewage sludge in agriculture. *Tenside Surfact. Deterg.*, v. 26, p. 122-128.

FORESTI, E., Zaiat, M., Cabral, A. K. A., Del Nery, V. (1995). Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) reactor for paper industry wateswater treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 12, p. 235-239.

FYTIANOS, K.; VOUDRIAS, E.; MOURATIDOU, T. (1998). The sorption – desorption behavior of linear alkylbenzene sulfonate in marine sediments. *Chemosphere*, v. 36, p. 2067-2074.

GARCIA, M. P.; GARCIA, L. I. R.; ALONSO, J. M. Q.; MARQUEZ, D. S. (1996). Influence of LAS (linear alkylbenzene sulphonates) on biodegradation kinetics. *Chem Biochem. Eng. Q.*, v. 10, p. 75-82.

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; DALMAU, M.; RIBOSA, I.; SANCHEZ-LEAL, J. (2002). Structure-activity relationships for association of LAS with activated sludge. *Chemosphere*, v. 49, p. 279-286.

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; RIBOSA, I.; LATORRE, A., SÁNCHEZ-LEAL, A.(2005). Anaerobic digestion of linear alkylbenzenesulfonates: Biodegradation kinetics and metabolite analysis. *Chemosphere*, v. 60, p. 1636-1643.

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; SÁNCHEZ-LEAL, J.; RIBOSA, I. (2000). Anaerobic degradation and toxicity of commercial cationic surfactants in anaerobic screening tests. *Chemosphere*, v. 41, p. 705-710.

GARCIA-MORALES, J. L.; NEBOT, E.; ROMERO, L. I.; SALES, D. (2001). Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by linear alkylbenzenesulfonate (LAS). *Chem. Biochem. Eng. Q.*, v. 15, p. 13-19.

GAVALA, H. N.; HAAGENSEN, F.; MONGENSEN, A. S.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. (2001). Linear alkylbenzene sulfonates: inhibition effect on acetate and propionate degradation during anaerobic digestion. In: *Proc. 4th Int. Symp. Environ. Biotechnol.*, Anais, p. 452-455.

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

GIGER, W. E.; BRUNNER, P. H.; AHEL, M.; McEVOY, J.; MARCOMINI, A.; SCHAFFER, C. (1987). Organic detergent ingredients and their degradation products in sewage and sewage sludge. *Gas. Wass. Abwass.*, v. 66, p. 111-120.

GIGER, W. E.; STEPHANOU, E.; SCHAFENER, C. (1981). Persistent organic chemicals in sewage effluents – I. Identifications of nonylphenols and nonylphenol-ethoxylates by glass capillary gas chromatograph/mass spectrometry. *Chemosphere*, v. 10, p. 1254-1263.

GILES, C. H.; MacEWAN, T. H.; NAKHWA, S. N.; SMITH, D (1960). Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and measurement of specific surface areas of solids. *J. Chem. Soc.*, 3973-3993.

GODON, J. J.; MORINIERE, J.; MOLETTA, M.; GAILLAC, M.; BRU, V.; DEGENES, J. P. (2005). Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the ‘*Synergistes*’ example. *Environ. Microbiol.*, v 7, p.213-224.

GODON, J. J.; ZUMSTEIN, E.; DABERT, P.; HABOUZIT, F.; MOLETTA, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 2802-2813

GOUDAR, C.; STREVETT, K.; GREGO, J. (1999). Competitive substrate biodegradation during surfactant-enhanced remediation. *J. Environ. Eng.*,v. 125, p.1142-1148.

GREINER, P.; SIX, E. (1998). Evaluation of the results of the LAS-monitoring in Germany. *The Cler Review*, v. 4, p. 94- 101.

GUSMÃO, V. R. (2005). *Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator anaeróbio horizontal de leito fixo utilizado na remoção de BTEX*. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

HAAGENSEN, F.; MONGENSE, A. S.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. (2002). Anaerobic treatment of sludge: focusing on reduction of LAS concentration in sludge. *Water Sci. Technol.*, v. 46, p. 159-165.

HAIGH, S. D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Sci Total Environ.*, v. 185, p. 161-170.

HAMPEL, M.; BLASCO, J.(2002). Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate and one long-chain degradation intermediate, sulfophenyl carboxylic acid and early life-stages of seabream (*Sparus aurata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 51, p. 53-59.

HARMSSEN, H. J.; WULLINGS, B., AKKERMANS, A. D.; LUDWIG, W., STAMS, A. J.; (1993). Phylogenetic analysis of *Syntrophobacter wolinii* reveals a relationship with sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, v. 160, p. 238-240.

HARRISON, I. M.; CANDAU, F.; ZANA, R. (1999). Interactions between polyampholytes and ionic surfactants. *Colloid Polym. Sci.*, v. 277, p. 48-57.

HATA, D. J.; SMITH, D. S. (2004). Blood group B degrading activity of *Ruminococcus gnavus* alpha-galactosidase. *Artif. Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol.*, v. 32, p. 263-274.

HATAMURA, E.; EYSINK, G. J.; BEVILACQUA, J. E.; MORAES, R. P. (1993). Enriquecimento das espumas por substâncias químicas como agente de exportação de poluentes no Rio Tietê./ Relatório Técnico. Cetesb.

HIDAKA, H.; JOU, H.; NOHARA, K.; ZHAO, J. (1992). Photocatalytic degradation of the hydrophobic pesticide permethrin in fluoro surfactant/TiO₂ aqueous dispersions. *Chemosphere*, v. 25, p. 1589-1598.

HOLD, G. L., PRYDE, S. E.; RUSSEL, V. J.; FURRIE, E.; FLINT, H. J. (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 39, p. 33-39.

HOLMSTRUP, M.; KROGH, P. H. (2002). Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. *The Cler Review*, v. 7, p.54-65.

HOLT, M. S.; BERNSTEIN, S. L. (1992). Linear alkylbenzene in sewage sludge and sludge amended soils. *Water Research*, v. 26, p. 613-624.

HOLT, M. S.; FOX, K. K.; BURFORD, M.; DANIEL, M.; BUCKLAND, H. (1998). UK monitoring study on the removal of linear alkylbenzene sulphonate in trickling filter type sewage treatment plants. Contribution to GREAT-ER projects 2. *The Sci. of the Total Environmental*, v. 210/211, p. 255- 269.

HOLT, M. S.; WATERS, J.; COMBER, M. C. I.; ARMITAGE, R.; MORRIS, R., NEWBERY, C. (1995). AIS/ CESIO Environmental surfactant monitoring program.

SDIA sewage treatment pilot study on linear alkylbenzene sulfonate. *Water Research*, v. 29, p. 2063-2070.

HOUSAINDOKN, M. R.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; MOGHADASI, J.; JONES, M. N. (1993). Interaction of glucose oxidase with ionic surfactants: a microcalorimetric study. *Int. J. Macromol.*, v. 15, p. 337-341.

HOUSE, W. H.; FARR, I. S. (1989). Adsorption of sulphonates from detergent mixtures on potassium kaolinite. *Coll. Surf.*, v. 40, p. 167- 180.

HUANG, L. N.; ZHU, S.; ZHOU, H.; QU, L. H. (2005). Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill. *FEMS Microbiology Letters*, v. 242, p. 297-303.

HUDDLESTON R.; NIELSEN, A.; COOK, A. (1979). LAS biodegradation: the phase of the aromatic ring. *Soap Comestics, Chemical Specialties*, v. 53, p. 36-38.

HUSKA, J.; ZÁVADSKÁ, I.; TÓTH, D.(1997). Effect of carbon starvation of bacteria on acceleration of surfactant biotransformation. *Biologia*, v. 52, p. 753-758.

HUSKA, J.; ZÁVADSKÁ, I.; TÓTH, D., DOBROTOVÁ, M., GEMEINER, P. (1996). Immobilization of surfactant degradation bacteria in alginate gel. *Biologia (Brasil)*, v. 51, p. 505-508.

IGLESIAS-JIMENEZ, E.; POVEDA, E.; SANCHEZ-MARTIN, M. J.; SANCHEZ-CAMAZANO, M. (1997). Effect of nature of exogenous organic matter on pesticide sorption by the soil. *Arch Environ. Contam. Toxicol.*, v. 33, p. 117-125.

ISOBE, K. O.; ZAKARIA, M. P.; CHIEM, N. H.; MINH, L. Y.; PRUDENTE, M.; BOONYATUMANOND, R.; SAHA, M.; SARKAR, S.; TAKADA, H. (2004). Distribution of linear alkylbenzene (LABs) in river and coastal environments in south and southeast Asia. *Water Research*, v. 38, p. 2449-2459.

JENSEN, J. (1999). Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment. *The Science of the Total Environment*, v. 226, p. 93- 111.

JERABKOVA, H.; KRALOVA, B.; NAHLIK, J. (1999). Biofilm of *Pseudomonas* C12B on glass support as catalytic agent and for continuous SDS removal. *Int. Biodeterior Biodegrad.*, v. 44, p. 233-241.

JIMENEZ, L.; BREEN, A.; THOMAS, N.; FEDERLE, T.W.; SAYLER, G. (1991). Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 57, p. 1566-1569.

KAKSONEN, A. H.; PLUMB, J. J.; ROBERTSON, W. J.; FRANZMANN, P. D.; GIBSON, J. A. E.; PUHAKKA, J. A. (2004). Culturable diversity and Community fatty acid profiling of sulfate-reducing fluidized-bed reactors treating acidic metal-containing wastewater. *Geomicrobiol. J.*, v. 21, p. 469-480.

- KARSA, D. R.; PORTER, M. R. (1995). Biodegradability of surfactants. Blackie Academic and Professional. 257p.
- KEIS, S.; BENNETT, C. F.; WARD, V. K.; JONES, D. T. (1995). Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 45, p. 693-705.
- KERTESZ, M. A. (1996). Desulfonation of aliphatic sulfonates by *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *FEMS Microbiology Letters*, v. 137, p. 221-225.
- KERTESZ, M. A., (1999). Ridding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, p. 135-175.
- KERTESZ, M. A.; KÖLBERNER, P.; STOCKINGER, H.; BEIL, S.; COOK, A. M. (1994). Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. *Appl. Environ. Microbiology*, v. 60, p. 2296-2303.
- KHANISLAMOVA, G. M. (1991). Effects on non-ionic surfactants on life activities of *Collembola*. In: VEERESH, G. K., VIRAKTAMATH, D. (Eds) *Advances in Management and Conservation of Soil Fauna*. New Delhi: Oxford and IBH Publishing LTD, p. 383-387.
- KIKUCHI, M.; TOKAI, A.; YOSHIDA, T. (1986). Determination of trace levels of linear alkylbenzenesulfonates in the marine environment by high-performance liquid Chromatography., v. 20, p. 643-650.
- KIMURA, M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions trough comparative studies of nucleotides sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, p. 111-120.
- KNIEF, C.; DUNFIELD, P. F. (2005). Respoense and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing rations. *Environmental Microbiology*, v. 7, p. 1307-1317.
- KOCAL, J. A.; VORA, B. V.; IMAI, T. (2001). Production of linear alkylbenzenes. *Applied Catalysis A: General*, v. 221, p. 295-301.
- KOTANI, M.; MASAMOTO, Y.; WATANABE, M. (1994). An alternative study of the skin irritant effect of a homologous series of surfactants. *Toxic. In Vitro*, v. 8, p. 229-233.
- KRÜEGER, C. J.; RADAKOVICH, K. M.; SAWYER, T. E.; BARBER, L. B.; SMITH, R. L.; FIELD, J. A. (1998). Biodegradation of surfactant linear alkylbenzenesulfonate in sewage contaminated ground water and field tracer test. *Environ. Sci. Technol.*, v. 32, p. 3954-3961.

KÜCHLER, T.; SCHANAACK, W. (1997). Behaviour of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sandy soils with low amounts of organic matter. *Chemosphere*, v. 35, p. 153-167.

KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 23, p. 39-48.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

LAPARA, T.; NAKATSU, C. H.; PANTEA, L.; ALLEMAN, J. (2000). Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 3951-3959.

LARSON, R. J. (1990). Structure-activity relationships for biodegradation of linear alkylbenzenesulfonates. *Environ. Sci. Technol.*, v. 24, p. 1241-1247.

LARSON, R. J.; ROTTHGEB, T. M.; SHIMP, R. J.; WARD, T. E.; VENTULLO, R. M. (1993). Kinetics and practical significance of biodegradation of linear alkylbenzene sulphonate in the environment. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v. 70, p. 645-657.

LARSON, R. J.; VASHON, R. D. (1983). Biodegradation of cationic surfactants in laboratory and environmental systems. *Dev. Ind. Microbiol.*, v. 24, p. 425-434.

LARSON, R.J.; PAYNE, A. (1981). Fate of the benzene ring of linear alkylbenzene sulphonate in natural waters. *Applied Environmental Microbiology*, v. 41, p. 621-627.

LAWRENCE, J. E.; GRANT, J.; QUILLIAM, M. A.; BAUDER, A. G.; CEMBELLA, A. D. (2000). Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Trochocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture. *Marine Ecology Process Series*, v. 201, p. 147-154.

LEE, B. K. H (1970). The effect of anionic and non-ionic detergents on soil microfungi. *Can J Bot.*, v. 48, p. 583-589.

LEE, C.; RUSSELL, N. J.; WHITE, G. F. (1995). Modelling the kinetics of biodegradation of anionic surfactants by biofilm bacteria from polluted river sites: A comparison of five classes of surfactant at three sites. *Water Res.*, v. 29, p. 2491-2497.

LEÓN, V. M.; GONZÁLEZ-MAZZO, E.; FORJA, J. M.; GÓMEZ-PARRA, A. (2000) Identification of linear alkylbenzene sulfonate biodegradation intermediates in anoxic marine coastal sediments. *The Cler Review*, v. 6, p. 40- 45.

LESER, T. D.; AMENUVOR, J. Z.; JENSEN, T. K.; LINDECORONA, R. H.; BOYE, M.; MOLLER, K. (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 673-690.

LIE, T.J.; CLAWSON, M.L.; GODCHAUX, W.; LEADBETTER, E.R (1999). Sulfidogenesis from 2-aminoethanesulfonate (taurine) fermentation by a morphologically unusual sulfate-reducing bacterium, *Desulforhopalus singaporensis* sp.nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 3328-3334.

LIMA, C. A. A. L. (2001). *Tratamento de esgoto sanitário em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) – escala piloto*. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

LOBNER, T.; TORÄNG, I.; BATSTONE, D. J.; SCHMIDT, J. E.; ANGELIDAKI, I. (2005). Effects of process stability on anaerobic biodegradation of LAS in UASB reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, p. 758-765

LOVLEY, D. R.; PHILLIPS, E. J.; LONERGAN, D. J.; WIDMAN, P. K. (1995). Fe(III) and S⁰ reduction by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, p. 2132-2138.

LUCIANI, I.; DENOYEL, R.; ROUQUEROL, J. (2001). Pole(ethoxy) anionic surfactants: micellization and adsorption at the solid/liquid interface. *Colloids Surf, A.*, v. 178, p. 297-312.

MAINTINGUER, S. I. (2004). *Degradação anaeróbia de fenol sob diferentes condições nutricionais*. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

MARCHESI, J. R.; HOUSE, W.A.; WHITE, G. F.; RUSSEL, N. J.; FARR, L. S. (1991). A comparative study of the adsorption of linear alkylbenzene sulphates and alkylbenzene sulphonates on river sediments. *Colloid. Surf.*, v. 53, p. 63-78.

MARCOMINI, A.; CAPEL, P. D.; LICHTENSTEIGER, T.; BRUNNER, P. H.; GIGER, W. (1989). Behavior aromatic surfactants and PCBs in sludge-treated soil and landfills. *J. Environ Qual.*, v. 18, p. 523-528.

MARCOMINI, A.; CAPRI, S.; GIGER, W. (1987). Determination of linear alkylbenzenesulphonates, alkylphenol polyethoxylates and nonylphenol in wastewater by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, v. 403, p. 243-252.

MARCOMINI, A.; DI CORCIA, A.; SAMPERI, R.; CAPRI, S. (1993). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic biotransformation products. *J. Chromatographic A*, v. 644, p. 59-71.

MARQUES, M. L.; SILVA, J.; ROSEIRO, J. C. (1999). Co-metabolism and microbiol growth in the biodegradation of alkylbenzenesulphonates. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 24, p. 435-437.

MATTHIES, C.; EVERS, S.; LUDWIG, W.; SCHINK, B. (2000). *Anaerovorax odorimutans* gen. nov. sp. nov., a putrescine fermenting, strictly anaerobic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 1591-1594.

MATTHIES, C.; KUBNER, C. H.; ACKER, G.; DRAKE, H. L. (2001). *Clostridium uliginosum* sp. nov., a novel acid-tolerante, anaerobic bacterium with connecting filaments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 1119-1125.

MATTHIJS, E.; DE HENAU, H. (1987). Determination of LAS. *Tenside surfactant Detergent*, v. 24, p. 193-198.

MC AVOY, D. C.; ECKHOFF, W. S.; RAPAPORT, R. A. (1997). Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the environmental. *The Cler Review*, v. 3, p. 4-17.

MEZZANOTE, V.; CASTIGLIONI, F.; TODESCHINI, R.; PAVAN, M. (2003). Study on anaerobic and aerobic degradation of different non-ionic surfactants. *Bioresorce Technology*, v. 87, p. 87-91.

MIEURE, J. P.; WATERS, J.; HOLT, M. S.; MATTHIJS, E. (1990). Terrestrial safety assessment of linear alkylbenzene sulfonate. *Chemosphere*, v. 21, p. 252-262.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. (1984) (EDS) *Statistics for analytical chemistry*. Ellis Horwood Chichester, p. 96, ch 4.

MIYAZAKI, M.; TORIGOE, K.; ESUMI, K. (2000). Interactions of sugar per-substituted poly (amidoamine) dendrimers with anionic surfactants. *Langmuir*, v. 16, p. 1522-1528.

MÖESCHE, M.; MEYER, U. (2001). Anaerobic treatment of surfactnt containing wastewater from textile finishing Industry. In *9th World Congr. Anaerob. Digest.* 02-05 Sep. 2001, Anais, Belgica.

MONGENSEN, A. S.; AHRING, B. K. (2002). Formation of metabolites during biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in an Upflow Anaerobic Sludge Bed reactor under thermophilic conditions. *Biotechnol. Bioengin.*, v. 77, p. 483-488.

MORAES, E. M.; ADORNO, M. A.T.; ZAIAT, M.; Foresti, E. (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- PE. Anais. Editora Universitária- UFPE, p. 2813-2823.

MORENO, A.; FERRER, J.; BEVIA, F.; PRATS, D.; VÁSQUEZ, B.; ZARZO, D. (1994). Monitoring of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) removal in a lagoon treatments system. *Water Research*, v. 28, p. 2183-2189.

MUKERJEE, P.; MYSELS, K. J. (1971). *Critical micelle concentration of aqueous surfactant systems*. National Standard Reference Data System. US Department of Commerce, Washington.

MUNSON, M. A.; PITT-FORD, T.; CHONG, B.; WEIGHTMAN, A.; WADE, W. G. (2002). Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J. Dent. Res.*, v. 81, p. 761-766.

NAKAE, A.; TSUJI, K.; YAMANAKA, M. (1980). Determination of trace amounts of alkylbenzenesulfonates by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Analyt. Chem.*, v. 52, p. 2275-2277.

NAKAE, A.; TSUJI, K.; YAMANAKA, M. (1981). Determination of alkyl chain distribution of alkylbenzenesulfonates by liquid chromatography. *Analyst. Chem.*, v. 53, p. 1818-1821.

NAKAGAWA, T.; SATO, S.; YAMAMOTO, Y.; FUKUI, F. (2002). Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. *Water Research*, v. 36, p. 2813-2823.

NAKAYAMA, C. R. (2005). *Degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP), 2,3 4-triclorofenol (2, 3, 4 – TCP) e 2,6 – diclorofenol (2,6 – DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do sistema Estuarino Santos São Vicente*. Tese (doutorado). – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, 2005.

NIELSEN, A.T.; LIU, W. T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D. (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1251-1258.

OLIVEIRA, S.W.B; MOARES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. (2004). Formaldehyde degradation in an anaerobic packed-bed bioreactor. *Water Research*, v. 38, p. 1685-1694.

OSBORN, A. M.; MOORE, E. R. B.; TIMMIS, K. N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.*, v. 2, p. 39-50.

OSBORNE, C. A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. (2005). PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, v. 248, p. 183-187.

OU, Z.; YEDILER, A.; YAUWU, H.; LIANGQING, J.; KETTRUP, A.; TIECHENG, S. (1996). Adsorption of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on soils. *Chemosphere*, v. 32, p. 827-839.

PACIK, I. (1990). Modified polyurethane carriers for biochemical wastewater treatment. *Water Science Technology*, v. 22, p. 33-42.

PADDEN, A. N.; DILLON, V. M.; EDMONDS, J.; COLLINS, M. D.; ALVAREZ, N.; JOHN, P. (1999). An indigo-reduce moderate thermophile from a woad vat, *Clostridium isatidis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 49, p. 1025-1231.

PADDEN, A. N.; RAINEY, F. A.; KELLY, D. P.; WOOD, A. P. (1997). *Xanthobacter tagetidis* sp. nov., an organism associated with Tagetes species and able to grow on substituted thiophene. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 47, p. 394-401.

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

PAPADOPOULOS, A.; SAVVIDES, C.; LOIZIDIS, M.; HARALAMOUS, K. J.; LOIZIDOU, M. (1997). An assessment of the quality and treatment of detergent wastewater. *Water Sci. Technol.*, v. 36, p. 377-381.

PARK, J. W.; JAFFE, P. R. (1993). Partitioning of three nonionic organic compounds between adsorbed surfactants, micelles, and water. *Environ. Sci. Technol.*, v. 27, p. 2559-2566.

PARTEARROYO, M.A.; PILLING, S. J.; JONES, M. N. (1991). The lysis of isolated fish (*Oncorhynchus mykiss*) gill epithelial cells by surfactants. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 100, p. 381-388.

PASTER, B. J.; BOCHES, S. K.; GALVIN, J. L.; ERICSON, R. F.; LAN, C. N.; LEVANOS, V. A.; SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.*, v. 183, p. 3770-3783.

PATTERSON, D. A.; METCALFE, I. S.; XIONG, F.; LIVINGSTON, A. C. (2001). Wet air oxidation of linear alkylbenzene sulfonates. Effect of temperature and pressure. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 40, p. 5507-5516.

PECENIK, G.; BORGONOVI, G.; CASTRO, P.; GAGLIARDI, I. (1984). Biodegradation of linear alkylbenzene sulphonates (LAS). *Proceedings of the Eighth Surfactant Congress*, v. 1, p. 121-127.

PERALES, J. A.; MANZANO, D.; SALES, J. M. (1999). Linear alkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 63, p. 94-100.

PERALES, J. A.; MANZANO, M. A.; SALES, D.; QUIROGA, J. M. (2003). Biodisposition of linear alkylbenzene sulphonates and their associated sulphophenyl carboxylic acid metabolites in sea water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 51, p. 187-194.

PETERS, R. W.; SHEM, L.; LEWIS, B. A. (1992). Surfactant screening of diesel-contaminated soil. *Hazard Waste Hazard Mater*, v. 9, p. 113-137.

PRATS, D.; RODRIGUEZ, F.; MUELA, M. (1995). LAS in marine sediments. In *Proceedings of the 26 th Symposium on Tenside Detergents*, 1995, Barcelona, Anais, p. 177-190,

PRATS, D.; RODRIGUEZ, M.; LLAMAS, J. M.; MUELA, M. A.; FERRER, J.; MORENO, A.; BERNA, J. L. (2000). The use of specific analytical methods to assess the anaerobic biodegradation of LAS. In: *Proceedings 5th World Surfactants Congress CESIO 2000*. Fortezza de Basso, Firenze, Itália, May-june, p. 1638-1643.

PRATS, D.; RUIZ, F.; VAZQUEZ, B.; ZARZO, D.; BERNA, J. L.; MORENO, A. (1993). LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting-ecological implications. *Environ Toxicol Chem.*, v. 12, p. 1599-1608.

PULS, R. W.; PAUL, C. J.; VARDY, J. (1994). Transport and transformation of hexavalent chromium through soils and into ground water. *J. Soil. Contam.*, v. 3, p. 203-225.

QUIROGA, J.; SALES, D.; GÓMEZ-PARRA, A. (1989). Experimental evaluation of pollution potencial of anionic surfactant in the marine environment. *Water Research*, v. 23, p. 801-807.

RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. (1993). Phylogenetic evidence for the classification of *Acidothermus cellulolyticus* into the subphylum of actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 108, p. 27-30.

RAPAPORT, R. A.; ECKHOFF, W. S. (1990). Monitoring linear alkylbenzene sulfate in the environment 1973-1986. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 9, p. 1245-1257.

REES, G. N.; PATEL, B. K.; GRASSIA, G. S.; SHEEHY, A. J. (1997). *Anaerobaculum thermoterrenum* gen. nov., sp. nov., a novel, thermophilic bacterium which ferments citrate. *Int. J. Syst Bacteriol.*, v. 47, p. 150-154.

RIBEIRO, R. (2001). *Influência do tipo de substrato na dinâmica de formação do biofilme em matrizes de poliuretano*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

RIEU-LESME, F.; MORVAN, B.; COLLINS, M. D.; FONTY, G.; WILLEMS, A. (1996). A new H₂/CO₂ – using acetogenic bacterium from the rumen: description of *Ruminococcus schinkii* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 140, p. 281-286.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, L. C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, v. 58, p. 406-411.

ROEST, K.; HEILING, H. G.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; STAMS, A. J.; AKKERMANS, A. D. (2005). Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 28, p. 175-185.

ROIG, M. G.; PEDRAZ, M. A.; SANCHEZ, J. M. (1999). Adsorption and primary biodegradation of anionic surfactants. Action of immobilized *Pseudomonas* cells. *Ing. Quim. (Madri)*, v. 31, p. 179-191.

ROIG, M. G.; PEDRAZ, M. A.; SANCHEZ, J. M.; HUSKA, J.; TÓTH, D. (1998). Sorption isotherms and kinetics in the primary biodegradation of anionic surfactants by immobilized bacteria: II *Comamonas terrigena* N3H. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, v. 4, p. 271-281.

ROY, D. (1988). Effect of an anionic detergent on the lipid moieties of various cell types in the opercular epidermis of *Rita rita*. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, v. 41, p. 353-360.

RUIZ BEVIA, F.; PRATS, D.; RICO, C. (1989). Elimination of LAS (linear alkylbenzene sulfonate) during sewage treatment drying and composting of sludge and soli amending process, In: QUAGHEBEUR, D.; TEMMERMAN, I.; ANGELETTI, G. (Eds), *Organic contaminants in waste water, sludge and sediments*, Elsevier Applied Science, Londres, 1989.

RUTHVEN, D. M. (1984) *Principles of adsorption and adsorption process*. Ed John Wiley & Sons, New York.

SÁEZ, M.; LEÓN, V. M.; GÓMEZ-PARRA, A.; GONZÁLEZ-MAZO, E. (2000). Extraction and isolation of linear alkylbenzene sulfonates and their intermediate metabolites from various marine organisms. *Journal of Chromatography A*, v. 889, p. 99-104.

SAITOU, N.; NEI, M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, v. 4, p. 406-425.

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

SANZ, J. L.; RODRIGUEZ, N.; FERRER, J.; MORENO, A.; BERNA, J. L. (2000). Evaluation of the inhibition potencial of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to the methanogenic process. *The Cler Reviews*, v. 6, p. 26-30.

SARRACIN, L.; LIMOUZIN-MAIRE, Y.; REBOUILLON, P. (1999). Evaluation of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) biodegradability in sediment by solid-phase extraction and HPLC analysis. *Toxicol. Environ. Chem.*, v. 69, p. 487-498.

SARTI, A. (1998). *Avaliação de desempenho do Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) no tratamento de substrato sintético simulando esgoto doméstico*. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1508, p. 235-251.

SEDLAK, R. I.; BOOMAN, K. A. (1986). Study of LAS and alcohol ethoxylate removal at a municipal wastewater treatment plant. Paper presented at the US SDA annual convention Boca Raton, FL.

SHCHERBAKOVA, V.; LAURINAVICHUS, S.; AKIMENKO, V. K. (1999). Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in anaerobic microbial community. *Chemosphere*, v. 39, p. 1861-1870.

SILVA, A. J. (2005). *Biodessulfatação com posterior oxidação parcial do sulfeto em reatores operados em bateladas seqüências*. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SOKOLOVA, T. G.; GONZÁLEZ, J. M.; KOSTRIKINA, N. A.; CHERNYH, N. A.; SLEPOVA, T. V.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A.; ROBB, F. (2004). *Thermosinus carboxydivorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, carbon-monoxide-oxidizing, hydrogenogenic bacterium from a hot pool of Yellowstone National Park. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 54, p. 2353-2359

SOMASUNDARAN, P.; HUANG, I. (2000). Adsorption /aggregation of surfactants and their mixtures at solid-liquid interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci*, v. 88, p. 1798-208.

SPROER, C.; REICHENBACH, H.; STACKEBRANDT, E. (1999). The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 49, p. 1255-1265.

STACKEBRANDT, E.; KRAMER, I.; SWIDERSKI, J.; HIPPE, H. (1999). Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, v. 24, p. 253-258.

Standard Methods for the Examination of water and wastewater (1998). 20th ed. APHA/AWWA/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

STEBER, J. (1979). Investigation of the biodegradation of ¹⁴C ring-labeled linear alkylbenzene sulphonate in surface water and sewage treatment plant models. *Water Research*, v. 21, p. 661-667.

STEBER, J.; WIERICH, P. (1985). Metabolites and biodegradation pathways of fatty alcohol ethoxylates in microbial biocenoses of sewage treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 49, p. 530- 537.

STROMPL, C.; TINDALL, B. J.; JARVIS, G. N.; LUNSDORF, H.; MOORE, E. R.; HIPPE, H. (1999). A re-evaluation of a taxonomy of the genus *Anaerovibrio*, with the reclassification of *Anaerovibrio glycerini* as *Anaerosinus glycerini* gen.

nov., comb. nov., and *Anaerovibrio burkinabensis* as *Anaeroarcus burkinabensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 49, p. 1861-1872.

SWISHER, R. D. (1987). Surfactants: their nature, behavior, and structure. In: DEKKER, M *Surfactant Biodegradation*, p. 17-45, Inc. New York.

TANAKA, K.; STACKEBRANDT, E.; TOHYAMA, S.; EGUCHI, T. (2000). *Desulfovirga adipica* gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, Gram negative, sulfate reducing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 639-644.

TANAKA, S.; ICHIKAWA, T. (1993). Effects of photolytic pre-treatment on biodegradation and detoxification of surfactants in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.*, v. 28, p. 103-110.

TARTAKOVSKY, B.; MANUEL, M. F.; BEAUTIER, D.; GREER, C. W.; GUIOT, S. R. (2001). Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol degrading consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 734, p. 476-483.

TELH, M. (2001). *Avaliação do uso de reator anaeróbio horizontal de leito fixo no tratamento de vinhaça sob condições termofílicas*. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001

TELLES, G. P.; SILVA, F. R. (2001). Trimming and clustering sugarcane ESTs. *Gen. Mol. Biol.*, v. 24, p.17–23.

THOMAS, O. R. T.; WHITE, G. F. (1991). Immobilization of the surfactant-degrading bacterium *Pseudomonas* 12B in polyacrylamide gel: II. Optimizing SDS-degrading activity and stability. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 12, p. 969-975.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. J.; GIBSON, T. J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v. 22, p.4673–4680.

TOLLS, J.; LEHMANN, D. T.; SIJM, H. M. (2000). Quantification of in vivo biotransformation of the anionic C12- 2-LAS in fathead minnows. *Environ. Tox. Chem.*, v. 19, p. 2394-2400.

TOPPING, B. W.; WATERS, J (1982). The monitoring of cationic surfactants in sewage plants. *Tenside Surfactant Deterg.*, v. 19, p. 164-169.

TORRES, P (1992). *Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

TREHY, M. L.; GLEDHILL, W. E.; MIEURE, J. P.; ADAMOVE, J. E.; NIELSEN, M.; PERKINS, H. O.; ECKHOFF, J. E. (1996). Environmental monitoring for linear

alkylbenzene sulfonates, dialkyltetralin sulfonates and their biodegradation intermediates. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 15, p. 233-240.

UTSUNOMIYA, A.; WATANUKI, T.; MATSUSHITA, K.; NISHINA, M.; TOMITA, I. (1997). Assessment of the toxicity of linear alkylbenzene sulfonate and quaternary alkylammonium chloride by measuring C13-glycerol in *Dunaliella* sp. *Chemosphere*, v. 3, p. 2479-2490.

VAN ELSAS, J. D. (1995). Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties. *Scientia Horticultura*, v. 63, p. 131-133.

VAZQUEZ, G.; ANTORRENA, G.; NAVAZA, J. M. (2000). Influence of surfactant concentration and chain length on the absorption of CO₂ by aqueous surfactant solutions in the presence and absence of induced Marangoni effect. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 39, 1088-1094.

VERGE, C.; MORENO, A. (2000). Effects of anionic surfactants on *Daphna magna*. *Tenside Surfactants Deterg.*, v. 37, p. 172-175.

VISSCHER, P.T.; GRITZER, R. F.; LEADRETTER, E. R. (1999). Low-molecular-weight sulfonates, a major substrate for sulfate reducers in marine microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 3272-3278.

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

WALKER, B. (1995). Conserving biological diversity through ecosystem resilience. *Conservation Biology*, v. 9, p. 747-752.

WANG, J.; ZENG, B.; FANG, C.; ZHOU, X. (2000). The influence of surfactants on the electron-transfer reaction at the self-assembled thiol monolayers modifying a gold electrode. *J. Electroanal Chem.*, v. 484, p. 88-92.

WANG, X.; MAEGAWA, T.; KARASAWA, T.; OZAKI, E.; NAKAMURA, S. (2005). *Clostridium sardiniense* Prevot 1938 and *Clostridium absonum* Nakamura et al. 1973 are heterotype synonyms: evidence from phylogenetic analyses of phospholipase C and 16S rRNA sequence, and DNA relatedness. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 55, p. 1193-1197

WATANABE, K.; TERAMOTO, M.; HARAYAMA, S. (1999). An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 2813-2819.

WATERS, J.; FEIJTEL, T. C. J. (1995). AIS/CESIO environmental surfactant monitoring program: outcome of five national pilot studies on linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Chemosphere*, v. 30, p. 1939-1956.

WINTZINGERODE, F. V.; SELENT, B.; HEGEMANN, W.; GÖBEL, U. B. (1999). Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene transforming microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 283-286.

WOLF, W.; FEIJTEL, T. (1998). Terrestrial risk assessment for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in sludge amended soils. *Chemosphere*, v. 36, p. 1319-1343.

WU, Z. H.; JIANG, D. M.; LI, P.; LI, Y. Z. (2005). Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. *Environ. Microbiol.*, v. 7, p. 1602-1610.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. (2005). *Pleomorphomonas oryzae*. gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 55, p. 1233-1237.

YOKOYAMA, Y.; SATO, H. (1991). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of linear alkylbenzenesulphonates in river water at ppb^a levels by pre-column concentration. *Journal of Chromatography*, v. 555, p. 155-162.

YOSHIKUNI, Y.; CHIZUMI, E.; YASUKO, M.; HIROSHI, K.; KAZUKI, M.; KOUICHI, Y. (1992). Kinetic study on the biodegradation of linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in well-water. *Chemosphere*, v. 24, p. 969-977.

YOSHIMURA, K.; ARA, K.; HAYASHI, K.; KAWASE, J.; TSUJI, K. (1984). Biodegradation of linear alkylbenzene sulphonate and soap in river water. *Japanese Journal of Limnology*, v. 45, p. 204-212.

ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; Foresti, E. (1994). Reator anaeróbio de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química*, v. 11, p. 33-42.

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

ZAVARZINA, D. G.; ZHILINA, T. N.; TOUROVA, T. P.; KUZNETSOV, B. B.; KOSTRIKINA, N. A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. (2000). *Thermanaerovibrio velox* sp. nov., a new anaerobic thermophilic, organotrophic bacterium that reduces elemental sulfur, and emended description of the genus *Thermanaerovibrio*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 1287-1295.

Apêndice A - Curvas de calibração

Tabela A1. Curva de calibração para determinação de alquilbenzeno linear sulfonado

Padrão (mg/L)	Parâmetros	Pico 1 (14±0,5 min)	Pico 2 (17±0,6 min)	Pico 3 (20±0,6 min)	Pico 4 (23±0,5 min)	Soma (áreas)
2	área	55013	108814	84900	49972	298693
	mg/L	0,37	0,73	0,57	0,33	
	(%)	18,5	36,5	28,5	16,5	
4	área	94133	195951	160960	107403	558447
	mg/L	0,67	1,40	1,15	0,77	
	(%)	16,7	35,4	28,7	19,2	
6	Área	181983	350181	262645	157129	951938
	mg/L	1,15	2,21	1,65	0,99	
	(%)	19,2	36,8	27,5	16,5	
8	Área	260639	497408	359452	208402	1325901
	mg/L	1,57	3,00	2,17	1,26	
	(%)	19,6	37,5	27,2	15,7	
10	área	329207	661380	521770	315054	1827411
	mg/L	1,80	3,62	2,85	1,72	
	(%)	18,0	36,2	28,5	17,3	
12	área	356372	724581	558410	368256	2007619
	mg/L	2,13	4,33	3,34	2,20	
	(%)	17,7	36,2	27,8	18,3	
14	área	399912	804614	611707	470000	2286233
	mg/L	2,45	4,93	3,75	2,88	
	(%)	17,5	35,2	27,7	20,0	
16	área	433771	910644	743295	480076	2567786
	mg/L	2,70	5,67	4,63	2,99	
	(%)	16,8	35,4	28,9	18,7	
20	área	538576	1193147	898358	662046	3292127
	mg/L	3,27	7,25	5,46	4,02	
	(%)	16,3	36,2	27,3	20,1	

Tabela A2. Exemplo de Curva de Calibração para determinação de LAS

Concentração Teórica (mg/L)	Pico 1 (área)	Pico 2 (área)	Pico 3 (área)	Pico 4 (área)	Área Total
2	29794	68014	18883	49071	165762
4	66916	142479	111245	80967	401607
6	105407	199618	155939	110446	571410
8	138272	266030	202259	133155	739716
10	188033	422237	357304	265617	1233191
12	228616	509590	427071	297779	1463056
14	357539	659999	529745	363710	1910993

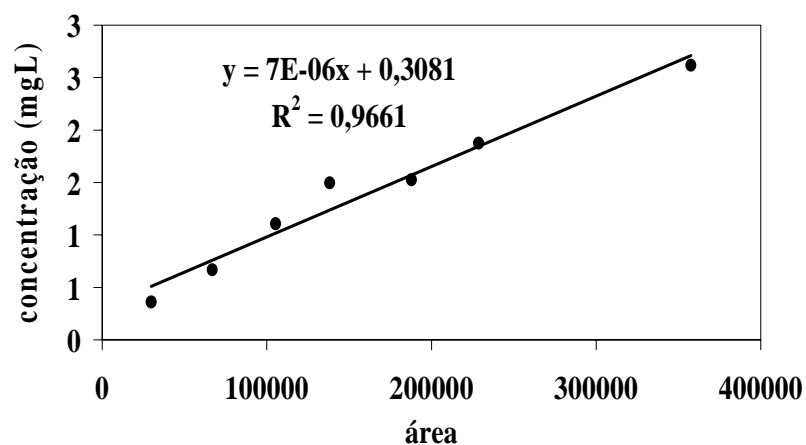


Figura A1. Curvas de calibração de LAS para o pico 1

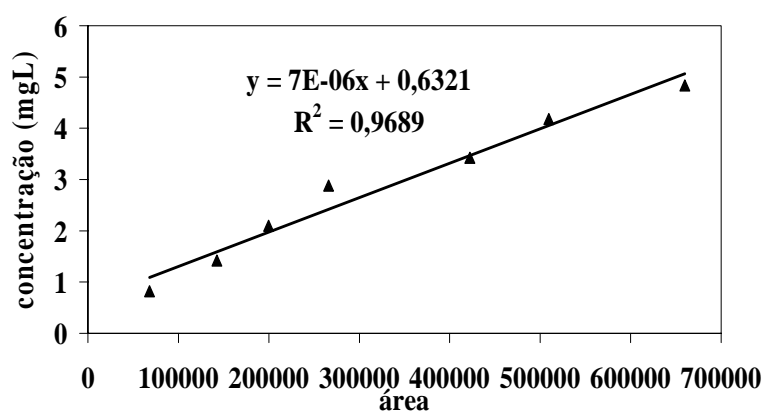


Figura A2. Curvas de calibração de LAS para pico 2

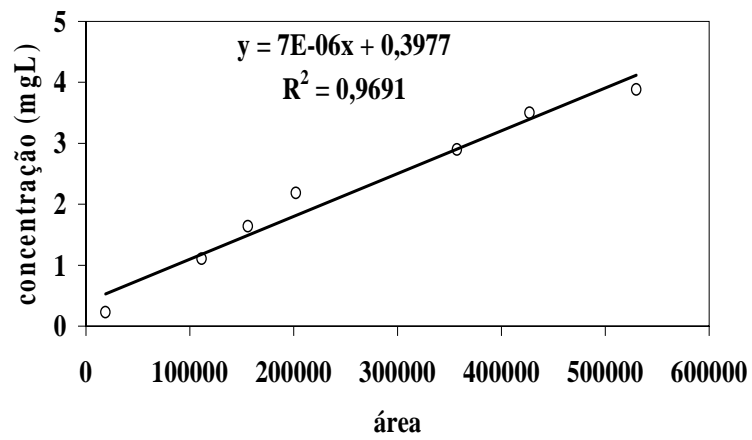


Figura A3. Curvas de calibração de LAS para o pico 3

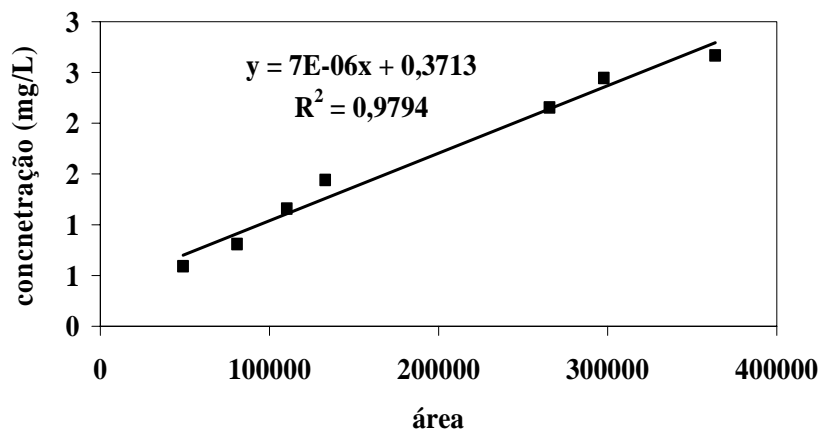


Figura A4. Curvas de calibração de LAS para o pico 4

Apêndice B – Testes de adsorção

Tabela B1. Valores de LAS adsorvido nas espumas ao longo do tempo – Ensaio de tempo de contato em reatores em batelada

Tempo (horas)	Quantidade de LAS adsorvido nas espumas de poliuretano	
	mg/L	mg
0	5,2	1,0
0,25	4,1	0,8
0,5	7,2	1,4
1,0	11,9	2,4
2,5	7,5	1,5
5,0	10,7	2,1
10,0	8,8	1,8

Tabela B4. Valores de LAS presente na solução de esgoto sintético e adsorvido na espuma de poliuretano após 12 horas de contato

Ce (mg/L)	Quantidade de LAS adsorvido nas espumas de poliuretano	
	(mg/L)	mg
1,4	1,2	0,2
5,0	2,4	0,5
5,8	10,7	2,1
9,1	11,6	2,3
14,2	10,5	2,1
13,3	15,4	3,1
15,1	16,8	3,4
20,0	19,7	3,9
19,3	32,2	6,4

Ce= concentração de LAS na solução de esgoto sintético logo após contato com a espuma

Apêndice C - Monitoramento dos reatores em batelada

Tabela C1a. Concentração média de metano ($\mu\text{mol/L}$) no *headspace* dos reatores anaeróbios em batelada alimentados com meio mineral e LAS como única fonte de carbono orgânico

Tempo (dias)	Controle (sem LAS)	Ensaio B 50 mgLAS/L	Ensaio C 100 mgLAS/L	Ensaio D 200 mgLAS/L
1	2,30	3,04	2,95	4,11
2	2,07	4,20	3,67	5,82
3	3,60	4,23	4,24	4,74
4	4,83	5,86	5,63	9,00
5	4,48	5,58	5,15	8,19
6	4,30	5,96	5,39	7,23
7	4,94	6,33	6,10	8,24
10	6,04	7,62	7,88	9,28
11	5,81	6,87	6,79	8,69
14	8,57	7,25	6,55	8,60
17	8,72	10,23	9,15	12,85
18	7,84	10,33	9,68	13,42
19	9,41	8,86	10,74	15,58
20	10,10	10,74	9,96	13,50
21	8,41	11,13	9,43	11,62
24	10,42	11,65	11,87	14,65
26	9,91	12,82	12,87	13,48
27	10,88	15,05	12,46	15,90
28	9,74	12,74	15,98	20,15
33	10,11	13,05	17,08	12,71
34	11,64	11,89	13,88	19,47
35	11,09	16,16	13,29	15,31
40	13,90	13,77	15,90	15,10
42	15,57	16,88	17,17	17,33
45	12,91	13,34	17,53	13,31
46	17,36	18,14	15,30	18,06
47	15,81	15,43	16,00	16,37
49	15,87	15,75	18,04	16,33
52	16,18	17,67	14,41	19,07
55	17,60	17,81	14,40	19,95

Tabela C1b. Concentração média de metano ($\mu\text{mol/L}$) no *headspace* dos reatores anaeróbios em batelada alimentados com meio mineral, LAS e co-substrato

Tempo (dias)	Ensaio E	Ensaio F
	50 mgLAS/L + 350 mg Lactato/L	50 mgLAS/L+ 350 mg Glicose/L
1	4,42	5,46
2	6,49	6,68
3	7,75	8,44
5	8,82	9,56
6	8,55	8,61
7	7,93	8,13
8	9,08	8,88
9	8,93	9,83
14	10,23	12,21
16	9,28	9,97
20	14,03	14,96
21	10,89	11,97
28	11,98	13,50
30	11,88	12,20
33	10,90	13,88
34	13,42	15,00
35	12,37	13,42
37	12,12	13,58
40	12,62	11,71
43	15,38	16,59
46	15,32	15,23
48	13,90	15,02
50	13,32	12,14
55	8,90	6,54

Tabela C2. Concentração média de metano ($\mu\text{mol/L}$) no *headspace* dos reatores anaeróbios em batelada alimentados com substrato sintético

Tempo (dias)	Substrato Sintético	Substrato Sintético + 50 mg LAS/L	Substrato Sintético + Ácidos Orgânicos	Substrato Sintético + Ácidos Orgânicos + 50 mg LAS/L
1	6,29	7,23	18,75	17,53
2	8,15	8,27	35,56	33,28
3	9,50	8,92	36,80	36,52
4	8,76	12,20	35,80	41,54
5	11,67	9,63	23,83	28,02
9	8,85	11,15	29,78	31,52
15	8,26	9,35	19,70	22,38
18	10,82	10,33	20,67	24,03
22	11,00	11,04	22,96	25,01
25	13,88	11,81	20,86	21,77
29	10,60	10,50	18,89	19,20
33	9,29	10,37	19,22	21,11
37	10,85	10,92	20,40	22,55
40	12,42	12,58	19,57	21,45
45	11,80	11,97	15,70	15,94

Apêndice D - Monitoramento dos RAHLFs

Tabela D1. Parâmetros físico-químicos do afluente e efluente do reator R1

Tempo de Operação (d)	pH Afl	pH Efl	DQO _b Afl (mg/L)	DQO _f Afl (mg/L)	DQO _b Efl (mg/L)	DQO _f Efl (mg/L)	E _{DQOb} %	E _{DQOf} %
Etapa I								
16	7,7	7,8	765	722	77	62	90	92
18	7,8	8,3	760	755	73	68	90	91
20	7,8	8,1	793	786	83	68	89	91
23	7,6	7,9	791	765	66	49	92	93
27	7,8	8,0	804	765	74	55	91	93
Etapa II								
31	7,5	8,1	845	803	70	43	92	95
34	6,9	8,3	734	682	89	47	88	93
40	7,8	8,3	811	770	61	51	92	94
48	6,9	8,3	752	690	60	45	92	94
52	6,9	7,6	815	705	70	48	91	94
Etapa III								
59	6,7	8,2	748	682	61	53	92	93
62	6,8	8,2	722	616	82	81	89	89
65	6,7	8,1	800	790	53	51	93	94
68	6,7	7,9	774	759	33	26	96	97
73	7,6	7,7	834	769	151	133	82	84
103	7,5	6,7	785	780	649	636	17	19
108	8,0	7,7	855	847	518	485	39	43
111	8,0	7,3	755	750	395	364	48	52
118	8,0	6,7	798	760	595	555	25	30
120	8,0	6,5	800	780	588	556	26	30
130	8,0	6,6	795	793	442	416	44	48
133	7,8	6,9	837	800	460	437	45	48
137	7,8	7,4	755	750	387	384	49	49
140	7,7	6,7	811	777	401	364	50	55
144	7,5	6,9	788	759	389	365	51	54
Etapa IV								
150	7,5	7,1	612	601	149	139	74	77
153	7,8	7,5	635	584	194	178	70	72
158	7,8	7,0	632	580	217	168	66	73
161	7,5	7,5	619	600	154	141	75	77
165	7,7	8,2	680	667	153	109	77	84
178	7,8	7,4	666	658	269	214	60	68
181	7,9	7,8	712	707	133	123	81	81
193	7,9	7,5	700	695	109	75	81	89
200	6,5	6,9	640	593	70	60	89	90
215	6,5	7,0	635	595	69	61	89	90
223	7,1	7,6	658	626	132	91	80	86
231	6,7	7,7	564	421	109	93	80	83
247	7,2	7,5	590	580	88	61	85	89
254	7,0	7,2	550	545	52	91	90	90
279	7,0	7,2	560	550	41	40	92	92
282	7,2	7,3	533	506	63	61	88	88
285	7,1	7,4	519	394	64	58	87	88

300	7,8	7,4	615	567	42	34	93	94
302	7,2	7,6	434	334	78	57	82	86
306	7,2	7,5	370	325	45	40	88	94
313	7,1	7,4	515	474	66	60	87	88

Tabela D2. Parâmetros físico-químicos do afluente e efluente do reator R1
(continuação)

Tempo de Operação (d)	Alcalinidade Afl (mgCaCO ₃ /L)	Alcalinidade Efl (mgCaCO ₃ /L)	AVT Efl (mgHac/L)	CH ₄ (mmol/L)
Etapa I				
16	147	280	12	8,5
18	138	289	18	8,6
20	130	301	14	9,9
23	122	330	12	14,9
27	122	314	12	11,0
Etapa II				
31	32	252	12	10,5
34	32	252	12	10,5
40	133	332	8	11,5
48	135	319	9	8,3
52	152	348	9	17,5
Etapa III				
59	76	487	13	13,6
62	83	344	12	13,0
65	103	378	7	12,4
68	110	352	9	10,0
73	197	353	27	16,3
103	208	262	57	
108	190	206	155	3,46
111	200	239	154	3,85
118	200	132	195	2,0
120	200	97	191	3,2
130	197	174	150	1,50
133	210	233	144	1,85
137	212	223	141	4,16
140	227	209	124	9,4
144	201	309	103	-
Etapa IV				
150	201	272	52	1,77
153	243	290	33	2,56
158	240	294	44	1,72
161	208	374	26	1,50
165	190	320	26	2,70
178	200	365	17	8,9
181	239	362	42	2,7
193	200	433	16	-
200	250	650	29	2,00
215	240	450	28	2,1
223	234	326	28	6,7
231	266	333	28	4,9
241	250	453	36	4,0
247	290	460	40	3,3
254	270	451	24	5,4

282	222	316	32	4,3
285	227	401	34	5,0
300	252	327	41	3,1
302	135	318	36	
306	254	328	43	7,0
313	207	311	28	

Tabela D3. Eficiência de remoção de LAS no reator R1

Tempo de Operação (d)	Afluente (mg/L)	Efluente (mg/L)	Eficiência de Remoção (%)
Etapa II			
31	7,0	0,5	93
34	6,0	0,4	93
40	7,5	1,5	80
48	7,0	1,9	73
52	7,0	4,6	34
Etapa III			
59	14,0	4,4	68
62	14,0	2,0	86
65	13,0	5,0	61
68	13,0	5,0	61
73	12,0	12,0	0
103	14,0	8,7	38
108	14,0	14,0	0
111	14,0	14,0	0
118	14,0	10,0	28
120	14,0	12,0	14
130	14,0	12,0	14
133	13,0	10,0	23
140	14,0	11,6	14
144	14,0	11,6	14
Etapa IV			
153	14,0	13,0	7,0
158	14,0	12,7	9,3
161	14,0	12,0	14
165	14,0	10,7	23
178	12,0	8,0	33
181	12,0	7,9	34
182	13,0	9,0	30
183	14,0	10,4	25
193	14	7,2	48
200	14	5,3	62
215	14	8,1	42
223	14	7,8	44
224	14	8,0	43
231	14	7,9	43
237	14	7,8	44
240	14	6,1	56

247	14	7,1	49
300	12	5,9	50
302	14	7,7	45
306	14	7,0	50
312	12	6,1	49
313	14	6,9	51

Tabela D4. Parâmetros físico-químicos do afluente e efluente do reator R2

Tempo de Operação (d)	pH Afl	pH Efl	DQO _b Afl (mg/L)	DQO _f Afl (mg/L)	DQO _b Efl (mg/L)	DQO _f Efl (mg/L)	E _{DQOb} %	E _{DQOf} %
Etapa I								
16	7,5	8,0	750	713	57	55	92	93
18	7,8	8,2	768	734	42	42	94	94
20	7,7	8,3	787	740	56	43	93	94
23	7,7	8,0	807	734	39	30	95	96
27	7,8	8,3	785	744	55	44	93	94
Etapa II								
31	7,9	8,0	837	753	42	38	91	95
34	6,7	8,2	743	686	89	74	88	90
40	7,5	8,2	808	783	46	46	94	94
48	6,8	8,2	784	710	57	46	93	94
52	7,8	7,6	818	804	55	32	93	96
Etapa III								
59	6,9	8,1	777	648	55	44	93	94
62	7,4	8,0	667	578	53	49	92	93
65	6,8	8,1	768	767	44	35	94	95
68	6,7	7,9	760	725	33	18	96	98
73	7,9	7,5	826	782	120	112	85	86
103	7,5	7,3	785	785	333	329	57	58
108	7,6	7,5	753	753	353	303	53	60
111	8,0	7,7	755	750	528	506	30	33
118	8,0	6,9	798	760	293	255	63	68
120	8,0	6,9	800	780	232	225	71	72
130	8,0	6,9	642	640	280	233	56	64
133	8,0	7,3	674	647	194	154	71	77
137	7,8	7,3	746	745	210	190	72	74
140	7,7	6,9	679	660	239	229	65	66
144	7,5	6,7	785	746	246	220	69	72
Etapa IV								
150	7,6	7,0	578	545	199	187	65	68
153	7,5	7,2	564	548	158	117	72	79
158	7,5	7,0	565	549	176	168	69	70
161	7,5	7,4	553	550	154	133	72	76
165	7,9	7,9	633	601	153	115	76	82
178	7,9	7,6	636	625	202	144	68	77
181	7,6	7,7	660	614	156	142	76	78
193	7,6	7,4	665	660	128	103	80	83
200	7,2	6,9	556	545	98	90	82	83
215	7,2	6,9	560	555	82	80	85	86
223	7,4	7,3	448	440	117	91	74	83
231	6,9	7,3	562	421	84	78	85	86
241	7,0	7,2						

247	7,1	7,5	474	470	80	75	83	84
254	7,0	7,0	460	450	60	55	87	88
ETAPA IV								
279	7,0	7,2						
282	7,2	7,6						
285	7,1	7,3						
300	7,0	7,8						
302	8,2	7,1						
306	8,2	7,5						
313	7,6	7,4						

Tabela D5. Parâmetros físico-químicos do afluente e efluente do reator R2
(continuação)

Tempo de Operação (d)	Alcalinidade Afl (mgCaCO ₃ /L)	Alcalinidade Efl (mgCaCO ₃ /L)	AVT Efl (mgHac/L)	CH ₄ (mmol/L)
Etapa I				
16	147	334	23	11,9
18	146	327	19	6,7
20	132	323	15	13,4
23	131	321	15	17,5
27	117	311	12	13,6
Etapa II				
31	32	260	12	10,9
34	32	260	11	6,9
40	133	311	14	19,4
48	82	331	10	10,9
52	152	381	13	11,6
Etapa III				
59	96	331	15	18,5
62	82	288	17	19,2
65	124	365	10	17,1
68	73	369	11	16,2
73	204	370	17	15,1
103	208	347	13	
108	185	254	77	12,3
111	190	327	82	5,5
118	210	248	51	12,1
120	200	304	36	10,8
130	200	308	57	2,80
133	208	328	19	11,54
137	227	262	83	14,00
140	226	330	51	22,0
144	201	283	47	20,0
Etapa IV				
150	189	330	26	10,4
153	200	325	25	9,00
158	200	327	26	12,04
161	216	357	21	16,6
165	187	419	23	22,3
178	200	343	24	6,3
181	206	338	18	5,1
193	200	433	16	-

200	210	698	14	1,77
215	200	425	15	5,1
223	180	274	20	5,4
231	196	316	32	8,2
241	200	411	40	5,0
247	208	485	28	5,0
254	200	419	28	2,0
Etapa IV				
279				
282	214	176	22	
285	195	207	32	
300	234	178	25	
302	159	190	34	
306	195	183	17	
313	196	192	13	

Tabela D6. Eficiência de remoção de LAS no reator R2

Tempo de Operação (d)	Afluente (mg/L)	Efluente (mg/L)	Eficiência de Remoção (%)
Etapa II			
31	8,0	1,3	84
34	7,0	1,7	66
40	8,0	2,7	66
48	7,0	2,0	71
52	8,0	2,7	66
Etapa III			
59	13,5	7,0	48
62	14,0	4,5	68
65	13,0	2,7	79
68	14,0	3,2	77
73	12,0	8,5	33
103	14,0	10,0	28
108	14,0	13,5	3,5
111	14,0	9,5	32
118	14,0	11,0	21
120	14,0	12,5	11
130	14,0	11,5	18
137	14,0	11,0	21
140	13,0	10,5	19
144	14,0	10,0	28
Etapa IV			
150	14,0	10,0	28
153	14,0	12,0	14
158	14,0	12,5	11
161	14,0	12,0	14
165	14,0	11,0	21
178	13,0	8,7	33
181	12,0	7,4	38
182	12,0	6,8	43
183	14,0	9,8	30
193	14,0	8,9	36
200	14,0	5,0	64
215	14	8,2	41
223	14	8,7	37

224	14	7,9	43
231	14	7,9	43
236	14	8,1	42
237	14	7,6	46
240	14	7,8	44
244	14	7,6	46
247	14	7,6	46
Etapa V			
279	14	12,4	11
282	14	13,7	0
285	14	10,6	24
300	14	6,2	55
302	14	5,2	63
306	14	4,7	66
312	14	1,9	86
313	14	1,3	91

Apêndice E – Variação Espacial no Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (R1 e R2)

Tabela E1. Variação espacial no reator R1 na primeira etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E (%)
	0	1	5	10	14	19	20	
DQO _f	765	516	204	111	77	57	54	93
Ácido acético	12,8	97,7	59,4	37,2	18,5	<LD	<LD	
Ácido propiônico	0	49,3	31,7	14,7	2,5	<LD	<LD	

LD – Limite de Detecção

Tabela E2. Variação espacial no reator R1 na segunda etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E (%)
	0	1	5	10	14	19	20	
DQO _f	705	575	224	95	85	62	48	93
Ácido acético	27,8	64,5	34,5	5,6	0,8	<LD	<LD	
Ácido propiônico	<LD	29,3	19,0	<LD	<LD	<LD	<LD	
SO ₄ ²⁻	11,0	16,0	9,0	9,0	5,0	3,0	2,0	
LAS	7,0	5,0	4,9	5,6	4,8	4,5	4,6	34

LD – Limite de Detecção

Tabela E3. Variação espacial no reator R1 na terceira etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E (%)
	0	1	5	10	14	19	20	
1ª Variação Espacial (68dias)								
DQO _f	774	759	574	310	157	155	135	83
Ácido acético	77,9	156,7	66,2	13,1	6,0	<LD	<LD	
Ácido propiônico	<LD	57,1	29,2	0,8	<LD	<LD	<LD	
Ácido isobutírico	<LD	0,21	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
SO ₄ ²⁻	7,0	11,0	11,0	11,0	7,0	6,0	2,0	
S ²⁻	0,05	0,63	0,91	0,75	0,83	0,90	0,13	
LAS	15,0	12,1	12,0	12,1	10,8	12,4	11,8	21
2ª Variação Espacial (144dias)								
DQO _f	785	685	613	609	652	651	649	17
Ácido acético	<LD	94,4	245,2	268,0	276,7	278,7	30,4	
Ácido propiônico	<LD	31,9	102,5	120,8	126,7	125,9	30,3	
Ácido isobutírico	<LD	<LD	1,9	2,9	3,5	4,4	0,7	
Ácido butírico	<LD	<LD	8,0	8,9	10,6	12,0	<LD	
Ácido isovalérico	<LD	<LD	6,8	8,4	9,4	11,3	<LD	
SO ₄ ²⁻	7,0	11	6	6	13	9	14	
S ²⁻	0	0,5	0,7	1,2	1,9	1,5	1,6	
LAS	14	8,9	5,0	9,2	7,7	7,5	8,7	38

LD – Limite de Detecção

Tabela E4. Variação espacial no reator R1 na quarta etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E(%)	
	0	1	5	10	14	19	20		
1ª Variação Espacial (200 dias)									
DQO _f	593	226	118	70	52	63	60	90	
Ácido acético	<LD	44,1	31,3	30,3	33,3	28,5	40,8		
Ácido propiônico	<LD	16,9	15,2	14,0	18,9	12,3	15,2		
SO ₄ ²⁻	10	1,0	3,0	1,0	2,0	3,0	5,0		
S ²⁻	<LD	0,6	0,5	0,8	1,2	1,5	1,0		
LAS	14	8,4	7,9	7,9	7,8	7,0	7,0		50
2ª Variação Espacial (312 dias)									
DQO _f	407	205	174	141	132	128	121	70	
Ácido acético	<LD	14,3	12,11	<LD	<LD	<LD	<LD		
Ácido propiônico	<LD	0,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD		
SO ₄ ²⁻	8,0	3,0	7,0	2,0	1,0	2,0	1,0		
S ²⁻	0	0,9	1,1	1,0	0,9	0,9	0,5		
LAS	14	7,0	4,5	7,0	6,6	6,7	7,1		49

LD – Limite de Detecção

Tabela E5. Variação espacial no reator R2 na primeira etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E (%)
	0	1	5	10	14	19	20	
DQO _f	744	437	95	49	47	44	44	94
Ácido acético	9,4	66,9	16,9	<LD	<LD	<LD	<LD	
Ácido propiônico	<LD	29,5	7,9	<LD	<LD	<LD	<LD	

LD – Limite de Detecção

Tabela E6. Variação espacial no reator R2 na segunda etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E (%)
	0	1	5	10	14	19	20	
DQOf	804	549	376	315	69	50	32	96
Ácido acético	23,1	43,8	5,3	0,9	<LD	<LD	<LD	
Ácido propiônico	<LD	21,4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	
SO ₄ ²⁻	8,0	17,0	14,0	4,0	3,0	2,0	0,0	100
LAS	7,9	2,5	4,6	3,6	3,7	2,5	2,7	66

LD – Limite de Detecção

Tabela E7. Variação espacial no reator R2 na terceira etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E (%)
	0	1	5	10	14	19	20	
1ª Variação Espacial (68 dias)								
DQO _f	796	757	735	622	414	242	131	83
Ácido acético	13,6	82,7	10,2	<LD	<LD	<LD	<LD	
Ácido propiônico	<LD	30,0	1,7	<LD	<LD	<LD	<LD	
SO ₄ ²⁻	8	20	13	8	4	2	1	87
S ²⁻	0,04	0,86	0,92	0,2	0,35	0,50	0,04	
LAS (mg/L)	14,9	12,6	11,6	10,1	10,7	10,6	10,9	27
2ª Variação Espacial (144 dias)								
DQO _f (mg/L)	785	496	482	386	284	287	289	63
Ácido acético (mg/L)	<LD	130,6	152,7	94,4	44,2	31,2	32,0	
Ácido propiônico (mg/L)	<LD	53,5	91, 2	83	45,3	17,4	129,7	
Ácido isobutírico (mg/L)	<LD	<LD	0,97	1,0	0,24	<LD	4,7	
Ácido butírico (mg/L)	<LD	0,37	6,7	1,2	<LD	<LD	12,8	
Ácido isovalérico (mg/L)	<LD	0,91	6,2	6,1	4,5	2,1	12,1	
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	8	12	9	10	7	11	15	
S ²⁻ (mg/L)	0	0,6	0,54	0,22	0,16	0,41	0,28	
LAS (mg/L)	14	11,1	10,8	11,1	11,1	9,3	9,9	29

LD – Limite de Detecção

Tabela E8. Variação espacial no reator R2 da quarta etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E (%)
	0	1	5	10	14	19	20	
DQO _f	545	284	144	105	105	97	90	83
Ácido acético	<LD	50,6	47,1	27,5	22,0	14,6	12,4	
Ácido propiônico	<LD	21,2	25,9	7,9	2,9	1,6	0,5	
SO ₄ ²⁻	5,0	4,0	6,0	2,0	7,0	3,0	15,0	
S ²⁻	0	1,4	1,5	1,1	1,1	1,4	1,2	
LAS	14,0	7,9	7,3	7,4	6,8	6,5	7,0	50

LD – Limite de Detecção

Tabela E9. Variação espacial no reator R2 na quinta etapa de operação

Parâmetros (mg/L)	L/D							E (%)
	0	1	5	10	14	19	20	
DQO _f	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	
SO ₄ ²⁻	1	1	1	47	0	16	3	
S ²⁻	0	0,02	0,03	0,11	0,14	0,12	0,06	
LAS	14,0	5,5	5,0	3,2	3,1	2,2	1,9	86

Apêndice F – Seqüências obtidas no Genbank

Tabela F1. Seqüências obtidas no Genbank relacionadas aos clones das amostras do reator R1

	Clone	Número de Acesso no Genbank	Descrição do Genbank	Similaridade (%)
1	R1AA1M13r		Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB (Lagoa anaeróbia de suinocultura)	95/94
2	R1AA4T7		Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB (Lagoa anaeróbia de suinocultura)	96/97/96
			“ <i>Aminiphilus restrictus</i> ” (bactéria anaeróbia degradadora de aminoácidos encontradas em reator UASB)	92/97/94
3	R1AA5T7		Bactéria anaeróbia não cultivada, clone B-1AB (Lagoa anaeróbia de suinocultura)	96/98/89
4	R1AA6		Bactéria não cultivada, clone cc152 (íleo e ceco de galinhas)	94
			<i>Clostridium</i> sp. N8 linhagem N6 (fezes humanas)	93/100
			<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	94
5	R1AA9T7		Bactérias não cultivadas mle142 (<i>Deferribacteres</i> ; <i>Synergistes</i>) (biorreatores utilizados no tratamento de água residuária de industria farmacêutica)	97/98/96
6	R1AA10		Bactéria não cultivada clone cc152	94
7	R1AA11T7		Bactéria não cultivada clone 012 ^o 12_B_SD_P15 (digestor anaeróbio de lodo)	89/98/96
			Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB (Lagoa anaeróbia de suinocultura)	91/94/98
			“ <i>Aminiphilus restrictus</i> ” (bactéria anaeróbia degradadora de aminoácidos encontradas em reator UASB)	89/98/94
8	R1AA12T7		Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB (Lagoa anaeróbia de suinocultura)	92/94/92
9	R1AB2T7		Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB (Lagoa anaeróbia de suinocultura)	96/98/85
			Bactéria não cultivada MTCE-T2 11H; Decloração redutiva de TCE	
10	R1AB3	AY982969	Bactéria não cultivada clone L178 gene RNAr 16S, seqüência parcial	94
		X94967	<i>Ruminococcus ganvus</i>	94
11	R1AB4T7	AY953151	Bactéria não cultivada clone B-1AB gene RNAr 16S, seqüência parcial	96
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
			<i>Aminomonas paucivorans</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
			<i>Sporomusa malonica</i> (Clostridia,	95/91/91

			Clostridiales; Acidaminococcaceae; <i>Sporomusa</i>)	
			<i>Anaerovibrio burkinabensis</i> DSM 6283 (T) (Clostridia, Clostridiales; Acidaminococcaceae)	94/93/83
		AF069287	<i>Anaeromusa acidaminophila</i> DSM 3853 (Clostridia; Clostridiales; Acidaminococcaceae)	
		L08066	<i>Aminobacterium colombiense</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	
		U817606	<i>Synergistes jonesii</i> , gene RNAr 16S	
			Eubactéria não identificada, clone vadinCA02, gene RNAr 16S, seqüência parcial	
12	R1AB6M13r	AY214180	Bactéria não cultivada clone ZZ1204, gene RNAr 16S, seqüência parcial	95
		AY218598	Bactéria não cultivada clone KD2-97, gene RNAr 16S, seqüência parcial	97
		AJ009459	Bactéria não cultivada clone SJA-29, gene RNAr 16S, seqüência parcial	95
		AJ010964	<i>Acetonema longum</i> DSM 6540(T), gene RNAr 16S	92
		AJ010961	<i>Anaerovibrio burkinabensis</i> DSM 6283 (T), gene RNAr 16S,	91
		AJ279799	<i>Sporomusa malonica</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 5090Type	93
		AJ506192	<i>Sporomusa aerovorans</i> gene parcial do RNAr16S, linhagem TMAM3	94
		AJ279801	<i>Sporomusa sphaeroides</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 2875 Type	93
		AF071415	<i>Anaeromusa acidaminophila</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
		AY519200	<i>Thermosinus carboxydivorans</i> linhagem Nor1, gene RNAr 16S, seqüência parcial	91
		AJ508928	<i>Propionispora hipper</i>	
13	R1AB8T7		Bactéria anaeróbia não cultivada clone B- 1AB (Lagoa anaeróbia de suinocultura)	94/93/95
14	R1AB9T7	AY654328	Bactéria não cultivada, clone synarJE1, gene RNAr 16S, seqüência parcial	
		AF280863	Bactéria não cultivada mle1-42, gene RNAr 16S, seqüência parcial	
		AY353956	<i>Soehngenia saccharolytica</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	
15	R1AB12T7		Bactéria não cultivada MTCE-T2 11H; Decloração redutiva de TCE	
			Bactéria não cultivada mle1-42 (<i>Deferribacteres</i> ; <i>Synergistes</i>) (biorreatores utilizados no tratamento de água residuária da industria farmacêutica)	
16	R1AC1	DQ088208	Bactéria não cultivada, clone C19, gene RNAr 16S, seqüência parcial	100
17	R1AC3T7	AY654328	Bactéria não cultivada, clone synarJE15, gene RNAr 16S, seqüência parcial.	93
		AF280863	Bactéria não cultivada mle1-42, gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
18	R1AC4T7	AY654328	Bactéria não cultivada, clone synarJE1, gene RNAr 16S, seqüência parcial	

		AF280863	Bactéria não cultivada mle1-42, gene RNAr 16S, seqüência parcial	
		AY353956	<i>Soehngenia saccharolytica</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	
19	R1AC5T7		Bactéria não cultivada, clone: Rs-N28	92
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> (Firmicutes; Clostridia; Clostridiales); anaeróbias degradadoras de aminoácidos	91/89/96
			Bactéria não cultivada MTCE-T2 11H; Decloração redutiva de TCE	97/97/86
20	R1AC6	AY756595	Bactéria não cultivada, clone LJ6, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
		U81750	Bactéria não identificada, clone vadinHB04, gene RNAr 16S, seqüência parcial	97
		AF473845	<i>Acidaminoccus</i> sp. ADV 255.99, gene RNAr 16S, seqüência parcial	91
21	R1AC7T7	AB062819	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, seqüência parcial, clone: BCf4-02	90
		AF125202	Bactéria não cultivada W028, gene RNAr 16S, seqüência completa	91
		AY349370	<i>Deferribacteres</i> sp. oral clone JV001	90
22	R1AC8T7		Bactéria não cultivada MTCE-T2 11H; Decloração redutiva de TCE	
			Bactéria não cultivada mle1-42 (<i>Deferribacteres</i> ; <i>Synergistes</i>) (biorreatores utilizados no tratamento de água residuária da industria farmacêutica)	
23	R1AC9T7	AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> (Firmicutes; Clostridia; Clostridiales); anaeróbias degradadoras de aminoácidos	97
		AF161069	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	94
			<i>Thermanaerovibrio velox</i> (anaerobia, termofílica, bactéria organotrófica que reduz enxofre)	92/89
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i>	94/100/93
24	R1AC10	AJ009498	Bactéria não cultivada SJA-162, gene RNAr 16S	98
25	R1AD2T7	AY654328	Bactéria não cultivada, clone synarJE15, gene RNAr 16S, seqüência parcial	
		AF280863	Bactéria não cultivada, clone mle1-42, gene RNAr 16S, seqüência parcial	
		AY353956	<i>Soehngenia saccharolytica</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	
26	R1AD3T7	AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada, clone B-1AB, gene RNAr 16S, seqüência parcial	96/98
		U817606	Bactéria não identificada, clone vadin CA02, gene RNAr 16S, seqüência parcial	97/98/96
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> , gene RNAr 16S	93/100/90
27	R1AD4T7	AY654314	Bactéria não cultivada, clone synarJJ08, gene RNAr 16S, seqüência parcial	91
		AB062819	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, seqüência parcial, clone BCf4-02	
28	R1AD6T7		Bactéria não identificada, clone vadinHB04 (reator anaeróbio de leito fluidizado alimentado com vinhaça)	95

			<i>Phascolarctobacterium faecium</i> (ACM3679) Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Acidaminococcaceae	92/97
29	R1AD7	AB118592 DQ028372	Endosimbionte 'TC1' gene RNAr 16S Não cultivados, bactéria Gram positivas com baixa G+C, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99 95
30	R1AD8	AY571396	Bactéria não cultivada, clone RsaHf311, gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
31	R1AD12M13r	AF280863	Bactéria não cultivada mle1-42 (<i>Deferribacteres</i> ; <i>Synergistes</i>), (biorreatores utilizados no tratamento de água residuária da industria farmacêutica)	
32	R1AE1	AY756595 U81750	Bactéria não cultivada, clone LJ6, gene RNAr 16S, seqüência parcial Bactéria não identificada, clone vadinHB04, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99 96
33	R1AE3M13r	AY2117431	<i>Phascolarctobacterium faecium</i> (ACM3679), Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Acidaminococcaceae Bactéria não cultivada MTCE-T2 11H; Decloração redutiva de TCE Bactéria não cultivada mle1-42 (<i>Deferribacteres</i> ; <i>Synergistes</i>) (biorreatores utilizados no tratamento de água residuária da indústria farmacêutica)	92/96
34	R1AE3M13r		Bactéria anaeróbia não cultivada, clone B-1AB (Lagoa Anaeróbia de Suinocultura)	95/98
35	R1AE5T7	AY95315 U817606	Bacteria anaeróbia não cultivada, clone B-1AB, gene RNAr 16S, seqüência parcial Bactéria não identificada, clone vadinCA02, gene RNAr 16S, seqüência parcial	96/98/94 97/98/96
		L08066 AF069287	<i>Synergistes jonesii</i> , gene RNAr 16S <i>Aminobacterium colombiense</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	93/100/90
36	R1AE7T7	X99235 AY654328 AF280863 AY353956	<i>Desulfohalobium retbaense</i> Bacteria não cultivada, clone synarJE15, gene RNAr 16S, seqüência parcial Bactéria não cultivada mle1-42, gene RNAr 16S, seqüência parcial <i>Soehngenia saccharolytica</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	
37	R1AE8	AY548783	Bactéria não cultivada, clone 262 <i>Clostridium</i> sp. PPf35E6 (reator de leiteo fluidizado redutor de sulfato tratando água residuária contendo metais) <i>Clostridium aminobutyricum</i> strain DSM 2634	97 94/100 93
			<i>Anaerovorax odorimutans</i> linhagem NorPut	94/89
38	R1AE9T7		Bactéria não cultivada MTCE-T2 11H; Decloraçã redutiva de TCE	90/97/90

			Bactéria não cultivada mle1-42 (<i>Deferribacteres</i> ; <i>Synergistes</i>) (biorreatores utilizados no tratamento de água residuária da industria farmacêutica)	
39	R1AE10M13r		Bactéria anaeróbia não cultivada, clone B-1AB (Lagoa Anaeróbia de Suinocultura)	93
40	R1AF1T7		Bactéria não cultivada MTCE-T2 11H; Decloraçã reductiva de TCE	95/98/94
42	R1AF3		Bactéria Anaeróbia não cultivada, clone B-1AB (Lagoa Anaeróbia de Suinocultura)	94
43	R1AF5T7	AF280863	Bactéria não cultivada mle1-42, gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
		AY654328	Bactéria não cultivada, clone synarJE15, gene RNAr 16S, seqüência parcial	93
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	97
44	R1AA3		<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain F-7	96
			<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain B-32	96
		AJ563931	<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>lacticogenes</i> DSM 1719T	93
		AJ563934	<i>Beijerinckia derxii</i> subsp. <i>venezuelae</i> DSM 2329T (bactéria metanotrófica fixadora de nitrogênio)	93
45	R1AB1		<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain F-7	96
		AF191739	<i>Ensifer adhaerens</i> ATCC 33212T	93
46	R1AB5		<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain F-7	97
47	R1AB7		<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain F-7	99
48	R1AA7	AY297801	Alpha proteobacterium pACH81	97
		AF150502	<i>Methylosinus sp. PW1</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	94
		AJ868423	<i>Methylocystis sp. DWT</i> , gene RNAr 16S, strain DWT	94
49	R1AB10	AY297801	Alpha proteobacterium pACH1, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
		AB159685	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain B-32	99
		AF150502	<i>Methylosinus sp. PW1</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	
		AJ868423	<i>Methylocystis sp. DWT</i> , gene RNAr 16S, strain DWT	
50	R1AD10	AY297801	Alpha proteobacterium pACH81, gene RNAr 16S, seqüência parcial	98
		AF150502	<i>Methylosinus sp. PW1</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	94
		AJ868423	<i>Methylosinus sp. DWT</i> , gene RNAr 16S, strain DWT	94
51	R1AE4	AB208736	<i>Bacterium (AE) C021</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	97
		AJ238567	<i>Azospirillum doebereineriae</i> , gene RNAr	97

52	R1AE6	AB159685	16S <i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain B-32	99
		AY297801	Alpha proteobacterium pACH81, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
53	R1AF4	AY297801	Alpha proteobacterium pACH81, gene RNAr 16S, seqüência parcial	98
		AF150502	<i>Methylosinus</i> sp. PW1, gene RNAr 16S, seqüência parcial	94
		AJ868423	<i>Methylocystis</i> sp. DWT, gene RNAr 16S, strain DWT	94

Tabela F2 - Sequências obtidas no Genbank relacionadas aos clones das amostras do reator R2

	Clone	Número de Acesso no Genbank	Descrição do Genbank	Similaridade (%)
1	R2AA6	U16147	<i>Clostridium saccharobutyricum</i> P262, gene RNAr, seqüência parcial	99
		AF316590	<i>Clostridium butyricum</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	98
2	R2AA9	AJ863329	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, clone 27RHU52	98
		AJ244650	Semelhante a <i>Brevundimonas</i> sp. LMG 11050, gene RNAr 16S	98
		AY177780	<i>Afipia</i> sp. não cultivada, gene RNAr 16S, seqüência parcial	98
		AB192400	<i>Caulobacter</i> sp. L08 gene RNAr 16S, seqüência parcial	98
3	R2AA10	UEU409003	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, clone HuCB31	99
		AF371689	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, clone p-248-o5	99
		AY953232	Bactéria não cultivada clone A-3B, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
		AY007244	<i>Clostridium glycolicum</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	97
		DQ133569	<i>Clostridium metallolevans</i> , linhagem AS11, gene RNAr 16S, seqüência parcial	97
4	R2AB2	AB127972	<i>Kaistina koreensis</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain Y9	95
		AB159685	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, strain B-32	97
		AJ458468	<i>Methylosinus sporium</i> , gene RNAr 16S, linhagem 44/2	93
5	R2AB7	AF371689	Bactéria não cultivada, clone p-248-o5, gene RNAr 16S, seqüência parcial	100
		AF371690	Bactéria não cultivada, clone p-55-a5, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
		AY244773	<i>Clostridium glycolicum</i> , gene RNAr	99

		DQ133569	16S, seqüência parcial <i>Clostridium metallolevans</i> , linhagem AS11, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
6	R2AB12	AF371689	Bactéria não cultivada, clone p-248-o5, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
		AF371690	Bactéria não cultivada, clone p-55-a5, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
		AJ404682	Bactéria não identificada ZF5, gene RNAr 16S	98
		AJ318903	<i>Clostridium glycolicum</i> , gene RNAr 16S, linhagem MH5	98
		DQ133569	<i>Clostridium metallolevans</i> , linhagem AS11, gene RNAr 16S, seqüência parcial	98
7	R2AC3	AY928261	<i>Bacterium</i> S19M31, gene RNAr 16S, seqüência parcial	98
		AB127972	<i>Kaistina koreensis</i> , gene RNAr 16S, linhagem Y9	98
		AB159685	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, linhagem B-32	98
8	R2AC4	AF371932	Bactéria não cultivada, clone AKIW475, gene RNAr 16S	99
		AF371837	Bactéria não cultivada, clone p-2117-s959-2, gene RNAr 16S	99
		Y18176	<i>Clostridium disporicum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 5521	99
9	R2AC6	AB127972	<i>Kaistina koreensis</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
		AB174816	<i>Rhizobiales bacterium</i> RR47, gene RNAr 16S	99
		AB159685	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial, linhagem B-32	98
10	R2AC10	AJ536839	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, clone 263	97
		AJ306757	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, clone SHA-88	96
		X76161	<i>Clostridium aminobutyricum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 2634	94
11	R2AD3	AF371689	Bactéria não cultivada, clone p-248-o5, gene RNAr 16S	98
		AF371690	Bactéria não cultivada, clone p-55-a5, gene RNAr 16S	98
		X76750	<i>Clostridium glycolicum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 1288T	97
12	R2AD4	AB021338	<i>Bacterium</i> rM3, gene RNAr 16S	99
		DQ070859	<i>Comamonas</i> sp. não cultivada, clone nmt ct4, gene RNAr 16S, seqüência parcial	98
		AF508103	<i>Variovorax paradoxus</i> TG27, gene RNAr 16S	96
13	R2AD5	AF371837	Bactéria não cultivada, clone p-2171-s959-3, gene RNAr 16S	99
		DQ129392	Bactéria não cultivada, clone AK1W585, gene RNAr 16S, seqüência parcial	93
		AB161371	<i>Clostridium sardiniense</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 600	93

14	R2AD8	AJ237605	<i>Syntrophobacter</i> sp., gene RNAr 16S, linhagem TsuA1	94
		DQ145138	Bactéria não cultivada, clone A40, gene RNAr 16S, seqüência parcial.	94
		AF170418	<i>Desulfacinum</i> sp. M40/2 CIV-2.3, gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
15	R2AD10	AF371932	Bactéria não cultivada, clone AK1W475, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
			Bactéria não cultivada, clone AK1W439, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
			Bactéria não cultivada clone p-2117-s959-2, gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
		Y18176	<i>Clostridium disporicum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 5521	99
16	R2AD11	AY953222	Bactéria anaeróbia não cultivada, clone A-2D, gene RNAr 16S	99
		AF316590	<i>Clostridium butyricum</i> , gene RNAr 16S	99
17	R2AE2	AJ409003	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, clone HuCB31	99
		AF371689	Bactéria não cultivada, clone p-248-o5, gene RNAr 16S	99
		AY007244	<i>Clostridium glycolicum</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	99
18	R2AE6	AF371932	Bactéria não cultivada, clone AK1W475, gene RNAr 16S	99
		DQ129393	Bactéria não cultivada AKI439, gene RNAr 16S	99
		Y18176	<i>Clostridium disporicum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM5521	98
19	R2AE10	X94198	<i>X. agilis</i> , gene RNAr 16S	99
		X94200	<i>A. caulinodans</i> , gene RNAr 16S	98
20	R2AF3	AF371839	Bactéria não cultivada, clone p-4581-4Wb3,, gene RNAr 16S	99
		Y18176	<i>Clostridium disporicum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 5521	98
21	R2AF5	AF371835	Bactéria não cultivada, clone p-406-03, gene RNAr 16S	98
		Y18176	<i>Clostridium disporicum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 5521	97
22	R2AF8	X70905	<i>S. wolinii</i> , gene RNAr 16S (DSM 2805)	95
		X82874	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> , gene RNAr 16S, linhagem MPOB	95
23	R2AF10	AF072581	<i>Aminomonas páucivorans</i> , gene RNAr 16S	97
		AF071414	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	90
24	R2AG5	AF371835	Bactéria não cultivada, clone p-406-o3, gene RNAr 16S	98
		Y18176	<i>Clostridium disporicum</i> , gene RNAr e 16S, strain DSM 5521	96
25	R2AG6	AF371689	Bactéria não cultivada, clone p-248-o5, gene RNAr 16S	99
		AF371835	Bactéria não cultivada, clone A-3B, gene RNAr 16S	99
		AY007244	<i>Clostridium glycolicum</i> , gene RNAr	97

26	R2AG8	AF371689	16S, linhagem DSM1288T			
			Bactéria não cultivada, clone p-248-o5, gene RNAr 16S	99		
		AF371835	Bactéria não cultivada, clone A-3B, gene RNAr 16S	99		
27	R2AG12	AY007244	<i>C. glycolicum</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	97		
			Bactéria não cultivada, clone p-2194-s959-3, gene RNAr 16S	96		
		X71850	<i>C. chartatabidum</i> , gene RNAr 16S	95		
28	R2AH7	AF371689	Bactéria não cultivada, clone p-248-o5, gene RNAr 16S	99		
		AY007244	<i>C.glycolicum</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	98		
			Bactéria não cultivada, clone p-4936-6Wb2, gene RNAr 16s	99		
29	R2AE11	AF371932	Bactéria não cultivada, clone p-4936-6Wb2, gene RNAr 16s	99		
			<i>Clostridium disporicum</i> , gene RNAr 16S, DSM5521	98		
		Y18176	<i>Clostridium disporicum</i> , gene RNAr 16S, DSM5521	98		
30	R2AA3T7	AB089066	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, clone Rs-C88	91		
		AY005447	Semelhante a <i>Flexistipes</i> sp. oral, clone BH007, gene RNAr 16S, seqüência parcial	90		
		AY349370	<i>Deferribacteres</i> sp oral, clone JV001	90		
		AY349371	<i>Deferribacteres</i> sp. oral, clone JV006, gene RNAr 16S	90		
		AF481215	<i>Firmicutes oral</i> , clone MCE3 120 E3, gene RNAr 16S	90		
		AY349372	<i>Deferribacteres</i> sp. oral, clone JV023, gene RNAr 16S	91		
		AF481214	<i>Firmicutes oral</i> , clone MCE7_5E2, gene RNAr 16S	91		
		AY005445	<i>Flexistipes</i> -like sp. oral, clone BB062, gene RNAr 16S	88		
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> , gene RNAr 16S	88		
		31	R2AB3T7	AY920216	Bactéria não cultivada, clone Eldhufec341, gene RNAr 16S	96
				AF227826	<i>Clostridium</i> sp. 75061, gene RNAr 16S	96
Y18174	<i>Clostridium tertium</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 2485			96		
AF371839	Bactéria não cultivada, clone p-4581-4Wb3, gene RNAr 16S			96		
AY548781	<i>Clostridium</i> sp. Ppf35E1			95		
Y18175	<i>Clostridium sartagoformum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 129			95		
X98395	<i>Clostridium</i> sp. gene RNAr 16S			95		
Y18176	<i>Clostridium</i> sp. gene RNAr 16S, linhagem DSM5521			94		
X71850	<i>C. chartatabidum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 5482			94		
AJ245413	<i>Clostridium tertium</i> (ATCC 14573), gene RNAr 16S			95		
X76164	<i>Clostridium longisporum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 8431			94		
AF275949	<i>Clostridium neonatale</i> , gene RNAr 16S			94		
X76745	<i>Clostridium quinii</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 67361			94		

		X68176	<i>Clostridium butyricum</i> (ATCC43755), gene RNAr 16S	93
32	R2AB6T7	AF280863	Bactéria não cultivada mle1042, gene RNAr 16S	96
		AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada, clone B-1AB, gene RNAr 16S	95
		AJ249260	<i>Bacterium</i> DCE29, gene RNAr 16S	95
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> , gene RNAr 16S	92
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
		AF071414	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> , gene RNAr 16S, DSM 6589	89
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	90
33	R2AC2T7	AY920216	Bactéria não cultivada, clone Eldhufec341, gene RNAr 16S	97
		AF371839	Bactéria não cultivada, clone p-4581-4Wb3, gene RNAr 16S	96
		AF227826	<i>Clostridium</i> sp. 75064, gene RNAr 16S	96
		Y18174	<i>Clostridium tertium</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 2485	96
		Y18175	<i>Clostridium sartagoformum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 129	95
		Y71850	<i>C. chartatabidum</i> , gene RNAr 16S, DSM 5482	95
		AJ245413	<i>C. tertium</i> (ATCC 14573), gene RNAr 16S	95
		Y18176	<i>C. disporicum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 5521	94
		X76164	<i>Clostridium longisporum</i> , gene RNAr 16S, linhagem DSM 8431	94
		X97432	<i>C. vincentii</i> , gene RNAr 16S	94
		AJ276992	<i>Clostridium uliginosum</i> , gene RNAr 16S, linhagem CK55	94
		AY442812	<i>Clostridium butyricum</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	94
34	R2AD1T7	DQ191710	Bactéria não cultivada, clone AME E40, gene RNAr 16S	96
		AY426471	Bactéria não cultivada, clone E6, gene RNAr 16S	97
		AJ621885	<i>Desulfovibrio cavernae</i> , gene RNAr 16S, linhagem H1MT	90
		AF067964	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	88
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	92
		AY359867	<i>Desulfovibrio longus</i> , linhagem DSM 6739, gene RNAr 16S	88
		AJ582758	<i>Desulfovibrio ferrireducens</i> , gene RNAr 16S, linhagem CY2	87
		AF227984	<i>Desulfovibrio mexicoense</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	87
		AF458778	<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	87
		U65995	<i>Lawsonia intracellularis</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	87

35	R2AD6T7	AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada, clone B-1AB, gene RNAr 16S	94
		U81706	Bactéria não identificada, clone vadin CA02, gene RNAr 16S	95
		CR933167	Bactéria não cultivada, gene RNAr 16S, clone 009C05_B_SD_P15	95
		AF280863	Bactéria não cultivada mle1-42, gene RNAr 16S	94
		AJ249260	<i>Bacterium</i> DCE29, gene RNAr 16S	94
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	91
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S, seqüência parcial	91
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> , gene RNAr 16S, seqüência parcial	91
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S, seqüência parcial	88
		AF071414	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> gene RNAr 16S, DSM 6589	88
36	R2AE3T7	AY426466	Bactéria não cultivada gene RNAr 16S	89
		CR933167	Bactéria não cultivada gene RNAr 16S clone 009C05_B_SD_P15	89
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S, seqüência parcial	93
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	90
37	R2AE5T7	AY654387	Bactéria não cultivada, clone synarJL12 gene RNAr 16S	90
		AY654328	Bactéria não cultivada, clone synarJL15 gene RNAr 16S	90
		AF481215	<i>Firmicutes oral</i> clone MCE3_120 E3 gene RNAr 16S	92
38	R2AF4T7	AY654387	Bactéria não cultivada, clone synarJL12 gene RNAr 16S	89
		AY654328	Bactéria não cultivada, clone synarJL15 gene RNAr 16S	89
		AF481215	<i>Firmicutes oral</i> clone MCE3_120 E3 gene RNAr 16S	89
		AY005447	Semelhante a <i>Flexistipes</i> sp oral clone BH007 gene RNAr 16S	90
		AY349370	<i>Deferribacteres</i> sp oral clone JV 001 gene RNAr 16S	91
39	R2AF6T7	AF280863	Bactéria não cultivada mle1042 gene RNAr 16S	94
		AY953151	Bactéria não cultivada clone B-1AB gene RNAr 16S	94
		U81706	Bactéria não cultivada vadin CA02 gene RNAr 16S	94
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	91
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	91
		AF161069	<i>Thermanaerovibrio velox</i> Z-9701 (T) gene RNAr 16S	88
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	89
40	R2AC3T7	DQ133569	<i>Clostridium metallolevans</i> linhgem AS11 gene RNAr 16S	95
		AB200713	Bactéria não cultivada gene RNAr 16S clone 108	95
		AY548780	<i>Clostridium</i> sp PPf35L1 gene RNAr	95

			16S	
		AY244773	<i>Clostridium glycolicum</i> gene RNAr 16S seqüência parcial sp 2002-87768	95
		AJ291746	<i>Clostridium glycolicum</i> gene RNAr 16S linhagem RD-1	94
		AY007244	<i>Clostridium glycolicum</i> gene RNAr 16S seqüência parcial spCIN5	94
		X76750	<i>Clostridium glycolicum</i> gene RNAr 16S seqüência linhagem DSM 1288T	94
		AY438672	<i>Clostridium bartlettii</i> linhagem WAL 16138 gene RNAr 16S	93
		M59107	<i>Clostridium lituseburense</i> gene RNAr 16S ATCC 25759	92
41	R2AH5T7	AY762914	Bactéria não cultivada clone C9/S14 gene RNAr 16S	90
		AF280863	Bactéria não cultivada mle1-42 gene RNAr 16S	90
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AY278615	<i>Synergistes genomosp.</i> C1	92
		U50711	<i>Anaerobaculum thermotermum</i> gene RNAr 16S sp Rwcit	92
		AY005447	Semelhante a <i>Flexistipes</i> sp. oral clone BH007 gene RNAr 16S	92
		AY005445	Semelhante a <i>Flexistipes</i> sp. oral clone BB062 gene RNAr 16S	92
		AY005444	Semelhante a <i>Flexistipes</i> sp. oral clone BA121 gene RNAr 16S	92
		AF481215	<i>Firmicutes oral</i> clone MCE3_120 E3 gene RNAr 16S	92
		AY349372	<i>Deferribacteres</i> sp. oral clone JV023 gene RNAr 16S	92
42	R2AH6T7	AY762914	Bactéria não cultivada clone C9/S14 gene RNAr 16S	94
		U81706	Bactéria não identificada clone vadinCA02 gene RNAr 16S	94
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	90
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	90
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	89
43	R2AB11T7	AY654328	Bactéria não cultivada clone synarJE15 gene RNAr 16S	94
		AY654367	Bactéria não cultivada clone synarCH02 gene RNAr 16S	93
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	85
		AF071414	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	84
		AF481215	<i>Firmicutes oral</i> clone MCE3_120 E3 gene RNAr 16S	89
		AY349370	<i>Deferribacteres</i> sp oral clone JV001 gene RNAr 16S	87
44	R2AB9T7	AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB gene RNAr 16S	90
		U81706	Bactéria não identificada clone vadinCA02 gene RNAr 16S	91
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S	98

			seqüência parcial	
		U50711	<i>Anaerobaculum thermotermum</i> gene RNAr 16S sp Rwcit	97
45	R2AC8T7	AY426466	Bactéria não cultivada clone E24 gene RNAr 16S	96
		DQ080188	Bactéria não cultivada clone B51 gene RNAr 16S	95
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	93
		AF071413	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	89
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	93
46	R2AC9T7	AJ244650	<i>Brevundimonas</i> -like sp. LMG 11050 gene RNAr 16S	95
		AY177780	<i>Afipia</i> sp não cultivada gene RNAr 16S seqüência parcial	94
		U87785	<i>Afipia</i> <i>genosp</i> 14 gene RNAr 16S seqüência parcial	95
		AJ227773	<i>Caulobacter</i> sp gene RNAr 16S linhagem FWC35	95
		DQ124680	<i>Caulobacter tundrae</i> Z-0024 gene RNAr 16S	96
		AJ007805	<i>Caulobacter henricii</i> gene RNAr 16S	94
		AB023427	<i>Caulobacter segnis</i> linhagem MBIC2835 gene RNAr 16S	94
		AY512823	<i>Caulobacter vibrioides</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	96
		AJ227758	<i>Caulobacter henricii</i> gene RNAr 16S linhagem ATCC 15253 (T)	94
		AB074665	Alpha proteobacterium D-A(2)-9 gene RNAr 16S	94
		AF125194	<i>Caulobacter crescentus</i> 9 gene RNAr 16S seqüência parcial	94
47	R2AD12T7	AJ536689	<i>Bacterium</i> RBS4-92 9 gene RNAr 16S	98
		AJ536688	<i>Bacterium</i> RBS4-86 9 gene RNAr 16S	98
		AJ224614	Alpha proteobacterium TV6-2b 9 gene RNAr 16S	98
		AJ313028	<i>Xanthobacter</i> sp. MN45.1 9 gene RNAr 16S isolado MN 45.1	98
		X94204	<i>X. flavus</i> 9 gene RNAr 16S linhagem JW/KR-1	98
		X99469	<i>X. tagetidis</i> strain TagT2C	98
		AF399969	<i>X. aminooxidans</i> 9 gene RNAr 16S seqüência parcial	97
		X94200	<i>Azorhizobium caulinodans</i> linhagem ORS 571	97
		X94198	<i>X. agilis</i> linhagem SA35	97
		X67221	<i>A. caulinodans</i> strain LMG 6465	97
48	R2AE12T7	AY95315	Bactéria não cultivada clone B-1AB 9 gene RNAr 16S	95
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> 9 gene RNAr 16S	92
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> 9 gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	89
		AF071414	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	89

49	R2AE7T&	CR933151	gene RNAr 16S DSM 6589	89
		L08066	Bactéria não cultivada 9 gene RNAr 16S clone 012A12_B_SD_P15	88
		AY642589	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	92
		AF072581	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF071414	<i>A. paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	89
		AF069287	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	89
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	89
50	R2AE8T7	AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB gene RNAr 16S	97
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	93
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	93
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	93
		AF071414	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	91
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	90
		X99235	<i>Desulfohalobium retbaense</i> HR100 (DSM 56921)	86
U48244	<i>Desulfohalobium retbaense</i> gene RNAr 16S DSM 5692	85		
51	R2AF12T7	AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB gene RNAr 16S	95
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	91
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF071414	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	89
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	89
		AJ244650	<i>Semelhante a Brevundimonas</i> sp. LMG 11050 gene RNAr 16S	96
52	R2A	AY177780	<i>Afipia</i> sp não cultivada gene RNAr 16S seqüência parcial	93
		U87785	<i>Afipia</i> genosp 14 gene RNAr 16S seqüência parcial	96
		AJ227773	<i>Caulobacter</i> sp gene RNAr 16S linhagem FWC35	95
		DQ124680	<i>Caulobacter tundrae</i> linhagem Z-0024 gene RNAr 16S	95
		AJ007805	<i>Caulobacter henricii</i> gene RNAr 16S	95
		AJ227758	<i>C. henricii</i> gene RNAr 16S linhagem ATCC 15253 (T)	95
		AB023427	<i>Caulobacter segnis</i> linhagem MBIC2835 gene RNAr 16S	95
		AJ717391	<i>Phenylobacterium falsum</i> gene RNAr 16S linhagem AC49T	93
		AJ244649	<i>Brevundimonas</i> sp LMG 9564 gene RNAr 16S	93
		DQ111026	<i>Brevundimonas vesicularis</i> isolado	93

53	R2AC1oT7	U81706	O283 gene RNAr 16S	96
			Eubactéria não identificada clone vadinCA02 gene RNAr 16S	
		AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB gene RNAr 16S	96
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF071414	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	89
54	R2AG11T7	AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	
		AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB gene RNAr 16S	95
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	91
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	91
		AF071414	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	88
55	R2AG9T7	AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	88
		AY762914	Bactéria não cultivada clone C9/S14 gene RNAr 16S	89
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	91
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	91
		U50711	<i>Anaerobaculum thermotermum</i> gene RNAr 16S sp Rwcit	93
56	R2AF2M13r	AY426471	Bactéria não cultivada clone E6 gene RNAr 16S	92
		AF072581	<i>A. paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	91
		AF071414	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	89
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	93
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
57	R2AG2M13r	AY005445	<i>Flexistipes</i> -like so oral clone BB06 gene RNAr 16S	94
		DQ066697	Bactéria não cultivada FOTU25(2-78) gene RNAr 16S	89
		X78073	<i>Clostridium acetobutylicum</i> (NCP 262) gene RNAr 16S	89
		AY188842	<i>Clostridium</i> sp. F7/4 gene RNAr 16S sequencia parcial	88
		AY442812	<i>Clostridium butyricum</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	89
		X68176	<i>C. butyricum</i> (ATCC 43755) gene RNAr 16S	89
		X68179	<i>C. beijerinckii</i> (DSM 791) gene RNAr 16S	89
		Y18171	<i>C. roseum</i> gene RNAr 16S linhagem DSM 51	89
	AJ458419	<i>C. diolos</i> gene RNAr 16S linhagem E5	89	
	U16122	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	89	

			gene RNAr 16S	
58	R2AC12M13r	AY426466	Bactéria não cultivada clone E243 gene RNAr 16S	98
		AF280863	Bactéria não cultivada mle1-42 gene RNAr 16S	97
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	86
		AF073521	<i>Aminobacterium mobilis</i> gene RNAr 16S strain ILE-3	87
		AF071414	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	87
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	86
59	R2AH10M13r	AF072581	<i>A. paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	96
		AF071414	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S DSM 6589	96
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF161069	<i>T. velox</i> Z-9701 (T) gene RNAr 16S	93
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	89
60	R2AH12M13r	AY953222	Bactéria anaeróbia não cultivada clone A02D gene RNAr 16S	96
		AY442812	<i>C. butyricum</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	96
		X68176	<i>C. butyricum</i> (ATCC 43755) gene RNAr 16S	96
		U16122	<i>C. saccharoperbutylaceticum</i> N1-4 gene RNAr 16S	96
		AF275949	<i>C. neonatale</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	96
		X76742	<i>C. corinoforum</i> gene RNAr 16S linhagem DSM 5906	95
		U16147	<i>C. saccharobutylicum</i> P262 gene RNAr 16S	95
		X76749	<i>C. favosporum</i> gene RNAr 16S DSM 5907	95
		AF143692	<i>C. gasigenes</i> strain R26 gene RNAr 16S seqüência parcial	95
		X71857	<i>C. puniceum</i> gene RNAr 16S linhagem DSM 2619	95
61	R2AA5M13r	AY953151	Bactéria anaeróbia não cultivada clone B-1AB gene RNAr 16S	95
		L08066	<i>Synergistes jonesii</i> gene RNAr 16S	92
		AY642589	<i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF072581	<i>Aminomonas paucivorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	92
		AF071414	<i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	90
		AF069287	<i>Aminobacterium colombiense</i> gene RNAr 16S seqüência parcial	90
62	R2AB5M13r	AY375053	Bactéria não cultivada clone B141 gene RNAr 16S seqüência parcial	90
		AM072424	<i>Holophaga</i> sp não cultivada gene RNAr 16S clone JG35-2-JT87	90
		AY225647	Bactéria Acidobacteriaceae não cultivada clone AT-s3-23 gene RNAr	89

		16S	
		U23141 <i>Pelobacter carbinolicus</i> gene RNAr	87
		16S seqüência parcial	
		AJ233939 <i>Chondromyces lanuginosus</i> gene RNAr	86
		16S linhagem Syt2	
		X81185 <i>Magnetic coccus</i> MP17 gene RNAr	87
		16S (TB24)	
		AY 996786 <i>Cystobacter</i> sp. SDU-1 gene RNAr 16S	86
		seqüência parcial	
		AJ233908 <i>Melittangium boletus</i> gene RNAr 16S	86
		linhagem Me b8	
		AJ233907 <i>Melittangium alboraceum</i> gene RNAr	86
		16S linhagem Me b7	
		AJ233902 <i>Cystobacter ferrugineus</i> gene RNAr	86
		16S linhagem Cb fe27	
63	R2AF11M13r	CR93307 Bactéria não cultivada gene RNAr 16S	98
		clone 060E02_B_SD_P93	
		AF072581 <i>Aminomonas paucivorans</i> gene RNAr	92
		16S seqüência parcial	
		AF071414 <i>T. acidaminovorans</i> gene RNAr 16S	91
		DSM 6589	
		AY642589 <i>Aminiphilus restrictus</i> gene RNAr 16S	94
		seqüência parcial	
		AF069287 <i>Aminobacterium colombiense</i> gene	92
		RNAr 16S seqüência parcial	
		AF161069 <i>T. velox</i> Z-9701 (T) gene RNAr 16S	91
		seqüência parcial	
		AF481216 <i>Flexistipes</i> sp E3_33_E1 oral isolado	91
		gene RNAr 16S	
		AY701758 <i>Thermoanaerobacter</i> sp. AIP 505.99	86
		gene RNAr 16S seqüência parcial	
