FABRICIO MOTTERAN

**Caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbio de leito
fluidificado envolvida na degradação de surfactante não iônico álcool
etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL)**

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2013

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

M922c Motteran, Fabrício
Caracterização da comunidade microbiana de reator
anaeróbico de leito fluidificado envolvida na degradação
de surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia
não ramificada (GENAPOL) / Fabrício Motteran;
orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche;
coorientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2013.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2013.

1. Areia. 2. Sacarose. 3. AE. 4. GENAPOL® C-100. 5.
Pirosequenciamento. 6. Proteobacteria. 7.
Desulfobulbus. 8. Alcool linear etoxilado. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel e Licenciado **FABRICIO MOTTERAN**.

Título da tese: "Caracterização filogenética da remoção e degradação de surfactante não iônico álcool linear etoxilado em reator anaeróbio de leito fluidificado".

Data da defesa: 13/12/2013

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Assoc. **Maria Bernadete Amâncio Varesche (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof. Dr. **Flávio Henrique da Silva**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Prof. Dr. **André Luiz Meleiro Porto**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Aprovado

Prof. Dr. **Erich Kellner**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Aos meus pais Mario e Tânia Moterani e ao meu irmão Breno, por todo apoio, incentivo, carinho e inspiração, Dedico.

AGRADECIMENTOS

Na realização de um trabalho científico como este, torna-se fundamental a colaboração de instituições e profissionais da área para o bom desenvolvimento do trabalho, assim como a participação da família e dos amigos, que também contribuíram de maneira essencial para atingir, com êxito, os objetivos estabelecidos. Dessa forma, agradeço a todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização desta tese. Em especial, quero expressar meus sinceros agradecimentos.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus pelo dom da vida, pois sem Ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, destes momentos que é tão importante.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio concedido por meio da bolsa de doutorado (Processo nº 2010/18885-0).

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio no início desta etapa acadêmica.

À professora Dra. Maria Bernadete A. Varesche, pela oportunidade, apoio, confiança e ensinamentos para desenvolver este trabalho e pela orientação durante a realização do mesmo.

Ao professor Dr. Edson Luiz Silva (Tininho), pelas inúmeras e valiosas sugestões e colaborações neste trabalho.

À professora Dra. Lorena Lima de Oliveira pela ajuda no início desta jornada, e junto ao professor Ariovaldo Silva agradeço às sugestões perante a qualificação deste estudo.

Aos professores Eugênio Foresti, Marcelo Zaiat, Márcia Damianovic e Wyclef Dymurgo pelos conselhos e experiências compartilhadas.

À Dra. Isabel K. Sakamoto (Bel) técnica do Laboratório de Processos Biológicos (LPB), pelo auxílio na realização das análises relativas à biologia molecular e microbiologia (DGGE, PCR, NMP) e na discussão dos resultados destas análises.

À Dra. Maria Ângela Adorno (Janja) pelas valiosas sugestões, conselhos e ensinamentos referentes à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Às técnicas, Eloisa Pozzi (Elô), Carolina Sabatini e Juliana Custódio, pelas inúmeras ajudas e suportes técnicos.

Ao Fernando Moura, técnico em informática do Engenharia Ambiental, pelas inúmeras ajudas.

À Juliana Kawanishi Braga, amiga, companheira e colega, para todas as horas. Agradeço o apoio, a ajuda para solucionar problemas e dificuldades, dividindo tarefas, compartilhando

experiências e conhecimentos durante a realização deste trabalho, sem ela este trabalho não seria o mesmo. Agradeço pelas horas difíceis, carinho compreensão e atenção.

Aos amigos que conheci ao longo destes anos no LPB; Adriana Maluf (Drica), Adys, Ana Cláudia Barana, Ariovaldo Silva (Ari), Bruna Moraes, Bruna Carrer, Camila, Caio Martins, Carla Diniz, Carol Gil, Carol Zampol, Dagoberto Okada, Daniel Moureira, Davi Andrade, Débora Fonseca, Djalma Ferraz, Eduardo Penteado (Dú), Filipe Vasconcelos Ferreira, Flavia Talarico Saia, Gleyce, Guilherme Peixoto, Guilherme Oliveira, Gustavo Mockaitis, Henrique (Muringa), Inês Tomina, Jorge Pantoja, José Alberto Corrêa Leite (Betão), Laís, Leandro Godói, Lênin, Livia Botta, Lucas Marcon, Lucas Fuess, Luis Ricardo, Marcus Vinicius, Mariana Carosia, Matheus Souza, Mérida Del Pilar, Paulo Clairmont, Priscila Camiloti, Rachael Biancalana, Rafael Brito (Bazola), Regiane Corrêa, Ricardo Almeida, Rogério Vilela, Samantha Santos, Sami Chatila, Sandra Maintinguer, Thaís Zaninetti, Tiago Martins, Tiago Palladino Delforno, Tiago (Cebola), Theo Souza, Túlio Siqueira.

E em especial a Mara Rúbia, Elisa, Milena, Zaryf, Fernando, Danilo Schwab e Juliana Resende pelos bons momentos de companhia, distração e conselhos.

Aos amigos Marcelo, Adriano, Carlos Magno, Dani, Alexandre, Juliano Reis, Fernanda, Erlon e Júlia distantes, porém presentes nos momentos difíceis.

Aos meus amados pais Mario e Tânia, que desde o início, sempre estiveram comigo, me apoiando em minhas decisões na realização deste sonho, agradeço imensamente o carinho e atenção a toda hora durante esta etapa de minha vida.

Ao meu irmão Breno, minhas avós Laura e Lucília e a Lígia pelo apoio e carinho, durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários do SHS pelo auxílio e gentileza. Em especial à Sá e Priscila da secretaria de Pós Graduação do Departamento de Hidráulica e Saneamento (PPG-SHS), e Silvana Celestine, secretária do curso de Engenharia Ambiental (campus II da USP) pela paciência, colaboração e ajuda quando necessária.

À Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) e ao departamento de Hidráulica e saneamento (SHS) pela oportunidade e apoio.

Obrigado!

**“A vida é como uma câmera,
Foque no que é importante,
Capture bons momentos,
Desenvolva a vida a partir dos negativos,
E se as coisas não derem certo, tire outra foto.”**

RESUMO

MOTTERAN, F. (2013). **Caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbio de leito fluidificado envolvida na degradação de surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL)**. 187 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2013.

O objetivo deste estudo foi avaliar a remoção do surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE) em reator anaeróbio de leito fluidificado preenchido com areia como material suporte, em escala de bancada (1,2 L) com TDH de 18 horas, recirculação e fluxo contínuo. O reator foi inoculado com lodo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura e alimentado com substrato sintético acrescido de surfactante não iônico GENAPOL[®] C-100 (Sigma-Aldrich[®]) como fonte de (AE). Análises de monitoramento da concentração do surfactante não iônico AE e matéria orgânica, bem como, dos parâmetros físico-químicos foram realizadas para observar e quantificar a estabilidade do reator, na remoção e degradação do surfactante. A operação do reator foi dividida em cinco etapas: inoculação (535 ± 121 mg/L de DQO), adaptação da biomassa (600 ± 70 mg/L de DQO), Fase I ($4,7$ mg/L de AE e 623 ± 65 mg/L de DQO), Fase II ($22,5$ mg/L de AE e 735 ± 87 mg/L de DQO), Fase III ($51,4$ mg/L de AE e 697 ± 68 mg/L de DQO), Fase IV ($107,4$ mg/L de AE e 845 ± 87 mg/L de DQO) e Fase V ($97,9$ mg/L de AE e 882 ± 126 mg/L de DQO). Aplicação das técnicas de PCR/DGGE e pirosequenciamento da região do rRNA 16S foi realizada para constatar a diversidade microbiana nas fases operacionais IV e V. A eficiência média de remoção de matéria orgânica e AE foi de 88% e 99%, respectivamente, durante a operação do reator. A similaridade das populações dos Domínios Archaea e Bacteria foi de 74% e 59%, respectivamente, para as amostras da Fase IV (com sacarose) e Fase V (sem sacarose). A sacarose não alterou o comportamento físico-químico do reator de leito fluidificado, mas este co-substrato influenciou, tanto, na produção de ácidos orgânicos voláteis, quanto, na diversidade dos microrganismos envolvidos na degradação do AE. Por meio da análise de pirosequenciamento das amostras das Fases IV e V do material suporte e separador de fases do reator foram identificados 83 gêneros dos quais 18 foram relacionados com a degradação de surfactante não iônico, bem como, seus subprodutos. Obteve-se maior abundância relativa para os seguintes gêneros: *Sporomusa*, *Geobacter*, *Desulfobulbus*, *Synergistes*, *Sedimentibacter*, *Holophaga*, *Serpens* e *Azonexus*. Observou-se elevada diversidade filogenética e similaridade com sequências de bactérias relacionadas com a degradação de surfactante não iônico AE.

Palavras-chave: Areia. Sacarose. AE. GENAPOL[®] C-100. PCR/DGGE. Pirosequenciamento. Proteobacteria. *Desulfobulbus*. Álcool linear etoxilado.

ABSTRACT

MOTTERAN, F. (2013). **Microbial characterization of anaerobic fluidized bed reactor involved in the nonionic surfactant alcohol ethoxylate non-branched (GENAPOL) degradation.** 187 f. Thesis (Ph.D.) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos. In 2013.

The aim of this study was to evaluate the removal of nonionic alcohol ethoxylate non-branched (AE) in anaerobic fluidized bed reactor filled with sand as support material, on a bench scale (1.2 L) with 18 hours of TDH, recirculation and continuous flow. The reactor was inoculated with sludge from a UASB reactor used in the treatment of swine manure and fed with synthetic substrate plus nonionic GENAPOL[®] C-100 (Sigma-Aldrich[®]) as a source of AE. Monitoring analysis of the nonionic surfactant AE concentration and organic matter, as well as the physicochemical parameters were performed to observe and quantify the reactor stability, in the removal and degradation of the surfactant. The reactor operation was divided into five phases: inoculation (535±121 mg/L of COD), biomass adaptation (600±70 mg/L of COD), Phase I (4,7 mg/L of AE and 623±65 mg/L of COD), Phase II (22,5 mg/L of AE and 735±87 mg/L of COD), Phase III (51,4 mg/L of AE and 697±68 mg/L of COD), Phase IV (107,4 mg/L of AE and 845±87 mg/L of COD) and Phase V (97,9 mg/L of AE and 882±126 mg/L of COD). Application of the techniques PCR/DGGE and pyrosequencing of the 16S rRNA region were performed to observe the microbial diversity in the operational phases IV and V. The average removal efficiency of organic matter and AE was 88% and 99%, respectively, during the reactor operation. The populations similarity of the Archaea and Bacteria Domains were 74% and 59%, respectively, for samples from Phase IV (with sucrose) and Phase V (without sucrose). Sucrose did not alter the physical-chemical behavior of the fluidized bed reactor, but this co-substrate influenced both in the volatile fatty acids production, as in the diversity of microorganisms involved in the AE degradation. Through the pyrosequencing analysis of samples from Phases IV and V of the reactor (support material and phase separator), 83 genera were identified of which 18 were related to the nonionic surfactant degradation, as well as its byproducts. Highest relative abundance values were obtained for the following genera: *Sporomusa*, *Geobacter*, *Desulfobulbus*, *Synergistes*, *Sedimentibacter*, *Holophaga*, *Serpens* and *Azonexus*. A high phylogenetic diversity and similarity to sequences of bacteria related to the degradation of nonionic AE surfactant were observed.

Keywords: Sand. Sucrose. AE. GENAPOL[®] C-100. PCR/DGGE. Pyrosequencing. Proteobacteria. *Desulfobulbus*. Linear alcohol ethoxylate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biodegradação do álcool graxo etoxilado e seus metabolitos sob condição aeróbia e anaeróbia	10
Figura 2 – Rota de degradação do álcool etoxilado.....	11
Figura 3 – Fluxograma experimental das fases de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado	24
Figura 4 – Estrutura química do surfactante não iônico de cadeia não ramificada (AE), GENAPOL [®] C-100 da Sigma-Aldrich®, sendo, n, o número de unidades etoxílicas	26
Figura 5 – Desenho esquemático do reator anaeróbio de leito fluidificado	27
Figura 6 – Cromatograma referente ao padrão de 20 mg/L de AE	32
Figura 7 – Interpolação dos cromatogramas dos padrões da curva de AE (10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L). Em detalhe, a sobreposição dos picos nas diversas concentrações	33
Figura 8 – Curva analítica de AE obtida em CLAE	33
Figura 9 – Esquema das diluições e inoculações do NMP	40
Figura 10 – Resazurina em frasco de alimentação do reator	42
Figura 11 – Avaliação do potencial redox com resazurina. A – Aplicação em forma de pulso. B – Conexão com a alimentação	42
Figura 12 – DQO filtrada aplicada ao reator no período de inoculação	52
Figura 13 – Variação do pH no período de inoculação	53
Figura 14 – Distribuição de ácidos orgânicos voláteis no período de inoculação.....	54
Figura 15 – Variação temporal de DQO filtrada afluente (afl), efluente (efl) e eficiência de remoção	55
Figura 16 – Carga orgânica volumétrica (COV) aplicada ao reator	56
Figura 17 – Relação entre concentração de AE e DQO	57
Figura 18 – Proporção da adsorção de AE no reator de leito fluidificado	61
Figura 19 – Valores de pH afluente e efluente ao longo da operação do reator.....	63
Figura 20 – Blotpot das series de alcalinidade total, parcial e intermediária afluente e efluente	65
Figura 21 – Variação da Alcalinidade total, parcial e intermediária afluente e efluente ao longo do tempo de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado.....	66
Figura 22 – Valores de AI/AP afluente e efluente ao longo da operação do reator	67

Figura 23 – Diferença dos valores médios de AI/AP afluente e efluente.....	68
Figura 24 – Distribuição dos ácidos orgânicos em cada fase operacional	70
Figura 25 – Valores de sólidos ao longo da operação do reator anaeróbio de leito fluidificado	72
Figura 26 – (A) Parte superior do leito de areia; (B) Porção superior do reator – separador de fases; (C) Porção inferior do reator – distribuidor	74
Figura 27 – Microscopia de contraste de fase dos microrganismos observados na areia do reator ao final da operação: (A) bacilos e (B) endósporos.....	75
Figura 28 – Microscopia de contraste de fase dos microrganismos observados no separador de fase do reator ao final da operação: (A e B) bacilos; (C) Tecameba	75
Figura 29 – Microscopia de contraste de fase dos microrganismos observados no distribuidor do reator ao final da operação: (A) aglomerados celulares imersos em exopolímeros; (B e E) filamentos; (C) Tecameba; (D) endósporos; (E) sarcinas ...	76
Figura 30 – Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos observados na areia do reator ao final da operação: (A) bacilos e cocobacilos (aumento 5000X); (B) aglomerados celulares ao material suporte (aumento de 1000X); (C) Adesão de bacilos ao material suporte (aumento 5000X)	78
Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos observados no separador de fases do reator ao final da operação: (A) bacilos, cocobacilos, cocos e exopolímeros; (B) bacilos; (C 1) filamentos semelhantes a <i>Methanosaeta</i> ; (C 2) material inerte (aumento 5000X)	79
Figura 32 – Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos observados na biomassa do leito do reator ao final da operação: (A) víbrios, (B 1) bacilos (B 2) cocos (aumento 5000X)	80
Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos observados no distribuidor do reator ao final da operação: (A) filamentos, cocos e bacilos; (B) espiroquetas; (C) bacilos e espiroquetas; (D) bacilos, filamentos, espiroquetas e; (aumento 5000X), (E) bacilos (aumento 2000X), (F) sarcinas e bacilos (aumento 5000X)	81
Figura 34 – Quantificação dos grupos microbianos por NMP: (A) bactérias anaeróbias totais e (B) arqueas metanogênica.....	85
Figura 35 – Dendograma de distância dos perfis de bandas das amostras do reator anaeróbio de leito fluidificado para Domínio Bacteria.....	87

Figura 36 – Dendograma de distância dos perfis de bandas das amostras do reator anaeróbio de leito fluidificado para Domínio Archaea.....	88
Figura 37 – Dendograma de distância dos perfis de bandas das amostras do ensaio de NMP para o Domínio Bacteria	90
Figura 38 – Dendograma de distância dos perfis de bandas das amostras do ensaio de NMP para o Domínio Archaea	91
Figura 39 – Curva de rarefação da biomassa do material suporte e separador de fases na Fase IV, com 97% (<i>cutoff</i> 0,03) e 95% (<i>cutoff</i> 0,05) de similaridade.....	96
Figura 40 – Curva de rarefação da biomassa do material suporte e separador de fases na Fase V, 97% (<i>cutoff</i> 0,03) e 95% (<i>cutoff</i> 0,05) de similaridade	96
Figura 41 – Dendograma baseado na análise de agrupamento do índice Bray-Curtis para as biomassas do material suporte e separador de fases das Fases IV e V	98
Figura 42 – Abundância relativa dos filos identificados na biomassa do material suporte e separador de fases das Fases IV e V (Similaridade 97%).....	101
Figura 43 – Abundância relativa das classes (Similaridade 97%) identificadas na biomassa do material suporte e do separador de fases das Fases IV e V.....	107
Figura 44 – Distribuição dos gêneros (%) referente a abundância relativa na amostra do material suporte da Fase IV (MS-C).....	120
Figura 45 – Distribuição dos gêneros (%) referente a abundância relativa da biomassa do separador de fases da Fase IV (SF-C).....	123
Figura 46 – Distribuição dos gêneros (%) referente a abundância relativa na amostra do material suporte da Fase V (MS-S).....	126
Figura 47 – Distribuição dos gêneros (%) referente a abundância relativa na amostra do separador de fases da Fase V (SF-S).....	129
Figura 48 – Árvore filogenética do reator de leito fluidificado com UTOs das sequências representativas dos gêneros responsáveis pela de gradação indireta do AE.....	132
Figura 49 – Ajuste da produção acumulada de metano nas series experimentais.....	137
Figura 50 – Diminuição equivalente da matéria orgânica nas séries experimentais (valores médios - ajuste de decaimento exponencial).....	139
Figura 51 – Coeficientes de similaridade dos padrões de bandas do Domínio Archaea.....	141
Figura 52 – Coeficientes de similaridade dos padrões de bandas do Domínio Bacteria.....	141
Figura 53 – Histograma da seleção de sequencias das amostras de pirosequenciamento	171

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Álcool etoxilado detectados em diferentes ambientes.....	7
Tabela 2 – Composição do substrato sintético	26
Tabela 3 – Composição da solução de sais.....	26
Tabela 4 – Características da areia utilizada como material suporte no reator de leito fluidificado	28
Tabela 5 – Parâmetros de fluidificação do leito	28
Tabela 6 – Análises de monitoramento do reator de leito fluidificado	29
Tabela 7 – Descrição da metodologia de preparação para determinação de álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE).....	30
Tabela 8 – Condições cromatográficas para a quantificação do AE por CLAE	31
Tabela 9 – Gradiente dos efluentes do CLAE para a metodologia cromatográfica do AE.....	32
Tabela 10 – Composição do substrato sintético	36
Tabela 11 – Composição da solução de sais.....	36
Tabela 12 – Soluções para água de diluição.....	39
Tabela 13 – Programação do termociclador para amplificação do rRNA 16S para o Domínio Bacteria	44
Tabela 14 – Programação do termociclador para amplificação do rRNA 16S para o Domínio Archaea	45
Tabela 15 – Soluções para amplificação usando primers 968FGC e 1401R e 1100FGC e 1400R.....	45
Tabela 16 – Condições utilizadas na PCR.....	47
Tabela 17 – Soluções para amplificação usando iniciadores 27F e 1100R.....	47
Tabela 18 – Identificação das amostras de pirosequenciamento	48
Tabela 19 – Valores de sólidos do inóculo.....	51
Tabela 20 – Concentração afluente e efluente de AE no reator anaeróbio de leito fluidificado	58
Tabela 21 – Balanço de massa para AE durante a operação do reator	61
Tabela 22 – Distribuição de AE no reator de leito fluidificado.....	62
Tabela 23 – Alcalinidade parcial, total e intermediária.....	64
Tabela 24 – Ácidos orgânicos em cada fase de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado	69
Tabela 25 – Série de sólidos nas fases de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado	72

Tabela 26 – NMP de bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas	82
Tabela 27 – Identificação das amostras para os dendogramas do reator anaeróbio de leito fluidificado para o Domínio Bacteria e Archaea	86
Tabela 28 – Identificação das amostras para os dendogramas do ensaio de NMP para o Domínio Bacteria e Archaea	89
Tabela 29 – Número total de sequências e UTOs	92
Tabela 30 – Índices de diversidade da biomassa do RALF nas Fases IV e V.....	93
Tabela 31 – Índices de similaridade da biomassa do material suporte e separador de fases nas Fases IV e V	95
Tabela 32 – Ordens taxonômicas identificadas na biomassa do RALF	99
Tabela 33 – Abundância relativa e UTOs dos filos identificados na biomassa do RALF	100
Tabela 34 – Distribuição das classes de bactérias identificadas na biomassa do reator de leito fluidificado	105
Tabela 35 – Distribuição das ordens identificadas na biomassa do reator de leito fluidificado	111
Tabela 36 – Distribuição das famílias nas amostras do reator de leito fluidificado	114
Tabela 37 – Distribuição dos gêneros na biomassa do reator de leito fluidificado	117
Tabela 38 – Sequências obtidas no <i>GenBank</i> comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do AE.....	133
Tabela 39 – Produção acumulada de metano mensurada nas séries experimentais nas CNTP	135
Tabela 40 – Parâmetros obtidos do ajuste da equação de Gompertz modificado	136
Tabela 41 – Valor inicial e final de DQO e AE nas series experimentais do teste de potencial metanogênico	138
Tabela 42 – Índice de Shannon-Wiener para as amostras dos testes de potencial metanogênico	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Medida do número de espécies das parcelas amostradas
A.R	Abundancia relativa
AE	Álcool etoxilado de cadeia não ramificada
AEO	Álcool etoxilado
AI	Alcalinidade intermediaria
AOV	Ácidos orgânicos voláteis
AP	Alcalinidade parcial
APEs	Alquilfenóis etoxilados
APHA	American public health association
ASBR	Reator anaeróbio operado em bateladas seqüenciais
c	Total de espécies amostradas
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CONAMA	Conselho nacional de meio ambiente
COV	Carga orgânica volumétrica
D'	Índice de Simpson
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis (eletroforese em gel de gradiente desnaturante)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (bases nitrogenadas)
DQO	Demanda química de oxigênio
DSM 1532	Cepa da bactéria <i>Acinetobacter junni</i>
e	Número de euler (2,71828)
EC	European communities
EGSB	Expanded granular sludge bed (reator de leito granular expandido)

EO	Grupo etoxilado
H'	Índice de Shannon
HAc	Equivalência de ácido acético
HERA	Human & environmental risk assessment
HMDS	Hexamethyldesilazane
HPLC	high performance/pressure liquide chromatography
IC ₅₀	50% da concentração máxima de inibição
INDEAR	Instituto de Agrobiotecnologia Rosário
J'	Equitabilidade de Pielou
LAE	Álcool linear etoxilado – (linear alcohol ethoxylate)
LAS	Alquilbenzeno linear sulfonado
LPB	Laboratório de processos biológicos
M	Produção acumulada de metano (μmol)
M	Molar
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS-C	Amostra do material suporte (areia) na fase operacional com a presença de sacarose
MS-S	Amostra do material suporte (areia) na fase operacional sem a presença de sacarose
NIS	Nonionic surfactant (Surfactante não iônico)
NMP	Número mais provável
OTU	Operation taxonomic units
P	Produção potencial de metano (μmol)
P.A.	Alto grau de pureza
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino

PCR	Polymerase chain reaction (reação de polimerização em cadeia)
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial hidrogeniônico
QIIME	Quantitative insights into microbial ecology
RAHLF	Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
RDP	Ribossomal database project
Rm	Taxa de produção de metano ($\mu\text{mol/h}$)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SF-C	Amostra do separador de fases na fase operacional com a presença de sacarose
SF-S	Amostra do separador de fases na fase operacional sem a presença de sacarose
SPE	Coluna de extração em fase sólida
ST	Sólidos totais
STF	Sólidos totais fixos
STV	Sólidos totais voláteis
t	Tempo (horas)
TDH	Tempo de detenção hidráulico
TR01	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp.
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic averages
UTO	Unidade taxonômica operacional
UV	Ultravioleta
V	Volt
Vmf	Velocidade de mínima fluidificação
λ	Fase <i>lag</i> (horas)
λ	Comprimento de onda

LISTA DE SIMBOLOS

°C	graus Celsius
°C /min	graus centígrados por minuto
µg/Kg	micrograma por kilograma
µg/L	micrograma por litro
µL	microlitro
µm	micrômetro
µmol	micromol
µmol/h	micromol por hora
C ₁₀₋₁₈	cadeia alquílica com 10 a 18 carbonos
cel/gSTV	células por grama de sólidos voláteis totais
cm	centímetro
d	dia
g	grama
g/cm	grama por centímetro
g/L	grama por litro
h	hora
kg	quilograma
kgDQO/d	kilograma de DQO por dia
L	litro
L/h	litros por hora
m	metro
M	molar
m/s	metros por segundo
mg	miligrama
mgCaCO ₃ /L	miligrama de carbonato de cálcio por litro

mg/kg	miligrama por kilograma
mg/L	miligrama por litro
mgDQO/L.d	miligrama de DQO por litro por dia
mgHAc/L	miligrama de equivalência de ácido acético por litro
mL	mililitro
mL/h	mililitros por hora
mL/L	mililitros por litro
mL/min	mililitros por minuto
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimol
mV	milivolt
ng	nanograma
ng/L	nanograma por litro
nm	nanômetros
R ²	coeficiente de determinação
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxi
LISTA DE SIMBOLOS	xxv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS	3
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 – Histórico	5
3.2 – Surfactante não iônico de cadeia não ramificada	6
3.3 – Álcool etoxilado	6
3.4 – Mercado e legislação	8
3.5 – Remoção e degradação de surfactantes	9
3.6 – Toxicidade do surfactante não iônico	12
3.7 – Microrganismos envolvidos na degradação de surfactante	14
3.8 – Reator de leito fluidificado	19
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 – Fluxograma operacional	23
4.2 – Inóculo	25
4.3 – Surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada.....	25
4.4 – Água residuária sintética	26
4.5 – Reator de leito fluidificado	27
4.6 – Análises físico-químicas e cromatográficas	29
4.7 – Inoculação.....	34

4.8 – Adaptação	34
4.9 - Fases operacionais com surfactante não iônico.....	34
4.10 – Extração de álcool etoxilado adsorvido.....	35
4.11 – Potencial metanogênico.....	36
4.12 – Microscopia óptica	38
4.13 – Microscopia eletrônica de varredura	38
4.14 – Determinação do número mais provável	38
4.15 – Avaliação do potencial redox	41
4.16 – Biologia molecular	43
4.17 – Extração de DNA e PCR	43
4.18 – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante.....	45
4.19 – Pirosequenciamento.....	46
4.20 – Índices de riqueza e diversidade	49
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 – Inoculação.....	51
5.2 – Remoção de matéria orgânica	54
5.3 – Remoção de álcool etoxilado.....	57
5.4 – Balanço de massa.....	60
5.5 – pH	63
5.6 – Alcalinidade.....	64
5.7 – Relação AI/AP.....	67
5.8 – Ácidos orgânicos voláteis.....	68
5.9 – Sólidos	71
5.10 – Avaliação do potencial redox	72
5.11 – Exames Microscópicos	74
5.11.1 – Microscopia de contraste de fase.....	74
5.11.2 – Microscopia eletrônica de varredura	77

5.12 – Análise quantitativa de microrganismos.....	82
5.12.1 – Determinação do número mais provável para bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas	82
5.12.2 – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	85
5.12.3 – Pirosequenciamento.....	91
5.12.3.1 – Preparação das sequências.....	91
5.12.3.2 – Índices de diversidade	92
5.12.3.3 – Dominância e Curva de Rarefação	94
5.12.3.4 – Classes	105
5.12.3.5 – Ordens.....	110
5.12.3.6 – Famílias	113
5.12.3.7 – Gêneros.....	117
5.12.3.7.1 – Gêneros identificados na biomassa do material suporte da Fase IV (MS-C).....	120
5.12.3.7.2 – Gêneros identificados na biomassa do separador de fases da Fase IV (SF-C)	122
5.12.3.7.3 – Gêneros identificados na biomassa do material suporte da Fase V (MS-S).....	126
5.12.3.7.4 – Gêneros identificados na biomassa do separador de fases da Fase V (SF-S).....	128
5.13 – Potencial metanogênico.....	135
6 – CONCLUSÕES.....	143
7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	145
8 – REFERÊNCIAS	147
9 – ANEXOS	171

1 – INTRODUÇÃO

O álcool etoxilado de cadeia não ramificada (linear) é comercialmente significativo e nos últimos anos tem ganhado grande espaço no mercado mundial devido às boas características de biodegradabilidade quando comparado com outros surfactantes.

Este surfactante é considerado biodegradável e usualmente encontrado em diversos ambientes, em variadas concentrações, sendo constituído por cadeias alquílicas de 9 a 18 átomos de carbono e entre 5 a 23 grupos etoxilados (BERNA et al., 2007).

A degradação do AE (álcool etoxilado de cadeia não ramificada) em sistema de tratamento aeróbio vem sendo bastante estudada. A remoção deste surfactante deve-se, provavelmente, aos fenômenos de degradação e adsorção no lodo biológico (HUBER; MEYER; RYS, 2000). Todavia, são ainda poucos os estudos sobre a degradação do AE em condição anaeróbia.

Na literatura, não foi verificada aplicação de reator anaeróbio de leito fluidificado para o tratamento (remoção e degradação) de água residuária contendo surfactante não iônico de cadeia não ramificada (AE). No Brasil, também não há registro de estudos nessa linha, o que torna esse trabalho inédito.

A escolha dessa configuração de reator foi devido aos bons resultados de remoção de LAS obtidos por Carosia (2011), Ferreira (2012) e Oliveira (2010) nesse caso, com areia como material suporte para formação de biofilme. Além disso, o reator anaeróbio de leito fluidificado tem sido aplicado no tratamento de águas residuárias simples e complexas. Nessa configuração reacional tem-se maior transferência de massa e, por conseguinte, maior disponibilidade do surfactante para os microrganismos, favorecendo a eficiência de remoção quando comparado com outras configurações de reator. Além disso, a recirculação do líquido para a expansão do leito no reator favorece a diluição do tóxico, bem como influência na quantidade de microrganismos aderidos no material suporte (DIEZ BLANCO; GARCIA ENCINA; FDZ-POLANCO, 1995).

No Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP outras configurações de reatores também foram avaliadas para remoção de surfactante aniônico alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), dentre elas, reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) (OKADA, 2012), reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) (DUARTE et al., 2008), reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (ASBR) (DUARTE, 2006), sob condição

desnitrificante e anaeróbia e reator anaeróbio de leito granulado expandido (EGSB) (DELFORNO, 2011). As melhores eficiências de remoção de LAS foram obtidas com reator de leito fluidificado.

O reator anaeróbio de leito fluidificado com biomassa imobilizada em material suporte favorece a retenção dos microrganismos, sendo possível obter elevada eficiência de remoção de matéria orgânica, com baixos tempos de retenção hidráulica. Hauroun e Idris (2009) e Silva (1995) usaram este reator para avaliar a degradação de compostos tóxicos, tais como, fenol e águas residuária de indústria têxtil. Nesta configuração reacional podem ser utilizados diversos materiais como meio suporte, tais como, areia, argila expandida, carvão, pérolas de vidro, pneu triturado, etc. para a imobilização da biomassa (BARROS, 2010; OLIVEIRA, 2010).

Nesta pesquisa foi avaliada a remoção e degradação do composto padrão de surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL[®] C-100) em reator anaeróbio de leito fluidificado. A aplicação deste modelo de reator ainda não foi estudada para a remoção e degradação de surfactante não iônico AE (álcool etoxilado). Outro fator importante deste estudo está relacionado às comunidades microbianas envolvidas no processo de degradação deste surfactante não iônico. A análise da diversidade microbiana é de fundamental importância, uma vez que, pode-se correlacionar a degradação do AE a possíveis gêneros e espécies de bactérias presentes no biofilme do reator. Assim, no presente trabalho investigou-se a degradação do surfactante álcool etoxilado de cadeia não ramificada em reator anaeróbio de leito fluidificado, com areia como material suporte e os microrganismos envolvidos na degradação deste composto por meio de técnicas de biologia molecular e pirosequenciamento da região V4 do rRNA 16S.

2 – OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de remoção do álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE) em reator anaeróbio de leito fluidificado. Para atingir esse objetivo foram avaliados:

- Desenvolver metodologia de determinação do surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL[®] C-100) por CLAE;
- Avaliar a remoção de matéria orgânica na fase de inoculação do reator com lodo anaeróbio de reator UASB usado no tratamento de resíduos de suinocultura;
- Avaliar a remoção de matéria orgânica na fase de adaptação da biomassa ao substrato sintético;
- Avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica e surfactante não iônico (AE) nas fases de operação do reator de leito fluidificado em escala de bancada preenchido com areia como material suporte;
- Caracterizar a comunidade de bactérias e arqueas por NMP, DGGE e exames microscópicos;
- Avaliar o potencial redox no leito do reator
- Avaliar o potencial metanogênico do lodo na presença do surfactante não iônico AE (GENAPOL[®] C-100);
- Caracterizar filogeneticamente a biomassa do leito e separador de fases do reator no final das Fases IV e V.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Histórico

A fabricação de sabão é uma das atividades industriais mais antigas da civilização. O primeiro material semelhante ao sabão foi encontrado em escavações na Babilônia a 2800 a.C. Estes compostos eram fabricados com gorduras fervidas junto às cinzas. Na Roma antiga a mistura de gordura animal derretida, ou sebo, com cinzas da madeira e óleo da argila, facilitava a lavagem de roupas exigindo, para tanto, menos esforço (BAIRD, 1995).

Na Europa, a produção em escala industrial do sabão foi iniciada no século XVIII, e a partir daí novas variedades de sabão tornaram-se disponíveis, tanto para a lavagem de roupas doméstica, quanto para uso industrial e higiene pessoal, tornando-se item de utilidade diária.

A produção de detergentes de uso doméstico nos Estados Unidos começou no início da década de 30 e ganhou mercado após a segunda guerra mundial. Na composição da maioria destes agentes de limpeza são empregadas substâncias como surfactantes, cuja característica principal é diminuir a tensão superficial da água.

Dentre os agentes tensoativos mais utilizados, estão o sabão e detergente, sendo que no primeiro caso refere-se a sais de ácidos graxos de cadeia longa, como o estearato de sódio ($C_{17}H_{35}COO^-Na^+$). Uma desvantagem do sabão como agente de limpeza refere-se à formação de sais insolúveis com cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , comumente presente em águas duras. A precipitação do sabão com estes íons dificulta o processo de formação de espuma e compromete o processo de limpeza (BIGARDI et al., 2003).

Os detergentes sintéticos são mais solúveis do que o sabão e, portanto, mais eficiente, aliando a vantagem de não formar compostos insolúveis com íons divalentes (BAIRD, 1995). Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais e domésticos.

A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, estes possuem características mais tóxicas em relação ao meio ambiente, assim diante da legislação e do controle ambiental novos conceitos levaram à procura por surfactantes que geram menor impacto ambiental, como alternativa aos produtos existentes.

3.2 – Surfactante não iônico de cadeia não ramificada

Os surfactantes dispersam os contaminantes não solúveis em água e, por esse motivo, são aliados à água quando utilizados para fins de limpeza. Os surfactantes modificam o meio reacional permitindo solubilizar espécies de baixa solubilidade ou promover novo meio que pode modificar a velocidade reacional, a posição de equilíbrio das reações químicas e, em alguns casos a estereoquímica dependendo da natureza da reação, do tipo de reativo (eletrofílico, nucleofílico, etc.) e do tipo e forma (catiônica, aniônica, etc.) da micela (WEEST; HARWELL, 1992).

Nas últimas décadas os surfactantes não iônicos têm chamado grande atenção, principalmente devido a seu elevado consumo e as propriedades tóxicas dos produtos oriundos de sua degradação (PETROVIC et al., 2002; SCOTT; JONES, 2000). Por exemplo, os compostos gerados da degradação de alquilfenóis etoxilados (APEs) podem ser mais tóxicos para os organismos aquáticos que os próprios APEs.

Octilfenol e nonilfenol (produtos da degradação dos APE) são capazes de induzir a vitelogenia em peixes machos em concentração abaixo de 5 µg/L (YING et al., 2006), podendo assim ser classificados como compostos desreguladores endócrinos. Álcool etoxilado (AE), segundo grupo de surfactantes não iônico, mais comumente usado é facilmente biodegradável e ambientalmente seguro (KROGH et al., 2003; YING et al., 2006).

3.3 – Álcool etoxilado

O álcool etoxilado de cadeia não ramificada (linear), conhecido como AE, pertence ao grupo químico de surfactantes não iônicos (NIS) e são comercialmente significativos (MEZZANOTE et al., 2002). Por esta razão, são lançados em corpos d'água por meio de água residuária industrial e esgoto sanitário.

Por exemplo, 23 a 141 mg/kg de álcool etoxilado foi encontrado em lodo anaeróbico de sistema de tratamento de água residuária (BERNA et al., 2007; CANTERO; SOLEDAD; ANDPÉREZ-BENDITO, 2004).

O álcool etoxilado de cadeia não ramificada é usualmente encontrado em diversos ambientes, nas mais variadas concentrações (Tabela 1). Entretanto, segundo

Berna et al. (2007), este surfactante com 9 a 18 cadeias não ramificadas (lineares) de álcoois e 5 a 23 grupos etoxilados são biodegradáveis. Em “*screening test*” sob condição anaeróbia foi verificado que esta degradação pode ser usualmente superior a 70% (BERNA et al., 2007).

Tabela 1 – Álcool etoxilado detectados em diferentes ambientes

Concentração	Localização	Referência
0,9 µg/L	Sistema de tratamento de efluente (lodos ativados e lagoas)	Morrall <i>et al.</i> , 2006
15,6 µg/L	Filtros biológicos de sistema de tratamento de efluentes	Morrall <i>et al.</i> , 2006
23 – 141 mg/L	Lodo de digestores aeróbio	Cantero; Soledad e Andpérez-Bendito, 2004*
194 ng/L	Solo – lençol (intersticial)	Krogh <i>et al.</i> , 2003
710 ng/L	Solo – lençol freático	Krogh <i>et al.</i> , 2003
160 – 1600 µg/kg	Sedimentos de rios (Itália)	Cavalli <i>et al.</i> , 2000*
37 – 1300 µg/kg	Sedimento marinho - Espanha	Petrovic <i>et al.</i> , 2002*
171 – 919 µg/kg	Sedimentos de rios – Estados Unidos	Dyer <i>et al.</i> , 2006

* - Adaptado de Berna et al. (2007)

Segundo Larson e Games, (1981) a degradação anaeróbia de reduzida concentração de álcool etoxilados de cadeia não ramificada (AE) pode indicar que microrganismos endêmicos de águas superficiais ou de estações de tratamento de esgoto sanitário possuem afinidade para a utilização destes compostos como fonte de carbono. Ou seja, convertem o surfactante a CO₂, indicando, assim, reduzida incorporação do carbono nos componentes celulares. Entretanto, pode ocorrer morte celular quando, no meio, houver elevadas concentrações deste composto.

Kiewiet et al. (1996) verificaram degradabilidade de surfactantes não iônicos, como o álcool etoxilado e alquilfenol etoxilado nas concentrações entre 40 µg/L e 160 µg/L em condição anaeróbia. Os autores observaram degradação incompleta destes compostos e formação de metabólitos, tais como, ácido dodecanóico, ácido acético e compostos persistentes (polietilenoglicol). Huber, Meyer e Rys, (2000) também verificaram polietilenoglicol como subproduto da degradação anaeróbia de álcool etoxilado nas

concentrações entre 5 e 40 mg/L, em reatores em batelada. Estes metabólitos secundários necessitam de grande atenção quando são lançados nos cursos d'água. Além disso, compostos como alquilfenol, nonilfenol ou octilfenol originados da degradação anaeróbia de dietoxilados ou carboetoxilados são considerados poluentes aquáticos originados após o tratamento de águas residuárias contendo estes surfactantes (LOYO-ROSALES, RICE; TORRENTS, 2007).

3.4 – Mercado e legislação

As águas residuárias são misturas complexas de sólidos e componentes dissolvidos. Na estação de tratamento de água residuária, principalmente, por meio de processos biológicos, os diversos compostos podem ser reduzidos a concentrações aceitáveis ou convertidos em substâncias inofensivas. No entanto, algumas águas residuárias são descartadas nos corpos hídricos sem o devido tratamento (MENDONÇA, 2004).

Entre os poluentes, os detergentes são importante fonte de poluição industrial, comercial e doméstica, principalmente nos grandes centros urbanos. No mundo todo, o consumo de surfactantes é de oito milhões de toneladas, se somadas as mais diferentes classes (LI; SCHRÖDER, 2000).

Nos países europeus, os detergentes já estão sujeitos a disposições normativas relativas à fabricação, correto manuseio, utilização e rotulagem segundo a *Commission Recommendation* 89/542/EEC e *Commission Recommendation* 98/480/EC de 22 de julho de 1998, as quais preocupam com as boas práticas ambientais para os detergentes de limpeza doméstica.

Esta legislação européia denota a respeito da biodegradabilidade primária dos tensoativos dos detergentes e é aplicada, somente, aos tensoativos aniônicos e não iônicos. Portanto, sendo necessária a abordagem para biodegradação final em resposta às grandes preocupações relacionadas ao potencial de toxicidade dos metabolitos persistentes.

No Brasil, a Resolução Normativa CONAMA N°357 de 17 de maio de 2005 (complementada e alterada pela Resolução N°430 de 13 de maio de 2011), cita sobre os padrões de qualidade das águas doces de Classe 1, salinas e salobras preconizando 0,5 mg/L e 0,2 mg/L, respectivamente apenas para o LAS (Alquilbenzeno Linear Sulfonado) como “substâncias tensoativas que reagem ao azul de metileno”.

Este grupo de tensoativos que reagem ao azul de metileno não engloba os álcoois etoxilados, sendo assim necessário estudar a quantidade de surfactantes dispostos nos corpos hídricos, bem como, sua concentração, a fim de aprimorar o tratamento e disposição, uma vez que estes compostos estão cada vez mais presentes no esgoto sanitário e água residuária.

3.5 – Remoção e degradação de surfactantes

Há várias técnicas para remoção de surfactantes de águas residuárias. Entretanto, de acordo com Piveli (2002), 3 mg/L a 6 mg/L de detergentes no esgoto sanitário, não interferem na eficiência da remoção de matéria orgânica de estação de tratamento, devido à adsorção às partículas que sedimentam nos decantadores primários ou por degradação biológica em reatores aeróbios e anaeróbios.

Todavia, para amostra ambiental, Bosquilha (2002) verificou valores inferiores a concentração citada por Piveli (2002). Segundo Bosquilha (2002), as concentrações de surfactantes em sistema estuarino e baía de Santos e São Vicente foram de 0,1 mg/L e 0,26 mg/L no verão e inverno, respectivamente, e foram encontradas em mais de 30 % das amostras analisadas.

Assim, a biodegradabilidade pode ser definida como a porcentagem de degradação de uma substância decorrente da ação de microrganismos em dado período de tempo, a qual é um importante fator para a redução e remoção de contaminantes orgânicos do meio ambiente. Segundo Merrettig-Bruns e Jelen (2009), a avaliação da biodegradabilidade de substâncias orgânicas xenobióticas é um parâmetro essencial para a avaliação da qualidade ambiental.

Segundo a *Commission Recommendation* 89/542/EEC e *Commission Recommendation* 98/480/EC de 22 de julho de 1998 a biodegradação de surfactantes pode ser enquadrada em duas etapas: (1) Biodegradação primária, na qual há a alteração estrutural (transformação de um surfactante por microrganismos, resultando na perda de suas propriedades tensoativas devido à quebra da cadeia principal e, consequentemente, perda da propriedade de atividade superficial) e (2) Biodegradação final, quando o surfactante é totalmente degradado por microrganismos resultando sua decomposição em produtos mineralizados como água, dióxido de carbono, metano, sais minerais e novas células microbianas.

Por meio de ensaios de adsorção e balanço de massa, Oliveira et al. (2009) verificaram redução de 35% de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reator anaeróbico horizontal de leito fixo. Todavia, Oliveira et al. (2010), obtiveram remoção de 95% de LAS em reator anaeróbico de leito fluidificado, com areia como material suporte para 46 mg/L afluyente.

Assim como, no LAS a fração hidrofóbica, que no caso do AE é a porção etoxilada contribui positivamente para a ligação com o sedimento e/ou biomassa. Entretanto, esta cadeia diminui a solubilidade e micelização deste composto, provavelmente, influenciada por ligações de hidrogênio ou devido ao aumento da distância entre as moléculas de surfactante com o meio aquático provocada por forças hidrofóbicas (KIEWIET et al., 1996).

Na degradação aeróbia de cadeias não ramificadas (lineares) de álcool etoxilado o mecanismo de clivagem ocorre na porção alquílica, por meio da α -oxidação (MARCOMINI et al., 2000), mas, este mecanismo é dependente da disponibilidade de oxigênio molecular no meio, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Biodegradação do álcool graxo etoxilado e seus metabolitos sob condição aeróbia e anaeróbia

Fonte: Steber e Wierich (1985); Steber e Wierich (1987)

Na degradação anaeróbia de cadeias não ramificadas de ácidos graxos, o mecanismo de clivagem ocorre pela β -oxidação ou outros mecanismos, ainda desconhecidos. Huber,

Meyer e Rys, (2000) citaram que o principal ataque à molécula de AE por microrganismos anaeróbios ocorre na fração central, entre as cadeias alquil e etoxi.

Também pode ocorrer a degradação do AE liberando unidades de polietileno glicol (PEG) gradualmente até alcançar a fração lipofílica, tendo assim a geração de acetaldeído como primeiro produto indicador desta degradação (BATTERSBY; KRAVETZ; SALANITRO, 2000), como observado na Figura 2.

Figura 2 – Rota de degradação do álcool etoxilado

Fonte: Huber, Meyer e Rys (2000)

As bactérias, ao degradarem o polietileno glicol, quebram a cadeia hidrofílica e liberam a porção alquílica hidrofóbica. Assim, resíduos na forma de ácidos graxos são degradados por outras bactérias, principalmente, via β -oxidação (MÖSCHE, 2004). O mesmo ocorre com alquilfenol etoxilado, sendo inicializada pelo ataque a fração hidrofílica da molécula. Portanto, a porção do surfactante é encurtada a grupos etoxilados (KIEWIET et al., 1996), gerando vários produtos metabólicos, tais como, ácido dodecanóico, ácido acético, metano e dióxido de carbono (HUBER; MEYER; RYS, 2000).

Wagener (1987) constatou que surfactante linear (cadeias não ramificadas) alquil etoxilado não iônico (polietileno glicol alquil éter) foi metabolizado sob condição fermentativa-metanogênica em polietileno glicol, com cadeias de menor tamanho (PEG),

metano e dióxido de carbono. Esse autor verificou a redução da concentração afluenta de 1 g/L para 1 mg/L em reator anaeróbio de leito fixo preenchido com esferas de calcário com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 29 dias depois de 69 dias de operação.

Diante destes dados, foi utilizada neste projeto temperatura mesofílica sob condição anaeróbia e regime contínuo de operação, como comprovados por Oliveira (2010) serem adequados para a degradação de LAS (alquilbenzeno linear sulfonado), surfactante aniônico.

3.6 – Toxicidade do surfactante não iônico

O comportamento, destino e efeito biológico dos surfactantes no ambiente devem ser estudados e compreendidos para avaliar seu risco ambiental. Warne e Schiffko (1999) verificaram que os surfactantes contribuem para a toxicidade dos organismos aquáticos.

Os surfactantes podem acumular no lodo de estações de tratamento de efluentes e exercer efeitos inibitórios nos microrganismos responsáveis pelo tratamento biológico, comprometendo a efetividade da estação, e causando sérias consequências na remoção de poluentes (HOLT; WATERS; COMBER, 1995).

A toxicidade aguda e crônica dos surfactantes não iônicos álcool etoxilado, tanto de cadeia não ramificada (linear), quanto de cadeia ramificada são descritas em peixes, *Daphnia*, ostras, camarões, caranguejos, algas de água doce e macrófitas aquáticas (TALMAGE, 1994).

Segundo Kiewiet et al., (1996), a toxicidade aguda e crônica do álcool etoxilado para algas e *Daphnia* foram de 0,1 mg/L a 100 mg/L. Este fato é difícil de indicar as tendências gerais da relação entre a estrutura molecular dos surfactantes não iônicos e toxicidade. Entretanto, Roberts e Marshall (1995) cita que a toxicidade promovida por álcool etoxilado em peixes é dependente primeiramente da cadeia hidrofóbica, assim a cadeia etoxilada, não exerce influência significativa para a toxicidade.

Estes fatos foram confirmados por Ribosa et al. (1993), os quais testaram a toxicidade (EC50) de surfactantes não iônicos n-Dodecil com 12 carbonos na cadeia alquílica e de 2 a 10 unidades de óxido de etileno em *Photobacterium phosphoreum*. Os autores verificaram a influência do comprimento da cadeia alquílica do álcool etoxilado na toxicidade neste microrganismo.

Ivankovic, Hrenovic e Gudelj (2009) estudaram a toxicidade de 12 surfactantes comerciais de diferentes categorias em *Acinetobacter junni* (cepa DSM 1532), bactéria

acumuladora de fosfato encontrada em estações de tratamento de efluentes de lodos ativados. Para o surfactante não iônico álcool etoxilado EMPILAN[®] do grupo GENAPOL[®] verificou-se baixos efeitos tóxicos comparados com outros surfactantes do mesmo grupo nas concentrações de 0,05 mg/L a 15 mg/L. Neste estudo foi observado que a toxicidade dos surfactantes aumentou com a diminuição do comprimento da cadeia alquílica, verificando também que o grupo etoxilado de diversos surfactantes não iônico não influenciou na toxicidade deste composto.

Human & Environmental Risk Assessment - HERA (2009) e Wong, Dorn e Chai (1997), citam que a toxicidade do álcool etoxilado tende a aumentar com o aumento do comprimento da cadeia alquílica (número de átomos de carbono) e diminuição do número de grupos etoxilados. Entretanto, Warne e Schiffko (1999) verificaram que álcool etoxilado contendo oito grupos EO foi mais tóxico, quando comparado com álcool etoxilado contendo três grupos EO. Porém, os autores não puderam afirmar que houve tendência de aumento da toxicidade com o aumento da etoxilação do surfactante. Segundo Feijtal e Van de Plassche (1995) não há relação entre o comprimento da cadeia carbônica (alquílica) e o número de grupos etoxilados (EO) na toxicidade de surfactantes não iônicos álcool etoxilado.

O álcool etoxilado com cadeia alquílica não ramificada típica com C12 a C15, normalmente pode chegar a mais de 60% de degradação final em testes padronizados de biodegradabilidade (HUMAN & ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, 2009) para concentrações entre 2 mg/L e 100 mg/L. Entretanto, em álcool etoxilados contendo mais de 20 unidades de óxido de etileno, foi observada taxa reduzida de biodegradação (HOLT; WATERS; COMBER, 1995; SCHARER; KRAVETZ; CARR, 1979). No entanto, com a adaptação natural dos organismos dos diferentes ambientes para degradar estes compostos, esta taxa de degradação pode aumentar. De acordo com relatórios da Human & environmental risk assessment (2009), os homólogos C16 e C18 nas concentrações de 2 mg/L a 100mg/L, com até 30 unidades de óxido de etileno pode ser facilmente biodegradáveis (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2006).

Devido à característica principal dos surfactantes de ficarem adsorvidos em interfaces (duas fases imiscíveis), podem interagir com a membrana celular dos organismos (STERZEL, 1990). Esta interação depende da concentração do surfactante.

Os surfactantes afetam células vivas provocando danos ao funcionamento e integridade da membrana plasmática (SHCHERBAKOVA; LAURINAVICHIOUS; AKIMENKO, 1999). Segundo Lee (1970), o mecanismo que provoca essa toxicidade dá-se

pela redução na absorção de nutrientes essenciais, no consumo de oxigênio e na liberação de produtos metabólicos tóxicos, causadas pela adsorção do surfactante na superfície celular.

Os monômeros da molécula de surfactante adsorvem-se na membrana e quando há baixa relação surfactante/membrana (abaixo da CMC), tanto a permeabilidade da membrana e o transporte de soluto trans-membrana são aumentados. Quando a concentração do surfactante é aumentada (próximos a CMC) este leva a lise celular (DE LA MAZA et al. 1991, 1996; OHNISHI; SAGITANI, 1993). Em concentrações acima da CMC a estrutura lamelar da membrana é perdida e solubilizada resultando na separação da camada fosfolipídica das proteínas, solubilizando as proteínas presentes na membrana celular (CHANG et al., 1985). Como consequência destas interações, os surfactantes são capazes de influenciar o metabolismo de componentes da membrana (DE LEO, 1989).

Os surfactantes podem, ainda, alterar a pigmentação e a morfologia dos microrganismos, além de ativar ou inibir enzimas, alterar a estrutura polipeptídica e mudar a carga superficial da molécula (HOUSAINDOKN et al., 1993).

O mecanismo de toxicidade do álcool etoxilado ocorre devido à porção não-polar, cujos homólogos com cadeias mais longas de hidrocarbonetos são mais eficientes na penetração na membrana celular e, assim, mais tóxicos. Contudo, os homólogos deste composto devem ser suficientemente solúveis em água para permitir concentração tóxica e alcançar o organismo alvo (HUMAN & ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, 2009).

Para os álcoois de cadeia longa, geralmente menos solúvel e mais tóxico dos homólogos, a toxicidade é restringida pela solubilidade do comprimento da cadeia de hidrocarbonetos principalmente acima de C15. Embora, a adição de grupos de óxido de etileno faz com que os homólogos de álcool etoxilado seja mais solúvel, isso pode reduzir a toxicidade de cadeias com comprimentos maiores de hidrocarbonetos (HUMAN & ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, 2009).

3.7 – Microrganismos envolvidos na degradação de surfactante

Nos últimos anos, a biodegradação de compostos tóxicos tem sido alvo de grande interesse, principalmente quando há a contaminação por poluentes orgânicos (LI; BAI, 2005). A possível contaminação do ambiente por agentes tensoativos resultantes da utilização

generalizada na fabricação de detergentes, bem como, na utilização dos mesmos como agentes de limpeza tem sido revistos (SCOTT; JONES, 2000).

Tsomides et al. (1995) citam que surfactantes podem ter efeitos inibitórios quando a concentração deste tensoativo se aproxima ou excede os valores da concentração micelar crítica (CMC). Os surfactantes podem ser tóxicos para microrganismos quando estes são utilizados como substrato preferencial impedindo, assim o contato direto entre as células e a superfície de outros substratos principalmente quando há compostos mais tóxicos ou de difícil degradabilidade presente no meio (LAHA; LUTHY, 1992).

Várias espécies de microrganismos estão associadas com a degradação de surfactantes principalmente no que diz respeito ao alquilbenzeno linear sulfonado (LAS). Jimenez et al. (1991) estudaram consórcio microbiano constituído por três cepas de *Pseudomonas* spp. e uma de *Aeromonas* sp. O LAS foi adicionado a 1µg/L como única fonte de carbono, todas as espécies estudadas foram capazes de degradar mais de 25% do LAS e esse foi convertido a CO₂.

A degradação do LAS envolve a quebra da cadeia alquílica, do grupo sulfonado e finalmente, do anel aromático (PERALES et al., 1999). Os microrganismos anaeróbios podem utilizar o grupo sulfonado de três formas: a) como aceptor de elétron; b) como doador de elétron para a respiração anaeróbia e c) como substrato para a fermentação. A redução do grupo sulfonado foi descoberta em cultura pura de *Desulfovibrio desulfuricans*, isolada de sedimento marinho. Esse organismo foi capaz de reduzir o organossulfonado em combinação com lactato como doador de elétrons (DENGGER; COOK, 1999).

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

Almendariz et al. (2001) estudaram a degradação do LAS em reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) operado em dois estágio, um acidogênico e outro metanogênico. No reator acidogênico foi adicionado *Pseudomonas aeruginosa* que, sob condição aeróbia utilizou LAS como fonte de carbono. Os autores verificaram para 20 mg/L de LAS afluente, degradação de 41%, que ocorreu principalmente no primeiro estágio pela atividade das bactérias acidogênicas. Embora, o surfactante tenha adsorvido no lodo, não foi verificada inibição dos microrganismos e da produção de ácido acético. No entanto, no reator

metanogênico os microrganismos foram inibidos pela presença de LAS, porém recuperados quando o surfactante foi retirado da alimentação.

Khleifat (2006) investigou a biodegradação do LAS por consórcio de bactérias facultativas. *Pantoea agglomerans* e *Serratia odorífera* isoladas do lodo de estação de tratamento de esgoto. As bactérias foram submetidas a duas condições distintas de crescimento: (1) em meio mínimo M9 e (2) em caldo nutriente. As culturas foram submetidas ao crescimento, separadamente e em consórcio, nas duas condições nutricionais e na presença de LAS. Os reatores com células suspensas foram mantidos a 32°C e 250 rpm. O autor constatou que existiu cooperação catabólica, sendo que as bactérias foram mais hábeis em degradar o LAS em consórcio microbiano. Para 200 mg/L de LAS como única fonte de carbono, degradação de 70% foi alcançada em caldo nutriente e 36% em meio mínimo M9. No entanto, outras condições foram estudadas, tais como, variação do co-substrato (glicose, sacarose, maltose, manitol e ácido succínico) e variação da fonte de nitrogênio (cloreto de amônio, triptona, extrato de levedura, nitrato de amônio e caseína). Em todos os casos, a degradação de LAS aumentou na presença do co-substrato de carbono e fonte de nitrogênio atingindo sua completa mineralização em 48-72 horas.

Oliveira et al. (2009) realizaram a caracterização filogenética do Domínio Bacteria em reator de leito fluidificado usado para degradação anaeróbia de alquilbenzeno linear sulfonado. Os autores caracterizaram a biomassa de biofilme desenvolvido em pérola de vidro e areia, respectivamente, usados como materiais suporte. Os clones foram relacionados a diferentes classes tais como Anaerolineae, Acidobacteria, Actinobacteria, Sphingobacteria, Deinococci, Bacilli, Clostridia, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Verrucomicrobia, e com bactérias não cultivadas.

Duarte et al. (2010) identificaram as populações de microrganismos presentes em reator operado em bateladas sequenciais usado na remoção de LAS, por meio do sequenciamento e análise filogenética do rRNA 16S. O inóculo foi proveniente de UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Para tanto, foi usada amostra da última etapa de operação do reator (22 mg/L de LAS) e alimentação sem co-substratos. Por meio da aproximação filogenética foi constatada ampla diversidade de microrganismos. Os clones foram relacionados a nove Filos, sendo eles: Bacteroidetes (35%), Proteobacteria (18%), Verrucomicrobia (11%), Fibrobacteres (8%), Acidobacteria (5%), Chlorobi (3%), Firmicutes (3%), Actinobacteria (2%) e Chloroflexi (2%).

A porcentagem de bactérias não classificadas representou 13% do total sequenciado. Segundo os autores acima mencionados, *Pseudomonas* spp. provavelmente foi responsável pela degradação do LAS. Bactérias do gênero *Syntrophus* podem ter usado o enxofre da molécula de LAS, enquanto *Dechloromonas* spp. podem ter usado o anel aromático da molécula de LAS como fonte de carbono e energia.

Carosia (2011) avaliou a remoção de sabão em pó contendo LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado. Este autor obteve 88 clones referente à biomassa da areia, usada como material suporte. Dentre os clones relacionados ao Filo Proteobacteria, 38 pertenciam a Classes Betaproteobacteria, Ordem Rhodocyclales. Outros 27 clones foram relacionados à Classe Deltaproteobacteria, sendo 26 clones pertencentes à Ordem Desulfomonadales e um a Ordem Desulfovibrionales. Em relação à Classe Epsilonproteobacteria foram obtidos 11 clones e, apenas um relacionado à Classe Gammaproteobacteria.

Carosia (2011) e Oliveira (2010) encontraram bactérias semelhantes à *Sediminibacterium* (bacilos Gram negativos) em reator anaeróbio de leito fluidificado usado na remoção de LAS, sendo que a primeira autora usou o LAS padrão e a segunda sabão de uso doméstico. É interessante notar que alguns filos foram constantes nas diferentes configurações de reatores estudadas para tratamento de água residuária contendo LAS, entre eles foram constatados Firmicutes e Proteobactéria. O filo Proteobactéria foi observado por Delforno (2011), Duarte et al. (2010) e Oliveira et al. (2010). Todavia, as classes predominantes em cada trabalho foram distintas.

Delforno et al. (2012) constatou similaridade de bactérias com a classe Deltaproteobacteria. Oliveira et al. (2010) observaram similaridade de bactérias com a classe Betaproteobactéria. Duarte et al. (2010) encontraram semelhança com microrganismos da classe Alphaproteobactéria. Provavelmente, as diferenças encontradas entre os trabalhos citados podem ser atribuídas às distintas configurações de reatores, características hidráulicas, composição nutricional e origem do inóculo.

Okada (2013) por meio de análise de pirosequenciamento da região do rRNA 16S de amostras do ensaio de reator UASB alimentados com água residuária de lavanderia foram encontrados 147 gêneros, dos quais 32 foram relacionados com a degradação do surfactante não iônico LAS. Os gêneros encontrados com significativa abundância relativa (>1%) foram *Comamonas*, *Dechloromonas*, *Desulfovibrio*, *Gemmatimonas*, *Holophoga*, *Parvibaculum*, *Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Sporomusa*, *Synergistes* e *Zoogloea*. Estes gêneros estão relacionados à degradação de compostos aromáticos, dessulfonação, β e ω -oxidação.

Na avaliação da biodegradabilidade de álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE) têm sido aplicadas populações mistas de microrganismos provenientes de águas residuárias domésticas ou de ambientes naturais de águas fluviais (TIDSWELL; RUSSELL; WHITE, 1996).

Tidswell, Russell e White (1996) usaram *Pseudomonas* sp. cepa SC25A previamente isolada para o crescimento anaeróbio em álcool etoxilado (polietileno glicol dodecil éter) como única fonte de carbono e energia. Os autores verificaram o crescimento dessa bactéria com surfactante não iônico nas variações mono-, di, tri- e octaetileno glicol. Os autores também verificaram, por meio de carbono radio marcado (^{14}C), que as moléculas dos surfactantes foram clivadas por este microrganismo, na cadeia alquílica, fazendo parte do mecanismo de biodegradação primária da molécula, gerando assim ácidos mono e dicarboxílicos.

Li e Bai, (2005) utilizaram o surfactante não iônico álcool etoxilado (Tergitol 15-S-7) com cadeias alquílicas de 11 a 15 carbonos e grupo etoxilado de sete unidade ($\text{C}_{11-15}\text{E}_7$), como co-substrato para a degradação de hidrocarbonetos policíclico aromáticos (PAH) por *Neptunomonas naphthovorans*, em frascos de 500 mL em meio salino (200 mL) sob condição aeróbia. Os autores afirmaram que este tensoativo presente no meio de cultura pode ser biodegradável e prontamente utilizado como fonte de carbono para este microrganismo.

Nonilfenol etoxilado, surfactante não iônico largamente utilizado em aplicações industriais e na agricultura, tem sido alvo de diversos estudos de biodegradabilidade devido à geração de subprodutos metabólicos provenientes da quebra desta molécula. Diante disto alguns grupos de microrganismos têm sido identificados como sendo capazes de degradar este composto.

Ivankovic, Hrenovic e Gudelj (2009), avaliaram a toxicidade de surfactantes comerciais em bactérias acumuladoras de fosfato. Os autores verificaram que a biodegradação destes compostos não foi observada em culturas puras de *Acinetobacter junni*, sendo necessário consórcio de bactérias para a efetiva degradação.

Até o momento, as bactérias isoladas capazes de degradar o surfactante não iônico nonilfenol etoxilado pertencem principalmente à classe Gama Proteobacteria (principalmente semelhantes à *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*) (LOZADA et al., 2004, 2006). Representantes das classes Alfa Proteobacteria e Beta Proteobacteria isoladas de sistemas de tratamento de lodos ativados e ambiente aquático natural possuem também papel muito importante na degradação deste surfactante não iônico (LOZADA et al., 2004, 2006).

Gu et al. (2008), avaliaram grupos de bactérias capazes de degradar nonilfenol etoxilado. Para tanto, inocularam biorreatores com biomassa de lodos ativados na presença deste surfactante com homólogos de nonilfenol de 4 a 19 grupos etoxilados (EO), como única fonte de carbono. Os autores obtiveram isolados de bactérias capazes de degradar nonilfenol etoxilado pertencentes aos filos alfa, beta e gama Proteobacteria sendo verificada semelhança com *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Cupriavidus*, *Ralstonia* e *Achromobacter* e ao filo Firmicutes (*Staphylococcus*).

Maki et al. (1994), isolaram *Pseudomonas* sp., cepa TR01, oriundas de sistemas de lodos ativados capaz de crescer na presença de nonilfenol etoxilado com nove grupos etoxilados como única fonte de carbono e energia. Sob tais condições, foram produzidos subprodutos, como nonilfenol com dois grupos etoxilados, além de acetato.

Desse modo, as bactérias são capazes de transformar alquilfenóis etoxilados em cadeias menores, principalmente na quebra da fração etoxilada. Entretanto, isso pode ocorrer de forma lenta. A biodegradação primária refere-se à perda da capacidade tensoativa do surfactante, mas a mineralização deste composto ainda não está totalmente elucidada (WARHURST, 1995), principalmente no que diz respeito a rotas metabólicas e microrganismos envolvidos nesta degradação.

Scott e Jones (2000) citam que em condição aeróbia pode ocorrer rápida biodegradação primária e final por meio de consórcio microbiano. Steber e Wierich (1985), usaram culturas mistas de microrganismos e métodos precisos de avaliação da biodegradabilidade de AE em estação de tratamento de efluentes. Os autores verificaram a geração de produtos da biodegradação primária e tardia deste surfactante por condições aeróbias e anaeróbias (STEBER; WIERICH, 1987).

Neste estudo foi realizada a identificação de bactérias por meio de análises de pirosequenciamento da região V4 do rRNA 16S, tanto das amostras da biomassa retirada do material suporte (areia), quanto, daquelas do separador de fases do reator de leito fluidificado nas duas últimas fases operacionais (Fase IV e Fase V).

3.8 – Reator de leito fluidificado

A partir do final de 1970 a aplicação do processo anaeróbio para o tratamento de esgoto doméstico e água residuária industrial, seguiu duas linhas de pesquisa definidas, uma

voltada para o entendimento da operação dos reatores de leito fluidificado preconizada por Lettinga, (1984), relacionadas aos reatores de leito de lodo com fluxo ascendente, e outra, com trabalhos desenvolvidos aplicando o conceito de fluidificação.

O termo fluidificação foi criado nos USA, na década de 40. Esta denominação serviu para descrever o processo hidrodinâmico do contato entre gás e sólido (EPSTEIN, 2004). O estado fluidificado pode ser determinado a partir da constante movimentação, ou mudança de posição, de qualquer partícula, do leito em relação às outras partículas, ou quando o leito inicia sua expansão para vazões de líquido crescentes. No estado fluidificado, as partículas trocam continuamente de posição umas em relação às outras, em todo o leito (KNESEBECK, 2003).

O reator anaeróbio de leito fluidificado é uma configuração tecnológica incluída dentre os reatores não convencionais que tem sido usada desde 1970 para tratamento de água residuária industrial (MENDONÇA, 2004). A partir de então, foram construídas estações de tratamento de esgoto nos Estados Unidos e Europa utilizando esta configuração de reator tanto, em escala laboratorial, quanto piloto passando assim a ter maior aplicação (GONÇALVES et al., 2001).

A aplicação desse reator no tratamento de água residuária e esgoto sanitário têm aumentado devido a suas vantagens sobre os processos tradicionais. Este reator é de concepção vertical, e fluxo ascendente da massa líquida, que promove a suspensão das partículas sólidas do leito, que servem de suporte para os consórcios de microrganismos que realizam a decomposição da matéria orgânica presente no substrato afluente (METCALF & EDDY, 2003).

O reator anaeróbio de leito fluidificado favorece a retenção de microrganismos e possui efetiva remoção de sólidos suspensos totais (SANZ; POLANCO, 1990), e pode ser utilizado como alternativa para tratamento de surfactantes não iônicos.

O modelo de reator de leito fluidificado é descrito pela suspensão do sólido devido ao fluxo ascendente em velocidade elevada para causar a flutuação e movimentação das partículas. Tanto, a transferência de massa, quanto a de calor são favorecidas neste modelo, quando comparados com reatores de leito fixo (MENDONÇA, 2004).

Segundo Gonçalves (2005) o desempenho na remoção de matéria orgânica em reatores anaeróbios está diretamente relacionado ao tempo de detenção hidráulico adotado e características operacionais aplicadas ao sistema.

No reator de leito fluidificado o líquido após atravessar o leito aumenta a perda de carga do líquido através do leito. Este aumento da perda de carga se eleva até que as partículas sólidas fiquem desprendidas uma das outras. Isto acontece quando a perda de pressão é suficiente para equilibrar o peso aparente das partículas, no qual qualquer aumento na velocidade resulta na expansão do leito, com consequente movimento das mesmas (GOMIDE, 1983).

Neste estado de transição, o leito está no ponto de fluidificação incipiente, e a correspondente velocidade superficial é denominada velocidade mínima de fluidificação (V_{mf}). Qualquer aumento na velocidade do líquido resulta no acréscimo na expansão do leito, no movimento das partículas e uma distancia média maior entre elas (KUNII; LEVENSPIEL, 1969).

A elevação da velocidade mínima de fluidificação depende da densidade das partículas e de seu tamanho. Esta densidade deve ser maior do que a do líquido, para garantir que as partículas fluidificadas permaneçam no reator. Para que isso ocorra a vazão deve ser ajustada de forma a manter as partículas em movimento, mas mantida suficientemente baixa para evitar que sejam arrastadas com o efluente (KUNII; LEVENSPIEL, 1969).

A movimentação do material suporte (partículas) é de fundamental importância para o controle operacional, para a formação dos consórcios de microrganismos e para a eficiência do reator (BRAGA, 1989).

O reator anaeróbio de leito fluidificado vem sendo estudado com sucesso no tratamento de esgoto doméstico (baixa concentração de matéria orgânica), água residuária industrial e outras cuja composição inclui compostos tóxicos, como por exemplo, fenol (SILVA, 1985) e vinhaça (ANDALIB et al., 2012). Neste reator, ocorre a imobilização da biomassa (microrganismos) em material suporte e elevada eficiência de remoção de matéria orgânica em baixo tempo de detenção hidráulica (MARIN et al., 1994).

Segundo Borja et al. (2001) os modelos de reatores biológicos com base nos conceitos de fluidificação possuem grande eficiência no tratamento de efluentes industriais, ou seja, na faixa de 70% a 95%, em termos de remoção da DQO para águas residuárias industriais (MANRESA et al., 2000; MENDONÇA, 2002; YE; CHEN; FENG, 2005).

Vários materiais suportes, como argila, carvão e pérolas de vidro podem ser usados para imobilizar a biomassa no leito desse reator (OLIVEIRA, 2010). Além disso, a taxa de recirculação aplicada auxilia na diluição do composto tóxico favorecendo ainda mais a sua remoção (OLIVEIRA, 2010; SILVA, 1985).

Carosia (2011) e Delforno (2011) avaliaram a remoção de LAS em reator de leito fluidificado e reator de leito de lodo granulado expandido (EGSB), respectivamente. Segundo os autores, presença do surfactante não alterou significativamente a remoção de DQO. Carosia (2011), observou eficiência de remoção de matéria orgânica de $87,2 \pm 5,4\%$ e $85,8 \pm 4,9\%$, antes e depois da adição de LAS, respectivamente, para concentração de DQO afluente de 532 ± 69 mg/L e 607 ± 60 mg/L.

Delforno (2011) por meio do balanço de massa verificou que 56,6% do LAS adicionado em reator EGSB foram removidos, sendo 48,4% por biodegradação e 8,2% por adsorção, durante 285 dias para $13,93 \pm 1,84$ mg/L afluente. Carosia (2011) verificou que 42,4% do LAS adicionado no reator de leito fluidificado foram removidos por degradação biológica, sendo 0,9% adsorvidos na biomassa e 4,5% adsorvidos na biomassa efluente. Nesse último caso, o reator foi operado por 231 dias com $14,4 \pm 3,5$ mg/L de LAS afluente.

Neste estudo foi avaliada a eficiência na remoção e degradação do surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE – GENAPOL[®] C-100) em reator de leito fluidificado, com recirculação e TDH de 18 horas.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Fluxograma operacional

Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar a remoção do surfactante não iônico, álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE), em reator de leito fluidificado alimentado com substrato sintético simulando esgoto doméstico. O reator foi instalado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) e mantido a 30 °C em câmara climatizada.

Para evitar possíveis danos à biota estabelecida no reator, nas primeiras fases de operação (fase de inoculação e fase de adaptação), optou-se por iniciar a adição do surfactante em baixas concentrações, com aumento gradativo concomitante a estabilização da remoção de matéria orgânica.

Assim, as fases de operação foram definidas segundo a concentração de surfactante adicionado ao substrato sintético. O fluxograma experimental das fases de execução da pesquisa referente aos 492 dias de operação encontra-se delineado na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma experimental das fases de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado

O reator foi operado nas seguintes condições: fase de inoculação da biomassa ao material suporte por 20 dias; fase de adaptação da biomassa, alimentação com substrato sintético, sem álcool etoxilado (AE), por 40 dias; Fase I, alimentação com substrato sintético e $4,7 \pm 2,2$ mg/L de AE por 93 dias; Fase II, alimentação com substrato sintético e $22,5 \pm 8,4$ mg/L de AE por 95 dias; Fase III, alimentação com substrato sintético e $51,4 \pm 2,3$ mg/L de AE por 74 dias; Fase IV, alimentação com substrato sintético e $107,4 \pm 47,3$ mg/L de AE por 89 dias e Fase V, alimentação com substrato sintético sem co-substrato (sacarose) e $97,9 \pm 37,7$ mg/L de AE por 81 dias.

4.2 – Inóculo

O reator de leito fluidificado foi inoculado com lodo anaeróbio proveniente de reator UASB usado no tratamento de resíduos de suinocultura, instalado no Departamento de Engenharia Rural, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Jaboticabal. Este inóculo encontra-se na forma floculenta e coloração escura. Este lodo foi escolhido devido aos bons resultados obtidos em trabalhos anteriores na degradação de surfactante aniônico LAS (alquilbenzeno linear sulfonado), em pesquisas desenvolvidas por Duarte (2006) e Oliveira (2010).

4.3 – Surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada

O surfactante não iônico utilizado neste trabalho, tanto como padrão, quanto para fonte de alimentação do reator foi o álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE) também é conhecido como LAE (Álcool Linear Etoxilado), produzido pela Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA) de nome comercial GENAPOL® C-100.

Este surfactante é proveniente do óleo de coco e é uma mistura de cadeias alquílicas de C_{12} e C_{14} com média de 10 unidades etoxi, cujo peso molecular é de 627 g/mol e concentração micelar crítica (CMC) de 0,075. Sua estrutura química está representada na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura química do surfactante não iônico de cadeia não ramificada (AE), GENAPOL[®] C-100 da Sigma-Aldrich®, sendo, n, o número de unidades etoxílicas

4.4 – Água residuária sintética

O substrato sintético descrito por Torres (1992) e modificado por Duarte (2006), foi a base do meio nutricional do reator (Tabela 2 – Composição do substrato sintético e Tabela 3).

Tabela 2 – Composição do substrato sintético

Nutrientes	Volume (5 litros)
Extrato de levedura (g)	2,5
Sacarose (g)	0,4
Soluções de sais (mL)	25
Bicarbonato de sódio (g)	2

Tabela 3 – Composição da solução de sais

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

A solução de sais foi preparada previamente e mantida em frasco âmbar de 1,0 L sob refrigeração. Os demais compostos foram preparados semanalmente e mantidos em frascos tampados sem umidade. A sacarose, extrato de levedura e bicarbonato de sódio foram dissolvidos em água da rede pública de abastecimento, completando assim o frasco Duran[®] para cinco litros.

A solução estoque de AE, foi preparada a partir do surfactante não iônico GENAPOL[®] C-100 dissolvido em água ultrapurificada. A solução foi armazenada a 4°C em frascos âmbar protegidos da luz e periodicamente renovada.

Para manter a anaerobiose no frasco de alimentação foi adaptada uma bexiga de borracha na tampa do recipiente de alimentação com atmosfera preenchida com N_2 (100%).

4.5 – Reator de leito fluidificado

O reator utilizado para tratamento de substrato sintético contendo AE foi construído totalmente em acrílico com 4,0 cm de diâmetro e 100 cm de altura (Figura 5). Estas dimensões do reator foram as mesmas adotadas por Carosia (2011), Ferreira (2012) e Oliveira (2010).

Na base do reator foi instalado um distribuidor para garantir a uniformidade do fluxo dentro do sistema e, no topo, um separador de fases para impedir que partículas sólidas fossem levadas para fora do reator e garantir a saída do efluente.

Figura 5 – Desenho esquemático do reator anaeróbico de leito fluidificado
Fonte: Oliveira (2010)

O tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado ao reator foi de aproximadamente 18 horas, cuja vazão de alimentação foi de 70 mL/h, controlado por bomba peristáltica de precisão, Provitec[®], Modelo DM 5000/5900, com regulação de vazão eletrônica.

Para a imobilização da biomassa no reator anaeróbico de leito fluidificado foi utilizado areia como material suporte, devido aos bons resultados obtidos por Oliveira (2010). As características da areia usada nesse trabalho estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Características da areia utilizada como material suporte no reator de leito fluidificado

Suporte	Massa (g)	Diâmetro (mm)	Densidade (g/cm³)
Areia	306	1,4 – 1,7	2,3

A areia foi submetida a tratamento ácido com a finalidade de remover impurezas e criar rugosidades em sua superfície para facilitar a adesão da biomassa quando da inoculação do reator. Para tanto, a areia foi mergulhada em solução de ácido fluorídrico (10%), até completa limpeza notada pela coloração da solução de marrom a transparente. Em seguida este material foi levado à estufa de secagem (105 °C) por 24 horas (SILVA, 1985).

A vazão da bomba de recirculação necessária para atingir o valor de velocidade mínima de fluidificação (Vmf) da areia foi de aproximadamente 95 L/h. Silva (1985) recomenda fluidificação 30% acima do valor mínimo. No caso específico desse trabalho, em função das características da bomba obteve-se a vazão 49,5% superior a velocidade de mínima fluidificação, resultando em um grau de mistura superior a 1.880 vezes. Os demais parâmetros relativos à fluidificação do leito de areia estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros de fluidificação do leito

Altura do leito	Expansão do leito	Volume do leito	Qrec	Vmf	Velocidade superficial	Grau de mistura
(cm)	(%)	(L)	(L/h)	(L/h)	(m/s)	
27,8	8,2	0,35	94,9	63,5	27,2	1.882 vezes

Qrec – Vazão de recirculação; Vmf – velocidade de mínima fluidificação

A recirculação promove a diluição de compostos tóxicos, além de aumentar a transferência de massa. Segundo Seghezze et al. (1998), a diluição do afluente promovida pela recirculação do efluente pode favorecer a remoção e degradação de compostos de difícil degradação. Em virtude da diluição inicial do afluente, a concentração do substrato é reduzida, assim contribuindo para diminuir o efeito deletério dos surfactantes aos microrganismos (IZA, 1991).

A fluidificação promovida pela recirculação do efluente aumenta o contato entre os microrganismos aderidos no material suporte e o substrato, o que causa um acréscimo no

desempenho do processo de degradação de compostos recalcitrantes (FERNANDEZ et al., 2008).

4.6 – Análises físico-químicas e cromatográficas

Amostras do afluente e efluente do reator foram analisadas seguindo a frequência e parâmetros apresentados na Tabela 6. Foram realizadas análises de pH, sólidos (totais, fixos e voláteis) e DQO, de acordo com Standard... (2005). A determinação de ácidos voláteis foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo a metodologia descrita por (PENTEADO, 2012). Alcalinidade foi determinada pela metodologia desenvolvida por Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley, Boyle e Converse (1986).

Tabela 6 – Análises de monitoramento do reator de leito fluidificado

Parâmetro	Método	Frequência	Referência
pH (unidade)	Potenciométrico	2X semana	Standard... (2005)
Sólidos totais	Gravimétrico	1X semana	Standard... (2005)
DQO filtrada (mg/L)	Espectrofotométrico	2X semana	Standard... (2005)
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	Titulométrico	2X semana	Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley, Boyle e Converse (1986)
Ácidos voláteis	CLAE	2X semana	Penteado, (2012)
AE (mg/L)	CLAE	2X semana	Neste estudo
Vazão (mL/h)	Volumétrico	Diariamente	-

A concentração de AE foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada e adaptada da metodologia desenvolvida por Matthijs et al. (2004), seguindo determinadas etapas de processamento das amostras de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 – Descrição da metodologia de preparação para determinação de álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE)

Etapas	
1	Evaporar as amostras em béquer
2	Ressolvatar em 10 mL de Solução 1* em ultrassom por 10 minutos
3	Condicionar coluna de alumina com 10 mL da Solução 1* (separar solução)
4	Passar a amostra na coluna e descartá-la
5	Eluir com 10 mL da Solução 1* previamente separada
6	Evaporar em béquer (10 mL)
7	Transferir para frascos âmbar de 4 mL em metanol de 1 em 1 mL
8	Evaporar
9	Adicionar 10 µL de 1-Naphtoyl Chloride
10	Adicionar 25 µL de 1-Methylimidazole
11	Adicionar 865 µL de Acetonitrila
12	Agitar no vórtex
13	Levar à estufa a 60°C por 30 minutos com tampa frouxa (semi aberta)
14	Resfriar
15	Adicionar 100 µL de Metanol
16	Agitar no vórtex
17	Evaporar
18	Ressolvatar em 3 mL de Solução 2**
19	Ultrassom por 10 minutos com a tampa frouxa (semi aberta)
20	Condicionar a coluna com 10 mL da Solução 2**
21	Passar a amostra ressolvatada
22	Descartar
23	Limpar a coluna com 10 mL da Solução 2**
24	Descartar
25	Eluir com 20 mL de Solução 1*, de 10 em 10 mL
26	Evaporar em béquer (10 mL)
27	Ressolvatar em 4 mL de acetonitrila
28	Ultrassom por 10 minutos
29	Transferir para frascos âmbar de 4 mL
30	Injetar no cromatógrafo (CLAE)
* Diclorometano/Metanol (100:5)	
** Diclorometano/Ciclohexano (1:1)	

Os solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, ciclohexano e diclorometano foram todos de elevado grau de pureza (99%), especialmente utilizados para análise de CLAE.

A derivatização química é uma técnica comumente utilizada para aumentar a sensibilidade de detecção de compostos (MEISSNER; ENGELHARDT, 1999). Para este

estudo foram utilizados os derivatizantes 1-Naphtoyl Chloride e 1-Methylimidazole da Sigma-Aldrich® e utilizados sem preparações adicionais. Notou-se que os reagentes de derivatização devem ser utilizados ainda novos, uma vez que estas substâncias podem ter vida útil relativamente curta devido à sua grande susceptibilidade à hidrólise e oxidação.

Nesse estudo foi utilizada a coluna de extração em fase sólida (SPE) de alta performance da SampliQ® com preenchimento de alumina de 5x6 mL da Agilent Technologies® (MATTHINS et al., 2004) e acopladas no manifold.

As amostras, tanto dos padrões, quanto do afluyente, foram evaporadas em frasco âmbar de 4 mL, seguindo suas devidas diluições quando necessárias, não processando assim, as etapas de 1 a 8 descritas na Tabela 7.

No entanto, para as amostras de efluente seguiu-se o roteiro supracitado, sendo que na etapa 4, foram passados 50 mL da amostra em cartucho de alumina, concentrando, assim o surfactante na coluna. Após o desenvolvimento de todo o procedimento as amostras foram injetas no cromatógrafo, cujas condições cromatográficas estão dispostas na Tabela 8 e Tabela 9.

Tabela 8 – Condições cromatográficas para a quantificação do AE por CLAE

Condições cromatográficas	
Coluna	C-8 supelco, 5µm, 15 cm x 4,6
Eluente A	Acetato de amônio 0,03 M em água purificada e metanol P.A. (75:25)
Eluente B	Acetonitrila e metanol (50:50)
Fluxo	1,0 mL/min
Detector	Fluorescência, com λ excitação 300 nm e λ emissão 385 nm
Forno	38°C
Loop	20 µL
Tempo	30 minutos

Tabela 9 – Gradiente dos efluentes do CLAE para a metodologia cromatográfica do AE

Configuração do Gradiente dos Eluentes do Cromatógrafo			
Tempo (min)	Módulo	Evento	Valor (%)
5	Pumps	Concentração do solvente B	90
7	Pumps	Concentração do solvente B	90
13	Pumps	Concentração do solvente B	95
15	Pumps	Concentração do solvente B	95
20	Pumps	Concentração do solvente B	70
28	SCL-10Avp	STOP	0

As curvas analíticas para a quantificação do surfactante foram realizadas com solução de GENAPOL[®] C-100 (padrão AE – álcool etoxilado) em concentrações conhecidas, preparadas em água ultra purificada por meio de solução estoque. Soluções com concentração de 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L foram processadas segundo protocolo da Tabela 7 e analisadas por CLAE.

A quantificação de álcool etoxilado (AE) padrão foi realizada por integração das áreas totais das séries de picos relacionadas ao AE conforme os cromatogramas (Figura 6 e Figura 7). O surfactante comercial é uma mistura de complexos componentes com grande variação de comprimentos de cadeias alquil e unidades etoxi. Assim é comum a sobreposição e/ou aparecimento de vários picos em um mesmo tempo de retenção.

Figura 6 – Cromatograma referente ao padrão de 20 mg/L de AE
TR – Tempo de Retenção

Figura 7 – Interpolação dos cromatogramas dos padrões da curva de AE (10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L). Em detalhe, a sobreposição dos picos nas diversas concentrações

Os cromatogramas obtidos com o padrão GENAPOL[®] C-100 de 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L, foram utilizados para o cálculo da curva analítica. Tal curva foi calculada para amostras em duplicata (Figura 8).

Figura 8 – Curva analítica de AE obtida em CLAE

4.7 – Inoculação

A imobilização da biomassa no material suporte foi realizada mediante sua adaptação ao substrato sintético. O sistema foi mantido em recirculação (circuito fechado) com substrato sintético e 25 mL de lodo (2% do volume total do reator) por tempo suficiente para estabilização da matéria orgânica. A alimentação do reator foi armazenada em frasco Duran[®] a 30 ± 1 °C. Posteriormente ao consumo do substrato, nova solução era adicionada ao frasco de alimentação do reator. Este período foi determinado segundo medições de demanda química de oxigênio (DQO).

4.8 – Adaptação

Nesta fase de operação o sistema foi aberto (sistema contínuo), mantendo a mesma composição do substrato sintético, como demonstrado na Tabela 2 e Tabela 3.

Outro fator importante desta fase foi a adição de N₂ (100%) ao substrato sintético (frasco Duran[®] de 5,0 litros), com o objetivo de diminuir os níveis de oxigênio dissolvido afluente no reator. Para tanto, por meio de pipeta de vidro e mangueira foi adicionado N₂ ao *headspace* (aproximadamente 200 mL) do frasco de alimentação durante 15 minutos. O frasco contendo a alimentação, a partir desta fase, ficou refrigerado a 4 °C para evitar a fermentação.

4.9 - Fases operacionais com surfactante não iônico

As fases denominadas I, II, III, IV e V referem-se às concentrações de GENAPOL[®] C-100 de 4,7 mg/L, 22,5 mg/L, 51,4 mg/L, 107,4 mg/L e 97,9 mg/L, respectivamente, adicionadas ao substrato sintético.

Para estas fases foram adicionados ao substrato sintético volumes conhecidos das soluções estoques de 1 g/L (Fase I), 3 g/L (Fase II) e 6 g/L (Fase III, IV e V) do surfactante não iônico AE (GENAPOL[®] C-100) em 5 litros de alimentação, obtendo assim a concentração em estudos para cada fase operacional.

4.10 – Extração de álcool etoxilado adsorvido

A extração do AE foi realizada por meio da metodologia desenvolvida por Duarte et al. (2008), para a quantificação de surfactantes aniônicos (LAS) em materiais inertes e biomassa. Amostras de material suporte (areia) e biomassa (distribuidor, separador de fases e paredes internas do reator) foram retiradas do reator de leito fluidificado ao final da Fase V para determinação do AE adsorvido e cálculo do balanço de massa do surfactante no sistema.

O protocolo de extração de LAS para quantificar o surfactante adsorvido na biomassa e material suporte (DUARTE, 2006; OLIVEIRA et al., 2009) foi modificado a partir daquele usado pela petroquímica espanhola (PETRESA).

Para isso, as amostras de suporte contendo o surfactante não iônico AE foram mantidas em estufa a 110°C por 24 horas (em duplicata) para, posteriormente, ser realizado o processo de extração que consistiu nas seguintes etapas:

- 1 – O material suporte/biomassa, previamente seco, foi pesado e anotado a massa
- 2 – Foram adicionados ao material suporte 50 mL de metanol P.A.
- 3 – A mistura heterogênea (metanol + material suporte/biomassa) foi transferida para banho de ultra-som por 30 minutos em temperatura de aproximadamente 50°C
- 4 – Foi separado o material suporte/biomassa do líquido coletando, assim a fase líquida da mistura
- 5 – As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas
- 6 – Ao material suporte/biomassa foram adicionadas 20 mL de água destilada
- 7 – Repetiu-se as etapas 3 e 4
- 8 – A solução formada pelo metanol coletado em cada etapa mais a água foi filtrada em membrana de 0,22 µm
- 9 – Evaporou-se o extrato metanólico em placa aquecida (60°C) até o volume ser reduzido a aproximadamente 20 mL
- 10 – Prosseguiu-se com as etapas para a derivatização e leitura destas amostras em cromatografia de alta eficiência (CLAE).

A eficiência desse método de extração de surfactante já foi confirmada por Carosia (2011), Delforno (2011), Duarte et al., (2008), Ferreira (2012), Oliveira (2010) e Oliveira et al., (2009), para LAS.

4.11 – Potencial metanogênico

O teste de produção de metano pode oferecer informações importante sobre a transformação da matéria orgânica a metano, principalmente no que diz respeito a substratos específicos (ESPÓSITO et al., 2012). O teste de potencial metanogênico específico foi realizado em batelada em frascos Duran[®] de 500 mL em duplicata. Os reatores foram preenchidos com 225 mL de substrato sintético idêntico ao de alimentação do reator anaeróbio de leito fluidificado em escala de bancada, conforme as Tabela 10 e Tabela 11.

Tabela 10 – Composição do substrato sintético

Nutrientes	Volume (5 litros)
Extrato de levedura (g)	2,5
Sacarose (g)	0,4
Soluções de sais (mL)	25
Bicarbonato de sódio (g)	2

Tabela 11 – Composição da solução de sais

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

O inóculo dos reatores em batelada foi proveniente de lodo floculento de reator UASB usado no tratamento de água residuária de suinocultura. O lodo foi previamente acondicionado em câmara climatizada a 30±1°C por sete dias, a fim de exaurir as fontes de carbono disponíveis presentes no inóculo. Após este período 25 mL (10% do volume reacional) de lodo foi adicionado a cada reator, totalizando junto ao substrato sintético, volume total de 250 mL. A concentração média de sólidos voláteis totais (SVT) nas series experimentais foi de 1,74 g/L.

As concentrações de álcool etoxilado (AE) adicionadas nas séries experimentais foram de 7,2±0,9 mg/L, 24,1±0,7 mg/L, 65,1±40 mg/L e 123,4±34 mg/L. O ensaio controle foi realizado com a adição de substrato sintético, porém sem o acréscimo de AE.

Os reatores foram mantidos sob agitação de 130 rpm e temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Este ensaio foi realizado com células em crescimento planctônico, sem adesão em material suporte. Foram realizadas análises de DQO e sólidos no início e final da operação dos reatores seguindo a metodologia descrita em Standard... (2005) e técnica gravimétrica, respectivamente.

A produção de metano (CH_4) foi monitorada em cromatógrafo em fase gasosa (CG) 2010 (Shimadzu, Japão) equipado com detector de condutividade térmica e coluna Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm). Argônio foi empregado como gás de arraste (12 mL/min), temperatura do injetor de 220°C , temperatura da coluna de 130°C , temperatura do detector de 230°C e volume de amostra de 500 μL , conforme metodologia padronizada no laboratório de Processos Biológicos, Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC/USP.

Foi utilizado o ajuste pela equação de Gompertz modificada (Equação 1) (PEIXOTO et al., 2012; ZWIETERING, et al., 1990), a qual foi possível definir o potencial de produção de metano, produção acumulada de metano, taxa de produção de metano e fase lag. Jeong et al. (2007) encontraram excelentes resultados quando utilizaram a equação de Gompertz modificada aplicada aos resultados obtidos em reatores anaeróbios em batelada para a produção de metano.

$$M = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo: M = produção acumulada de metano (μmol),

P = produção potencial de metano (μmol),

R_m = taxa de produção de metano ($\mu\text{mol/h}$),

λ = fase lag (horas),

t = tempo (horas)

e = número de Euler (2,71828)

Os parâmetros P, R_m e λ foram estimados por meio do software OriginPro[®] 8.1 e foram realizadas acima de 100 interações para convergir os dados usando o modelo matemático supracitado.

A produção específica de metano foi obtida dividindo a produção acumulada (μmol) pela quantidade de sólidos voláteis totais (SVT) mensurados em cada série experimental.

4.12 – Microscopia óptica

Amostras da biomassa do reator foram examinadas em microscópio Olympus BX60 de contraste de fase e fluorescência, acoplado à câmera com captura de imagem e software Image Pro Plus[®]. Para isso, em lâminas de vidro previamente limpas com álcool, foi colocada fina camada de ágar (2%). Após sua solidificação, uma gota de amostra foi adicionada e recoberta com a lamínula.

4.13 – Microscopia eletrônica de varredura

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas com amostras retiradas após final da operação do reator. As amostras do biofilme foram preparadas de acordo com, Nation (1983) modificado por Araujo (1994). As amostras foram previamente fixadas em 0,1 M de tampão fosfato (pH = 7,3) contendo glutaraldeído a 2,5% por 12 horas a 4°C. As amostras fixadas foram lavadas três vezes em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,3) por 10 minutos e desidratadas usando solução de etanol a 50%, 70%, 80%, 90% e 95% durante 10 minutos em cada concentração. Cada amostra foi lavada três vezes em etanol 100% por 10 minutos e fixada por lavagem duas vezes durante 30 segundos com hexamethyldesilazane (HMDS). As amostras foram secas à temperatura inferior a 60°C durante 2 horas e revestidas com ouro. As análises de MEV foram realizadas com o Digital Scanning Microscope da Zeiss modelo DSM-960.

4.14 – Determinação do número mais provável

Para estimar a população de microrganismos (bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas) foi utilizada a técnica de tubos múltiplos por meio do número mais provável (NMP). Esta técnica foi originalmente realizada por McCrady (1915), entretanto, foi modificada por Sakamoto (1996) para a quantificação de microrganismos anaeróbios.

O método consiste em diluições seriadas para a contagem indireta da densidade de microrganismos em um líquido. Para a quantificação do NMP foi utilizado o protocolo do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (STANDARD..., 1998).

O procedimento consistiu na inoculação dos microrganismos, provenientes da Fase V da operação do reator (biomassa do material suporte e biomassa do separador de fases) no meio de cultura idêntico ao utilizado como substrato sintético adicionado ao reator de leito fluidificado com 120 mg/L de AE, em triplicata.

Para a preparação da água de diluição foram necessárias duas soluções descritas na Tabela 12.

Tabela 12 – Soluções para água de diluição

Solução de água de diluição	Reagente	Volume*
1	K ₂ HPO ₄ (0,2 M)	1 mL
2	KH ₂ PO ₄ (0,2 M)	0,25 mL

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

Para a preparação da água anaeróbia foi utilizado 300 mL de água destilada a qual foi transferida para erlenmeyer e submetida ao aquecimento até entrar em ebulição. Essa água foi resfriada, durante 20 minutos, sob atmosfera de N₂ (100%), acoplado-se uma seringa e pipeta ao sistema de distribuição de gás. Em seguida esta água foi utilizada para preparar a solução de diluição. Dessa forma, as soluções 1 e 2 foram adicionadas em frascos apropriado e o volume finalizado com essa água anaeróbia como descrito na Tabela 12.

Foram adicionados 9,0 mL de água de diluição em cada frasco de antibiótico (30 mL) como auxílio de um pipetador automático. Após a transferência os frascos foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) por 1 minuto, tampados com tampa de butila e lacres de alumínio. Todo este material foi autoclavado a 121°C e 1 atm durante 20 minutos.

Para a preparação do meio de cultura utilizou-se o mesmo procedimento adotado da água de diluição. Entretanto, o meio foi esterilizado por filtração em membrana (0,22 µm) por meio do sistema Milipore®, previamente esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm durante 20 minutos. Após a filtração o meio foi submetido à atmosfera de N₂ (100%) durante 20 minutos e, posteriormente, adicionado o surfactante AE. A seguir foram transferidos 8,9 mL desse meio em frascos de antibiótico de 30 mL (previamente esterilizados). Os frascos foram fechados com tampa de butila e lacre de alumínio. Em todos os frascos de contagem,

anteriormente à inoculação, foi adicionado 0,1 mL de solução redutora de sulfeto de sódio (5%) (SAKAMOTO, 1996).

Amostras da biomassa do material suporte (areia) e do separador de fases foram retiradas do reator ao final da operação (Fase V cuja alimentação continha aproximadamente 100 mg/L de AE). O material foi transferido para frasco de antibiótico, fechado com tampa de butila e pérolas de vidro e submetido à agitação por cerca de 30 minutos, para que a biomassa se desprendesse do material suporte e passasse para a fase líquida a fim de ser coletada com seringa.

A seguir foi realizada a diluição seriada da amostra. Para isso foi transferido 1 mL (com seringa estéril) da amostra contendo biomassa para 9 mL de água de diluição. A partir desta diluição, mais 1 mL foi retirado e transferido para outro frasco de diluição contendo 9 mL, e assim sucessivamente até a diluição 10^{-20} (Figura 9).

Figura 9 – Esquema das diluições e inoculações do NMP

A partir da diluição seriada com água de diluição foi realizada a inoculação em meio de cultura como detalhado na Figura 9. A etapa de inoculação foi realizada em triplicata. Os frascos de contagem (NMP) foram incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 dias.

A leitura do NMP para as bactérias anaeróbias totais foi realizada pela turvação do meio reacional para as diferentes diluições. As arqueas metanogênicas foram avaliadas pela detecção de metano em cada frasco de contagem, por meio de análise de cromatografia em fase gasosa (GC).

A composição do biogás gerado em cada frasco de contagem foi avaliada por meio da retirada de amostra (500 µL) do *headspace* de cada frasco. A análise foi realizada em cromatografia em fase gasosa GC-2010 Shimadzu[®], equipado com detector de condutividade térmica (TCD), com coluna Carboxen[®] 1010 plot 30 m X 0,53 mm, sendo o argônio o gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 230°C, respectivamente, e na coluna a temperatura foi 130°C com aquecimento de 46°C/min até 135°C.

Combinações de respostas positivas foram a base do cálculo para estimar o NMP, usando a tabela padrão de probabilidade (STANDARD..., 1998), que confere o limite de confiança de 95% para cada valor determinado. Foi realizada a quantificação em NMP de células/g STV. A análise de sólidos totais voláteis foi realizada segundo Standard... (2005).

As combinações encontradas para as bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas do material suporte foram inseridas na Equação 2, a fim de se calcular o NMP de microrganismos por 100 mL.

$$\text{NMP} = \text{valor da Tabela} \times 10/10^y = \text{NMP}/100 \text{ mL} \quad (\text{Equação 2})$$

$y = \text{menor diluição}$

4.15 – Avaliação do potencial redox

A constatação de potencial redox foi realizada por meio de método indireto, conforme protocolo desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos (LPB – EESC/USP). Esse método baseia-se na diferenciação da coloração do corante resazurina conforme o potencial redox do meio. A cor azul é característica de aerobiose e a cor branca corresponde à anaerobiose estrita. A cor rosa é característica de meios com potencial redox entre 100 e -100 mV, podendo ser relacionada às condições microaerófilas.

O experimento consistiu na adição do corante resazurina 0,1% na alimentação do reator, na proporção 1 mL/L. O frasco com alimentação já acrescida de resazurina foi submetido a atmosfera de N₂ (100%) durante aproximadamente 30 minutos e em seguida transferido para alimentação do reator. Além disso, foi injetado 1 mL de resazurina na forma de pulso na entrada da alimentação do reator, ou seja, uma quantidade corante foi injetada de uma só vez, em um tempo curto quanto possível, pode ser observado na Figura 10 e Figura 11.

Figura 10 – Resazurina em frasco de alimentação do reator

Figura 11 – Avaliação do potencial redox com resazurina. A – Aplicação em forma de pulso. B – Conexão com a alimentação

4.16 – Biologia molecular

Para análise filogenética foram utilizadas amostras do final das Fases IV e V de operação do reator e amostras do ensaio do NMP, com crescimento positivo, após 30 dias de incubação. As amostras para as análises de biologia molecular foram provenientes do biofilme aderido ao material suporte (areia), biomassa do distribuidor, biomassa planctônica do separador de fases do reator anaeróbio de leito fluidificado e biomassa proveniente do ensaio de potencial metanogênico dos reatores anaeróbios em batelada, sendo que para esta última foi feito apenas PCR/DGGE.

As amostras do NMP foram selecionadas de acordo com o seguinte critério: (1) menor diluição com crescimento positivo para o inóculo (10^2 e 10^3); (2) maior diluição com crescimento positivo para arqueas metanogênicas (Met) séries 10^5 , 10^6 e 10^7 para o separador de fases e 10^6 , 10^7 e 10^8 para a areia; e (3) maior diluição com crescimento positivo para bactérias anaeróbias totais (Bat) séries 10^8 e 10^9 para o separador de fases e 10^9 e 10^{10} , tanto para biofilme da areia, como do separador de fases.

4.17 – Extração de DNA e PCR

A extração de DNA e o produto da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), tanto das amostras do reator anaeróbio de fluidificado e em batelada, como do NMP, foram realizadas utilizando *glass beads* e mistura de fenol tamponado com Tris e clorofórmio (1:1 v/v) seguindo o procedimento descrito por GRIFFITHS et al. (2000) modificado. Para isso, na amostra de biomassa acrescida de 0,3 – 0,5 g de *glass beads* e 1 mL de PBS foi adicionado 1 mL de fenol tamponado com Tris e 1 mL de clorofórmio. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 30 – 50 segundos e centrifugada por 10 minutos a 6.000 rpm a 4°C.

Em seguida 1 mL do sobrenadante foi transferido para eppendorf de 2 mL (amostra mantida no gelo), foi adicionado 1 mL de fenol, a amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada nas mesmas condições supracitadas.

Aproximadamente 800 µL do sobrenadante foram transferidos para outro eppendorf e o mesmo volume foi adicionado de clorofórmio. A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada nas mesmas condições iniciais.

Aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram transferidos para outro eppendorf e o mesmo volume foi adicionado de clorofórmio novamente. A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada nas mesmas condições iniciais. Por fim, aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para outro eppendorf e a amostra de DNA foi armazenada a -20°C.

Para verificar a integridade e a concentração do DNA (2µL do *High DNA Mass Ladder Invitrogen*) foi realizada eletroforese em gel de agarose a 0,8%, utilizando 5 µL do extrato de ácido nucléico homogeneizado com 1 µL de *loading buffer* 6x. As condições de corrida da eletroforese foram as seguintes: 75 V (6 V/cm) constante por 30 minutos. Após a corrida o gel foi transferido para câmara de trans-iluminador UV (*Stratagene – Eagle Eye II*) para observação das imagens das bandas do gel.

A purificação do DNA foi realizada com o Kit *Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo protocolo indicado do produto. Em seguida realizou-se a PCR para o prosseguimento das análises de DGGE. A partir do DNA das amostras do material suporte (areia) e separador de fases do final das fases IV e V foram realizadas o Pirosequenciamento no Instituto de Agrobiotecnologia Rosário (INDEAR) (Rosário, Argentina) utilizando o 454 Genome Sequencer FLX (Roche). Para a PCR foram usados os iniciadores (*primers*) 968FGC e 1401R (NUBEL, 1996), para o Domínio Bacteria, cuja programação do termociclador (Eppendorf AG - 22331 Hamburg) está apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 – Programação do termociclador para amplificação do rRNA 16S para o Domínio Bacteria

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
95°C	94°C	56°C	72°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
05:00	00:30	00:40	01:00	00:45	00:45	01:00	07:00	
	10 ciclos			25 ciclos				

Para o Domínio Archaea foram utilizados os *primers* 1100FGC e 1400R (KUDO, 1997) cuja programação do termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400) está apresentada na Tabela 14.

Tabela 14 – Programação do termociclador para amplificação do rRNA 16S para o Domínio Archaea

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
95°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
05:00	01:00	01:00	01:00	07:00	
	35 ciclos				

O produto da PCR foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, utilizando 5 µL do produto homogeneizado com 1 µL de *loading buffer* e 2 µL do padrão *Low DNA Mass Ladder Invitrogen*. As condições de corrida da eletroforese foram de 75 V (6 V/cm) constante por 1 hora.

Na Tabela 15 estão detalhados os reagentes e concentrações utilizadas para reação em cadeia da polimerase (PCR).

Tabela 15 – Soluções para amplificação usando primers 968FGC e 1401R e 1100FGC e 1400R

Reagentes	Concentração	1 amostra (µL)
H ₂ O ultrapurificada	-	3,5
Tampão PCR Invitrogen®	10X	5,0
MgCl ₂	50 mM	1,5
dNTP (cada base nitrogenada)	2 mM	5,0
Primer 27F	100 pmol/µL	0,5
Primer 1100R	100 pmol/µL	0,5
Taq DNA Polimerase Invitroge®	5 U/µL	0,5
Amostra	100 ng	2,0-3,0
Total	-	~ 20

4.18 – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

O produto de amplificação da PCR com os *primers* das amostras do reator anaeróbio de leite fluidificado, dos reatores em batelada bem como do NMP foram aplicados em gel de poliacrilamida 8%, em TAE 1X, com gradiente linear de desnaturante (uréia e formamida) variando de 35% a 60% para à análise em DGGE, tanto para Domínio Bacteria quanto, para o Domínio Archaea. A corrida foi realizada a 60°C com 75 V (6 V/cm) por 16 horas. O gel foi

corado com o brometo de etídeo e a leitura dos padrões de bandas do DGGE foi feita em câmara de trans-iluminador UV (*Stratagene – Eagle Eye II*).

As análises multivariadas dos perfis de bandas do DGGE foram realizadas por meio da aplicação do software *BioNumeric 2.5* (*Applied Maths*, Bélgica), as quais foram analisadas utilizando a correlação *Pearson*. Os dendogramas foram construídos pelo método UPMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*).

4.19 – Pirosequenciamento

Foram retiradas amostras de biomassa das duas últimas fases de operação do reator de leite fluidificado, as quais consistiam em concentrações similares do surfactante não iônico AE ($107,4 \pm 47,3$ mg/L e $97,9 \pm 37,7$ mg/L). A principal diferenciação entre ambas as fases foi a presença e ausência de sacarose, adicionada ao substrato sintético afluyente. Assim, foram separadas quatro amostras para a análise de pirosequenciamento da região V4 do rRNA 16S.

As amostras foram lavadas sucessivamente em tampão fosfato e centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos. Os *pellets* foram armazenados a -20°C . A extração do DNA dos *pellets* foi baseada em protocolo de Griffiths et al. (2000) modificado, usando fenol tamponado com Tris e clorofórmio (1:1 v/v).

O DNA extraído foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X e purificado com *Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification kit* (*GE Healthcare*). Espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE, USA) foi utilizado para verificar a qualidade do DNA extraído. Para garantir a qualidade, a concentração de DNA de cada amostra foi de no mínimo 10 ng/ μL e pureza OD_{260/280} entre 1,80 e 2,0.

Além disso, foi verificada a amplificação do DNA utilizando os iniciadores (*primers*) 27F e 1100R (LANE, 1991; TURNER et al., 1999). A PCR foi realizada em termociclador *Eppendorf Mastercycle* (*Eppendorf AG – 22331 Hamburg*) nas condições descritas na Tabela 16 e soluções descritas na Tabela 17.

Tabela 16 – Condições utilizadas na PCR

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
95°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
05:00 min	45s	45s	105s	105s	
	30 ciclos				

Tabela 17 – Soluções para amplificação usando iniciadores 27F e 1100R

Reagentes	Concentração	Quantidade por amostra (µL)
H ₂ O ultrapura	-	3,0
Tampão PCR Invitrogen®	10X	5,0
MgCl ₂	50 mM	1,5
dNTP (cada base nitrogenada)	2 mM	5,0
Primer 27F	100 pmol/µL	0,5
Primer 1100R	100 pmol/µL	0,5
Taq DNA Polimerase Invitroge®	5 U/µL	0,5
Amostra	100 ng	2,0-3,0
Total	-	~ 20

O DNA extraído foi desidratado e precipitado em etanol 95%. Para isso, 1 mL de etanol 95% (4°C) foi adicionado à amostra purificada, a amostra foi homogeneizada manualmente em movimentos suaves e em seguida centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foi adicionado 0,5 mL de etanol 70% (4°C) à amostra. A amostra foi homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o restante do etanol foi evaporado naturalmente por 24 h em capela.

Após a precipitação do DNA as amostras foram enviadas para o instituto de Agrobiotecnologia Rosário (INDEAR) para análise de pirosequenciamento em equipamento FLX GS-454 (*Life Sciences*®, *Roche*®).

Foram utilizados quatro *barcode* com 10 pb, tag, e os iniciadores 563F/802R (MURPHY et al., 2010) designados para cada amostra (Tabela 18). As amostras foram combinadas com microesferas magnéticas (*beads*) e amplificadas por meio de PCR em

emulsão e as microesferas ligadas aos fragmentos de DNA foram depositadas em distintos poços (MARGULIES et al., 2005).

Tabela 18 – Identificação das amostras de pirosequenciamento

Amostra	Barcode	Tag+Primer Forward	Primer Reverse
MS-C	AGCACTGTAG	CACGACGTTGTAAAACG	CAGGAAACAGCT
		ACAYTGGGYDTAAAGNG	ATGACC
SF-C	ATCAGACACG	CACGACGTTGTAAAACG	CAGGAAACAGCT
		ACAYTGGGYDTAAAGNG	ATGACC
MS-S	ATATCGCGAG	CACGACGTTGTAAAACG	CAGGAAACAGCT
		ACAYTGGGYDTAAAGNG	ATGACC
SF-S	CGTGTCTCTA	CACGACGTTGTAAAACG	CAGGAAACAGCT
		ACAYTGGGYDTAAAGNG	ATGACC

MS-C – biomassa do material suporte (areia) na Fase IV; SF-C biomassa do separador de fases da Fase IV; MS-S – biomassa do material suporte (areia) na Fase V; SF-S biomassa do separador de fases da Fase V.

Os dados do pirosequenciamento foram processados utilizando o *Ribosomal Database Project* (RDP) Pyrosequencing Pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/index.jsp>) (COLE, 2009), o qual permitiu a realização das análises estatísticas das amostras com menor número de pares de bases. O primeiro passo foi selecionar as sequências baseado nos seguintes parâmetros: comprimento das sequências maior que 200 pb e coeficiente de qualidade maior ou igual a 25.

As sequências foram localizadas por meio dos *barcodes* citados na Tabela 18 dentre as outras amostras das placas, com tolerância de até duas bases, assim uma vez identificadas as amostras o barcodes foram removidos das sequências.

As leituras das sequências que não corresponderam a sequência dos iniciadores (*primers*) não foram atribuídas a nenhuma amostra e, portanto, foram descartadas. Leituras menores que 200 pb ou que continham uma ou mais ambiguidades foram removidas, bem como as leituras que não foram relacionadas a nenhum domínio. As quimeras foram removidas utilizando DECIPHER (<http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimerasOutputs.html>) de acordo com Wright et al. (2012).

As sequências foram alinhadas com a ferramenta INFERNAL (*Inference of RNA Alignments*) ALIGNER (NAWROCKI; KOLBE; EDDY, 2009) e atribuídas taxonomicamente com 97% (agrupamento hierárquico - método UClust (EDGAR, 2010)) e

similaridade empregando RDP classifier (Ribossomal Database Project; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

As *single* OTUs (*Operation Taxonomic Units*) foram removidas, pois de acordo com Medinger et al. (2010) e Tedersoo et al. (2010), são sequências suspeitas que precisam ser removidas no momento da análise. Posteriormente, as sequências representativas de cada OTU foram selecionadas a partir do arquivo *dereplicate*.

A classificação taxonômica das UTOs (Unidade Taxonômica Operacional) foi realizada utilizando o RDP-Classifier (Ribossomal Database Project - <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) adotando limite de confiança de 50% (WANG et al. 2007).

A curva de rarefação das amostras foi determinada usando a ferramenta de análise do RDP-Pyrosequencing Pypeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>). Os índices de riqueza (Chao 1), Dominância, Equitabilidade, Diversidade (Shannon-Winner, Simpson, Whitaker e β) e Similaridade de Bray-Curtis foram calculadas utilizando o software PAST (Paleontological Statistics Software) como proposto por Hammer, Harper e Ryan (2001).

As sequências foram submetidas ao *European Nucleotide Archive* (<http://www.ebi.ac.uk>), com números de acessos: ERS377591 (amostra da biomassa do material suporte da Fase IV), ERS377593 (amostra da biomassa do separador de fases da Fase IV), ERS377592 (amostra da biomassa do material suporte da Fase V) e ERS377594 (amostra da biomassa do separador de fases da Fase V); o número de acesso do projeto é PRJEB5055.

4.20 – Índices de riqueza e diversidade

Para o cálculo da riqueza total foi utilizado o índice de Chao 1 o qual estima a riqueza total do número de espécies representadas por apenas um indivíduo nas amostras (*singletons*) e o número de espécies com apenas dois indivíduos nas amostras (*doubletons*), por meio da Equação 3:

$$Sc = S + \frac{F_1^2}{2 F_2} \quad (\text{Equação 3})$$

sendo,

Sc = riqueza estimada,

S = riqueza absoluta,

Fi = numero de espécies que tem exatamente *i* individuo em todas as amostras.

O cálculo de diversidade β foi obtido pelo índice de Whittaker que mede a mudança ou taxa de substituição na composição de espécies de um local para outro (WHITTAKER, 1960). Este índice varia de 0, quando duas amostras não apresentam nenhuma diferença na composição de espécies e 2, quando esta diferença é máxima. O índice β pode ser calculado utilizando a Equação 4:

$$\beta = \left(\frac{c}{a}\right)^{3/4} \times 1 \quad (\text{Equação 4})$$

sendo,

c = total de espécies nas parcelas amostradas;

a = média do número de espécies das parcelas amostradas.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Inoculação

No inóculo proveniente de lodo anaeróbio de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura foi observado 36,4 g/L de sólidos totais voláteis o que denotam grande concentração de matéria orgânica e microrganismos presentes em sua composição (Tabela 19). O pH e potencial redox do lodo, à temperatura de 21°C, foi de 7,3 e -257,8 mV respectivamente.

Tabela 19 – Valores de sólidos do inóculo

Biomassa	g/L
Sólidos Totais – ST	48,7
Sólidos Totais Voláteis – STV	36,4
Sólidos Totais Fixos – STF	12,4

A etapa de inoculação teve duração de 20 dias. Neste período o reator foi mantido em circuito fechado com o intuito de imobilização da biomassa no material suporte. Nesta fase foram preparados aproximadamente 5 litros de meio nutriente (substrato sintético, Tabela 2 e Tabela 3). Ao substrato sintético foi adicionado 25 mL de lodo anaeróbio, equivalente a 2% do volume do reator.

A carga orgânica volumétrica (COV) aplicada ao reator nesta fase foi de $0,97 \pm 0,5$ kgDQO/d. A DQO foi monitorada periodicamente. A cada alimentação a DQO afluente foi de 535 ± 121 mg/L, e após três dias estes valores eram de 129 ± 79 mg/L, obtendo-se assim 75% de eficiência de remoção da matéria orgânica (Figura 12). Oliveira (2010) utilizou metodologia semelhante de inoculação e obteve $87 \pm 3\%$ de eficiência para a remoção de 500 mg/L de DQO afluente em 22 dias de inoculação.

A COV aplicada nesta etapa ($0,97 \pm 0,5$ kgDQO/d) foi próxima daquela aplicada por Delforno (2011), em reator anaeróbio de leito de lodo expandido (EGSB) usado na remoção de LAS. Este autor obteve $0,8 \pm 0,08$ kgDQO/d de COV, na fase de adaptação do reator (48 dias), cuja DQO afluente foi de 573 ± 140 mg/L para TDH de 32 horas.

Figura 12 – DQO filtrada aplicada ao reator no período de inoculação

Em relação ao pH nesta etapa de inoculação observou-se o valor médio de $8,5 \pm 0,5$. Entretanto, notou-se tendência decrescente deste parâmetro, chegando a 7,5 no final desta fase (Figura 13), diferentemente dos resultados obtidos por Oliveira (2010). Esta autora obteve entre 7,4 a 8,1 para etapa referente a inoculação do reator de leito fluidificado.

Esta diminuição de pH pode ter sido promovida pela produção e/ou concentração de ácidos orgânicos voláteis (AOV). Em relação aos ácidos verificou-se $153,3 \pm 35,8$ mg/L, portanto, superior aquele obtido por Oliveira (2010), ou seja, na faixa de 14 a 20 mgHAc/L, entretanto, esta autora utilizou metodologia por titulação para verificação de AOV diferente daquela utilizada neste estudo (cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE). Ferreira (2012), na fase de inoculação do reator de leito fluidificado usado para a remoção de LAS em sabão em pó comercial obteve 44 ± 34 mg/L de AOV.

Figura 13 – Variação do pH no período de inoculação

Neste estudo notou-se que houve grande diversidade de ácidos orgânicos nesta fase, a maior porcentagem foi referente aos ácidos propiônico e valérico ($21,6 \pm 15,7$ mg/L e $20,8 \pm 15,1$ mg/L, respectivamente) (Figura 14). Verificou-se também, nesta fase, $23 \pm 5,6$ mg/L e 106 ± 5 mg/L de glicose e metanol, respectivamente. A geração destes produtos metabólicos solúveis podem ser oriundos da intensa atividade microbiana. Esta diversidade de compostos no meio sugere que a biomassa estava metabolicamente ativa.

Citr – Ácido cítrico, Malc – Ácido málico, Succ – Ácido Succínico, Latc – Ácido lático, Form – Ácido fórmico, Acet – Ácido acético, Prop – Ácido propiônico, Ipro – Ácido isopropiônico, Butc – Ácido butírico, Ival – Ácido Isovalérico, Capr – Ácido capróico.

Figura 14 – Distribuição de ácidos orgânicos voláteis no período de inoculação

5.2 – Remoção de matéria orgânica

Após a fase de inoculação o reator foi operado em circuito aberto, no qual a duração das fases operacionais foi determinada de acordo com a estabilidade de remoção de matéria orgânica (DQO). O período para cada fase foi de 40, 93, 89, 68, 91 e 73 dias, para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III, IV e V, respectivamente.

Na Fase de Adaptação a alimentação consistiu apenas de substrato sintético, com $599,8 \pm 70$ mg/L de DQO afluente. Nas demais fases operacionais foi adicionado surfactante não iônico (AE – GENAPOL[®] C-100) na formulação do substrato sintético.

Para os demais períodos observou-se $623,3 \pm 64,8$ mg/L; 735 ± 87 mg/L; 697 ± 27 mg/L; $845,1 \pm 87$ mg/L e $882,3 \pm 126$ mg/L de DQO, para a Fase I, II, III, IV e V, respectivamente. Assim, o aumento da concentração de matéria orgânica ao longo das fases operacionais é justificado devido ao acréscimo de surfactante ao substrato sintético (Figura 15). O aumento e a elevada variação deste parâmetro ocorreu devido à constituição do substrato sintético, fato observado também por Carosia (2011). Nesse último caso, o reator de leito fluidificado era alimentado com substrato sintético acrescido de detergente em pó como fonte de surfactante, cujos valores de DQO afluente foram de 232 ± 21 mg/L a 869 ± 63 mg/L.

Figura 15 – Variação temporal de DQO filtrada afluente (afl), efluente (efl) e eficiência de remoção

Em relação a DQO efluente observou-se ao longo das fases operacionais 90 ± 42 mg/L; 89 ± 48 mg/L; $49,7 \pm 18$ mg/L; $64,8 \pm 27$ mg/L; 114 ± 46 mg/L e $144,6 \pm 92$ mg/L, para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III, IV e V, respectivamente. Os menores valores observados foram referentes a Fase II, portanto, observando assim a adaptação da biomassa ao surfactante introduzido ao substrato sintético (Figura 15). A eficiência de remoção de matéria orgânica observada foi de $85 \pm 7\%$; $86 \pm 7\%$, $93 \pm 2\%$, $91 \pm 4\%$, $86 \pm 5\%$ e $83 \pm 11\%$ para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III, IV e V, respectivamente (Figura 15). Assim, obteve-se eficiência média ao longo da operação do reator superior a 85%.

Oliveira et al. (2010) avaliou a remoção de LAS em reator anaeróbico de leito fluidificado e obteve eficiência próxima a encontrada neste estudo, ou seja, de 88% a 91% de remoção de matéria orgânica para 632 mg/L de DQO afluente e 8 mg/L a 46 mg/L de LAS. Carosia (2011) e Ferreira (2012) empregaram a mesma configuração de reator e obtiveram eficiência máxima de 86% e 85% para remoção de matéria orgânica afluente com 607 ± 60 mg/L e 615 ± 99 mg/L de DQO, acrescido de $14,4 \pm 3,5$ mg/L e 6,8 mg/L de LAS em sabão em pó, respectivamente.

Entretanto, Ferreira (2012), que utilizou sabão em pó como fonte de LAS na última etapa de operação do reator de leito fluidificado com sacarose como co-substrato verificou decréscimo da eficiência de remoção de matéria orgânica quando aumentou a concentração de

LAS de $6,8 \pm 2$ mg/L para 16,4 mg/L. A eficiência reduziu de 85% para 77% para 582 mg/L de DQO afluente.

Verificou-se que ao longo das etapas de operação do reator ocorreu aumento da carga orgânica volumétrica (COV) aplicada devido ao aumento nos valores de DQO afluente (Figura 16). Houve elevada variação deste parâmetro ao longo das etapas operacionais. Obteve-se COV de $802,2 \pm 94$ mgDQO/L.d; $833,9 \pm 86$ mgDQO/L.d, $990,8 \pm 112$ mgDQO/L.d; $932,4 \pm 91$ mgDQO/L.d; 1.120 ± 116 mgDQO/L.d e 1.180 ± 169 mgDQO/L.d para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III, IV e V, respectivamente.

Figura 16 – Carga orgânica volumétrica (COV) aplicada ao reator

Notou-se que o co-substrato influenciou em menor proporção em relação ao acréscimo de surfactante durante as fases operacionais, principalmente, quando se comparou a Fase IV (com sacarose) e Fase V (sem sacarose). Desse modo, verificou-se que a presença de sacarose no substrato sintético não influenciou significativamente a carga orgânica aplicada ao reator.

Já o acréscimo do surfactante no substrato sintético, neste estudo, influenciou na carga orgânica, principalmente, nas Fases II, III, IV e V cujas concentrações de AE foram de 22,5 mg/L; 51,4 mg/L; 107,4 mg/L e 97,9 mg/L (Figura 17).

Observou-se DQO de $40,4 \pm 5$ mg/L; $57,1 \pm 0,8$ mg/L; $101,9 \pm 0,1$ mg/L e $281,4 \pm 7$ mg/L (concentração para as duas ultimas fases) para as Fases I, II, III, IV e V, respectivamente. Desse modo, a contribuição foi de 6,6%, 7,9%, 14,2% e 37,1% a DQO afluente em cada fase de operação do reator.

Figura 17 – Relação entre concentração de AE e DQO

Verificou-se com este estudo que o reator foi capaz de suportar carga orgânica próxima a $1.000 \text{ mgDQO/L.d}^{-1}$, sem alterar sua estabilidade. Mesmo com o aumento gradativo de matéria orgânica afluyente ao reator, observou-se eficiência de remoção de DQO superior a 85%.

Portanto, sob as condições experimentais impostas e TDH de 18 horas verificou-se remoção de matéria orgânica na presença do AE, fato também comprovado por Carosia (2011), Ferreira (2012) e Oliveira (2010), em estudos relacionados ao surfactante aniônico alquil benzeno linear sulfonado (LAS).

5.3 – Remoção de álcool etoxilado

Em relação ao álcool etoxilado (AE) afluyente, adicionou-se $4,7 \pm 2,2 \text{ mg/L}$; $22,5 \pm 8,4 \text{ mg/L}$; $51,4 \pm 21,3 \text{ mg/L}$; $107,4 \pm 47,3 \text{ mg/L}$ e $97,9 \pm 37,7 \text{ mg/L}$, para as Fases I, II, III, IV e V, respectivamente (Tabela 20).

Em relação ao efluente observou-se $0,1 \pm 0,01 \text{ mg/L}$; $0,3 \pm 0,48 \text{ mg/L}$; $0,1 \pm 0,3 \text{ mg/L}$; $2,6 \pm 3,5 \text{ mg/L}$ e $0,01 \pm 0,003 \text{ mg/L}$ para as Fases I, II, III, IV e V, e eficiência de remoção de 98%; 98%; 99%; 97% e 99%, respectivamente (Tabela 20). Portanto, obteve-se valores acima de 97 % de eficiência de remoção do AE em todas as fases operacionais.

Tabela 20 – Concentração afluenta e efluente de AE no reator anaeróbio de leito fluidificado

Fases de Operação	AE (mg/L)		Eficiência (%)
	Afluente	Efluente	
Fase I	4,7±2,2	0,1±0,01	98
Fase II	22,5±8,4	0,3±0,4	98
Fase III	51,4±21,3	0,1±0,3	99
Fase IV	107,4±47,3	2,6±3,5	97
Fase V	97,9±37,7	0,01±0,003	99

Valores de eficiência de remoção próximos aos encontrados neste estudo foram verificados por Lizotte Jr. et al. (1999). Entretanto, estes autores trabalharam com testes toxicológicos em embriões de peixe em mesocosmos com 1 mg/L a 10 mg/L de álcool etoxilado com 9 a 15 cadeias de carbono e 6 a 7 grupos etoxilados. Os autores verificaram 89% a 99% de remoção de AE, com três comprimentos de cadeias diferentes (C_{9-11} EO₆, C_{12-13} EO_{6,5}, e C_{14-15} EO₇) em 28 dias de incubação.

Segundo Talmage (1994), os álcoois etoxilados de cadeias não ramificadas (lineares) são rapidamente biodegradados e variações das taxas de remoção, em 3 dias, podem chegar de 99% a 100% de remoção, para compostos com cadeias de carbono entre 9 e 15 e com grau de etoxilação entre 6 e 7, em processos de lodos ativados. Federle e Itrich (2006) contradizem estes dados, ou seja, segundo esses autores há pouco conhecimento sobre as faixas reais de biodegradação para diferentes comprimentos de cadeias de alcoóis etoxilados.

Mezzanotte et al. (2002) observaram que a biodegradabilidade de AE de cadeia não ramificada (linear) é maior de acordo com a afinidade do surfactante com a água, bem como, depende também do número de átomos de carbono da cadeia alquil e da massa molecular total do surfactante.

Wagener (1987) avaliaram a remoção de AE (Brij 35) em reator de leito fixo preenchido com “*sinter-glass*” e inoclado com lodo anóxico. Os autores observaram elevada eficiência de remoção de surfactante não iônico. Estes autores adicionaram 1 g/L de surfactante ao reator, e após 45 dias de operação em batelada, iniciou-se a operação de forma contínua. Foi observado que após 68 dias de operação a concentração efluente foi de 1 mg/L, obtendo-se 99,9% de remoção do surfactante.

Huber, Meyer e Rys, (2000) realizaram ensaios de degradação anaeróbia de alcoóis etoxilados em reatores em batelada. Os autores comprovaram degradação maior que 99% de

AE (dodecanol octaetoximero) para 5 mg/L e 40 mg/L do surfactante após 22 e 50 dias, respectivamente.

Observou-se neste estudo com álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE – GENAPOL® C-100) em reator anaeróbio de leito fluidificado que a biomassa adaptou-se a degradação deste composto, cuja remoção foi superior a 98%. Outro aspecto importante refere-se a utilização da sacarose como co-substrato, a qual não afetou negativamente a remoção deste surfactante. A ausência deste co-substrato no meio favoreceu a remoção de AE, por conseguinte, maior eficiência de remoção desse composto foi observada na Fase V (sem sacarose). Destaca-se também, que o aumento da concentração de surfactante no meio reacional não afetou a remoção da matéria orgânica ao longo das fases operacionais.

A adaptação da biomassa também foi observada por Mezzanotte et al. (2002). Os autores avaliaram a degradação de dois AE (Dehydol LT7 e LS2 com 8 a 14 carbonos e 2 a 7 grupos etoxilados, respectivamente) em reatores operados em bateladas sequenciais, com 2,0 g/L em dose única e, posteriormente, adição de 0,2 g/L.d⁻¹ para ambos os surfactantes, durante 9 dias. Nesse caso, foi utilizado etanol para solubilizar o surfactante e o meio foi suplementado com soro de leite em pó como co-substrato. Em relação ao reator com LS2, os autores verificaram eficiência de 86% de remoção da matéria orgânica no final da operação, sendo atribuído a este fato a adaptação da biomassa ao composto, ao contrário do que ocorreu com o surfactante LT7, que foi consumido prontamente a medida que este era adicionado ao reator.

Outro fato importante observado neste estudo refere-se a ausência de sacarose na última fase operacional (Fase V). Provavelmente, na ausência da sacarose, os microrganismos utilizaram o AE, por conseguinte, verificou-se maior eficiência de remoção do mesmo. Tal possibilidade está relacionada também as características hidrodinâmicas do reator anaeróbio de leito fluidificado, ou seja, maior transferência de massa e diluição do tóxico devido a recirculação afluente. Desse modo, essa configuração reacional é opção excelente para remoção do surfactante AE.

A alimentação contínua e o elevado tempo de detenção hidráulica, aliados a recirculação do sistema, foram favoráveis a degradação anaeróbia para maior concentração do tensoativo. O sistema de mistura homogênea proporciona maior disponibilidade do substrato sintético contendo AE, quando comparado ao sistema pistonado. Além disso, a alimentação contínua não aplica de uma só vez grandes cargas do composto a biomassa aderida ao material suporte.

5.4 – Balanço de massa

O processo de adsorção dos surfactante é um importante mecanismo que influencia e afeta o comportamento destes no meio aquático e terrestre. Por meio dessa adsorção na biomassa, os surfactantes podem se manter nestes ambientes por longos períodos (WOLF; FEIJTEL, 1998). Correlação negativa entre o coeficiente de adsorção, taxa de biodegradação e extensão total da mineralização, foi reportada por Knaebel et al. (1996). Os autores verificaram que grande afinidade do contaminante a matriz ambiental conduz a baixas taxas de biodisponibilidade para a degradação.

O processo de adsorção de surfactantes a biomassa parece ser fortemente decisivo para o entendimento do fenômeno da biodegradação anaeróbia. Esta etapa parece ser altamente influenciada pela composição da biomassa e da hidrofobicidade das molécula dos tensoativos, considerando-se os diferentes isômeros e homólogos do LAS (HAND; WILLIAMS, 1987).

No caso de AE a adsorção no solo, sedimento e em menor extensão na biomassa de sistemas de lodos ativados, depende das propriedades dos homólogo alcoóis etoxilados, do número de cadeias carbônicas da porção alquílicas bem como as interações químicas e físicas do material ao qual é adsorvida (HUMAN & ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, 2009).

O balanço de massa do surfactante não iônico AE (GENAPOL[®] C-100) no reator foi calculado usando as concentrações médias da vazão média afluyente e efluente do reator. Verificou-se que após 492 dias de operação foram adicionados 24,19 g de AE, sendo que 0,36 g foram observados no efluente, obtendo assim remoção de 98% no sistema (Tabela 21 e Figura 18).

Tabela 21 – Balanço de massa para AE durante a operação do reator

Afluente (g)	Efluente (g)	Remoção da fase líquida (%)
24,19	0,36	98,5

Aproximadamente 2,5 mg (1,5%) do AE foi detectado no material suporte (areia), no biofilme presente na areia, separador de fases e na parede do reator, os quais indicaram baixa adsorção do surfactante no material suporte e biofilme do reator de leito fluidificado.

A porcentagem de AE adsorvido indica que este surfactante tem baixa afinidade pela areia, na qual foi encontrado 0,39 mg do surfactante não iônico. Na biomassa presente no distribuidor, separador de fases e ao longo da parede do reator foram encontradas as massas de 0,43 mg, 0,47 mg e 0,77 mg de AE adsorvido, respectivamente. Os valores de adsorção de AE no lodo, sólidos voláteis totais, areia e o percentual de adsorção podem ser observados na Tabela 22.

Figura 18 – Proporção da adsorção de AE no reator de leito fluidificado

Tabela 22 – Distribuição de AE no reator de leito fluidificado

Reator	Sólidos (g)	AE (mg)
Distribuidor	5,05	0,43
Separador de fases	36,8	0,47
Parede	2,8	0,77
Material suporte (Areia)	306	0,39
Total adsorvido no reator (mg)		2,05
Removido por adsorção (%)		0,008
Removido por degradação da fase líquida (%)		98,49

O valor de degradação biológica do AE foi bem superior aqueles observados por Carosia (2011), Ferreira (2012) e Oliveira (2010), para surfactante aniônico (LAS).

Carosia (2011) e Ferreira (2012) alimentaram o reator anaeróbio de leito fluidificado (TDH 18h) com sabão comercial como fonte de LAS. Esses autores verificaram degradação de 42% e 30%, respectivamente. Em relação ao LAS adsorvido, os autores, verificaram 6% e 9%, respectivamente para 14,4 mg/L e 12,5 mg/L de LAS. Oliveira (2010) observou 93% de degradação de surfactante aniônico (LAS padrão Sigma) após 283 dias de operação em reator de leito fluidificado com TDH de 18 horas e 8 mg/L a 43 mg/L afluyente.

Verificou-se, portanto, que a degradação e adsorção de LAS nos estudos de Carosia (2011) e Ferreira (2012) foram semelhantes devido a adição de sabão em pó comercial, o qual contém compostos como, coadjuvantes, enzimas, branqueadores ópticos, cargas e corantes. Tanto neste estudo quanto no realizado por Oliveira (2010) a fonte de surfactante, embora, distinta era proveniente de composto padrão, sem os demais compostos os quais podem interferir na degradação.

Jimenez et al. (1991), citam que quando existem substratos complexos como o extrato de levedura pode se obter o favorecimento da formação de consórcios microbianos mais diversos, o que auxilia na degradação de surfactantes, além de fornecer os nutrientes (micronutrientes, aminoácidos e vitaminas) necessários para manter a atividade de degradação destes compostos e crescimento das arqueas metanogênicas e bactérias anaeróbicas (ABBOUD; KHLEIFAT; BATARSEH, 2007; KHLEIFAT, 2006).

5.5 – pH

Observou-se pH afluente de $7,47 \pm 0,45$; $7,21 \pm 0,31$; $7,05 \pm 0,18$; $7,07 \pm 0,19$; $6,9 \pm 0,15$ e $7,26 \pm 0,18$ para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III, IV e V, respectivamente. Em relação ao pH efluente observou-se $8,08 \pm 0,14$; $8,08 \pm 0,17$; $8,11 \pm 0,09$; $7,93 \pm 0,19$; $7,92 \pm 0,15$ e $7,9 \pm 0,25$, respectivamente (Figura 19). Destaca-se que a adição do AE não alterou o pH do sistema, fato que pode ser atribuído ao surfactante ser um composto não iônico.

Figura 19 – Valores de pH afluente e efluente ao longo da operação do reator

Os valores de pH obtidos neste trabalho foram próximos aos encontrados por Oliveira (2010), cujos valores médios foram de 7,4 e 8,1 para afluente e efluente, respectivamente, em reator anaeróbico de leito fluidificado usado na remoção de LAS. Esta estabilidade pode ter ocorrido devido ao alto fator de diluição na alimentação do reator de leito fluidificado, o qual ameniza os choques de pH e diminui a carga orgânica afluente, fato também observado por Carosia (2011) na remoção de LAS de água residuária contendo sabão em pó.

Segundo Hidalgo e García-Encina (2002) quando os valores de pH estão inferiores a 6, os microrganismos permanecem aderidos ao material suporte, devido ao fato que os ácidos graxos não estão ionizados. Nestas condições estes ácidos são capazes de penetrar no biofilme chegando às camadas mais internas, o que provoca inativação da biomassa, demorando mais tempo para recuperação das atividades metabólicas dos microrganismos. Entretanto, quando o pH é maior que 8,5, os ácidos graxos estão dissociados em seus íons, e devido à sua carga e a

possíveis interações eletrostáticas, a passagem destes íons através do biofilme é impedida, o que afeta apenas a aderência da camada externa do biofilme eliminando assim parte dos microrganismos do sistema. Neste estudo, foi observada pouca variação de pH (6,9 a 8,1).

A ausência de co-substrato (sacarose) na composição do substrato sintético não alterou significativamente o valor de pH afluente. Este fato foi comprovado pelos valores de pH efluente, os quais foram similares para as fases IV e V. Especificamente, em relação a presença e ausência de co-substrato (sacarose) na remoção de surfactantes não iônico (AE) não foi verificada alteração significativa em relação a esse parâmetro.

Ferreira (2012) estudou a influência de co-substratos na remoção de surfactante aniônico (LAS), oriundo de sabão em pó de uso doméstico, em reator anaeróbio de leito fluidificado. Esse autor observou pH de $7,7 \pm 0,39$ e $7,5 \pm 0,21$ para afluente e efluente, respectivamente, quando utilizou sacarose como único co-substrato. Desse modo, mesmo com a presença de sacarose no substrato sintético os valores de pH observado pelo referido autor foi próximo a neutralidade.

5.6 – Alcalinidade

Os valores da alcalinidade parcial, total e intermediária, tanto do afluente como efluente tiveram pouca variação ao longo das fases de operação até a Fase IV quando havia a presença de sacarose na composição do substrato sintético. Os valores médios da alcalinidade parcial, total e intermediária podem ser verificados na Tabela 23.

Tabela 23 – Alcalinidade parcial, total e intermediária

	Alcalinidade Afluente (mgCaCO ₃ /L)			Alcalinidade Efluente (mgCaCO ₃ /L)		
	Parcial	Total	Intermediária	Parcial	Total	Intermediária
Adaptação	191,3±38	278,7±37	87,3±15	276,6±27	358,8±36	82,1±13
Fase I	193,2±30	292,9±30	99,7±19	299,6±28	386,5±36	86,9±12
Fase II	171,2±16	274,3±16	103,1±11	289,3±22	267,8±24	78,5±6
Fase III	173±20	273,3±15	100,3±12,9	289,2±18	379,2±22	90±10
Fase IV	175,9±28	300,2±41	124,4±22	272±31	362±41	90±13
Fase V	201,4±32	310±33	228±101	267±32	373±44	266±137

As variações entre as séries de alcalinidade podem ser melhor visualizadas na Figura 20 e Figura 21. Na Fase V, quando a sacarose foi removida do meio houve a elevação dos valores da alcalinidade intermediária, tanto do afluente, quando do efluente. Este fato possivelmente ocorreu devido a fermentação da sacarose em ácidos orgânicos voláteis na fase de adaptação, Fase I, II, III e IV, consumindo assim a alcalinidade do meio. Na Fase V não foi adicionada sacarose. Nessa fase, observou-se valores de alcalinidade e, principalmente, alcalinidade intermediária maiores, quando comparado com as fases anteriores. Desse modo, a ausência de co-substrato (Fase V) não alterou o tamponamento do sistema em relação à alcalinidade total média afluente e efluente.

Além disso, outro fator importante que deve ser mencionado refere-se a recirculação do efluente do reator, provavelmente, contribuindo para o tamponamento do sistema e amenizando as cargas de ácidos orgânicos, sendo assim verificada pouca variação dos valores da alcalinidade efluente parcial, total e intermediária.

Figura 20 – Blotpot das series de alcalinidade total, parcial e intermediária afluente e efluente

Figura 21 – Variação da Alcalinidade total, parcial e intermediária afluente e efluente ao longo do tempo de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado

Oliveira (2010), avaliou a remoção de surfactante aniônico (LAS) em reator anaeróbio de leito fluidificado observou 154 mgCaCO_3/L e 164 mgCaCO_3/L para alcalinidade total média efluente; ou seja, valores inferiores aos observados neste estudo. Costa et al. (2007), verificou para água residuária de lavanderia comercial alcalinidade total média afluente e efluente de 259 ± 74 mgCaCO_3/L e 251 ± 74 mgCaCO_3/L , respectivamente. Em ambos os trabalhos citados houve consumo de alcalinidade, diferentemente do observado neste estudo, principalmente, em relação a Fase V (sem co-substrato). Destaca-se também que nos dois primeiros estudos foi avaliada a remoção de surfactante aniônico (LAS), enquanto, neste estudo avaliou-se o surfactante não iônico (AE).

A alta estabilidade do reator relacionada à alcalinidade pode ser atribuída ao tamponamento referente a relação carbonato/bicarbonato, a qual protege o reator contra possível acidificação (FERNANDEZ et al., 2008). Este equilíbrio de tamponamento é favorecido também pela alta recirculação do efluente do reator, o qual favorece maior transferência de massa entre a região do separador de fases e o meio líquido.

5.7 – Relação AI/AP

A determinação da alcalinidade em dois estágios tem importante aspecto, no que se refere à relação AI/AP (Alcalinidade Intermediária/Alcalinidade Parcial). Segundo Ripley, Boyle e Converse (1986), valores superiores a 0,3 estão relacionados a ocorrência de distúrbios no processo de digestão anaeróbia. Todavia, Chernicharo (2007), Foresti (1994) e Rodrigues (2008) afirmam que, devido às particularidades de cada efluente, relação AI/AP superior a 0,3 podem não prejudicar o desempenho do sistema.

Verificou-se valores entre 0,19 a 1,81 para relação AI/AP afluente, em todas as fases. Os valores médios afluente foram de $0,48 \pm 0,16$; $0,54 \pm 0,17$; $0,61 \pm 0,10$; $0,59 \pm 0,14$; $0,72 \pm 0,16$ e $1,16 \pm 0,51$ para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III, IV e V, respectivamente. Contudo, verificou-se a relação AI/AP efluente mais constante ao longo da operação, cujos valores médios foram de $0,30 \pm 0,04$; $0,29 \pm 0,04$; $0,27 \pm 0,03$; $0,31 \pm 0,04$; $0,33 \pm 0,04$ e $0,99 \pm 0,49$, respectivamente (Figura 22).

Figura 22 – Valores de AI/AP afluente e efluente ao longo da operação do reator

Observou-se valores de 1,16 e 0,99 para AI/AP afluyente e efluente na Fase V; ou seja, valores relativamente altos quando comparados as demais etapas anteriores. Observou-se 0,60 e 0,27 para afluyente e efluente, respectivamente para as fases anteriores com a presença de sacarose. Notou-se que mesmo os valores sendo relativamente elevados, não foram constatados instabilidade reacional no sistema, para a remoção de matéria orgânica e AE. Provavelmente, a estabilidade foi devida a elevada variação verificada para alcalinidade intermediária, proporcionando assim aumento da relação AI/AP (Figura 23).

Figura 23 – Diferença dos valores médios de AI/AP afluyente e efluente

5.8 – Ácidos orgânicos voláteis

O monitoramento da concentração de ácidos orgânicos voláteis (AOV) é útil na verificação da estabilidade de degradação em reatores anaeróbios (AHRING; SANDBERG; ANGELIDAKI, 1995). Segundo Speece (1996) o processo de degradação anaeróbia é complexo, e há a formação de diversos produtos metabólicos intermediários que devem ser mantidos em equilíbrio dinâmico para evitar comprometimento do sistema.

A instabilidade do processo anaeróbio ocorre quando a velocidade de produção de ácidos for maior que seu consumo, acarretando diminuição do pH e inibição das atividades das arqueas metanogênicas que são mais sensíveis às mudanças nas condições ambientais (SPEECE, 1996).

A variação dos AOV totais foi obtida pela soma de todos os ácidos orgânicos gerados durante cada etapa experimental, assim a produção de ácidos orgânicos foi relativamente baixa quando comparada com outros processos anaeróbios. Observou-se valores de AOV totais de $153,3 \pm 35,8$ mg/L; $405,7$ mg/L; $154,9 \pm 155,7$ mg/L; $21,7 \pm 21,13$ mg/L; $19,5 \pm 4,2$ mg/L; $82 \pm 51,5$ mg/L e $90 \pm 86,1$ mg/L para as Fase de Inoculação, Fase de Adaptação, Fase I, II, III, IV e V, respectivamente. Estes valores foram próximos aos encontrados por Carosia (2011), ou seja, 20 mg/L e 230 mg/L de ácidos orgânicos. Os valores de AOV totais observados neste trabalho, tanto na Fase IV (com sacarose), quanto na Fase V (sem sacarose) foram superiores aqueles observados por Ferreira (2012), na última etapa de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado usado na remoção de LAS oriundo de sabão em pó com sacarose; ou seja de 15 mg/L. A discriminação dos valores dos ácidos orgânicos voláteis estão descritos na Tabela 24.

Tabela 24 – Ácidos orgânicos em cada fase de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado

Ácidos Orgânicos	Fases de Operação					
	Adaptação	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
	mg/L					
Cítrico	≤ LD	1,8	3,2	≤ LD	1,4	0,4
Málico	4,0	9,0	≤ LD	≤ LD	6,2	3,7
Succínico	12,8	1,1	0,8	0,1	8,1	22,5
Lático	4,5	0,1	≤ LD	≤ LD	2,0	2,6
Fórmico	≤ LD	2,8	≤ LD	≤ LD	4,6	1,5
Acético	11,4	6,4	≤ LD	≤ LD	5,5	4,2
Propiônico	14,8	8,8	≤ LD	0,1	13,6	7,3
Isobutírico	5,0	3,9	≤ LD	≤ LD	17,5	16
Butírico	15,5	3,9	0,8	2,1	1,8	3,2
Isovalérico	13,1	37,9	0,3	0,1	0,8	5,4
Valérico	≤ LD	10,1	0,2	≤ LD	≤ LD	0,5
Capróico	130,1	10,4	7,3	6,9	≤ LD	≤ LD

* LD – Limite de detecção

Observou-se na Fase de Inoculação e Adaptação grande variedade de AOV com maior predominância do ácido capróico, principalmente, nesta última fase citada. Na Fase I observou-se que a maior produção de AOV foi relativa ao ácido isovalérico, referente a 44%

da produção total de ácidos nesta fase, seguido de 12% de ácido capróico. Entretanto, na Fase II e III notou-se aumento da produção de ácido capróico de 58% para 75%, respectivamente.

Na Fase IV e V, houve produção de ácido foi mais diversa, com maior homogeneidade entre os AOV. Verificou-se maiores valores de ácido isobutírico e propiônico para a Fase IV e Fase V (Figura 24). Provavelmente, o aumento da concentração do surfactante AE interferiu no metabolismo microbiano do reator anaeróbio.

Figura 24 – Distribuição dos ácidos orgânicos em cada fase operacional

Verificou-se na ausência de co-substrato (sacarose) para a Fase V, $90 \pm 86,1$ mg/L de ácidos orgânicos efluente, em relação a Fase IV (com sacarose); ou seja, $82 \pm 51,5$ mg/L.

O reflexo desta produção de ácidos orgânicos na Fase V alterou apenas a alcalinidade intermediária, a qual foi estritamente relacionada ao produção de ácidos orgânicos voláteis. A variedade da distribuição de ácidos nas últimas etapas de operação (Fase IV e Fase V) evidencia o melhor aproveitamento dos substratos do meio, assim como, ocorreu na Fase I, na qual os microrganismos ainda não estavam adaptados ao surfactante não iônico.

Provavelmente, devido a mistura completa e maior transferência de massa no reator anaeróbio de leito fluidificado observou-se neste estudo baixa concentração de ácidos orgânicos voláteis. As velocidades de utilização dos substratos, tanto da matéria orgânica,

quanto dos subprodutos gerados (AOV), estão relacionadas à intensidade de mistura do reator (HIDALGO; GARCIA-ENCINA, 2002; SANCINETT et al., 2012).

Wagener (1987) avaliaram a degradação de 1 g/L de surfactante não iônico (Brij 35) em reator anaeróbio de leito fixo. Os autores verificaram 702 mg/L de ácido acético entre 45 e 68 dias de operação. Após 70 dias de operação este valor foi reduzido para 342 mg/L (5,7 mM) e, em seguida, para 132 mg/L (2,2 mM). Quando os autores alteraram a forma de adição do surfactante ao reator, ou seja, somente 100 mg/L, não foi detectada a presença de surfactante após 8 dias de operação, entretanto a concentração de ácido acético observada foi de 46,8 mg/L (0,78 mM) para 4,2 mg/L (0,07 mM) depois de 14 dias de operação.

Wagener e Schink (1988) verificaram na degradação de 1 g/L de surfactantes não iônicos (Bjir 30, 35, 58) em reatores em batelada a presença de ácido palmítico, após 11 semanas de operação. Ácido láctico, caprótico e palmítico foram convertidos em ácido acético após 6 semanas de operação. Na degradação anaeróbia os ácidos propiônico, acético e butírico são produzidos primeiramente a partir de compostos com cadeias alquílicas longas (GACIA-ENCINA et al., 2005; GHOSH; OMBREGT; PIPYN, 1985).

5.9 – Sólidos

Observou-se que grande parte dos sólidos efluente foi relacionado aos sólidos totais voláteis, portanto, compostos de microrganismos desprendidos, tanto do leito de areia, quanto do separador de fases (Tabela 25).

Verificou-se que, tanto os valores de sólidos totais, quanto de sólidos totais voláteis efluente diminuíram na Fase II, entretanto, com aumento na Fase IV e Fase V (Figura 25).

Observou-se $0,114 \pm 0,05$ g/L; $0,118 \pm 0,04$ g/L para sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) no efluente da Fase V, respectivamente. Na Fase IV observou-se valores inferiores, ou seja, $0,04 \pm 0,019$ g/L, $0,04 \pm 0,019$ g/L, respectivamente.

Notou-se que a concentração de sólidos totais voláteis foi superior, em ambas, as etapas de operação. Provavelmente, a ausência do co-substrato (sacarose) pode ter dificultado a adesão de biomassa, por conseguinte, desprendido aumentando os valores de sólidos efluente. Carosia (2011) e Ferreira (2012) verificaram $0,052 \pm 0,02$ g/L e $0,069 \pm 0,045$ g/L para os ST e $0,050 \pm 0,021$ g/L e $0,055 \pm 0,02$ g/L para STV, respectivamente, valores próximos aos encontrados na Fase IV (com sacarose) deste estudo.

Tabela 25 – Série de sólidos nas fases de operação do reator anaeróbio de leito fluidificado

Fases de Operação	Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis Efluente (g/L)	
	ST	STV
Adaptação	0,053±0,03	0,05±0,02
Fase I	0,031±0,01	0,03±0,01
Fase II	0,014±0,007	0,02±0,007
Fase III	0,015±0,009	0,017±0,014
Fase IV	0,04±0,019	0,04±0,019
Fase V	0,114±0,05	0,118±0,04

ST – Sólidos Totais, SVT – Sólidos Totais Voláteis

Figura 25 – Valores de sólidos ao longo da operação do reator anaeróbio de leito fluidificado

5.10 – Avaliação do potencial redox

O ensaio de anaerobiose do reator foi realizado no início da Fase I. Algumas horas após a adição de resazurina na alimentação (substrato sintético afluyente) do reator a coloração

do frasco permaneceu azulada. Este fato deve-se a presença do oxigênio dissolvido no meio líquido, mesmo após manutenção sob fluxo de nitrogênio (N₂, 100%) por aproximadamente 20 minutos.

Após a injeção de resazurina na porção inferior do reator (afluente) observou-se tonalidade rósea (ambiente microaerófilo). Sob tais condições o potencial redox está entre -200 e +200mV (GUSMÃO, 2005). No entanto, na região do leito de areia com biofilme observou-se que a resazurina tornou-se transparente, provavelmente, em potencial -300 mV (GUSMÃO, 2005).

No biofilme (condição de anaerobiose estrita), separador de fases e no distribuidor do reator (condição de microaerofilia) foi possível observar microrganismos como arqueas metanogênicas, dentre outros, na forma de bacilos, espiroquetas, víbrios etc.

As arqueas metanogênicas são anaeróbias estritas, todavia, estes microrganismos se mantiveram em condição intermediária de potencial redox. É importante destacar que tais células usam compostos finais da degradação anaeróbia, ou seja, H₂/CO₂, acetato, formiato, metanol, entre outros (GRAHAM; WHITE, 2002).

A constatação de consórcio anaeróbio representado por bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas foi avaliada pela técnica de tubos múltiplos, NMP, cuja realização foi efetuada em condições de anaerobiose estrita.

A região superior do reator (separador de fases) não foi vedada, portanto, ocorreu a formação de ambiente microaerófilo, proporcionando o desenvolvimento de microbiota diferenciada (Figura 26).

Figura 26 – (A) Parte superior do leito de areia; (B) Porção superior do reator – separador de fases; (C) Porção inferior do reator – distribuidor

5.11 – Exames Microscópicos

5.11.1 – Microscopia de contraste de fase

Ao final da Fase V de operação do reator foram retiradas amostras de biomassa da areia, distribuído e separador de fases do reator para a realização de exames microscópicos de contraste de fase com a finalidade de se verificar a diversidade morfológica dos microrganismos.

No biofilme da areia foi observada a predominância de bacilos, endósporos, e filamentos (Figura 27).

Figura 27 – Microscopia de contraste de fase dos microrganismos observados na areia do reator ao final da operação: (A) bacilos e (B) endósporos

No biofilme do separador de fases foi observada a predominância de bacilos (Figura 28).

Figura 28 – Microscopia de contraste de fase dos microrganismos observados no separador de fase do reator ao final da operação: (A e B) bacilos; (C) Tecameba

Nas amostras do biofilme do distribuidor foi observado elevado acúmulo de microrganismos. Este fato pode ter sido ocasionado devido à elevada concentração de substrato afluente. O surgimento da matriz gelatinosa nesta região do reator serviu de suporte para a fixação e colonização de microrganismos, sendo assim, observada a predominância de endósporos, hifas de fungos, filamentos, dentre outros aglomerados celulares (Figura 29). A matriz gelatinosa dificultou as análises em microscopia de contraste de fase.

Figura 29 – Microscopia de contraste de fase dos microrganismos observados no distribuidor do reator ao final da operação: (A) aglomerados celulares imersos em exopolímeros; (B e E)

filamentos; (C) Tecameba; (D) endósporos; (E) sarcinas

Portanto, grupos diferentes de microrganismos foram favorecidos pelas condições encontradas em cada região do reator associadas as suas capacidades fisiológicas favorecendo a remoção de AE. A degradação de surfactante não iônico (AE) ocorreu por meio de consórcios microbianos e foi facilitada pela configuração do reator de leito fluidificado, no qual diferentes micro ambientes foram estabelecidos em função das condições de operação.

5.11.2 – Microscopia eletrônica de varredura

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada na Fase V, foi possível observar biofilme estabelecido na areia, bem como, formações celulares em cada região do reator. Pôde-se constatar elevada densidade de células microbianas e camada de exopolímero cobrindo o suporte, além de ampla diversidade de morfologias.

Na areia foram observadas predominância de bacilos de diversos tamanhos. Observou-se também a superfície de fixação promovida pelo material suporte (areia), cujas microvilosidades foram realizadas pelo tratamento com ácido fluorídrico, possibilitando assim maior superfície de contato para os microrganismos e formação do biofilme (Figura 30).

Figura 30 – Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos observados na areia do reator ao final da operação: (A) bacilos e cocobacilos (aumento 5000X); (B) aglomerados celulares ao material suporte (aumento de 1000X); (C) Adesão de bacilos ao material suporte (aumento 5000X)

No separador de fases foram observados aglomerados celulares, cujas morfologias se assemelharam a bacilos e filamentos (Figura 31). Notou-se a presença de materiais inertes, bem como, exopolímeros os quais são utilizados como material suporte para células.

Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos observados no separador de fases do reator ao final da operação: (A) bacilos, cocobacilos, cocos e exopolímeros; (B) bacilos; (C 1) filamentos semelhantes a *Methanosaeta*; (C 2) material inerte (aumento 5000X)

Na biomassa do leito do reator foram observados bacilos, víbrios e cocos (Figura 32).

Figura 32 – Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos observados na biomassa do leito do reator ao final da operação: (A) víbrios, (B 1) bacilos (B 2) cocos (aumento 5000X)

No distribuidor notou-se maior diversidade morfológica e maior densidade de microrganismos. Foram observadas células com morfologias semelhantes a espiroquetas, bacilos, filamentos e sarcinas (Figura 33).

Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos observados no distribuidor do reator ao final da operação: (A) filamentos, cocos e bacilos; (B) espiroquetas; (C) bacilos e espiroquetas; (D) bacilos, filamentos, espiroquetas e; (aumento 5000X), (E) bacilos (aumento 2000X), (F) sarcinas e bacilos (aumento 5000X)

Segundo Miqueleto et al., (2010) a produção de exopolímeros em sistemas anaeróbios está relacionada a diversos fatores, tais como, fonte de carbono, altas relações

carbono/nitrogênio (C:N), condições microaerófilas, entre outras. Este fato foi evidenciado na porção superior do reator (separador de fases), na qual há um regime hidráulico com menor turbulência, a qual favoreceu a manutenção de outras populações de microrganismo, bem como, a troca gasosa entre a fase líquida e a atmosfera.

Segundo Costerton et al. (1995), esses biofilmes são sistemas heterogêneos, nos quais as células bacterianas são inseridas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, semelhantes a gel, sendo 98% do peso devido, principalmente, à água e sais.

Assim, a elevada diversidade morfológica encontrada ao final da operação do reator fortalece a hipótese de que a degradação do surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE) é decorrente de consórcio microbiano.

5.12 – Análise quantitativa de microrganismos

5.12.1 – Determinação do número mais provável para bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas

Obteve-se $3,9E12$ e $1,5E9$ células/mL para bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas referente a biomassa do leito do reator, respectivamente. Para o separador de fases foram observados $2,3E11$ e $2,8E8$ células/mL, respectivamente (Tabela 26).

Tabela 26 – NMP de bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas

	Material Suporte (Areia)		Separador de Fases	
	Bactérias Anaeróbias Totais	Arqueas Metanogênicas	Bactérias Anaeróbias Totais	Arqueas Metanogênicas
NMP (Células/mL)	$3,9E12$	$1,5E9$	$2,3E11$	$2,8E8$
NMP (Células/gSVT)	$7,8E14$	$3,0E11$	$2,0E13$	$2,5E10$

No final da operação do reator a concentração média de sólidos totais voláteis (SVT) era de 0,005 g/mL e 0,01 g/mL para o material suporte e separador de fases, respectivamente. A quantificação de bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas para material suporte (areia) foi de $7,8E14$ cel/gSTV e $3,0E11$ cel/gSTV, respectivamente. Assim, a proporção de arqueas metanogênicas foi de aproximadamente 4% em relação as bactérias anaeróbias totais.

No separador de fases as bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas representaram $2,05E13$ cel/gSTV e $2,5E10$ cel/gSTV, respectivamente. A proporção de arqueas metanogênicas no separador de fases foi de 12% quando comparado com as bactérias anaeróbias totais.

Observou-se valor inferior de bactérias anaeróbias totais no separador de fases em relação ao material suporte (areia). A proporção de microrganismos no material suporte (areia) foi 3% e 8% superior a observada no separador de fases, em relação a bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas, respectivamente. Este fato ocorreu principalmente devido à elevada superfície de contato promovida na areia.

Oliveira (2010) verificou em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com LAS padrão (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) $3,8E10$ cel/gSTV para bactérias anaeróbias totais e $1,93E4$ cel/gSTV para arqueas metanogênicas para biomassa do biofilme da areia. Estes valores foram inferiores aos encontrados neste estudo.

Entretanto, Carosia (2011), obteve para essa mesma configuração de reator e remoção de LAS em sabão em pó de uso doméstico, $3,10E22$ cel/gSTV de bactérias anaeróbias totais, tanto na biomassa aderida ao material suporte (areia), quanto na biomassa do separador de fases. Os valores para arqueas metanogênicas foram $2,4E6$ cel/gSTV e $2,7E7$ cel/gSTV para areia e separador de fases, respectivamente.

Carosia (2011) observou valores de bactérias anaeróbias totais superiores aqueles deste estudo. Entretanto, para as arqueas metanogênicas os valores observados foram inferiores. Este fato possivelmente foi devido ao substrato utilizado por esta autora, bem como, a diferente origem do inóculo do reator, ou seja, proveniente de reator UASB de abatedouro de aves.

Delforno et al. (2012), em estudo realizado em reator de leito de lodo expandido usado na degradação de LAS (14 mg/L) padrão (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) observou resultados similares no que diz respeito a distribuição de bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas. Os autores observaram populações de bactérias anaeróbias totais superiores as

de arqueas metanogênicas no separador de fases. Fato justificado devido a presença de bactérias homoacetogênicas (*Veillonellaceae*). Este microrganismo compete com as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas pelo mesmo substrato (hidrogênio) (DELFORNO et al., 2012), interferindo assim na dinâmica populacional nesta porção do reator. Além disso, no reator de leito fluidificado em estudo houve a troca gasosa na porção superior do reator (separador de fases) favorecendo, assim, ambiente microaerófilo, o que deve ter ocasionado a diminuição das arqueas metanogênicas nesta região.

Pôde-se observar predominância de ambos os grupos (bactérias anaeróbias totais e arqueas metanogênicas) no material suporte (Figura 34). Hidalgo e Garcia-Encina (2002), citam que a adesão dos microrganismos na porção inferior do reator principalmente na parte inferior do leito fluidificado é mais rápida que nas outras regiões. Estes autores citam também que a fricção e as forças abrasivas ocasionadas pela fluidificação do leito trabalham como controle de acumulação da biomassa e renovação da mesma no material suporte. Entretanto, apesar destes fatos a concentração da biomassa aderida na areia foi bem superior à encontrada nas outras porções do reator, o que devido a grande superfície de contato concedida pela areia e pelo tratamento ácido a qual foi submetida.

Figura 34 – Quantificação dos grupos microbianos por NMP: (A) bactérias anaeróbias totais e (B) arqueas metanogênica

5.12.2 – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Por meio das amostras retiradas tanto do reator de leito fluidificado (material suporte – areia, separador de fases e distribuidor), em duas fases distintas (Fase IV e Fase V), quanto nos ensaios para o desenvolvimento da técnica de NMP, foi realizado PCR e em seguida eletroforese em gel de agarose com gradiente desnaturante (DGGE) para o Domínio Bactéria e Archaea.

Os dendogramas para as amostras do reator nas duas fases analisadas (Fase IV e Fase V) tanto para o Domínio Bacteria quanto o Domínio Archaea foram diferenciadas segundo a Tabela 27.

Tabela 27 – Identificação das amostras para os dendogramas do reator anaeróbio de leito fluidificado para o Domínio Bacteria e Archaea

Identificação	Característica
I	Inóculo do reator anaeróbio de leito fluidificado – Lodo proveniente de reator UASB no tratamento de efluente líquido de suinocultura
A1	Amostra de biomassa do material suporte (areia) do reator anaeróbio de leito fluidificado retirada ao final da Fase IV, cujo substrato sintético havia a presença do co-substrato sacarose.
D1	Amostra de biomassa do distribuidor do reator anaeróbio de leito fluidificado retirada ao final da Fase IV, cujo substrato sintético havia a presença do co-substrato sacarose.
S1	Amostra de biomassa do separador de fases do reator anaeróbio de leito fluidificado retirada ao final da Fase IV, cujo substrato sintético havia a presença do co-substrato sacarose.
A2	Amostra de biomassa do material suporte (areia) do reator anaeróbio de leito fluidificado retirada ao final da Fase V, cujo co-substrato sacarose estava ausente no substrato sintético.
D2	Amostra de biomassa do distribuidor do reator anaeróbio de leito fluidificado retirada ao final da Fase V, cujo co-substrato sacarose estava ausente no substrato sintético.
S2	Amostra de biomassa do separador de fases do reator anaeróbio de leito fluidificado retirada ao final da Fase V, cujo co-substrato sacarose estava ausente no substrato sintético.

Similaridade entre as amostras de biomassa do reator anaeróbio de leito fluidificado em suas diferentes porções (material suporte – areia, distribuidor e separador de fases) foi observada para o Domínio Bacteria (Figura 35).

Mudanças nas populações microbianas pertencentes ao Domínio Bacteria foram observadas entre as fases finais de operação do reator, quando comparadas com os padrões de bandas do inóculo. Verificou-se por meio do dendograma para o Domínio Bacteria dois grupos com similaridade de 58% entre as amostras do biofilme da areia, quando o sistema era alimentado com AE e sacarose e na fase somente com AE e sem sacarose (Figura 35). Essas alterações podem ser devidas às novas condições nutricionais do substrato sintético. Notou-se também similaridade de 59% entre as populações bacterianas do reator submetidos à presença de sacarose quando comparados à ausência deste co-substrato (Figura 35).

A similaridade entre as amostras do distribuidor e separador em relação ao material suporte de ambas as Fases foram de 81% para a Fase IV e 78% para a Fase V, para o Domínio Bacteria. Este fato demonstra que apesar das diferentes características hidráulicas destas duas partes do reator os microrganismos presentes nestas porções foram mais similares quando comparados com a microbiota da areia. Comparando a similaridade entre o separador de fases e o distribuidor de ambas as fases (Fase IV e Fase V) obteve-se os valores de 91% e 85% de similaridade, respectivamente.

I – Inóculo; A1 – Areia Fase IV; S1 – Separador de fases Fase IV; D1 – Distribuidor Fase IV; A2 – Fase V; D2 – Distribuidor Fase V; S2 – Separador de fases Fase V.

Figura 35 – Dendograma de distância dos perfis de bandas das amostras do reator anaeróbio de leite fluidificado para Domínio Bacteria

No Domínio Archaea algumas populações que estavam presentes no inóculo foram favorecidas ao longo da operação (Figura 36). Por outro lado, algumas populações desapareceram, provavelmente, em função das condições nutricionais, operacionais do reator e competitividade entre espécies microbianas.

Na Fase IV (com sacarose) os coeficientes de similaridade para as populações de arqueas metanogênicas foram de 74% quando comparado com a Fase V (sem sacarose), e de 54% entre as Fases IV e V comparadas ao inoculo (Figura 36).

No Domínio Archaea a maior similaridade foi de 98% entre o distribuidor e separador de fases na Fase IV (com sacarose), no entanto, quando comparado com o material suporte (areia) desta mesma fase a similaridade foi de 91% (Figura 36). A similaridade entre os reatores com sacarose e sem sacarose foi de 74% para o Domínio Archaea, enquanto para o Domínio Bacteria foi de 59%, indicando houve maior alteração nas populações bacterianas.

As amostras de biomassa para a Fase V tiveram menor perfil de bandas (menos heterogêneo) quando comparados a Fase IV e com menor similaridade entre as amostras das porções do reator. Diferente ao encontrado no perfil de bandas do Domínio Bacteria e do Domínio Archaea para a Fase IV. Na Fase V houve maior similaridade entre as amostras de biomassa do material suporte (areia) com o separador de fases (89%) e com o distribuidor do reator esta similaridade foi de 82% (Figura 36).

I – Inóculo; A1 – Areia Fase IV; SI – Separador de fases Fase IV; D1 – Distribuidor Fase IV; A2 – Fase V; D2 – Distribuidor Fase V; S2 – Separador de fases Fase V.

Figura 36 – Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras do reator anaeróbico de leito fluidificado para Domínio Archaea

Os dendogramas para as amostras dos ensaios da técnica de tubos múltiplos (NMP) tanto para o Domínio Bacteria quanto o Domínio Archaea foram diferenciadas segundo a Tabela 28.

Tabela 28 – Identificação das amostras para os dendogramas do ensaio de NMP para o Domínio Bacteria e Archaea

Identificação	Característica
Inc A2	Biomassa retirada da técnica de NMP das séries $10^{-1}/10^{-2}$ inoculado com biomassa do material suporte (areia).
Inc S2	Biomassa retirada da técnica de NMP das séries $10^{-1}/10^{-2}$ inoculado com biomassa do separador de fases.
A2	Amostra de biomassa do material suporte (areia) do reator anaeróbio de leito fluidificado retirada ao final da Fase V, cujo co-substrato sacarose estava ausente no substrato sintético.
S2	Amostra de biomassa do separador de fases do reator anaeróbio de leito fluidificado retirada ao final da Fase V, cujo co-substrato sacarose estava ausente no substrato sintético.
Met A2	Biomassa retirada da técnica de NMP das séries $10^{-6}/10^{-7}/10^{-8}$ inoculado com biomassa do material suporte (areia).
Bat A2	Biomassa retirada da técnica de NMP das séries $10^{-9}/10^{-10}$ inoculado com biomassa do material suporte (areia).
Met S2	Biomassa retirada da técnica de NMP das séries $10^{-5}/10^{-6}/10^{-7}$ inoculado com biomassa do separador de fases.
Bat S2	Biomassa retirada da técnica de NMP das séries $10^{-8}/10^{-9}$ inoculado com biomassa do separador de fases.

Na Figura 37 nota-se a similaridade no perfil das bandas de 69% entre a biomassa do material suporte (areia – A2) e do separador de fases (S2) para o Domínio Bactéria. Entretanto entre as biomassas retiradas da areia (A2) e do separador de fases (S2) na Fase V, quando comparados com o inóculo das primeiras diluições do ensaio de NMP (Inc A2), esta similaridade foi de 52%, demonstrando que houve a seleção de microrganismos durante o ensaio de NMP na presença do surfactante não iônico AE.

O perfil das amostras retiradas dos frascos de NMP para Domínio Bacteria apresentou similaridade de 83% entre, Bat A2 e Bat S2, entretanto quando comparado com Inc S2 esta similaridade foi de 62% (Figura 37).

A2 – Biomassa Areia Fase V; S2 – Biomassa Separador de fases Fase V; Inc A2 – Inoculo NMP areia; Inc S2 – Inóculo NMP Separador; Met A2 – Biomassa da areia serie metanogênicas (diluições $10^{-6}/10^{-7}/10^{-8}$); BAT A2 – Biomassa da areia serie de bactérias anaeróbias totais (diluições $10^{-9}/10^{-10}$); Met S2 – Biomassa do separador serie metanogênicas (diluições $10^{-5}/10^{-6}/10^{-7}$); Bat S2 - Biomassa do separador serie de bactérias anaeróbias totais (diluições $10^{-8}/10^{-9}$).

Figura 37 – Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras do ensaio de NMP para o Domínio Bacteria

No dendrograma para o Domínio Archaea dos ensaios de NMP menor perfil de banda (homogêneo) quando comparado com o dendrograma do mesmo ensaio para o Domínio Bacteria. As amostras de Met S2 e Met A2 apresentaram similaridade entre si de 94% e estes quando comparados com o Inc A2 foi de 81%, como pode ser observado na Figura 38.

As biomassas referentes a A2 e S2 apresentaram similaridade no perfil de bandas de 89%, e quando comparados com o Inc S2 foi de 74%, e este por sua vez mostrou o maior número de bandas, justificando assim que nos ensaios de NMP houve a seleção de microrganismos mesmo em curto período de tempo. Este fato foi melhor demonstrado quando comparado as amostras dos frascos do NMP com a contagem de produção de metano (Met A2 e Met S2) com a biomassa oriunda da Fase V (A2 e S2), cuja similaridade entre as bandas foram de 48% (Figura 38).

A2 – Biomassa Areia Fase V; S2 – Biomassa Separador de fases Fase V; Inc A2 – Inóculo NMP areia; Inc S2 – Inóculo NMP Separador; Met A2 – Biomassa da areia série metanogênicas (diluições $10^{-6}/10^{-7}/10^{-8}$); Met S2 – Biomassa do separador serie metanogênicas (diluições $10^{-5}/10^{-6}/10^{-7}$).

Figura 38 – Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras do ensaio de NMP para o Domínio Archaea

5.12.3 – Pirosequenciamento

5.12.3.1 – Preparação das sequências

As análises de pirosequenciamento das quatro amostras do reator no estudo de degradação do álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE) resultaram em 19.798 sequências, entretanto nem todas as amostras apresentaram tamanho e qualidade necessária para serem empregadas nas análises taxonômicas e ecológicas. Deste total foram selecionadas 14.952 sequências (74,4%) com 225 pb em média, com desvio padrão de 0,81; 1,16; 1,0 e 1,04 para as amostras do material suporte na Fase IV (MS-C), separador de fases na Fase IV (SF-C), material suporte da Fase V (MS-S) e separador de fases na Fase V (SF-S), respectivamente.

Após a realização da remoção das sequências com qualidades baixas (*trimmer*) das amostras selecionou-se 3.666 sequências para a amostra da biomassa do MS-C, 2.991 sequência para a amostra do SF-C, 4.193 sequência para a amostra MS-S e 4.102 SF-S (Anexo 1; Figuras A, B, C e D).

Dentre as 14.952 sequência selecionadas foi realizada a remoção de quimeras, das quais foram removidos 221 sequências do total de amostras analisadas. As 14.731 sequências restantes foram definidas em 814 UTOs (Unidade Taxonômica Operacional) (Tabela 29).

Tabela 29 – Número total de sequências e UTOs

Sigla	Descrição da amostra	Nº Total de Sequências analisadas	Após o corte (<i>Trimming</i>)	Após Remoção de Quimeras	Após a remoção de singletons	Total de UTOs	UTOs Sequências representativas*
MS-C	Material Suporte Fase IV	4.958	3.666	3.635	3.528	311	212
SF-C	Separador de fases Fase IV	3.997	2.991	2.935	2.837	309	215
MS-S	Material Suporte Fase V	5.434	4.193	4.157	4.067	260	170
SF-S	Separador de fases Fase V	5.409	4.102	4.004	3.893	328	217
Total		19.798	14.952	14.731	14.325	1.208	814

UTO Unidades Taxonômicas Operacionais; MS-C – Material suporte (areia) Fase IV; SF-C – Separador de fases Fase IV; MS-S – Material suporte (areia) Fase V; SF-S – Separador de fases Fase V

5.12.3.2 – Índices de diversidade

Para avaliar a diversidade microbiana foram analisados os índices de diversidade de Shannon (H'), Simpson (D') e equitabilidade de Pielou (J'), para os resultados referentes ao número de UTOs e abundância relativa (número de sequências) das amostras da biomassa do material suporte e do separador de fases das Fases IV e V, oriundas das análises de pirosequenciamento.

Quando se comparou os índices de diversidade para as UTOs com os índices de diversidades para a abundância relativa, notou-se valores com menor variação para a diversidade relacionada a UTOs (Tabela 30).

Em relação a abundância relativa verificou-se para o índice de Shannon e Simpson para a biomassa do separador de fases na Fase V (SF-S) menor diversidade (1,54), quando comparada com as demais amostras. Entretanto, verificou-se para a biomassa do separador de fases na Fase IV (SF-C) maior diversidade (2,16), levando-se em conta o índice de Shannon. Para o índice de Simpson, o qual está relacionado com a dominância de uma espécie e não a heterogenidade, notou-se maior valor relativo para biomassa do material suporte da Fase V (MS-S); ou seja, 0,80 (Tabela 30).

Em relação ao índice de equitabilidade (J') observou-se pouca variação, ou seja, 0,57 e 0,62 (número de UTOs) e 0,39 e 0,56 (número de sequências), no qual, 1 representa a máxima diversidade (PIELOU, 1969). Para o número de UTOs observadas para a biomassa do material suporte da Fase IV e Fase V verificou-se valores iguais de 0,59. Provavelmente, houve prevalência de determinados grupos microbianos. Na biomassa do separador de fases observou-se valores distantes para ambas as fases, 0,62 para SF-C e 0,57 para SF-S. Provavelmente, a condição microaerófila na ausência e presença de sacarose influenciaram a prevalência de determinados grupos microbianos em detrimento a outras, nesta região do reator (Tabela 30).

Tabela 30 – Índices de diversidade da biomassa do RALF nas Fases IV e V

Amostra	Índices de diversidade					
	Abundância relativa			UTOs		
	Shannon (H')	Simpson (D')	Equitabilidade (J')	Shannon (H')	Simpson (D')	Equitabilidade (J')
MS-C	1,65	0,58	0,42	2,3	0,68	0,59
SF-C	2,16	0,73	0,56	2,4	0,71	0,62
MS-S	1,93	0,80	0,54	2,1	0,68	0,59
SF-S	1,54	0,56	0,39	2,2	0,67	0,57

UTO – Unidades Taxonômicas Operacionais; MS-C – Material suporte (areia) Fase IV; SF-C – Separador de fases Fase IV; MS-S – Material suporte (areia) Fase V; SF-S – Separador de fases Fase V.

Os valores de diversidade em relação aos índices de Shannon, Simpson e Equitabilidade, referentes ao número de UTOs para a biomassa do material suporte foram inferiores aqueles observados para biomassa do separador de fases na Fase IV. Por outro lado, na Fase V observou-se para esses índices valores superiores no material suporte quando comparados com o separador de fases. Assim, a presença de sacarose influenciou na

diversidade da comunidade microbiana do reator anaeróbio de leito fluidificado. Notou-se também que a região do reator (material suporte e separador de fases) é um fator importante na seleção microbiana.

Okada (2012) analisou por meio de pirosequenciamento, a diversidade filogenética da biomassa da manta de lodo e do separador de fases de reatores UASB usados na remoção de surfactante aniônico (LAS) em água residuária de lavanderia comercial. Este autor observou pouca variação no índice de Shannon (4,9 a 6,0), sendo que a maior diversidade foi observada para a biomassa da manta de lodo e o menor índice de Shannon foi atribuído à amostra com maior parcela de UTOs únicas (com apenas uma sequência).

No presente estudo também foi observado pouca variação no índice de Shannon referente ao número de UTOs (2,1 – 2,4). Foi obtido índice de 2,1 e curva de rarefação com valores entre 240-260 para a amostra MS-S, diferente do encontrado por Okada (2012). Nesta amostra, a menor quantidade de UTOs únicas não correspondeu à maior diversidade.

Observou-se para biomassa do material suporte na Fase V, sem sacarose distribuição mais equilibrada dos táxons com maior índice de diversidade (Shannon, referente a abundancia relativa) e menor numero de UTOs únicas. Em relação a Fase IV (com sacarose) observou-se maior diversidade (índice de Shannon, referente a abundancia relativa) (0,56) para biomassa do separador de fases (SF-C).

5.12.3.3 – Dominância e Curva de Rarefação

Em relação ao índice de dominância referente a abundancia relativa do número de UTOs pôde-se observar pouca variação, ou seja, 0,28 a 0,32 e 0,21 a 0,44, respectivamente. Observou-se para abundância relativa uma comunidade com distribuição mais equânime dos táxons para biomassa do MS-S (Fase V), em relação, aquilo verificado para biomassa do SF-S, cujos valores de dominância foram de 0,21 e 0,27, respectivamente. Aqueles valores observados próximos de zero foram relacionados a presença equilibrada de todos os táxons, enquanto, os valores próximos a 1 relacionados ao domínio de um táxon na comunidade microbiana (Tabela 31).

Observou-se para biomassa do material suporte (MS-C) na Fase IV, com sacarose maior dominância de determinado táxon (0,42) e maior riqueza em relação ao índice de

Chao 1 (437) e curva de rarefação (320), quando comparado com a Fase V, sem sacarose, cujos valores observados foram 398 e 260, respectivamente.

Quando se comparou as biomassas do separador de fases observou-se maiores valores para o índice de Chao 1, curva de rarefação e dominância para a Fase IV, com sacarose, cujos valores foram 0,27; 312 e 313, respectivamente. Na Fase V (com sacarose), os valores obtidos foram de 0,44; 330 e 443, para dominância, curva de rarefação e índice de Chao 1, respectivamente. Assim a presença de sacarose no meio, bem como, o material suporte influenciou na diversidade e dominância dos microrganismos do reator anaeróbio.

Para o índice de Bray-Curtis observou-se coeficientes de similaridade de 0,52 entre as amostras do material suporte com (MS-C) e sem sacarose (MS-S), e de 0,65 para as amostras do separador de fases nas mesmas condições operacionais. Quando se compara as diferentes regiões do reator para a mesma fase operacional obém-se valores de 0,73 e 0,59 para biomassa do material suporte e separador de fases para a Fase IV e Fase V, respectivamente (Figura 41).

Tabela 31 – Índices de similaridade da biomassa do material suporte e separador de fases nas Fases IV e V

Amostra	Índices de similaridade e riqueza			
	Abundancia relativa	UTOs		
	Dominância	Dominância	Rarefação (0,03)	Chao 1
MS-C	0,42	0,32	320	437
SF-C	0,27	0,28	312	313
MS-S	0,21	0,31	260	398
SF-S	0,44	0,32	330	443

UTOs – Unidades Taxonômicas Operacionais

MS-C – Material suporte (areia) Fase IV; SF-C – Separador de fases Fase IV; MS-S – Material suporte (areia) Fase V; SF-S – Separador de fases Fase V.

Para comparação da riqueza de espécies entre as amostras foram geradas curvas de rarefação utilizando *cutoff* de 3% e 5%. Por meio desta curva foi evidenciado maior riqueza nas amostras quando empregado 97% de similaridade (*cutoff* 0,03) quando comparado com os valores de 95% (*cutoff* 0,05) de similaridade, tanto para o material suporte, quanto para o separador de fases, em ambas, as fases de operação (Fase IV e V) (Figura 39 e Figura 40).

Por meio das análises de curva de rarefação, para 97% de similaridade, evidenciou-se maior riqueza para a biomassa do SF-S (Fase V) e menor riqueza para MS-S (Fase V).

Observou-se estimador de rarefação em torno de 320 e 260 para a biomassa do material suporte na presença e ausência de sacarose (MS-C e MS-S), respectivamente. Na biomassa do separador de fase na presença (SF-C) e ausência de sacarose (SF-S) observou-se 312 e 330, respectivamente (Tabela 31).

Figura 39 – Curva de rarefação da biomassa do material suporte e separador de fases na Fase IV, com 97% (*cutoff* 0,03) e 95% (*cutoff* 0,05) de similaridade

Figura 40 – Curva de rarefação da biomassa do material suporte e separador de fases na Fase V, 97% (*cutoff* 0,03) e 95% (*cutoff* 0,05) de similaridade

Outra possibilidade utilizada para mensurar a riqueza da biomassa é por meio do índice de Chao 1, o qual estima a riqueza total do número de espécies representadas por

apenas um indivíduo nas amostras (*singletons*) e o número de espécies com apenas dois indivíduos nas amostras (*doubletons*) (Equação 3).

Para nível de similaridade de 97% observou-se 437,1; 313; 398,1 e 443,1 para índice de diversidade Chao 1 para a biomassa do MS-C, SF-C, MS-S e SF-S, respectivamente.

Observou-se para o índice de Chao 1 e estimador de rarefação maior riqueza para a amostra do material suporte (MS-C) (437; 320) quando comparado ao separador de fases (SF-C) da Fase IV(313; 312), com sacarose. O oposto foi observado comparando-se a Fase V (443; 330), sem sacarose; ou seja, maior riqueza para a biomassa do separador de fases (Tabela 31).

Para avaliar a similaridade entre as amostras com base na presença/ausência e abundâncias das espécies utilizou-se o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. Para visualizar esta análise de agrupamento dos índices de similaridade selecionou-se um dendrograma usando o método de UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic mean*). Valor do índice Bray-Curtis igual 0 indica que as biomassas compartilham das mesmas espécies e valor igual a 1 refere-se a espécies diferentes nas biomassas analisadas.

Assim, observou-se para a biomassa do material suporte na presença e ausência de sacarose que aproximadamente 50% dos gêneros encontrados foram semelhantes. Todavia, para a biomassa do separador de fases observou-se porcentagem maior de 65% de similaridade dos gêneros para as duas fases com e sem sacarose. Por meio deste índice, também, verificou-se que aproximadamente 73% dos gêneros na Fase IV com sacarose estiveram presentes, tanto no material suporte, quanto no separador de fases. Entretanto, para a Fase V sem sacarose observou-se diminuição para 59% (Figura 41).

Figura 41 – Dendrograma baseado na análise de agrupamento do índice Bray-Curtis para as biomassas do material suporte e separador de fases das Fases IV e V

A diversidade β foi calculada pelo índice de Whittaker que mede a mudança ou taxa de substituição na composição de espécies de um local para outro (WHITTAKER, 1960). Este índice varia de 0, quando duas amostras não apresentam nenhuma diferença na composição de espécies e 2, quando esta diferença é máxima.

Para o índice de diversidade β , quanto menos gêneros as amostras compartilharem entre si mais alto é o valor deste índice. Assim foi possível averiguar o quanto as comunidades microbianas foram distintas. Observou-se 0,49 entre a biomassa do MS-C (Fase IV) e MS-S (Fase V) e 0,36 entre SF-C (Fase IV) e SF-C (Fase V). Para as regiões do reator na mesma fase operacional observou-se 0,24 entre MS-C (Fase IV) e SF-C (Fase IV) e 0,41 entre MS-S (Fase V) e SF-S (Fase V), segundo a comparação por pares de Whittaker.

Ambientes alterados dificultam a dispersão das espécies favorecendo o isolamento das populações, podendo até aumentar a diversidade β , mas com o passar do tempo as espécies mais exigentes podem desaparecer restando apenas as generalistas, resultando em baixos índices de diversidade β (MORENO; HALFFTER, 2001).

Em ambientes heterogêneos, espécies com diferentes amplitudes de tolerância tendem a ter diferentes padrões de distribuição espacial. Assim, com o aumento da heterogeneidade ambiental criam-se condições favoráveis para que outras espécies possam se estabelecer no local, resultando em aumento da diversidade β (VEECH et al., 2002). Baixos valores do índice de diversidade beta foram observados neste estudo. Entretanto, notou-se aumento neste índice quando se comparou as biomassas da Fase IV, com sacarose (0,24) e Fase V, sem

sacarose (0,41). A maior diversidade de acordo com o índice de Whittaker foi observado nas amostras do material suporte (0,49).

5.12.3.4 – Caracterização da diversidade microbiana

Por meio da classificação do RDP-Classifer obteve-se a classificação de filós até gêneros das amostras do material suporte e separador de fases das Fases IV e V, do reator anaeróbio de leito fluidificado (Tabela 32).

Para as amostras do material suporte da Fase IV (MS-C) obteve-se 3.528 sequências agrupadas em 212 UTOs, sendo que 10,17% destas não foram classificadas a nível de filo. Para a amostra do separador de fases (SF-C) desta mesma fase operacional obteve-se 2.837 sequências agrupadas em 215 UTOs, sendo 16,77% destas não identificadas. Para as amostras da Fase V, MS-S e SF-S obteve-se 4.067 e 3.893 sequências, e agrupadas em 170 e 217 OTUs, respectivamente, entretanto 5,6% e 25,9%, não foram identificadas a nível de filo.

Tabela 32 – Ordens taxonômicas identificadas na biomassa do RALF

Ordem taxonômica	Biomassa do reator anaeróbio de leito fluidificado			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Filo	11	11	7	11
Classe	19	19	13	20
Ordem	29	30	20	29
Família	35	37	29	39
Gênero	49	45	34	49

MS-C – Biomassa do material suporte da Fase IV, SF-C – Biomassa do separador de fases da Fase IV, MS-S - Biomassa do material suporte da Fase V, SF-S – Biomassa do separador de fases da Fase V

Observou-se abundância relativa de 1.289 filós agrupados em 94 UTOs, para biomassa do MS-C (Fase IV). Para a biomassa SF-C (Fase IV) observou-se abundância relativa de 1.437 filós agrupados em 102 UTOs. Para a biomassa da Fase V, MS-S e SF-S observou-se abundância relativa de 2.772 e 1.384 filós agrupados em 76 e 95 UTOs, respectivamente (Tabela 33).

Tabela 33 – Abundância relativa e UTOs dos filos identificados na biomassa do RALF

MS-C (Fase IV)				SF-C (Fase IV)			
Filos	A.R	UTOs	% A.R	Filos	A.R	UTOs	% A.R
Proteobacteria	657	48	51,0	Proteobacteria	777	49	54,1
Firmicutes	419	20	32,5	Firmicutes	342	23	23,8
Synergistetes	104	4	8,1	Acidobacteria	148	5	10,3
Acidobacteria	46	5	3,6	Synergistetes	62	4	4,3
Chloroflexi	13	4	1,0	Lentisphaerae	41	3	2,9
Gemmatimonadetes	13	1	1,0	Bacteroidetes	27	4	1,9
Verrucomicrobia	13	4	1,0	Verrucomicrobia	22	6	1,5
Fusobacteria	10	3	0,8	Chloroflexi	6	2	0,4
Bacteroidetes	6	3	0,5	Fusobacteria	6	3	0,4
Chlorobi	4	1	0,3	Gemmatimonadetes	4	2	0,3
Lentisphaerae	4	1	0,3	Armatimonadetes	2	1	0,1
Não Classificadas*	2.239	118	63,5	Não Classificadas*	1.400	113	49,3

MS-S (Fase V)				SF-S (Fase V)			
Filos	A.R	UTOs	% A.R	Filos	A.R.	UTOs	% A.R
Proteobacteria	1545	40	55,7	Proteobacteria	459	35	33,2
Acidobacteria	1017	12	36,7	Acidobacteria	441	11	31,9
Firmicutes	167	17	6,0	Firmicutes	233	27	16,8
Synergistetes	21	2	0,8	Tenericutes	121	2	8,7
Verrucomicrobia	12	3	0,4	Bacteroidetes	69	7	5,0
Bacteroidetes	6	1	0,2	Synergistetes	34	4	2,5
Fusobacteria	4	1	0,1	Chloroflexi	8	3	0,6
Não Classificadas*	1.291	93	31,7	Fusobacteria	6	2	0,4
				Verrucomicrobia	6	2	0,4
				Spirochaetes	5	1	0,4
				Gemmatimonadetes	2	1	0,1
				Não Classificadas*	2.509	122	64,4

A.R.- Abundância relativa; % A.R. – Porcentagem da Abundância relativa, UTO – Unidade taxonômica operacional. * Sequências não classificadas a nível taxonômico de gênero.

Observou-se maior porcentagem de filos Proteobacteria (33,2-55,7%), Acidobacteria (3,6-36,7%), Firmicutes (6-32,5%), Bacterioides (0,2-5,0%) e Synergistetes (0,8-8,1%), para a abundância relativa da biomassa do material suporte e separador de fases em ambas as fases. Em menor proporção observou-se os filos Fusobacteria (0,1-0,8%), Verrucomicrobia (0,4-1,5%) e Gemmatimonadetes (0,1-1,0%) para a biomassa do material suporte e separador de fases em ambas as fases. Alguns filos foram observados em apenas uma das amostras,

como é o caso do filo Chlorobi (0,3%) na biomassa do MS-C (Fase IV), filo Armatimonadetes (0,1%) na biomassa do SF-C (Fase IV) e os filios Tenericutes (8,7%) e Spirochaetes (0,4%) na biomassa do MS-S (Fase V) (Figura 42).

Não Classificadas * : sequências não classificadas a nível taxonômico de gênero.

Figura 42 – Abundância relativa dos filios identificados na biomassa do material suporte e separador de fases das Fases IV e V (Similaridade 97%)

Observou-se maior abundância relativa para o filo Proteobacteria para biomassa, tanto do material suporte, quanto do separador de fases, em ambas, as fases operacionais do reator de leito fluidificado. Os valores observados para este filo foram de 51%, 54%, 55% e 33%, para as amostras MS-C (Fase IV), SF-C (Fase IV), MS-S (Fase V) e SF-S (Fase V), respectivamente.

Para a biomassa da Fase IV, com sacarose (MS-C e SF-C) verificou-se que o filo Firmicutes foi o mais representativo, quando comparado com a Fase V (sem sacarose). Estes valores referentes a abundância relativa foram de 32,5%; 23,8%; 6% e 16,8% para biomassa do MS-C (Fase IV), SF-C (Fase IV), MS-S (Fase V) e SF-S (Fase V), respectivamente. Notou-se que na Fase V, sem sacarose Acidobacteria foi o segundo filo mais representativo em abundância relativa, ou seja, 36,7% e 31,9% para a biomassa do MS-S e SF-S, respectivamente. Nas amostras da Fase IV (com sacarose) observou-se 3,6% e 10,3% para este mesmo Filo para biomassa do MS-C e SF-C, respectivamente.

Notou-se que a presença ou ausência de sacarose não afetou a prevalência do filo Proteobacteria, entretanto outros filos como Firmicutes tiveram sua abundância relativa reduzida quando comparada as amostras da Fase IV e Fase V. Em relação ao filo Acidobacteria observou-se maior destaque na fase com ausência de sacarose (Fases V), quando comparado com a fase sem sacarose (Fase IV).

Carosia (2011) avaliou a degradação de LAS em sabão em pó em reator anaeróbio de leite fluidificado. Este autor observou prevalência de 88% de sequências similares ao filo Proteobacteria, além de 1% e 2% para Acidobacteria e Firmicutes de respectivamente, para amostras do material suporte do reator.

Ferreira (2012) avaliou a influência de co-substratos na degradação de LAS em sabão em pó. Este autor observou também a prevalência do filo Proteobacteria (72%). Os resultados para Acidobacteria (3%) e Firmicutes (6,3%), foram similares aos encontrados por Carosia (2011), para as amostras retiradas do material suporte (areia) do reator de leite fluidificado.

O filo Acidobacteria é encontrado em diversos ambientes, tais como, solos, águas termais, lodos ativados e sedimentos de lagos (QUAISER et al., 2003). Em estudos sobre a diversidade microbiana de solos verificou-se que representantes do filo Acidobacteria podem adaptar-se a limitação de recursos nutricionais e dominar quando há baixa produtividade vegetal o que provoca menor disponibilidade de fontes de carbono (NAETHER et al., 2012). Estes microrganismos são oligotróficos, e preferem solos pobres aos ricos em carbono, entretanto há diminuição em seu número quando o ambiente é enriquecido com sacarose. Estes microrganismos também são fortemente influenciados pelo pH e elevadas concentrações de CO₂ (JONES et al., 2009). Assim, a ausência da sacarose na Fase V pode ter influenciado na abundância relativa deste filo nas amostras MS-S e SF-S, quando comparado com o MS-C e SF-C.

Oliveira et al. (2013) caracterizaram o biofilme utilizado na degradação de LAS em reator anaeróbio de leite fluidificado. Assim como neste trabalho, os autores encontraram a predominância de populações semelhantes ao filo Proteobacteria (43,8%). Entretanto, verificou-se para os filos Firmicutes e Acidobacteria menor representatividade; ou seja, 1,9% e 2,9%, respectivamente. Oliveira et al. (2013) também observaram sequências similares a representantes dos filos Verrucomicrobia (3,8%) e Gemmatimonadetes (1,0%), semelhante ao verificado nesse estudo com baixa representatividade. Observou-se 1%; 1,5%; 0,4% e 0,4%, nas amostras do MS-C, SF-C, MS-S e SF-S respectivamente para o filo Verrucomicrobia. Em relação ao filo Gemmatimonadetes observou-se 1%; 0,3% e 0,1% para as amostras MS-C,

SF-C e SF-S, respectivamente. Não foi identificado similaridade com este filo na biomassa do MS-S.

Observou-se o filo Synergistetes nas amostras do MS-C, SF-C, MS-S e SF-S, cujos valores de abundância relativa foram de 8,1%; 4,3%; 0,8% e 2,5%, respectivamente. Os microrganismos representantes deste filo são encontrados em reatores anaeróbios, solo e trato digestivo de suínos, aves e humanos. São bactérias Gram negativas, estritamente anaeróbias, móveis, mesofílicas, apresentam formato de bacilo ou vibrião e podem crescer em pH em torno de 7,0 (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2007).

Segundo Godon et al. (2005) representantes do filo Synergistetes degradam aminoácidos em condição anaeróbia, semelhante a observado no reator do presente estudo, cuja fonte de aminoácidos era promovida pelo extrato de levedura. Algumas espécies deste filo foram identificadas como contribuintes significativas na degradação de matéria orgânica para a produção de biogás em reatores anaeróbios e são potenciais candidatas para uso na produção de energia renovável por meio da produção de gás hidrogênio (BAUMGARTNER et al., 2012). A presença deste filo é justificada pela origem do inóculo proveniente de lodo de reator UASB usado no tratamento de águas residuárias de suinocultura. Representantes deste filo também foram observados por Carosia (2011) e Ferreira (2012) cujas proporções foram de 2% e 3%, respectivamente, para amostras do material suporte utilizado no reator anaeróbio de leite fluidificado usado na remoção de LAS.

Carosia (2011) observou diminuição de representantes do filo Proteobacteria entre a biomassa do material suporte (areia) e separador de fases, cujos valores foram de 88% para 39%. Por outro lado, este autor verificou representantes similares ao filo Synergistetes na amostra do separador de fases, quando comparado com a amostra do material suporte, cujos valores foram de 19% e 2%, respectivamente. Especificamente, nesse trabalho de remoção de AE verificou-se representantes similares ao filo Synergistetes em maior destaque na amostra do separador de fases (2,5%), e somente na Fase V, na ausência de sacarose. Na Fase IV representantes deste filo foram evidenciados na amostra do material suporte (8,1%).

Verificou-se também sequências similares ao filo Chlorobi (0,3%). Os representantes desse filo são conhecidas como bactérias verde sulfurosas, estritamente anaeróbias e fotoautotróficas que obtém elétrons por meio da redução do sulfeto ou outros compostos sulfurosos (OVERMANN, 2006). As espécies ocupam nicho ecológico restrito em ambientes aquáticos anaeróbios. Uma característica metabólica importante deste grupo é a capacidade de fixar CO₂ por meio da via reversa do ciclo de Krebs (BUCHANAN; ARNON, 1990;

WAHLUND; TABITA, 1997). Entretanto, em estudos recentes de Kadnikov et al. (2013) e Liu et al. (2012) foram isoladas espécies desse filo Chlorobi termofílicas e anaeróbias facultativas a partir de amostra de rios.

Kadnikov et al. (2013) citam uma espécie pertencente ao filo Chlorobi que codifica várias dezenas de enzimas glicosil-transferase que são envolvidas na síntese de polissacarídeos intra e extracelular. Estes microrganismos podem crescer na presença de carboidratos de baixo peso molecular como glicose, frutose, sacarose e lactose. Estes microrganismos são versáteis podendo ser comparado com as espécies do filo Bacterioidetes, que são bem conhecidas como utilizadoras ativas de carboidratos (KADNIKOV et al., 2013). Estes dados corroboram para a presença do filo Chlorobi na fase operacional com a presença de sacarose como co-substrato, principalmente no que se refere ao material suporte (MS-C), onde a concentração de sacarose afluenta é maior que no separador de fases.

As bactérias pertencentes ao filo Bacterioidetes são metabolicamente diferentes, quimio-organotróficas e capazes de crescer em ampla variedade de substratos complexos. As espécies deste filo habitam solos, água doce e ambiente marinho, bem como, sedimentos em temperatura mesófila (KRIEG et al., 2010). Assim, a presença de sequências similares a este filo nas proporções de 0,5%; 1,9%; 0,2% e 5% em MS-C, SF-C, MS-S e SF-S são justificadas, principalmente no que se refere ao separador de fases na Fase V, onde houve maior porcentagem deste filo na ausência de sacarose, todavia, com elevada concentração de surfactante; ou seja, 97,9 mg/L de AE.

Somente, na amostra do separador de fases da Fase IV foi encontrado o filo Armatimonadetes (0,1%). Alguns representantes deste filo foram encontrados em sistemas de lodos ativados (DALEVI; HUGENHOLTZ; BLACKALL, 2001). Representantes deste filo também foram evidenciados em reatores anaeróbios usados no tratamento de bifenilas policloradas (PCB) (D'ANGELO; NUNEZ, 2010; SILVA, 2012). Segundo estes autores, os microrganismos pertencentes a este filo podem ser responsáveis pela decloração de PCBs em condição anaeróbia.

Os filos Tenericutes e Spirochaetes só foram encontrados nas amostras do material suporte na Fase V, nas proporções de 8,7% e 0,4%, respectivamente. Os microrganismos pertencentes ao filo Tenericutes são procariotos desprovidos de parede celular, e podem possuir glicocálix extracelular. A ausência de parede celular confere aos microrganismos deste filo certa plasticidade mecânica (MURRAY, 1984), fato que pode ter auxiliado estes microrganismos em sua permanência no material suporte, uma vez que, esta região era

influenciada pela turbulência causada pela recirculação do efluente e pelas forças de atrito entre as partículas da areia.

Os microrganismos pertencentes ao filo Spirochaetes são quimio-organotróficos e, dependendo da espécie, podem crescer em ambientes anaeróbio ou microaerófilo, são microrganismos anaeróbios facultativos (GARRITY; HOLT 2001). Apesar de serem de vida livre podem estar associados a outros microrganismos. Esse fato pode ter levado este grupo microbiano a se estabelecer no material suporte do reator, uma vez que, confere ampla superfície de contato para os demais microrganismos.

5.12.3.4 – Classes

Foram encontradas o total de 26 classes nas amostras do material suporte e separador de fases nas Fases IV e V, 19 classes referentes às amostras do MS-C e SF-C, 13 para MS-S e 20 para SF-S (Tabela 34).

Tabela 34 – Distribuição das classes de bactérias identificadas na biomassa do reator de leito fluidificado

Classe	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
Acidobacteria_Gp17	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1	4	1	0,3
Alphaproteobacteria	30	8	2,3	41	8	2,9	82	8	3,0	44	9	3,2
Anaerolineae	13	4	1,0	6	2	0,4	-	-	-	6	2	0,4
Armatimonadetes_gp2	-	-	-	2	1	0,1	-	-	-	-	-	-
Bacteroidia	4	2	0,3	7	1	0,5	6	1	0,2	24	1	1,7
Betaproteobacteria	39	10	3,0	140	10	9,7	313	8	11,3	42	6	3,0
Clostridia	121	8	9,4	117	13	8,1	151	14	5,4	154	18	11,1
Deltaproteobacteria	506	20	39,3	419	21	29,2	1092	21	39,3	352	16	25,4
Epsilonproteobacteria	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavobacteria	-	-	-	18	2	1,3	-	-	-	32	3	2,3
Fusobacteria	10	3	0,8	6	3	0,4	4	1	0,1	6	2	0,4
Gammaproteobacteria	80	9	6,2	177	10	12,3	-	-	-	21	4	1,5
Gemmatimonadetes	13	1	1,0	4	2	0,3	58	3	2,1	2	1	0,1
Holophagae	46	5	3,6	148	5	10,3	1015	11	36,6	437	10	31,6
Ignavibacteria	4	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

Classe	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
Ktedonobacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
Lentisphaeria	4	1	0,3	41	3	2,9	-	-	-	-	-	-
Mollicutes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	121	2	8,7
Negativicutes	298	12	23,1	225	10	15,7	16	3	0,6	79	9	5,7
Spartobacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	0,2
Sphingobacteria	2	1	0,2	2	1	0,1	-	-	-	13	3	0,9
Spirochaetes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	0,4
Subdivision3	7	2	0,5	9	3	0,6	6	2	0,2	-	-	-
Subdivision5	2	1	0,2	7	2	0,5	-	-	-	-	-	-
Synergistia	104	4	8,1	62	4	4,3	25	3	0,9	34	4	2,5
Verrucomicrobiae	4	1	0,3	6	1	0,4	6	1	0,2	3	1	0,2

A – Abundância relativa, U – UTOs (*Operation taxonomic units*), % - Porcentagem relativa a abundância relativa das amostras. MS-C – Amostra do material suporte da Fase IV (com sacarose), SF-C – Amostra do separador de fases da Fase IV (com sacarose), MS-S – Amostra do material suporte da Fase V (sem sacarose), SF-S – Amostra do separador de fases da Fase V (sem sacarose).

Observou-se maior representatividade nas amostras das seguintes Classes de bactérias: Deltaproteobacteria, Negativicutes e Holophagae. A classe Deltaproteobacteria foi a mais abundante nas amostras MS-C (39,3%), SF-C (29,2%) e MS-S (39,3%) (Figura 43). Representantes similares a classe Flavobacteria foram observados no separador de fases das Fases IV e V, na proporção de 1,3% e 2,3%, para SF-C e SF-S, respectivamente. Em relação a classe Lentisphaeria observou-se apenas nas amostras da fase IV, MS-C (0,1%) e SF-C (2,9%), ao contrário das classes Holophagae e Acidobacteria_Gp17, cujos representantes foram observados nas amostras da Fase V, nas proporções de 36,6% e 0,1% para as amostras MS-S e 31,6% e 0,3% para as amostras do SF-S, respectivamente.

Representantes das classes Epsilonproteobacteria (0,2%) e Ignavibacteria (0,3%) foram somente identificados no material suporte na presença de sacarose (MS-C). Em relação as classes Ktedonobacteria (0,1%), Mollicutes (8,7%), Spartobacteria (0,2%) e Spirochaetes (0,4) foram identificadas bactérias apenas no separador de fases da Fase V (SF-S) (Figura 43).

Figura 43 – Abundância relativa das classes (Similaridade 97%) identificadas na biomassa do material suporte e do separador de fases das Fases IV e V

Ampla diversidade filogenética é observada para os representantes da classe Deltaproteobacteria, sendo formada por dois grupos principais, e muito diferentes. Um grupo unicelular e anaeróbico obrigatório, no qual a maioria de seus representante usa como receptor final de elétrons, o sulfato e reduzem-no a sulfeto. Tais bactérias são encontradas em sedimentos ricos em enxofre, fontes geotérmicas e trato digestivo de animais (BROCK et al., 1994). Provavelmente, a identificação de bactérias pertencentes a essa classe seja justificada pela origem do inóculo proveniente de reator UASB usado no tratamento de dejetos da suinocultura. O outro grande grupo engloba as bactérias aeróbicas obrigatórias (BROCK et al., 1994).

Em estudo de remoção de surfactante aniônico (LAS) presente em detergente de uso doméstico, Carosia (2011) encontrou 31% de sequências relacionadas com membros desta classe. Delforno (2011) verificou em reator EGSB usado na degradação de LAS padrão 39,6% e 8,5% de representantes da classe Deltaproteobacteria no leito do reator e separador de fases, respectivamente. Entretanto, Oliveira et al. (2013) encontraram esta classe de microrganismos em pequena proporção, em reator anaeróbico de leito fluidificado usado na remoção de LAS (padrão), semelhante a Okada (2012) que avaliou a degradação de LAS em águas residuária de lavanderia em reator UASB.

Assim, observa-se que devido ao grupo sulfonado do surfactante LAS estes microrganismos estiveram presentes em grande proporção devido à capacidade de redução de sulfato deste surfactante. Entretanto, neste estudo com AE, a prevalência desta classe foi relacionada ao inóculo do reator, uma vez que este surfactante não iônico não apresenta nenhum composto de enxofre em sua molécula. A fonte de enxofre neste estudo (para manutenção metabólica deste grupo de microrganismo) pode ter sido originada do extrato de levedura (biotina) adicionado ao substrato sintético.

Foram encontrados a proporção de 23,1%; 15,7%; 0,6% e 5,7% da classe Negativicutes em amostras do MS-C, SF-C, MS-S e SF-S, respectivamente. Bactérias desta classe são pertencentes ao filo Firmicutes, no qual os membros deste grupo possuem composição peculiar da parede celular (Gram negativas), ao contrário dos outros membros deste filo (MOROTOMI; NAGAI; SAKON, 2007). Este grupo de microrganismos esteve em maior proporção na Fase IV com presença de sacarose, quando este co-substrato foi removido do meio a prevalência desta classe diminuiu (Tabela 34).

O transporte de sacarose e outros carboidratos para dentro das células bacterianas é realizado por meio de proteínas de membranas específicas que catabolizam o substrato por mecanismos altamente regulatórios a fim de conservar a energia celular. Estes mecanismos de transporte de carboidratos para dentro da célula em bactérias mesofílicas são realizados por transportadores de cátions e prótons acoplados, ligações ATP dependentes, bem como, fosfoenolpiruvato (sistema glicose fósforo transferase) (KONING et al., 2002).

Segundo Varrot et al. (2005), os genes que catabolizam a sacarose são expressos somente quando este substrato está presente no meio, esta regulação dos genes ocorre ao nível de transcrição ou repressão da via catabólica. Nas bactérias Gram negativas a rota de transporte da sacarose extracelular para o periplasma é realizado por meio de canais de porinas da membrana externa e é, em seguida, transportada através da membrana interna para dentro da célula (COSTA-RIU et al., 2003). A presença da sacarose na Fase IV e a característica de transporte e metabolismo da sacarose presente neste grupo bacteriano podem ter influenciado na proporção desta classe (Negativicutes) nesta fase operacional, quando comparado com a Fase V, principalmente devido a maior presença no material suporte, a qual recebia a maior concentração de sacarose afluente, quando comparado com o separador de fases.

As bactérias da classe Holophagae são bacilos, Gram negativos anaeróbios estritos, mesofílicos e quimio-organotróficos que podem fermentar trimetoxibenzoatos e

trihidroxibenzenos em acetato (KRIEG et al., 2010). Os membros deste grupo utilizam fumarato como doadores de elétrons, bem como, compostos metilados aromáticos, citrato e piruvato na respiração anaeróbia e fermentação homoacetogênica (COATES et al., 1999; LIESACK et al., 1994).

Representantes das classes Holophagae e Acidobacteria_Gp17 foram identificados apenas nas amostras da Fase V. Os membros da classe Acidobacteria_Gp17 são abundantemente distribuídos no ambiente, estão envolvidos diretamente no ciclo do carbono, podem ser encontradas em solos, sedimentos, água doce e marinha, e ambientes poluídos (WARD et al., 2009). Segundo Ward et al. (2009) alguns membros deste grupo são favorecidos em meio com baixa concentração de nutrientes (crescimento lento), exigindo vários dias ou semanas para formar colônias. Bactérias pertencentes a essa classe foram identificadas na fase operacional sem o acréscimo de sacarose ao substrato sintético. A classe Holophagae foi encontrada também em estudos de Carosia (2011) e Ferreira (2012), na remoção de detergente de uso doméstico contendo LAS em reatores de leito fluidificado.

Representantes das classes Lentisphaeria e Flavobacteria foram identificados no material suporte e separador de fase. Okada (2012) também identificou bactérias pertencentes as duas classes em reator UASB usado na remoção de LAS em água residuária de lavanderia. Carosia (2011) identificou bactérias pertencentes a classe Flavobacteria, bem como, Epsilonproteobacteria, apenas no material suporte do reator de leito fluidificado.

Na classe Flavobacteria estão incluídas bactérias Gram negativas, quimiorganotróficas, mesofílicas, com metabolismo aeróbio e anaeróbio e habitam ecossistemas terrestres e aquáticos (BERNARDET et al., 1996). O fato de terem metabolismo versátil justifica a presença desta classe de bactérias no separador de fases do reator; onde prevalecia ambiente com menor turbulência e maior troca gasosa, quando comparado com o material suporte.

Semelhante a Carosia (2011), as bactérias pertencentes a classe Epsilonproteobacteria estiveram presentes no material suporte do reator de leito fluidificado. Entretanto, Delforno (2011) identificou este mesmo grupo microbiano no leito do reator EGSB, usado na remoção de LAS. Segundo Okada (2012), que também identificou representantes desta classe de microrganismos em reator UASB, a presença deste grupo microbiano pode estar associada a sua capacidade deste grupo microbiano de persistir em ambientes sob condições adversas, principalmente quando há a disponibilidade de butirato no meio, sendo este proveniente da degradação anaeróbia de compostos orgânicos.

Assim como, as demais classes citadas anteriormente, representantes das classes Mollicutes, Spartonobacteria, Spirochaetes e Ktedonobacteria, foram identificados somente no separador de fases na condição, sem sacarose. Notou-se que a presença de sacarose interferiu na diversidade de classes de bactérias presentes, tanto no material suporte, quanto no separador de fases do reator de leito fluidificado.

5.12.3.5 – Ordens

As ordens dos microrganismos com maior proporção (referente a abundância relativa) no material suporte da Fase IV (MS-C) foram relacionadas com Selenomonadales (23,2%), Desulfuromonadales (17,1%), Desulfobacterales (16,2%), Clostridiales (9,4%) e Synergistales (8,1%). Para o separador de fase na mesma fase operacional (SF-C) foram identificadas bactérias pertencentes em maior proporção as ordens Desulfuromonadales (20,3%), Selenomonadales (15,7%), Holophagales (10,3%), Rhodocyclades (8,3%) e Clostridiales (8,2%) (Tabela 35).

Para a fase operacional sem a adição de sacarose (Fase V) referente ao material suporte (MS-S) foram identificadas bactérias (referente a abundância relativa) incluídas nas ordens Holophagales (36,7%), Desulfobacterales (22%), Desulfuromonadales (16,9%) Rhodocyclades (11,2%) e Clostridiales (5,5). Para o separador de fases (SF-S) desta mesma fase operacional foram identificadas bactérias pertencentes as ordens Holophagales (31,4%), Desulfuromonadales (19,6%), Clostridiales (11,1%), Acholeplasmatales (8,7%) e Selenomonadales (5,7%) (Tabela 35).

Tabela 35 – Distribuição das ordens identificadas na biomassa do reator de leito fluidificado

Ordem	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
Acholeplasmatales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	121	2	8,7
Actinomycetales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	0,3
Aeromonadales	22	3	1,7	48	3	3,3	49	2	1,8	17	2	1,2
Anaerolineales	13	4	1,0	6	2	0,4	-	-	-	6	2	0,4
Armatimonadetes	-	-	-	2	1	0,1	-	-	-	-	-	-
Bacteroidales	4	2	0,3	7	1	0,5	6	1	0,2	24	1	1,7
Burkholderiales	-	-	-	4	1	0,3	3	1	0,1	24	1	1,7
Campylobacterales	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caulobacterales	4	2	0,3	26	3	1,8	50	2	1,8	18	4	1,3
Chromatiales	14	2	1,1	18	2	1,3	-	-	-	-	-	-
Clostridiales	121	8	9,4	117	13	8,2	151	14	5,5	154	18	11,1
Desulfobacterales	208	4	16,2	81	4	5,6	609	6	22,0	69	2	5,0
Desulfovibrionales	11	3	0,9	4	2	0,3	10	3	0,4	2	1	0,1
Desulfuromonadales	220	7	17,1	292	9	20,3	468	10	16,9	273	10	19,6
Enterobacterales	4	1	0,3	16	1	1,1	-	-	-	-	-	-
Flavobacterales				18	2	1,3	-	-	-	32	3	2,3
Fusobacterales	10	3	0,8	6	3	0,4	4	1	0,1	6	2	0,4
Gemmatimonadales	13	1	1,0	4	2	0,3	-	-	-	2	1	0,1
Gp17	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1	-	-	-
Holophagales	46	5	3,6	148	5	10,3	1015	11	36,7	437	10	31,4
Hydrogenophilales	3	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ignavibacterales	4	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ktedonobacterales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
Nitrosomonadales	2	1	0,2	17	2	1,2	-	-	-	-	-	-
Pseudomonadales	40	3	3,1	92	3	6,4	9	1	0,3	2	1	0,1
Rhizobiales	16	4	1,2	11	4	0,8	16	3	0,6	11	2	0,8
Rhodocyclales	34	8	2,7	119	7	8,3	310	7	11,2	40	5	2,9
Rhodospirillales	4	2	0,3	-	-	-	3	1	0,1	9	2	0,6
Selenomonadales	298	12	23,2	225	10	15,7	16	3	0,6	79	9	5,7
Spartobacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	0,2
Sphingobacterales	2	1	0,2	2	1	0,1	-	-	-	13	3	0,9
Sphingomonadales	-	-	-	4	1	0,3	6	1	0,2	6	1	0,4

Continua...

Ordem	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
Spirochaetales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	0,4
Subdivision3	7	2	0,5	9	3	0,6	6	2	0,2	-	-	-
Subdivision5	2	1	0,2	7	2	0,5	-	-	-	-	-	-
Synergistales	104	4	8,1	62	4	4,3	25	3	0,9	21	3	1,5
Syntrophobacterales	11	2	0,9	5	1	0,3	-	-	-	2	1	0,1
Syntrophorhabdaceae	56	4	4,4	37	5	2,6	5	2	0,2	6	2	0,4
Verrucomicrobiales	4	1	0,3	6	1	0,4	6	1	0,2	3	1	0,2
Victivallales	4	1	0,3	41	3	2,9	-	-	-	-	-	-
Xanthomonadales	-	-	-	3	1	0,2	-	-	-	2	1	0,1

A – Abundância relativa, U – UTOs (*Operation taxonomic units*), % - Porcentagem relativa a abundância relativa das amostras. MS-C – Amostra do material suporte da Fase IV (com sacarose), SF-C – Amostra do separador de fases da Fase IV (com sacarose), MS-S – Amostra do material suporte da Fase V (sem sacarose), SF-S – Amostra do separador de fases da Fase V (sem sacarose).

Bactérias pertencentes as ordens mais abundantes observadas neste estudo e relacionadas a Selenomonadales, Desulfuromonadales, Clostridiales e Holophogales são encontradas em diversos ecossistemas. Os integrantes da ordem Selenomonadales realizam fermentação de compostos orgânicos até ácido acético por diversas vias e também por meio da rota da Acetil-CoA (VANDIEKEN; THAMDRUP, 2013).

As bactérias pertencentes aos ordens Desulfuromonadales (16,9-20,3%) e Campylobacterales (0,2%) são capazes de oxidar o acetato (VANDIEKEN; THAMDRUP, 2013). Delforno (2011) também identificou 27,9% de bactérias pertencentes a ordem Desulfuromonadales na remoção de LAS em reator EGSB.

A ordem Holophogales compreende microrganismos anaeróbios estritos, fermentadores obrigatórios, e também, podem oxidar compostos aromáticos em ácido acético. Possuem crescimento ótimo entre 28°C e 32°C e em pH de 6,8 a 7,5; alguns membros desta ordem desempenham metabolismo homoacetogênico (FUKUNAGA et al., 2008). Okada (2012) também identificou microrganismos pertencentes a esta ordem em reator UASB usado na degradação de LAS em água de lavanderia comercial.

Bactérias pertencentes a ordem Clostridiales foram observadas principalmente no meio suporte de ambas as fases, com e sem sacarose e, em menor proporção no separador de fases. Duarte et al. (2008) identificaram bactérias pertencentes a essa ordem em reator anaeróbio horizontal de leito fixo usado na degradação de LAS. Oliveira et al. (2013) também

encontraram bactérias semelhantes a essa ordem em reator anaeróbio de leito fluidificado empregado na remoção de LAS. As bactérias pertencentes a esta ordem podem usar compostos xenobióticos como receptores de elétrons, e algumas delas podem inclusive ser responsável pela degradação anaeróbia de surfactantes, principalmente o LAS, uma vez que, várias espécies da ordem Clostridiales podem dessulfonar a porção alquil deste surfactante (DUARTE et al., 2010).

Foram encontradas as seguintes ordens em comuns ao material suporte (MS-C) e o separador de fases (SF-C) na Fase IV: Chromatiales (1,1% e 1,3), Enterobacteriales (0,3% e 1,1%), Nitrosomonas (0,2% e 1,2%), Subdivisão5 (0,2% e 0,5%) e Victivallales (0,3% e 2,9%). Entre as amostras do separador de fases (SF-C e SF-S) foram encontradas as ordens Flavobacteriales (1,3% e 2,3%) e Xanthomonadales (0,2% e 0,1%) em comuns.

Representantes das ordens Campylobacteriales (0,2%), Hydrogenophilales (0,2%) e Ignavibracteriales (0,3%), foram identificadas apenas na amostra MS-C. Outras bactérias foram identificadas apenas nas amostras SF-C e MS-S e incluídas nas ordens Armatiomonadetes (0,1%) e Gp17 (0,1%). Bactérias pertencentes às ordens Acholeplasma (8,7%), Actinomycetales (0,3%), Ktedonobacteriales (0,1%), Spartobacteria (0,2%) e Spirochaetales (0,4%), somente foram identificadas no separador de fases da Fase V (SF-S).

5.12.3.6 – Famílias

As sequências identificadas foram incluídas em famílias, sendo 35 observadas na biomassa do material suporte da Fase IV (MS-C), 37 no separador de fases da Fase IV (SF-C), 29 do material suporte da Fase V (MS-S) e 39 no separador de fases da Fase V (SF-S) (Tabela 36).

Nota-se que essa distribuição esteve uniforme no que diz respeito ao material suporte e separador de fase na Fase IV. Entretanto, na Fase V verificou-se menor número de famílias (29) na biomassa do MS-S, enquanto, no SF-S observou-se o maior número de família dentre todas as amostras analisadas.

Observou-se a maior proporção de família (abundância relativa) de bactérias relacionadas com Veillonellaceae (23%), Geobacteraceae (17%), Desulfobulbaceae (16,3%), Synergistaceae (8,1%) e Clostridiales (5,1%), para a biomassa do MS-C. Geobacteraceae (20,3%), Veillonellaceae (15,4%), Holophagaceae (10,3%), Rhodocyclaceae (8,3%),

Pseudomonadaceae (6,4%) e Desulfobulbaceae (5,6%) foram observadas para biomassa do separador de fases da mesma fase operacional (Fase IV).

As famílias Holophagaceae (36,6%), Desulfobulbaceae (21,9%), Geobacteraceae (16,9%), Rhodocyclaceae (11,2%) e Clostridiales (3,4%), foram as mais abundantes no material suporte da Fase V. Para o separador de fases na Fase V foram encontradas as famílias Holophagaceae (32,3%), Geobacteraceae (20,1%), Acholeplasmataceae (8,9%), Clostridiales (7,5%) e Desulfobulbaceae (5,1%), sendo estas com maior abundancia relativa.

Tabela 36 – Distribuição das famílias nas amostras do reator de leito fluidificado

Família	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
Acetobacteraceae	-	-	-	-	-	-	3	1	0,1	-	-	-
Acholeplasmataceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	121	2	8,9
Acidaminococcaceae	3	1	0,2	3	1	0,2	-	-	-	10	1	0,7
Aeromonadaceae	22	3	1,7	48	3	3,3	49	2	1,8	17	2	1,3
Anaerolineaceae	15	5	1,2	6	2	0,4	-	-	-	6	2	0,4
Armatimonadetes	-	-	-	2	1	0,1	-	-	-	-	-	-
Beijerinckiaceae	-	-	-	-	-	-	4	1	0,1	-	-	-
Bradyrhizobiaceae	13	3	1,0	9	3	0,6	9	1	0,3	9	1	0,7
Burkholderiales	-	-	-	4	1	0,3	-	-	-	2	1	0,1
Campylobacteraceae	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caulobacteraceae	10	2	0,8	26	3	1,8	50	2	1,8	18	4	1,3
Chitinophagaceae	2	1	0,2	2	1	0,1	-	-	-	11	2	0,8
Clostridiales Sedis XI	65	3	5,1	66	5	4,6	94	6	3,4	101	7	7,5
Clostridiales Sedis XIII	-	-	-	6	2	0,4	9	1	0,3	12	2	0,9
Comamonadaceae	-	-	-	-	-	-	3	1	0,1	-	-	-
Cryomorphaceae	-	-	-	6	1	0,4	-	-	-	20	1	1,5
Cytophagaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
Desulfobulbaceae	208	4	16,3	81	4	5,6	609	6	21,9	69	2	5,1
Desulfovibrionaceae	11	3	0,9	4	2	0,3	10	3	0,4	2	1	0,1
Enterobacteriaceae	4	1	0,3	16	1	1,1	-	-	-	-	-	-
Erythrobacteraceae	-	-	-	-	-	-	7	1	0,3	-	-	-

Continua...

Família	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
Flavobacteriaceae	-	-	-	12	1	0,8	-	-	-	12	2	0,9
Fusobacteriaceae	10	3	0,8	6	3	0,4	4	1	0,1	6	2	0,4
Gemmatimonadaceae	13	1	1,0	4	2	0,3	-	-	-	2	1	0,1
Geobacteraceae	220	7	17,2	292	9	20,3	468	10	16,9	273	10	20,1
Gp17	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1	-	-	-
Gracilibacteraceae	-	-	-	8	2	0,6	7	2	0,3	9	3	0,7
Halothiobacillaceae	14	2	1,1	18	2	1,3	-	-	-	-	-	-
Holophagaceae	46	5	3,6	148	5	10,3	1015	11	36,6	437	10	32,3
Hydrogenophilaceae	3	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ignavibacteriaceae	4	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ktedonobacteraceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
Lachnospiraceae	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leptospiraceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	0,4
Methylocystaceae	2	1	0,1	-	-	-	3	1	0,1	-	-	-
Moraxellaceae	2	1	0,2				9	1	0,3	2	1	0,1
Nitrosomonadaceae	2	1	0,2	17	2	1,2	-	-	-	-	-	-
Nocardiaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	0,3
Peptostreptococcaceae	32	2	2,5	27	2	1,9	16	1	0,6	13	2	1,0
Peptostreptococcaceae	-	-	-	-	-	-	9	2	0,3	12	1	0,9
Porphyromonadaceae	4	2	0,3	7	1	0,5	6	1	0,2	24	1	1,8
Pseudomonadaceae	38	2	3,0	92	3	6,4	-	-	-	-	-	-
Rhodocyclaceae	34	8	2,7	119	7	8,3	310	7	11,2	9	3	0,7
Rhodospirillaceae	4	2	0,3	-	-	-	-	-	-	9	2	0,7
Ruminococcaceae	5	1	0,4	10	2	0,7	11	1	0,4	2	1	0,1
Spartobacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	0,2
Sphingomonadaceae	-	-	-	4	1	0,3	6	1	0,2	6	1	0,4
Subdivision3	7	2	0,5	9	3	0,6	6	2	0,2	-	-	-
Subdivision5	2	1	0,2	7	2	0,5	-	-	-	-	-	-
Synergistaceae	104	4	8,1	62	4	4,3	25	3	0,9	36	5	2,7
Syntrophaceae	-	-	-	5	1	0,3	-	-	-	2	1	0,1
Syntrophomonadaceae	17	1	1,3	-	-	-	5	1	0,2	5	2	0,4
Syntrophorhabdaceae	56	4	4,4	37	5	2,6	5	2	0,2	6	2	0,4
Veillonellaceae	295	11	23,0	222	9	15,4	16	3	0,6	69	8	5,1

Continua...

Família	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
Verrucomicrobiaceae	4	1	0,3	6	1	0,4	6	1	0,2	3	1	0,2
Victivallaceae	4	1	0,3	41	3	2,9	-	-	-	-	-	-
Xanthobacteraceae	3	1	0,2	3	1	0,2	-	-	-	2	1	0,1

A – Abundância relativa, U – UTOs (*Operation taxonomic units*), % - Porcentagem relativa a abundância relativa das amostras. MS-C – Amostra do material suporte da Fase IV (com sacarose), SF-C – Amostra do separador de fases da Fase IV (com sacarose), MS-S – Amostra do material suporte da Fase V (sem sacarose), SF-S – Amostra do separador de fases da Fase V (sem sacarose).

Representantes similares a membros das famílias Campylobacteraceae (0,2%), Hydrogenophilaceae (0,2%), Ignavibacteriaceae (0,3%) e Lachnospiraceae (0,2%) só foram identificadas na biomassa do material suporte da Fase IV, assim como, bactérias semelhantes a família Armatimonadetes (0,1%) só observadas na biomassa do separador de fase da mesma fase operacional.

Representantes das famílias Enterobacteriaceae (0,3-1,1%), Halothiobacillaceae (1,1-1,3%), Nitrosomonadaceae (0,2-1,2%), Pseudomonadaceae (3,0-6,4%), Victivallaceae (0,3-2,9%), e Subdivision5 (0,2-0,5%), foram evidenciadas apenas nas amostras da Fase IV (MS-C e SF-C). Os grupos microbianos pertencentes as famílias Pseudomonadaceae e Enterobacteriaceae podem ter como principais produtos da fermentação de carboidratos, lactato, acetato, succinato e formiato (JACOBS et al., 2009).

Os integrantes da família Victivallaceae podem ter como produto da fermentação o acetato, etanol e H₂ (JACOBS et al., 2009). Alguns destes compostos foram encontrados no efluente do reator, principalmente ácidos orgânicos. Assim, a sacarose pode ter proporcionado melhores condições ambientais para estes microrganismos nesta fase operacional.

Representantes das famílias Acetobacteraceae (0,1%), Beijerinckiaceae (0,1%), Comamonadaceae (0,1%), Erythrobacteraceae (0,3%) e Gp17 (0,1%) foram identificadas somente no material suporte da Fase V (MS-S). Nesta mesma fase operacional, porém, no separador de fases (SF-S) identificou-se representantes pertencentes as famílias Achaeplasmataceae (8,9%), Ktedonobacteraceae (0,1%), Leptospiraceae (0,4%), Nocardiaceae (0,3%) e Spartobacteria (0,2%), como exemplares únicos nesta partição do reator.

5.12.3.7 – Gêneros

Identificou-se o total de 83 gêneros na biomassa do reator de leito fluidificado, sendo estes distribuídos no material suporte (49) da Fase IV (MS-C), separador de fases (45) da Fase IV (SF-C), material suporte (34) da Fase V (MS-S) e no separador de fases (49) da Fase V (SF-S) (Tabela 37). Notou-se que a distribuição do número de gêneros nas amostras analisadas foi homogênea. Entretanto, na biomassa do MS-S (Fase V) foram identificados menor número de gêneros.

Tabela 37 – Distribuição dos gêneros na biomassa do reator de leito fluidificado

Gênero	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
<i>Acetoanaerobium</i>	-	-	-	-	-	-	9	2	0,3	13	2	0,9
<i>Acholeplasma</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	121	2	8,7
<i>Acinetobacter</i>	2	1	0,2				9	1	0,3	2	1	0,1
<i>Aeromonas</i>	20	2	1,6	46	2	3,2	49	2	1,8	17	2	1,2
<i>Agromonas</i>	4	1	0,3	3	1	0,2	-	-	-	-	-	-
<i>Aminomonas</i>	22	1	1,7	17	1	1,2	8	1	0,3	13	1	0,9
<i>Anaerosinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
<i>Anaerovorax</i>				6	0	0,4	9	1	0,3	12	2	0,9
<i>Aquabacterium</i>	-	-	-	4	0	0,3	-	-	-	2	1	0,1
<i>Arcobacter</i>	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Armatimonadetes</i>	-	-	-	2	0	0,1	-	-	-	-	-	-
<i>Azonexus</i>	12	3	0,9	64	3	4,5	299	3	10,8	31	2	2,2
<i>Azospira</i>	6	2	0,5	-	-	-	-	-	-	3	1	0,2
<i>Azovibrio</i>	9	1	0,7	24	1	1,7	-	-	-			
<i>Bellilinea</i>	2	1	0,2	2	1	0,1	-	-	-	2	1	0,1
<i>Bilophila</i>	11	3	0,9	4	3	0,3	10	3	0,4	2	1	0,1
<i>Bosea</i>	-	-	-	-	-	-	9	1	0,3	-	-	-
<i>Caulobacter</i>	-	-	-	-	-	-	7	1	0,3	7	2	0,5
<i>Cetobacterium</i>	10	3	0,8	6	3	0,4	4	1	0,1	6	2	0,4
<i>Chelatococcus</i>	-	-	-	-	-	-	4	1	0,1	-	-	-
<i>Cloacibacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1

Continua...

Gênero	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
<i>Clostridium III</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
<i>Clostridium XIVb</i>	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Croceicoccus</i>	-	-	-	-	-	-	7	1	0,3	-	-	-
<i>Dechloromonas</i>	-	-	-	-	-	-	3	1	0,1	-	-	-
<i>Delftia</i>	-	-	-	-	-	-	3	1	0,1	-	-	-
<i>Desulfobulbus</i>	208	4	16,1	81	4	5,6	609	6	21,9	69	2	5,0
<i>Desulfosporomusa</i>	9	2	0,7	3	2	0,2	-	-	-	4	1	0,3
<i>Dongia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
<i>Ferruginibacter</i>	-	-	-	2	0	0,1	-	-	-	11	2	0,8
<i>Flavobacterium</i>	-	-	-	12	0	0,8	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	1	0,7
<i>Gemmatimonas</i>	13	1	1,0	4	1	0,3	-	-	-	2	1	0,1
<i>Geobacter</i>	220	7	17,1	292	7	20,3	468	10	16,9	273	10	19,7
<i>Gordonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	0,3
<i>Gp17</i>	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1	-	-	-
<i>Gracilibacter</i>	-	-	-	8	0	0,6	7	2	0,3	9	3	0,7
<i>Holophaga</i>	46	5	3,6	148	5	10,3	1015	11	36,6	437	10	31,6
<i>Ignavibacterium</i>	4	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ktedonobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
<i>Leptonema</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	0,4
<i>Levilinea</i>	4	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Longilinea</i>	7	2	0,5	4	2	0,3	-	-	-	4	1	0,3
<i>Luteolibacter</i>	4	1	0,3	6	1	0,4	6	1	0,2	3	1	0,2
<i>Magnetospirillum</i>	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	7	1	0,5
<i>Meniscus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
<i>Nitrosomonas</i>	2	1	0,2	17	1	1,2	-	-	-	-	-	-
<i>Novosphingobium</i>	-	-	-	4	0	0,3	-	-	-	-	-	-
<i>Oceanibaculum</i>	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oligotropha</i>	4	1	0,3	3	1	0,2	-	-	-	-	-	-
<i>Paludibacter</i>	2	1	0,2	7	1	0,5	6	1	0,2	24	1	1,7
<i>Papillibacter</i>	5	1	0,4	10	1	0,7	11	1	0,4	-	-	-
<i>Phenylobacterium</i>	10	2	0,8	26	2	1,8	43	1	1,5	11	2	0,8
<i>Pleomorphomonas</i>	-	-	-	2	0	0,1	3	1	0,1	-	-	-

Continua...

Gênero	MS-C			SF-C			MS-S			SF-S		
	A	U	%	A	U	%	A	U	%	A	U	%
<i>Propionivibrio</i>	-	-	-	-	-	-	6	2	0,2	-	-	-
<i>Proteocatella</i>	32	2	2,5	27	2	1,9	16	1	0,6	12	1	0,9
<i>Pseudolabrys</i>	3	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rahnella</i>	4	1	0,3	16	1	1,1	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodanobacter</i>	-	-	-	3	0	0,2	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodopseudomonas</i>	5	1	0,4	3	1	0,2	-	-	-	9	1	0,7
<i>Rhodovarius</i>	-	-	-	-	-	-	3	1	0,1	-	-	-
<i>Sedimentibacter</i>	65	3	5,0	66	3	4,6	94	6	3,4	101	7	7,3
<i>Serpens</i>	38	2	2,9	92	2	6,4	-	-	-	-	-	-
<i>Smithella</i>	11	2	0,9	5	2	0,3	-	-	-	2	1	0,1
<i>Spartobacteria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	0,2
<i>Sphingobium</i>	-	-	-	-	-	-	6	1	0,2	6	1	0,4
<i>Sporomusa</i>	286	9	22,2	219	9	15,2	16	3	0,6	63	6	4,6
<i>Subdivision3</i>	7	2	0,5	9	2	0,6	6	2	0,2	-	-	-
<i>Subdivision5</i>	2	1	0,2	7	1	0,5	-	-	-	-	-	-
<i>Succinispira</i>	3	1	0,2	3	1	0,2	-	-	-	10	1	0,7
<i>Synergistes</i>	82	3	6,4	45	3	3,1	17	2	0,6	21	3	1,5
<i>Syntrophomonas</i>	17	1	1,3	-	-	-	5	1	0,2	5	2	0,4
<i>Syntrophorhabdus</i>	56	4	4,3	37	4	2,6	5	2	0,2	6	2	0,4
<i>Tannerella</i>	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Terrimonas</i>	2	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thauera</i>	5	1	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thermomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
<i>Thiobacillus</i>	3	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thiovirga</i>	14	2	1,1	18	2	1,3	-	-	-	-	-	-
<i>Tolumonas</i>	2	1	0,2	2	1	0,1	-	-	-	-	-	-
<i>Victivallis</i>	4	1	0,3	41	1	2,9	-	-	-	-	-	-
<i>Wandonia</i>	-	-	-	6	0	0,4	-	-	-	20	1	1,4
<i>Xanthobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0,1
<i>Zoogloea</i>	2	1	0,2	31	1	2,2	2	1	0,1	6	2	0,4

A – Abundância relativa, U – UTOs (Unidades taxonômicas operacionais), % - Porcentagem relativa a abundância relativa das amostras. MS-C – Amostra do material suporte da Fase IV (com sacarose), SF-C – Amostra do separador de fases da Fase IV (com sacarose), MS-S – Amostra do material suporte da Fase V (sem sacarose), SF-S – Amostra do separador de fases da Fase V (sem sacarose).

5.12.3.7.1 – Gêneros identificados na biomassa do material suporte da Fase IV (MS-C)

Identificou-se 49 gêneros na biomassa do material suporte da Fase IV (MS-C), com abundância relativa entre 0,2% e 22%. Dentre estes gêneros 55,5% são considerados anaeróbios estritos, 15,5% anaeróbios facultativos, 13,3% microaerófilos e 15,5% aeróbios. A maioria dos gêneros identificados são Gram negativos (88%) e apenas três gêneros são formadores de endósporos (*Desulfosporomusa*, *Proteocatella* e *Sedimentibacter*).

Os cinco gêneros com maior abundância relativa identificados foram *Sporomusa* (22,2%), *Geobacter* (17,1%), *Desulfobulbus* (16,1%), *Synergistes* (6,4%) e *Sedimentibacter* (5%) (Figura 44). Os gêneros *Arcobacter* (0,2), *Clostridium XIVb* (0,2), *Ignavibacterium* (0,3), *Levilinea* (0,3%), *Oceanibacterium* (0,2%), *Pseudolabrys* (0,2%), *Tannerella* (0,2%), *Terrimonas* (0,2%), *Thauera* (0,4%) e *Thiobacillus* (0,2%), somente, foram evidenciados na biomassa do material suporte da fase com sacarose (Figura 44).

Figura 44 – Distribuição dos gêneros (%) referente a abundância relativa na amostra do material suporte da Fase IV (MS-C)

Bactérias semelhantes a *Sporomusa* utilizam etileno glicol e compostos com carbono primário (C1), ambos podem ser originados como subprodutos da degradação do AE, que

pode ter sido utilizado como fonte de carbono por estes microrganismos (DWORKIN et al., 2006).

Desulfobulbus utilizam ácidos orgânicos e alcoóis como doadores de elétrons (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Estes compostos podem ter sido provenientes da degradação das cadeias alquílicas do surfactante AE.

Segundo Mungray e Kumar (2008), *Synergistes* além de ser capaz de degradar compostos tóxicos tem a atividade enzimática proteolítica aumentada quando submetidos à concentração de 0,15% do surfactante não iônico TWEEN 80, o que pode ter favorecido este gênero no reator em estudo.

Alguns gêneros identificados na biomassa aderida a areia da Fase IV, tais como, *Geobacter* são capazes de degradar compostos recalcitrantes, compostos tóxicos de cadeia alifática (*Paludibacter*), compostos tóxicos (*Desulfosporomusa*) e surfactantes aniônicos, como o LAS (*Holophaga*, *Bilophila*, *Levilinea*) (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005; DEFNOUN et al., 2000; DELFORNO et al., 2012; GILBRIDE; FULTHORPE, 2004; LAUE DINGER; COOK, 1997; LAUE; COOK, 2000; OKADA, 2012; OLIVEIRA et al., 2009; SASS et al., 2004;).

Apesar da condição anaeróbia do reator de leito fluidificado foram identificadas bactérias aeróbias, as quais podem se manter em condição de escassez de oxigênio, como é o caso de *Acinetobacter* (0,2%), *Serpens* (2,9%) e *Zoogloea* (0,2%), que utilizam nitrato como receptor final de elétrons ao invés do oxigênio, este ultimo gênero podendo permanecer sob condições anóxicas (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005; JUNI, 1954). O nitrato, como receptor de elétrons, é oriundo dos compostos nitrogenados presentes no extrato de levedura adicionado ao substrato sintético.

Alguns gêneros com menor abundância podem ter sido favorecidos pelo meio nutricional (substrato sintético), bem como por metabólitos de outros microrganismos presente no reator, como é o caso do gênero *Azonexus* (0,9%), que é considerado microaerófilo e podem utilizar tanto o N₂ da atmosfera como ácidos orgânicos (succinato e acetato) e etanol como fonte de carbono (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2006) .

Os microrganismos semelhantes a *Agromonas* (0,3%) possui papel importante na degradação da matéria orgânica, e sobrevivem em condições oligotróficas (baixa concentração de nutrientes) (OHTA; HATTORI, 1983), bem como, os representantes do gênero *Oligotrophia* (0,3%) que são considerados aeróbios mas podem utilizar monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio para o crescimento autotrófico

(DEBARATI et al., 2008). Este último gênero segundo Malik, Kimchhayarasy e Kakii (2005) podem ter seu metabolismo alterado quando submetidos a surfactantes aniônico como o LAS.

Bactérias semelhantes a *Syntrophomonas* (1,3%), utilizam ácidos graxos de cadeia longa (C4 a C18) como fonte de carbono (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005), e aquelas relacionadas a *Paludibacter* degradam compostos com cadeias alifáticas (PEI et al., 2010; UEKI et al., 2006). Provavelmente, estes gêneros estão relacionados diretamente com a degradação do AE, bem como, dos subprodutos gerados pela quebra da molécula deste surfactante. Fato evidenciado também pela identificação de bactérias semelhantes a *Nitrossomonas*, as quais além de degradar compostos aromáticos possui a capacidade de utilizar etileno como fonte de carbono (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005).

O substrato sintético contendo extrato de levedura e sacarose favoreceu bactérias semelhantes a *Gemmatimonas*, *Sedimentibacter*, *Serpens*, *Proteocatella*, *Amminomonas*, *Levilinea*, *Longilinea*, *Bellilinea* e *Succispira*, uma vez que os microrganismos pertencentes a estes gêneros possuem o crescimento estimulado quando submetidos a essa condição nutricional (BAENA et al., 1999; BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005; HESPELL et al., 1977; JANSSEN; FARRELL, 1999; KRIEG et al., 2010; OKADA, 2012; PIKUTA et al., 2009; YAMADA et al., 2006, 2007).

Identificou-se também bactérias semelhantes a *Rhodopseudomonas*, *Thauera*, *Ignavibacterium* e *Victivallis*. Tais microrganismos possuem metabolismo bastante versátil e podem utilizar alcoóis, aminoácidos, ácidos orgânicos, diversos açúcares, como a sacarose, e até mesmo compostos tóxicos como fonte de carbono (KIM et al., 2004; LINO et al., 2010; LIU et al., 2013; WEAVER; WALL; GEST, 1975; ZOETENDAL et al., 2003).

5.12.3.7.2 – Gêneros identificados na biomassa do separador de fases da Fase IV (SF-C)

Identificou-se 45 gêneros na biomassa do separador de fases da Fase IV (SF-C), com abundância relativa entre 0,1% e 20,3% . Dentre estes gêneros 50% são considerados anaeróbios estritos, 14% anaeróbios facultativos, 9% microaerófilos e 27% aeróbios. No separador de fases como há maior troca gasosa entre o líquido e atmosfera notou-se maior número de gêneros aeróbios nesta porção do reator quando comparado como o material suporte da mesma fase operacional. Por meio dessa constatação é possível inferir sobre a

influência da configuração do reator na seleção microbiana. A maioria dos gêneros identificados são Gram negativos (85%) e apenas dois gêneros são formadores de endósporos (*Desulfosporomusa*, *Proteocatella*).

Os gêneros mais abundantes identificados na amostra do separador de fases da Fase IV foram *Geobacter* (20,3%), *Sporomusa* (15,2%), *Holophaga* (10,3%), *Serpens* (6,4%) e *Desulfobulbus* (5,6%) (Figura 45). Os gêneros que foram evidenciados somente nesta amostra foram *Aquabacterium* (0,3%), *Armatimonadetes* (0,1%), *Flavobacterium* (0,8%), *Novosphingobium* (0,3%) e *Rhodanobacter* (0,2%) (Figura 45).

Figura 45 – Distribuição dos gêneros (%) referente a abundância relativa da biomassa do separador de fases da Fase IV (SF-C)

De maneira geral a degradação anaeróbia de polietilenoglicóis (PEG), subprodutos da degradação de álcool etoxilado de cadeia não ramificada ocorre por meio de microrganismo fermentadores (DWYER; TIEDJE, 1983; 1986; SCHINK; STIEB, 1983; WAGENER; SCHINK, 1988), desnitrificantes (GRANT e PAYNE, 1983) e sulfato-redutoras (DWYER; TIEDJE, 1986). Esta degradação pode proceder de forma diferente, conforme a comunidade microbiana presente no reator.

Na biomassa do separador de fases da Fase IV (SF-C) os dois gêneros identificados com maior foram *Geobacter* e *Sporomusa*, ambos anaeróbios. *Sporomusa* pode utilizar gases

como H_2 e CO_2 em seu metabolismo presentes em maior proporção no separador de fases, quando comparado com a porção inferior do reator de leito fluidificado, oxida açúcares (frutose), ácidos orgânicos (lactato), etileno glicóis, alcoóis (metanol, etanol) e compostos com uma molécula de carbono, tendo como principal produto da fermentação ácido acético (BREZNAK; SWITZER; SEITZ, 1988; DWORKIN; NORDT; ATCHLEY, 2005).

Membros do gênero *Geobacter* são capazes de oxidar compostos orgânicos recalcitrantes poluentes e metais como o ferro (Fe III) (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Estes microrganismos podem utilizar o gás carbônico, metano, metanol, etileno (subprodutos da degradação do AE), propileno, bromoetano e tricloroetileno, como fonte de carbono (ARCIERO et al., 1989). Bazylnski et al., (2000) relacionaram a fixação de nitrogênio a este gênero, com aquelas bactérias semelhantes a *Magnetospirillum*, também encontrado neste presente estudo (MS-C: 0,2% e SF-S: 0,5%). Bactérias semelhantes a *Magnetospirillum* possuem microrganismos microaerófilos, quimiorganotróficos, que não fermentam carboidratos, entretanto utilizam ácidos orgânicos como malato, succinato, fumarato, lactato, oxalacetato como fonte de carbono (SCHLEIFER et al., 1991).

Bactérias semelhantes a *Desulfobulbus* foram identificadas na biomassa do separador de fases. Tais representantes podem realizar metabolismo fermentativo a partir do etanol (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Delforno (2011) e Okada (2012) identificaram bactérias semelhantes a esse gênero em reator EGSB e UASB, respectivamente, usados na degradação do surfactante aniônico LAS. Essas bactérias são redutoras de sulfato e capazes de reduzir o grupamento sulfito na molécula de LAS.

Identificou-se também bactérias semelhantes a *Luteolibacter* (0,4%), *Flavobacterium* (0,8%), *Phenylobacterium* (1,8%), *Wandonia* (0,4%), *Gemmatimonas* (0,3%), *Agromonas* (0,2%), *Oligothrofa* (0,2%), *Rhodanobacter* (0,2%), *Armatimonadetes* (0,1%), *Ferruginibacter* (0,1%) e *Pleomorphomonas* (0,1%). Tais microrganismos são aeróbios e podem ter sido favorecidos pela troca gasosa que ocorreu no separador de fases, bem aquelas bactérias semelhantes a *Azonexus* (4,5%), *Azovibriu* (1,7%), *Thiovirga* (1,3%), *Aquabacterium* (0,3%), *Zoogloea* (2,2%) e *Serpens* (6,4%) que são microaerofílicas e anaeróbias facultativas.

Alguns gêneros aeróbios como *Pleomorphomonas* (0,1%) (IM et al., 2006) e *Armatimonadetes* (0,1%) (TAMAKI et al., 2011) e anaeróbios como *Bellilinea* (0,1%) (YAMADA et al., 2007) e *Gracilibacter* (0,6%) (LEE et al., 2006), foram favorecidas pela adição de sacarose nesta fase de operação do reator. Microrganismos semelhantes a estes

gêneros são capazes de utilizar a sacarose como fonte de energia na presença de extrato de levedura. *Gracilibacter* e *Pleomorphomonas* também foram identificados por Delforno (2011) e Duarte et al. (2008), respectivamente, em estudos de degradação de surfactante aniônico LAS.

Bactérias semelhantes a *Aminomonas* (1,2%), são consideradas assacarolíticas (não fermentadoras de sacarose) e fermentadoras de aminoácidos (BAENA et al., 1999). Entretanto, foram encontradas tanto no material suporte como no separador de fases de ambas as fases operacionais, possivelmente devido ao extrato de levedura adicionado ao substrato sintético do reator.

Identificou-se também no separador de fases bactérias semelhantes a *Rahnella* (1,1%). Referem-se a microrganismos anaeróbios com capacidade de produzir exopolissacarídeos em meio com sacarose (MATSUYAMA et al., 1999), fato evidenciado nesta porção do reator. Estes polissacarídeos podem servir como material suporte para os demais microrganismos.

Os gêneros *Flavobacterium* (0,8%) e *Cetobacterium* (0,4%) encontrados neste estudo foram citados por Finegold et al. (2003) e Schramm e Schink (1991) como degradadores de polietilenoglicóis, subprodutos da degradação de álcool etoxilado de cadeia não ramificada (AE), e surfactantes não iônico por meio de culturas mistas. Assim, bactérias semelhantes a estes gêneros podem estar relacionadas diretamente com a degradação do surfactante não iônico.

Nitrossomonas (1,2%) foi relacionado com a degradação de compostos aromáticos (KEENER; ARP, 1994) como o LAS (BRANDT et al., 2001), *Novosphingobium* (0,3%), também foi descrito como degradadora de hidrocarbonetos aromáticos (SOHN et al., 2004). Entretanto, os microrganismos semelhantes a *Nitrossomonas* também podem utilizar o metanol e etileno como fontes de carbono (ARCIERO et al., 1989), mas, são sensíveis ao surfactante aniônico (LAS) entre 3-15 mg/L (BRANDT et al., 2001).

Identificou-se também bactérias semelhantes a *Oligotropha* (0,2%) na biomassa do separador de fases do reator. Os microrganismo deste gênero são heterotróficos e capazes de utilizar o CO e CO₂ como fonte de carbono (DEBARATI et al., 2008; MALIK; KIMCHHAYARASY; KAKII, 2005), o que pode ter favorecido sua ocorrência nesta porção do reator. Todavia, o crescimento dessas bactérias é inviabilizado pela presença de LAS.

5.12.3.7.3 – Gêneros identificados na biomassa do material suporte da Fase V (MS-S)

Na amostra do material suporte da Fase V (MS-S) foram identificados 34 gêneros com abundância relativa entre 0,1% e 36,6%. Dentre estes gêneros 61% são considerados anaeróbios estritos, 9% anaeróbios facultativos, 6% microaerófilos e 24% aeróbios. A maioria dos gêneros encontrados são Gram negativos (84%) e apenas três gêneros são formadores de endósporos (*Sporomusa*, *Proteocatella* e *Sedimentibacter*).

Os gêneros mais abundantes identificados na amostra do material suporte da Fase V foram *Holophaga* (36,6%), *Desulfobulbus* (21,9%), *Geobacter* (16,9%), *Azonexus* (10,8%) e *Sedimentibacter* (3,4%). Os gêneros que foram identificados somente nesta amostra foram *Bosea* (0,3%), *Chelatococcus* (0,1%), *Croceicoccus* (0,3%), *Dechloromonas* (0,1%), *Delftia* (0,1%), *Gp17* (0,1%), *Propionivibrio* (0,2%) e *Rhodovarius* (0,1%) (Figura 46).

Figura 46 – Distribuição dos gêneros (%) referente a abundância relativa na amostra do material suporte da Fase V (MS-S)

Destaca-se que nas amostras anteriores bactérias semelhantes a *Desulfobulbus* e *Geobacter* tiveram grande participação na comunidade microbiana, sendo que o gênero

Holophaga foi o mais abundante nesta fase operacional. Representantes deste gênero é capaz de degradar ácido pirúvico e compostos aromáticos em acetato, bem como, utilizar compostos húmicos na respiração e fermentação (GILBRIDE; FULTHORPE, 2004).

Bactérias semelhantes a *Azonexus* tiveram significativa participação no material suporte da Fase V. Esta abundância se deve ao fato dos microrganismos pertencentes a este gênero serem capazes de utilizar ácidos orgânicos, como ácido succínico, propiônico e acético, bem como, etanol como fonte de carbono (CHOU et al., 2008), uma vez que são incapazes de oxidar a sacarose, a qual estava ausente nesta fase operacional. Chou et al. (2008) citam que os microrganismos pertencentes a este gênero possuem oxidação positiva para TWEEN 20 e TWEEN 40 dois surfactantes não iônicos. Assim, quando a sacarose esteve ausente no substrato sintético houve maior prevalência deste gênero no material suporte (10,8%), quando comparado com a fase anterior (0,9%), uma vez que o AE pode ter sido utilizado como fonte de carbono para estes microrganismos.

O gênero *Sedimentibacter* não fermenta carboidratos e requer extrato de levedura para o crescimento, sendo assim foi favorecido pelo substrato sintético desta fase operacional.

Os gêneros *Bosea* e *Croceicoccus* apesar de serem microaeróbio e aeróbio, respectivamente, e capazes de degradar sacarose foram encontrados no material suporte na amostra da Fase V. Segundo Das et al. (1996), microrganismos semelhantes a *Bosea* podem se manter sob condições anaeróbias na presença de ácidos orgânicos como malato e succinato.

Outros microrganismos que podem ter sido favorecidos pelo substrato sintético (apenas extrato de levedura e surfactante) foram aqueles semelhantes a *Chelatococcus*, *Propionivibrio* e *Dechloromonas* que necessitam do extrato de levedura para crescimento e podem utilizar ácidos orgânicos oriundos do processo de degradação de outros compostos como fonte de carbono (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005; PANDAY; DAS, 2010; ZEMB et al., 2011).

Microrganismos semelhantes a *Delftia* são aeróbios, encontrados em sedimentos e em sistemas de lodos ativados, são capazes de degradar compostos tóxicos, bem como, surfactante aniônico LAS presente em sistemas de tratamento de efluentes (DEJONGHE et al. 2003; HAN et al., 2005; HOLLENDER et al. 200).

Os microrganismos do gênero *Aeromonas* são anaeróbios facultativos e capazes de realizar “*quorum-sensing*”, importantes para a formação de biofilme, os quais possuem papel fundamental na fixação e colonização do material suporte do reator (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Finegold et al., (2003) verificaram a degradação aeróbia de surfactantes não

iônico (Span 65, Span 80, TWEEN 20, TWEEN 80, TWEEN 85 e Corexit 7664) nas concentrações de 1 a 5 g/L por culturas marinhas mistas contendo populações de *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Flavobacterium*.

O gênero *Synergistes* teve sua abundância relativa reduzida quando a sacarose foi retirada do substrato sintético (Fase V), quando comparado como a amostra do material suporte da Fase IV (6,4% para 1,5%). Este fato pode ter ocorrido devido a falta da disponibilidade de substrato facilmente assimilável como a sacarose, o qual utilizou o surfactante não iônico AE, bem como, seus subprodutos da degradação e ácidos orgânicos como fonte de carbono.

Na biomassa do MS-S foi verificado o menor número de gêneros (34) dentre as amostras analisadas. Pôde-se observar maior discrepância dos valores comparando os gêneros mais abundantes com os de menor frequência (Figura 46), fato que não foi observado nas outras amostras. Assim, a sacarose pode ter influenciado nesta predominância, entretanto a falta deste co-substrato não afetou a eficiência de remoção de matéria orgânica.

5.12.3.7.4 – Gêneros identificados na biomassa do separador de fases da Fase V (SF-S)

Foram identificados 49 gêneros na amostra do separador de fases da Fase V (SF-S), com abundância relativa entre 0,1% e 31,6%. Dentre estes gêneros 49% são considerados anaeróbios estritos, 19% anaeróbios facultativos, 13% microaerófilos e 19% aeróbios. A maioria dos gêneros identificados são Gram negativos (79%), e quatro gêneros são formadores de endósporos (*Sedimentibacter*, *Sporomusa*, *Desulfosporomusa* e *Proteocatella*).

Para a biomassa do separador de fases da Fase V os gêneros mais abundantes foram *Holophaga* (31,6%), *Geobacter* (19,7%), *Acholesplasma* (8,7%), *Sedimentibacter* (7,3%) e *Desulfobulbus* (5%) (Figura 47). Os gêneros que somente foram identificados nesta amostra foram *Acholeplasma* (8,7%), *Anaerosinus* (0,1%), *Cloacibacterium* (0,1%), *Clostridium III* (0,1%), *Dongia* (0,1%), *Flavobacterium* (0,7%), *Gordonia* (0,3%), *Ktedonobacter* (0,1%), *Leptonema* (0,4%), *Meniscus* (0,1%), *Spartobacteria* (0,2%), *Thermomonas* (0,1%) e *Xanthobacter* (0,1%) (Figura 47).

Figura 47 – Distribuição dos gêneros (%) referente a abundância relativa na amostra do separador de fases da Fase V (SF-S)

Entre os principais gêneros identificados nesta biomassa destaca-se *Holophaga*, *Geobacter*, *Sedimentibacter* e *Desulfobulbus*. Tais bactérias também foram identificadas na biomassa do material suporte da mesma fase operacional. Entretanto, *Acholeplasma* foi evidenciada apenas nesta amostra e *Azonexus* teve abundância relativa menor (2,2 %) que na biomassa do MS-S (10,8%).

Os microrganismos do gênero *Acholeplasma* são anaeróbios facultativos e quimiotróficos. Este gênero foi encontrado em estudos sobre diversidade microbiana de reator de leito granular expandido com altas cargas de sulfato e nitrato no tratamento de águas residuárias salobras (LIAO et al., 2013) e em estudos de diversidade microbiana em reatores termofílicos anaeróbios (WAGNER; WIEGEL, 2008). Estes microrganismo utilizam a glicose, galactose e frutose como doadores de elétron para a síntese de carboidratos. São capazes de fermentar piruvato em lactato e acetato, bem como, capazes de metabolizar vários açúcares e aminoácidos como fonte de carbono (LAZAREV et al., 2011), o que torna estes microrganismo com metabolismo muito versátil, capaz de utilizar subprodutos e metabólitos de outros microrganismos.

O ambiente com elevada troca gasosa do separador de fases proporcionou o desenvolvimento de diversos gêneros anteriormente citados, bem como, *Anaerosinus* que são microrganismos anaeróbios estritos, quimiotróficos produtores de ácido propiônico e H_2 (BIEBL et al., 2000).

Bactérias do gênero *Meniscus* são anaeróbias facultativas e necessitam do CO_2 para realizarem a fermentação de carboidratos (IRGENS, 1977). Bactérias do semelhantes a *Ktedonobacter* são microaeróbias e utilizam peptídeos como fonte de carbono. Estes microrganismos podem proporcionar subprodutos para os demais microrganismos na degradação do surfactante não iônio AE.

O gênero *Cloacibacterium* identificado nesta amostra também foi evidenciado por Delforno (2011) e Oliveira et al. (2010) em estudos envolvendo a degradação do surfactante aniônico LAS.

O gênero *Gordonia* também está relacionado com à degradação de compostos orgânicos hidrofílicos e hidrofóbicos. Os microrganismos representantes deste gênero são bactérias filamentosas que possuem a capacidade de utilizar estes compostos orgânicos em condições aeróbias, anaeróbias e anóxicas (ARENSKÖTTER; BRÖKER; STEINBÜCHEL, 2004; CARR; EALES; SEVIOUR, 2006). Assim como bactérias semelhantes a *Xanthobacter* que são microaeróbias, possuem metabolismo bastante versátil, os quais podem utilizar diversos açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos como fonte de carbono. Os representantes deste gênero (*Gordonia*) também são capazes de degradar compostos tóxicos entre eles o ácido 2-fenilbutírico, subproduto da degradação do surfactante LAS (LIU et al., 2011). Estes microrganismos requerem CO_2 para o metabolismo de alquenos alifáticos e produtos compostos por óxido de propileno (SMALL; ENSIGN, 1995), fatores ambientais que podem ter favorecido a presença desses gêneros no separador de fases.

Microrganismo semelhantes a *Dongia* são bactérias aeróbias, encontradas em sistema de lodos ativados (LIU et al., 2010), assim como os microrganismos pertencentes a *Flavobacterium* (aeróbios) e *Thermomonas* (anóxicos que utilizam o nitrato como receptor final de elétrons). Estes microrganismos são capazes de degradar surfactante não iônicos (TWEEN 20 e TWEEN 80) (BAIK et al., 2013; LIU et al., 2010; RYUICHIRO; KAYO; SAWAKO, 2011).

A seguir é apresentada a árvore filogenética para os 18 gêneros que apresentam relação indireta com a degradação de surfactantes não iônicos e/ou seus subprodutos (Figura 48). Para isso, foram selecionadas as sequências representativas das UTOs com maior abundância relativa (maior número de sequências). Pode-se observar na Tabela 38 as UTOs formadas com o número de sequências obtidas no reator, bem como os respectivos gêneros, descrição, similaridade e número de acesso. A filogenia dos demais grupos microbianos encontrado no reator de leite fluidificado está apresentada no Anexo 2.

* - Culturas não cultivadas descritas a nível de gênero pelo RDP (*Ribossomal database Project*)

Figura 48 – Árvore filogenética do reator de leito fluidificado com UTOs das sequências representativas dos gêneros responsáveis pela de gradação indireta do AE

Tabela 38 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do AE

UTO	Gênero	Nº. Sequências	Similaridade (%)	Acesso (nº.)	Descrição	Referência
1	<i>Sporomusa</i>	192	88,4	AJ006604	<i>Desulfosporomusa polytropia</i> partial 16S rRNA gene, strain STP2	Sass <i>et al.</i> (1998)
2	<i>Synergistes</i>	77	100	FJ799144	Bacterium enrichment culture clone EtOH-173 16S ribosomal partial sequence.RNA gene,	Meepayung <i>et al.</i> (não publ.)
3	<i>Desulfobulbus</i>	769	89	X95180	<i>Desulfobulbus elongatus</i> 16S ribosomal RNA.	Janssen (1996)
4	<i>Syntrophomonas</i>	19	83	AB021306	<i>Syntrophomonas</i> sp. MGB-C1 gene for 16S ribosomal RNA.	Sekiguchi <i>et al.</i> (1999)
5	<i>Paludibacter</i>	39	97	JQ072152	Uncultured bacterium clone NBBEQ0309_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Lee <i>et al.</i> (não publ.)
6	<i>Nitrossomonas</i>	5	97	HQ843683	Uncultured bacterium clone NIT-EN-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Bae <i>et al.</i> (não publ.)
7	<i>Rhodopseudomonas</i>	17	97	AF416661	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> strain NCIB8288 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Oda <i>et al.</i> (2004)
8	<i>Victivallis</i>	18	52	AY049713	<i>Victivallis vadensis</i> 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.	Zoetendal <i>et al.</i> (2003)
9	<i>Geobacter</i>	372	95	AY914177	<i>Geobacter lovleyi</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Sung <i>et al.</i> (2006)

Continua...

UTO	Gênero	N°. Sequências	Similaridade (%)	Acesso (n°.)	Descrição	Referência
10	<i>Flavobacterium</i>	22	93	GQ855723	<i>Poecilia</i> sp. SS-2009 isolate 2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial.	Schories <i>et al.</i> (2009)
11	<i>Aeromonas</i>	26	99	HF545221	<i>Aeromonas</i> sp. 30 partial 16S rRNA gene, isolate 30.	Marin <i>et al.</i> (não publ.)
12	<i>Azovibrio</i>	33	96	DQ833392	<i>Azovibrio</i> sp. RV1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Ritalahti <i>et al.</i> (não publ.)
13	<i>Cetobacterium</i>	7	93	JN033177	Uncultured bacterium clone 4-31047 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ni <i>et al.</i> (não publ.)
14	<i>Dongia</i>	2	73	FJ535047	Uncultured bacterium clone 108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Feng <i>et al.</i> (2009)
15	<i>Acetoanaerobium</i>	6	94	GU562448	<i>Acetoanaerobium noterae</i> strain ATCC 35199 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Yarza <i>et al.</i> (2008)
16	<i>Azonexus</i>	319	94	DQ664239	<i>Azonexus hydrophilus</i> strain IMCC1716 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Chou <i>et al.</i> (2008)
17	<i>Thauera</i>	5	95	AJ315677	<i>Thauera</i> sp. S2 16S rRNA gene, strain S2.	Mechichi <i>et al.</i> (2002)
18	<i>Ignavibacterium</i>	4	97	AY548931	Uncultured bacterium clone 1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Luo <i>et al.</i> (não publ.)

5.13 – Potencial metanogênico

O teste de potencial metanogênico teve duração de 690 horas (28 dias) e ao final deste período a produção acumulada média de metano nas séries experimentais foi semelhante entre si, entretanto a maior produção máxima obtida foi relativa à série experimental B4 ($123,4 \pm 34$ mg/L de AE), como pode ser observado na Tabela 39.

Tabela 39 – Produção acumulada de metano mensurada nas séries experimentais nas CNTP

Série Experimental	Concentração de AE	Produção	Produção
	inicial	média acumulada	máxima
	mg/L	$\mu\text{mol de CH}_4$	
Controle	0	469,5	883,2
B1	$7,2 \pm 0,9$	618,2	1.025,6
B2	$24,1 \pm 0,7$	606,6	1.054,3
B3	$65,1 \pm 40$	607,2	1.164,2
B4	$123,4 \pm 34$	523,7	1.228,4

Por meio do ajuste da equação de Gompertz modificada (Equação 1), foi possível estimar a produção acumulada de metano, a produção potencial de metano, a taxa de produção de metano e a duração da fase *lag* (fase de adaptação da biomassa) de cada série experimental. Observou-se que a produção potencial de metano nas séries experimentais foi proporcional à concentração de surfactante adicionada ao meio.

A taxa de produção de metano foi menor para a série experimental B4 ($123,4 \pm 34$ mg/L de AE), entretanto, a maior taxa de produção foi observada para a série experimental B1 (Tabela 40). Destaca-se, portanto, que $7,2 \pm 0,9$ mg/L de AE não inviabilizou o metabolismo anaeróbio das arqueas metanogênicas. Assim neste experimento pode-se notar que quanto, maior a concentração de AE aplicada aos reatores em batelada, menor foi a taxa de produção de metano.

Tabela 40 – Parâmetros obtidos do ajuste da equação de Gompertz modificado

Série Experimental	Parâmetros			
	Produção potencial de metano (μmol)	Taxa de produção de metano ($\mu\text{mol/d}$)	Fase <i>lag</i> (horas)	R ²
Controle	578,7 $\pm$ 20,4	37,6 $\pm$ 12	8,9 $\pm$ 2,6	0,68
B1	763,9 $\pm$ 16,4	41,2 $\pm$ 7,3	7,4 $\pm$ 1,7	0,85
B2	787,3 $\pm$ 20,6	28,1 $\pm$ 4,9	6,6 $\pm$ 2,5	0,83
B3	968,8 $\pm$ 20,2	10,9 $\pm$ 1,1	< 0,1 $\pm$ 3,9	0,92
B4	989,6 $\pm$ 58,9	4,27 $\pm$ 0,5	< 0,1 $\pm$ 8,9	0,91

Notou-se que quanto maior foi a concentração de surfactante nas séries operacionais menor foi a fase *lag* (Figura 49). Garcia-Morales et al. (2001) avaliaram o efeito inibitório do surfactante aniônico LAS (0 a 50 ppm) em processos anaeróbios em batelada. Diferente do observado neste estudo, estes autores verificaram que, quanto maior a concentração do surfactante no meio maior a fase *lag* e, assim quanto, mais longo for o período que antecede o ponto máximo de produção de metano maior foi o efeito inibitório causado por este surfactante.

Segundo Esposito et al. (2012), quanto maior a biodegradabilidade do substrato maior será a taxa de produção de metano. Este aspecto afeta a distância da curva de produção acumulada de metano desde o eixo Y do gráfico durante a fase inicial (fase *lag*). Quanto mais elevada a biodegradabilidade do composto (substrato) mais próxima do eixo Y será a curva, indicando menor fase *lag*. Por outro lado, quanto maior a concentração ou mais complexo for a matéria orgânica presente no meio, menor será a taxa de produção de metano durante essa fase inicial. Este fato resulta em uma grande distância da curva de produção acumulada de metano a partir do eixo Y durante a fase inicial.

No presente estudo, nas séries experimentais controle, B1 e B2, houve rápida produção de metano, alcançando a estabilidade antes de 72 horas. Para as séries experimentais B3 e B4, não foi observado uma fase *lag* significativa, porém a fase exponencial de ambas as séries teve maior durabilidade quando comparada com as demais séries experimentais. A estabilidade de produção de metano das séries B3 (65,1 $\pm$ 40 mg/L de AE) e B4 (123,4 $\pm$ 34 mg/L de AE) foi em 144 e 360 horas, respectivamente (Figura 49).

Figura 49 – Ajuste da produção acumulada de metano nas series experimentais

A taxa específica média de produção de metano foi de $4,15 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$; $5,6 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$; $4,8 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$; $4,1 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$, para as séries experimentais controle, B1, B2, B3 e B4, respectivamente. As maiores taxas de produção para estas séries foram de $11,8 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$; $17,9 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$; $13,1 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$; $9,8 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$ e $7,4 \mu\text{mol/gSSV.h}^{-1}$. A concentração do surfactante interferiu na cinética de transformação da matéria orgânica a metano, ou seja, quanto maior a concentração de surfactante mais lenta foi a produção de metano. Por outro lado, notou-se que quanto maior a concentração de surfactante maior a produção de metano, sendo assim o álcool etoxilado de cadeia não ramificada pode ser mineralizado a metano, de forma direta (β e ω oxidação) ou serve como co-substrato para a degradação da matéria orgânica menos complexa (extrato de levedura).

Esposito et al. (2012) verificaram que a co-digestão de compostos orgânicos diferentes pode resultar em efeitos sinérgicos; assim a biodegradabilidade da mistura destes dois compostos pode ser maior quando comparada com a degradação destes compostos separadamente. Os autores mencionam também que, o processo de co-digestão pode aumentar a produção de biogás e influenciar na redução de sólidos devido a gaseificação do substrato.

Fato que pode ter ocorrido neste estudo uma vez que, foi encontrada maior produção de metano nas séries experimentais com maior concentração de surfactante.

Parte do metano gerado neste ensaio foi oriundo da matéria orgânica presente no substrato sintético, o que pode ser verificado pelos valores de eficiência de remoção da matéria orgânica encontrados em cada série experimental (Tabela 41). Notou-se que para a série B2 obteve-se maior eficiência de remoção de matéria orgânica ao final do experimento (79,4%). Já na série B4 obteve-se menor eficiência de remoção de matéria orgânica (48,3%), evidenciando que o surfactante não iônico AE interferiu na remoção da matéria orgânica.

Tabela 41 – Valor inicial e final de DQO e AE nas series experimentais do teste de potencial metanogênico

Série Experimental	DQO			AE		
	Inicial	Final	Eficiência	Inicial	Final	Eficiência
	mg/L		%	mg/L		%
Controle	495±10,1	133±10,9	73,1	0	0	-
B1	453±25,9	144±1,1	74,9	7,2±0,9	≤ LD	99
B2	528±13,2	109±5,8	79,4	24,1±0,7	≤ LD	99
B3	500±8,1	152±18,3	69,6	65,1±40	≤ LD	99
B4	561±9,9	209±10	48,3	123,4±34	0,02	99

≤ LD – menor ou igual ao limite de detecção

Pode-se notar que quanto maior a presença de surfactante no meio mais lenta foi a conversão de DQO em metano. Estes fatos corroboram para a hipótese de que, apesar do surfactante não iônico AE (GENAPOL® C-100), ser biodegradável este tensoativo pode retardar o processo de degradação da matéria orgânica em sistemas em bateladas, entretanto, este surfactante serve como co-substrato para a geração de metano (Figura 50).

Assim, o substrato mais simples presente no meio (sacarose) foi degradado primeiro, sendo que esta degradação ocorreu logo nas primeiras horas experimentais. Posteriormente, ocorreu a degradação do surfactante gerando metano e diminuição, tanto da velocidade, quanto do consumo da matéria orgânica total, até concentração residual a qual foi diferente para cada série experimental em função da concentração de AE.

Garcia-Morales et al. (2001) avaliaram em estudos com reatores anaeróbios em batelada contendo LAS que a fase de consumo de matéria orgânica por bactérias acidogênicas ocorreu nas primeiras 10 horas de experimento, entretanto neste período houve a produção de

ácidos orgânicos voláteis, redução de pH e influencia negativa no processo de biotransformação do LAS a metano.

Figura 50 – Diminuição equivalente da matéria orgânica nas séries experimentais (valores médios - ajuste de decaimento exponencial)

A produção de ácidos nas séries experimentais não afetaram a produção de metano no período estudado. Os ácidos orgânicos voláteis totais (AOV) foram de $69,3 \pm 34,4$ mg/L; $48,2 \pm 8,2$ mg/L; $43,1 \pm 2,3$ mg/L; $49,8 \pm 11,1$ mg/L e $51,3 \pm 4$ mg/L, para as séries controle, B1, B2, B3 e B4, respectivamente. Os AOV com maiores representatividades nas séries B1, B2, B3 e B4 foram ácido fórmico ($35,8 \pm 1,9$ mg/L) seguido pelo acético ($4,3 \pm 1,07$ mg/L). Na série controle houve maior diversidade de produção de ácidos, dentre eles os mais representativos foram o ácido fórmico ($38,8 \pm 0,7$ mg/L) seguido do ácido láctico ($12,2 \pm 16,2$ mg/L) e ácido propiônico ($7 \pm 9,3$ mg/L).

Steber e Wierich (1985) avaliaram a biodegradação de álcool etoxilado (marcados com ^{14}C) em estação de tratamento de efluentes domésticos. Os autores observaram a presença de ácidos acético e fórmico, como subprodutos da degradação do AE. Estes autores citam que as cadeias do AE são clivadas em polietilenoglicóis carboxilados com duas moléculas de

carbono (C2) e estas sofrem sucessivas oxidações até ácido fórmico e ácido acético, e estes por sua vez são mineralizados a CO₂ e CH₄.

Microrganismos do gênero *Methanospirillum*, *Methanolinea*, *Methanoregula* e *Methanosphaerula*, são hidrogenotróficos e podem utilizar o H₂/CO₂, bem como, formiato como substrato (BAN et al., 2013). A degradação do surfactante AE, neste estudo, foi realizada por meio de consórcio microbiano de bactérias anaeróbias e arqueas provenientes do inóculo; uma vez que, foi evidenciada a produção de metano, ácido acético e ácido fórmico. Outro fator que pode ter colaborado para a maior produção de metano nas condições B3 e B4 pode ser referente à presença de bactérias sintróficas acetogênicas, possivelmente presente no inóculo, que segundo Ariesyady, Ito, e Okabe (2007) podem degradar cadeias curtas de ácidos graxos sob condições de baixa pressão parcial de hidrogênio.

Pelas análises de DGGE realizadas no final das 690 horas experimentais do teste de potencial metanogênico foi possível verificar diferenças na comunidade microbiana em função do aumento da concentração de surfactante AE.

Por meio da correlação de *Pearson* foram verificadas similaridades de 71% e 69% entre a série experimental B4 (127 mg/L de AE) e o inóculo do teste de potencial metanogênico, para os Domínios Archaea e Bacteria, respectivamente (Figura 51 e Figura 52).

A similaridade entre os grupos microbianos aumentou quando se compara as séries experimentais com menor concentração de surfactante. Foi encontrada similaridade de 98% e 82%, entre a série experimental controle e a série B1 (7,2±0,9 mg/L de AE) para os Domínios Archaea e Bacteria, respectivamente. Por meio dessa análise pode-se inferir que o surfactante não iônico AE alterou a diversidade dos microrganismos anaeróbios.

Notou-se para os microrganismos pertencentes ao Domínio Archaea apresentaram maior similaridade quando comparadas ao Domínio Bacteria das mesmas séries experimentais. Fato melhor visualizado quando se comparou as séries B4 (123,4±34 mg/L de AE) e B3 (65,1±40 mg/L de AE) de ambos os Domínios. Verificou-se que, para o Domínio Archaea, a similaridade foi de 90% e para o Domínio Bacteria esta mesma similaridade foi de 74% (Figura 51 e Figura 52).

I – inóculo, C – Controle, B1 – Serie experimental com $7,2 \pm 0,9$ mg/L de AE, B2 – Serie experimental com $24,1 \pm 0,7$ mg/L de AE, B3 – Serie experimental com $65,1 \pm 40$ mg/L de AE e B4 - Serie experimental com $123,4 \pm 34$ mg/L de AE.

Figura 51 – Coeficientes de similaridade dos padrões de bandas do Domínio Archaea

I – inóculo, C – Controle, B1 – Serie experimental com $7,2 \pm 0,9$ mg/L de AE, B2 – Serie experimental com $24,1 \pm 0,7$ mg/L de AE, B3 – Serie experimental com $65,1 \pm 40$ mg/L de AE e B4 - Serie experimental com $123,4 \pm 34$ mg/L de AE.

Figura 52 – Coeficientes de similaridade dos padrões de bandas do Domínio Bacteria

Por meio do cálculo do índice de Shannon-Wiener verificou-se que a comunidade microbiana pertencente ao Domínio Bacteria foi mais diversa quando comparado com o Domínio Archaea (Tabela 42).

Tabela 42 – Índice de Shannon-Wiener para as amostras dos testes de potencial metanogênico

Índice de Shannon-Wiener (H')				
Série Experimental	Concentração de AE (mg/L)	Domínio		Variação entre Domínios
		Bacteria	Archaea	
Inóculo	0	2,69	2,44	0,25
Controle	0	2,75	2,66	0,09
B1	$7,2 \pm 0,9$	2,85	2,55	0,3
B2	$24,1 \pm 0,7$	2,82	2,51	0,31
B3	$65,1 \pm 40$	2,54	2,50	0,04
B4	$123,4 \pm 34$	2,72	2,43	0,29

Resultados diferentes foram encontrados por Garcia-Morales et al. (2001), o qual compararam comunidades microbianas acidogênicas e metanogênicas em reatores anaeróbios em batelada na presença de LAS (0 a 50 ppm). Estes autores citam que o surfactante empregado possuiu maior efeito inibitório na comunidade metanogênica (Domínio Archaea) quando comparado com a comunidade acidogênica (Domínio Bacteria).

6 – CONCLUSÕES

Por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível mensurar o álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL[®] C-100) afluente e efluente de reator de leito fluidificado.

Obteve-se elevada remoção de matéria orgânica em todas as fases de operação do reator (inoculação, adaptação e nas fases com a presença do surfactante álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL[®] C-100).

Elevada eficiência de remoção de álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL[®] C-100) foi obtida devido principalmente a configuração do reator, efeito de diluição devido a recirculação, abertura superior do separador de fases (proporcionando ambiente microaerofílico), elevada superfície de contato promovida pelo material suporte (areia) e as excelentes características de transferência de massa. a

O álcool etoxilado de cadeia não ramificada não adsorveu no material suporte e sua remoção do sistema foi devido a degradação por meio dos microrganismos presente no reator de leito fluidificado.

A sacarose não afetou a remoção de álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL[®] C-100), entretanto, este co-substrato influenciou na diversidade microbiana do reator anaeróbio de leito fluidificado.

Elevada biodegradabilidade do surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada sob condições anaeróbias foi observada no ensaio de potencial metanogênico em reator em batelada.

Por meio das análises de pirosequenciamento da região V4 do rRNA 16S registrou-se 83 gêneros nas amostras do reator dentre estes, 18 estão relacionados com a degradação de surfactante não iônico, bem como, seus subprodutos indicando a necessidade de consórcio microbiano para a degradação do surfactante AE.

Os gêneros com maior abundância relativa no reator de leito fluidificado no estudo de degradação do surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada foram: *Sporomusa*, *Geobacter*, *Desulfobulbus*, *Synergistes*, *Sedimentibacter*, *Holophoga*, *Serpens* e *Azonexus*.

7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar a técnica de espectrometria de massa para estudo dos intermediários (subprodutos) da degradação do surfactante não iônico álcool etoxilado.
- Diminuir o tempo de detenção hidráulica (TDH) do reator de leito fluidificado no estudo de surfactante não iônico álcool etoxilado.
- Avaliar a remoção do álcool etoxilado de cadeia não ramificada e o efeito de diferentes co-substratos adicionados na alimentação do reator.
- Estudar outros surfactantes não iônicos como nonilfenol etoxilado.
- Utilizar águas residuárias reais como fonte de surfactantes não iônicos em reator anaeróbio de leito fluidificado.
- Aumentar a escala do reator de anaeróbio de leito fluidificado para estudo de degradação de surfactantes.
- Aplicação da técnica de PCR em tempo real (*polymerase chain reaction real time – PCR-real time*) para quantificação de grupos microbianos relacionados na degradação do surfactante não iônico de cadeia não ramificada, bem como seus subprodutos.

8 – REFERÊNCIAS

- ABBOUD, M. M.; KHLEIFAT, K. M.; BATARSEH, M. (2007). Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzosulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pantoea agglomerans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, n.4, p.432–439.
- AHRING, B. K.; SANDBERG, M. ANGELIDAKI, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, n.3, pp. 559-565.
- ALMENDARIZ, F. J. et al. (2001). Degradation of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugmented with a *Pseudomonas aeruginosa* (M113) strain. **Water Science and Technology**, v.44, n.4, p.183-188.
- ANDALIB, M. et al. (2012). Treatment of thin stillage in a high-rate anaerobic fluidized bed bioreactor (AFBR). **Bioresource Technology**, v.121, p.411–418, Oct. DOI:10.1016/j.biortech.2012.07.008. 2012.
- ANGELINI, T. E. et al. (2009). *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America**, v.106, n.43, p.18109-18113, Oct.
- ANGONESE, A. R. (2006). Avaliação da eficiência de um biodigestor tubular na redução da carga orgânica e produção de biogás a partir de dejetos de suínos. **Encontro de energia no Meio Rural**, ano 6.
- ARAUJO, D. J. et al. (2008). Anaerobic treatment of wastewater from the household and personal products industry in a hybrid. **Brazilian journal of Chemical Engineering**, v.25, n.3, p.443–451, July/Sept.
- 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.
- ARAUJO, J. C. et al. (2004). Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Environmental technology**, v.25, n.7, p.809–817.
- ARCIERO, D.; VANNELLI, T.; LOGAN, M.; HOOPER, A. B. (1989). Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europea*. **Biochem Biophys Res Commun**. v.159, pp.640-643.
- ARENSKÖTTER, M.; BRÖKER, D.; STEINBÜCHEL, A. (2004). Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.6, p.3195-3204.

ARIESYADY, H. D.; ITO, T.; OKABE, S. (2007). Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. **Water Research**, v. 41, p.1554–1568.

BAENA, S. et al. (1998). *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an Amino Acid-degrading Anaerobe Isolated from Anaerobic Sludge. **Anaerobe**, v.4, n.5, p.241-250.

BAENA, S. et al. (1999). *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp nov., a mesophilic anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.975-982, July.

BAIK, K. S. et al. (2013). *Dongia rigui* sp. nov., isolated from freshwater of a large wetland in Korea. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.104, n.6, p.1143-1150, Dec.

BAIRD, C. (1995). **Environmental chemistry**. New York: Freeman.

BAN, Q.; LI, J.; ZHANG, L.; JHA, A. K.; ZHANG, Y.; AI, B. (2013). Syntrophic propionate degradation response to temperature decrease and microbial community shift in an UASB reactor. **J. Microbiol. Biotechnol.**, In press. v.23, n.3, pp.382-389.

BARKER, D. J.; STUCKEY, D. C. (1999). A Review of soluble microbial products (smp) in wastewater treatment systems. **Water Research**, v.33. n.17, p.3063-3082.

BARROS, A.R.; AMORIM, E. L. C.; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. (2010) Biohydrogen Production in Anaerobic Fluidized Bed Reactors: Effect of Support Material and Hydraulic Retention Time. **International Journal of Hydrogen Energy**, n.35, pp.3379–3388.

BATTERSBY, N.S; KRAVETZ, L.; SALANITRO, J.P. (2000). Effect of branching on the biodegradability of alcohol-based surfactants. In: **Proceedings of the 5th World Surfactants Congress**, Florence, Italy pp. 1397–1407.

BAUMGARTNER, A. et al. (2012). The Phylum synergistetes in gingivitis and necrotizing ulcerative gingivitis. **Journal of Medical Microbiology**, v.61, n.Pt 11, p.1600–1609.

BAZYLINSKI, D. A.; DEAN, A. J.; LOVLEY, D. R. (2000). N₂-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. **Environmental Microbiology**, v.2, n.3, p.266–273, June.

BERNA, J. L. et al. (2007). Anaerobic biodegradation of surfactants – scientific review. **Tenside Surfactants Detergents**, v.44, n.6, p.312-347, Dec.

BERNA, L.; CAVALLI, L.; RENTA, C. (1995). A Life-cycle inventory for the production of linear alkylbenzene sulphonates in Europe. **Tenside Surfactants Detergents**, v.32, n.2, p.122-127.

BERNARDET, J. –F. et al. (1996). Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *flavobacterium*, emended description of the family *flavobacteriaceae*, and proposal of *flavobacterium hydatidis* nom. Nov. (basonym, *cytophaga aquatilis* strohl and tait 1978). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, n.1, p.128-148, Jan.

- BIEBL, H. et al. (2000). *Propionispora vibrioides*, nov. gen., nov. sp., a new gram-negative, spore-forming anaerobe that ferments sugar alcohols. *Archives Microbiology*, v.174, n.4, p.239–247, Oct.
- BIGARDI, T. A. R. et al. (2003). Fate of anionic surfactants in an aerated lagoon sedimentation pond WWTP. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.8, n.1/2, p.45-48, jan./jun.
- BORJA, R. et al. (2001). Performance evaluation of a mesophilic anaerobic fluidized-bed reactor treating wastewater derived from the production of proteins from extracted sunflower flour. **Bioresource Technology**, v.76, n.1, p.45–52.
- BOSQUILHA, G. E. (2002). **Estudo da distribuição de surfactantes e de polifosfatos no sistema estuarino de Santos/São Vicente e Baía de Santos (SP, Brasil) e avaliação das metodologias aplicadas**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.
- BRAGA, M. C. B. (1989). **Estudo da eficiência dos processos bioquímicos em um reator anaeróbio de leito fluidificado automatizado**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1989.
- BRAGA, R.; CARVALHO, P. F. C. (2003). **Recursos hídricos e planejamento urbano e regional**. Rio Claro: Laboratório de Planejamento Municipal; IGCE; UNESP. p.113-127.
- BRANDT, K. K. et al. (2001). Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on metabolic activity , growth rate , and microcolony formation of *nitrosomonas* and *nitrospira* strains toxic. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2489-2498, June.
- BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (2005). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer. v.2: The Proteobacteria.
- BREZNAK, J. A.; SWITZER, J. M.; SEITZ, H. J. (1988). *Sporomusa termitida* sp. nov., an H₂/CO₂-utilizing acetogen isolated from termites. **Archives of Microbiology**, v.150, n.3, p.282-288.
- BROCK, T. D. et al. (1990). **Biology of microorganisms**. 7thed. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- BUCHANAN, B.B.; ARNON, D. I. A Reverse KREBS cycle in photosynthesis: consensus at last. **Photosynthesis Research**, v.24, p.47–53.
- CANTERO, M.; SOLEDAD, R.; ANDPÉREZ-BENDITO, D. (2004). Determination of non-ionic poly-ethoxylated surfactants in sewage sludge by coacervative extraction and ion trap Liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n.46, p.147–153.
- CAROSIA, M. F. (2011). **Caracterização microbiana e degradação de detergente de uso doméstico em reator anaeróbio de leito fluidificado**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

- CARR, E. L.; EALES, K. L.; SEVIOUR, R. J. (2006). Substrate uptake by *Gordonia amarae* in activated sludge foams by FISH-MAR. **Water Science and Technology**, v.54, n.1, p.39–45.
- CAVALLI, L. et al. (2000). Surfactants in sediments. **Tenside Surfactants Detergents**, v.5, n.37, p. 282–288.
- CHAKRABORTY, R.; COATES, J. D. (2004). Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, n.4, p.437–446.
- CHANG, H. et al. (1998). Measurement of critical micelle concentration of nonionic surfactant solutions using impedance spectroscopy technique. **Review of Scientific Instruments**, v.69, n.6, p.2514–2520.
- CHANG, P. L. et al. (1985). Action of surface-active agents on arylsulfatase-C of human cultured fibroblasts. **Analytical Biochemistry**, v.144, v.2, p.362–370.
- CHAO, A. et al. (2005). A New statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. **Ecology Letters**, n.8, p.148–159.
- CHERNICHARO, C. A. L. (2007). **Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Politécnica.
- CHOU, J. H. et al. (2008). *Azonexus hydrophilus* sp. nov., a *nifH* gene-harbouring bacterium isolated from freshwater. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, n.58, Pt 4, p.946–951.
- COATES, J. D. et al. (1999a). *Geothrix ferrnentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe (III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n.49, p.1615–1622.
- COATES, J. D. et al. (1999b). Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, p.5234–5241, Dec.
- COLE, J. R. et al. (2009). The Ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v.37. Database issue D141–D145. doi:10.1093/nar/gkn879.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar. 2005, n.53, p.58–63.
- COSTA, J. C. et al. (2007). Quantitative image analysis as a diagnostic tool for monitoring structural changes of anaerobic granular sludge during detergent shock loads. **Biotechnology**, v.98, n.1, p.60–68.
- COSTA-RIU, N. et al. (2003). PorA represents the major cell wall channel of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.16, p. 4779–4786, Aug.

COSTERTON, J. W. et al. (1995). Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, n.1, p.711-745.

D'ANGELO, E. M.; NUNEZ, A. E. (2010). Effect of enviromental conditions on polychlorinated biphenyl transformations and bacterial communities in a river sediment. **Journal of soils and sediments**, v.10, n.6, p.1186-1199.

DALEVI, D.; HUGENHOLTZ, P.; BLACKALL, L. L. (2001). A Multiple outgroup approach to resolving division-level phylogenetic relationship using 16S rDNA data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.385-391.

DAS, M. M. et al. (1996). In Vitro gas production and rumen degradation characteristics of Zizyphus [Ziziphus] leaves. **Indian Journal of Animal Nutrition**, v.3, n.3, p.142-147.

DE LA MAZA, A. et al. (1991). Permeability changes of phospholipid vesicles caused by surfactants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.5, p.315-319.

DE LA MAZA, A.; PARRA, J. L. (1996). Changes in phosphatidylcholine liposomes caused by a mixture of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate. **Biochim Biophys Acta**. v.19, n.2, pp. 125-34.

DEBARATI, P. et al (2008). Genome sequence of the chemolithoautotrophic *Bacterium Oligotropha carboxidovorans* OM5. **J. Bacteriol.** August. v.190, n.15, pp. 5531-5532.

DEFNOUN, S. et al. (2000). Papillibacter cinnamivorans gen. nov., sp. nov., a cinnamate-transforming bacterium from a shea cake digester. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1221–1228.

DEJONGHE, W. et al. (2003). Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading Variovorax strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1532-1541, Mar.

DELFORNO, T. P. (2011). **Caracterização microbiana e remoção do alquilbenzeno linear sulfonado em reator EGSB**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulor, 2011.

DELFORNO, T. P. et al. (2012). Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. **Bioresource Technology**, v.107, p. 103-109.

DENGER, K.; COOK, A.M. (1999) Linear alkylbenzenesulphonate (LAS) bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulphur. **J. Appl. Microbiol.** v.86, pp. 165–168.

DIEZ BLANCO, V.; GARCIA ENCINA, P. A.; FDZ-POLANCO, F. (1995). Effects of biofilm growth , gas and liquid velocities on the expansion of an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). **Science**, v.29, n.7, p.1649-1654.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. (1961). Volatile acids by direct titration. **Journal Water Pollution Control Federation**, v.33, n.4, p.356–365.

DUARTE, I. C. S. et al. (2008). Evaluation of the microbial diversity in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor treating linear alkylbenzene sulfonate. **Biodegradation**, v.19, n.3, p.375–385.

DUARTE, I. C. S. (2006). **Caracterização microbiológica da remoção e degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reatores anaeróbios com biofilme e células planctônicas**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

DUARTE, I. C. S. (2010). Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in a horizontal anaerobic immobilized biomass reactor. **Bioresource Technology**, v.101, n.2, p.606–612.

DWORKIN, M. (2006). **Dimorphic prosthecate bacteria**: the genera caulobacter, asticcacaulis, hyphomicrobium, pedomicrobium, hyphomonas and thiodendron. The prokaryotes. New York: Springer. v.5: Proteobacteria: alpha and beta subclasses, p.72-90.

DWORKIN, S. I.; NORDT, L; ATCHLEY, S. (2005). Determining terrestrial paleotemperatures using the oxygen isotopic composition of pedogenic carbonate. **Earth and Planetary Science Letters**. V.237, p. 56-68, doi: 10.1016/j.epsl.2005.06.054.

DWYER, D. F.; TIEDJE, J. M. (1983). Degradation of ethylene glycol and polyethylene glycols by methanogenic consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.185–190.

DWYER, D. F.; TIEDJE, J. M. (1986). Metabolism of Polyethylene Glycol by Two Anaerobic Bacteria, *Desulfovibrio desulfuricans* and a *Bacteroides* sp. **Applied and environmental microbiology**, v.52, n.4, pp. 852-856.

DYER, S. D. et al. (2006). Assessment of alcohol ethoxylate surfactants and fatty alcohols mixtures in river sediments and prospective risk assessment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.120, n.1/3, p.45–63.

EDGAR, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v.26, n.19, p.2460-2461, Aug.

EPSTEIN, N. (2004). Teetering. **Powder Technology**, v.151, n.1/3, p.2–14.

ESPERANZA, M. et al. (2004). Determination of sex hormones and nonylphenol ethoxylates in the aqueous matrixes of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants. **Environmental Science & Technology**, v.38, n.11, p.3028–3035.

ESPOSITO, G. et al. (2012). Bio-methane potential tests to measure the biogas production from the digestion and co-digestion of complex organic substrates. **The Open Environmental Engineering Journal**, v.5, p.1-8, Jan.

EUROPEAN COMMISSION. Scientific Committee on Health and Environmental Risks. (2008). **Opinion on anaerobic degradation of surfactants and biodegradation of non surfactant organic ingredients**. [S.l.].

EUROPEAN COMMISSION. (1989). 89-542/EEC: Commission recommendation for the labelling of detergents and cleaning products. **Official Journal of the European Communities**, United Kingdom, 13 Sept. 1989.

EUROPEAN COMMISSION. (1998). 89-542/EEC: Commission recommendation on the principles applicable to the bodies responsible for out-of-court settlement of consumer disputes. **Official Journal of the European Communities**, United Kingdom, 30 Mar. 1998.

FEDERLE, T. W.; ITRICH, N. R. (2006). Fate of free and linear alcohol-ethoxylate-derived fatty alcohols in activated sludge. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, n.1, p.30–41.

FEIJTAL, T. C. F.; VAN DE PLASCHE, E. J. (1995). **Environmental risk characterization of 4 major surfactants used in the Netherlands**. Bilthoven: Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu and Nederlandse Vereniging Van Zeepfabrikanten.

FENG, L.; CHEN, Y.; ZHENG, X (2009). Enhancement of waste activated sludge protein conversion and volatile fatty acids accumulation during waste activated sludge anaerobic fermentation by carbohydrate substrate addition: the effect of pH. **Environmental Science and Technology**, v.12, n.43, p.4373-4380.

FERNÁNDEZ CIRELLI, A. et al.(2008). Surfactants in sludge-amended agricultural soils: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v.6, n.3, p.135–148.

FERNANDEZ, N. et al. (2008). Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater. **Renewable Energy**, v.33, p.2458–2466.

FERREIRA, F. V. (2012). **Influência do co-substrato na remoção de sabão em pó de uso doméstico e na diversidade microbiana de reator anaeróbio de leito fluidificado**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

FERREIRA, F. V. et al. (2011). Influence of co-substrate in household surfactant removal using anaerobic fluidized bed biological reactor – a comparative study. In: LATIN AMERICAN WORKSHOP AND SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION, 10., 2011, Ouro Preto. **Annals...** [S.l.:s.n.].

FINCHER, E. L.; PAYNE, W. J. (1962). Bacterial utilization of ether glycols. **Applied Microbiology**, v.10, p.542–547.

FINEGOLD, S.M. et al. (2003). *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, n.2, p.177-181.

FORESTI, E. (1994). Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: TALLERY SEMINARIO LATINOAMERICANO TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES, 3., 1994, Montevideu. **Anais...** Montevideu: Universidad de La República. p.97-110.

- FUKUNAGA, Y. et al. (2008). *Acanthopleuribacter pedisgen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from a chiton, and description of acanthopleuribacteraceae fam. nov., acanthopleuribacteralesord. nov., holophagaceae fam. nov., holophagalesord. nov. and holophagaececlassis nov. in the phylum 'acidobacteria'*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2597-2601.
- GARCIA ENCINA, P. A.; HIDALGO, M. D. (2005). Influence of substrate feed patterns on biofilm development in anaerobic fluidized bed reactors (AFBR). **Process Biochemistry**, v.40, n.7, p.2509–2516.
- GARCIA, M. T. et al. (2006). Inhibition of biogas production by alkyl benzene sulfonates (LAS) in a screening test for anaerobic biodegradability. **Biodegradation**, v.17, n.1, p.39-46, Feb.
- GARCIA-MORALES, J. L. et al. (2001). Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by linear alkylbenzene-sulfonate (LAS). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v.15, n.1, p.13-19.
- GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. (2001). The Road map to the manual. In: GARRIT, G.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nded. New York: Springer. v.1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, p.119-166.
- GHOSH, S.; OMBREGT, J. P.; PIPYN, P. (1985). Methane production from industrial wastes by two-phase anaerobic digestion, **Water Research**, v.19, n.9, p.1083–1088.
- GILBRIDE, K. A.; FULTHORPE, R. R. (2004). A Survey of the composition and diversity of bacterial populations in bleached kraft pulp-mill wastewater secondary treatment systems. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.8, p.633–644.
- GODON, J. et al. (2005). Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world : the “ Synergistes ” example. **Environmental Microbiology**, v.7, n.2, p.213–224.
- GOMIDE, R. (1983). Operações unitárias. São Paulo: Do Autor. v.1: Operações com Sistema de Sólidos Granulares.
- GONÇALVES, R. F. et al. (2001). Pós- tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores com biofilme. In: CHERNICARO, C.A.L. (Coord.). **Pós -tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: [s.n.]. Cap.4, p.171-278.
- GONÇALVES, S. C. (2005). **Efeito da agitação mecânica na co-digestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil – Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- GONZÁLEZ, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. (2007). Removal of a broad range of surfactants from municipal wastewater--comparison between membrane bioreactor and conventional activated sludge treatment. **Chemosphere**, v.67, n.2, p.335–343.
- GRAHAM, D. E.; WHITE, R. H. (2002). Elucidation of methanogenic coenzyme biosynthesis: from spectroscopy to genomics. **Natural Products Report**, n.19, p.133-147.

GRANT, M. A.; PAYNE, W. J. (1983). Anaerobic growth of *alcaligenes faecalis* vat. denitrificans at the expense of ether glycols and nonionic detergents. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, n.2, p.627-630.

GRIFFITHS, E. T. et al. (1986). Metabolite production during the biodegradation of the surfactant sodium dodecyltriethoxy sulphate under mixed-culture die-away conditions. **Journal of General Microbiology**, v.132, n.4, p.963–972.

GRIFFITHS, R. I. et al. (2000). Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA GU, X. et al. (2008). Degradation behaviors of nonylphenol ethoxylates by isolated bacteria using improved isolation method. *Journal of Environmental Sciences*, v.20, n.9, p.1025-1027. . **Appl Environ Microbiol.** v.66, n.12, pp. 5488–5491.

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.

HALSNAES, K.; HEIJ, B.; RIBEIRO, S. K. (2007). **Sumário para os formuladores de políticas**. [S.l.:s.n.].

HAMMER, O.; HARPER, D.; RYAN, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, n.1, art.4.

HAN, J. et al. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, n.1, p.66–76.

HAND, V. C.; WILLIAMS, G. K. (1987). Structure-activity-relationships for sorption of linear alkylbenzenesulfonates. *Environmental Science & Technology*, v.21, n.4, p.370-373.

HAROUN, M.; IDRIS, A. (2009). Treatment of textile dye with an anaerobic fluidized bed reactor. **Desalination**, v.237, pp. 357–366. doi: 10.1016/j.desal.2008.01.027.

HESPELL, R. B. (1977). *Serpens flexibilis* gen. nov., sp. nov., an Unusually Flexible, Lactate - Oxidizing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.27, n.4, p.371-381, Oct.

HIDALGO, M. D.; GARCÍA-ENCINA, P. A. (2002). Biofilm development and bed segregation in a methanogenic fluidized bed reactor. **Water Research**, v.36, n.12, p.3083–3091.

HOLLENDER, J. (2003). Assessing the microbial activity of soil samples, its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test. **Chemosphere**, v.53, n.3, pp. 269-275.

- HOLT, M. S.; WATERS, J.; COMBER, M. H. I. (1995). AIS/CESIO environmental surfactant monitoring programme. SDIA sewage treatment pilot study on linear alkylbenzene sulphonate (LAS). **Water Research**, v.29, n.9, p.2063–2070.
- HOUSAINDOKH, M. R. et al. (1993) Interaction of glucose oxidase with ionic surfactants: a microcalorimetric study, **Int. J. Biol. Macromol.**, v.15, p. 337-341.
- HUANG, Y.-L. et al. (2005). Aerobic and anaerobic biodegradation of polyethylene glycols using sludge microbes. **Process Biochemistry**, v.40, n.1, p.207–211.
- HUBER, M.; MEYER, U.; RYS, P. (2000). Biodegradation mechanisms of linear alcohol ethoxylates under anaerobic conditions. **Environmental Science & Technology**, v.34, n.9, p.1737–1741.
- HUMAN & ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT. (2009). **Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products Alcohol Ethoxylates**.
- IM, W. T. et al. (2006). *Pleomorphomonas koreensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species in the order Rhizobiales. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.56, Pt.7, p.1663-1666.
- Infect. Dis.** v.17, pp. 183-212.
- IRGENS, R. L. (1977). *Meniscus* a new genus of aerotolerant, gas-vacuolate bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.27, n.1, p.38-43.
- IVANKOVIC, T.; HRENOVIC, J.; GUDELJ, I. (2009). Toxicity of commercial surfactants to phosphate-accumulating bacterium. **Acta Chimica Slovenica**, v.56, n.4, p.1003-1009.
- IZA, J. (1991). Fluidized bed reactor for anaerobic wastewater treatment. **Water Science Technology**, v.28, n.8, pp. 109-132.
- JACOBS, D. M. et al. (2009). Non-digestible food ingredients , colonic microbiota and the impact on gut health and immunity : a role for metabolomics. **Current Drug Metabolism**, v.10, n.1, p.41–54.
- JANSSEN, P. H. (1996). Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* gen. nov., sp. nov. **Journal Archives Microbiology**, v.166, n.2, p.184-192, Sept.
- JANSSEN, P. H.; FARRELL, K. A. O. (1999). *Succinispira* gen. nov., sp. nov., a succinate-decarboxylating anaerobic bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, n.3, p.1009–1013.
- JEONG, T. Y. et al. (2007). Evaluation of methane production by the thermal pretreatment of waste activated sludge in an anaerobic digester. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.13, n.5, p.856-863.
- JIANG, C. et al. (2010). Identification and characterization of a novel fumarase gene by metagenome expression cloning from marine microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v.9, p. 91-99.

- JIMENEZ, L. et al. (1991). Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a 4-member aerobic bacterial consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.5, p.1566-1569.
- JONES, D. L. et al. (2009). Soil organic nitrogen mineralization across a global latitudinal gradient. **Global Biogeochemical Cycles**, v.23, n.1, p.1-5.
- KADNIKOV, V. V. et al. (2013). Genomic analysis of melioribacter roseus, facultatively anaerobic organotrophic bacterium representing a novel deep lineage within bacterioidetes/chlorobi group. **Plos One**, v.8, n.1, p.e53047.
- KAWAI, F. et al. (1978). Bacterial oxidation of polyethylene glycol. **Applied and Environmental Microbiology**, v.35, n.4, p.679–684, Apr.
- KEENER, W. K.; ARP, D. J. (1994). Transformations of aromatic compounds by nitrosomonas europaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.6, p.1914-1920, June.
- KHLEIFAT, K. M. (2006). Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two-member facultative anaerobic bacterial consortium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.5, p.1030–1035.
- KIEWIET, A. T. et al. (1996). Sorption of linear alcohol ethoxylates on suspended sediment. **Science**, v.32, n.4, p.675–680.
- KIM, M. K. et al. (2004). Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, rhodospseudomonas palustris, isolated from eutrophicated ponds. **Biotechnology Letters**, v.26, n.10, p.819–822.
- KNAEBEL, D. B. et al. (1996). Microbial mineralization of organic compounds in an acidic agricultural soil: Effects of preadsorption to various soil constituents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.15, n.11, p.1865-1875.
- KNESEBECK, A. (2003). **Estudo experimental e modelagem da fluidodinâmica em leito fluidizado trifásico**. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- KONING, S. M.; et al. (2002). Sugar transport in (hyper)thermophilic archaea. **Research Microbiology**, v.2, n.153, p.61-67.
- KRIEG, N. R. et al. (2010). Bacteroidetes phyl. nov. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nded. New York: Springer. v.4., p.25-470.
- KROGH, K. A. et al. (2003). Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides a review. **Chemosphere**, v.50, n.7, p.871–901, Feb.
- KUDO, Y. et al. (1997). Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, v.22, n.1, p.39-48, Jan.
- KUNII, D.; LEVENSPIEL, O. (1969). **Fluidization engineering**. New York: John Wiley.

- LAHA, S.; LUTHY, R. G. (1992). Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil–water systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, n.11, p.1367–1380, Dec.
- LANE, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques. In: STACKENBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Bacterial systematics**. New York: John Wiley. p.115–148.
- LARSON, R. J.; GAMES, L. M. (1981). Biodegradation of linear alcohol ethoxylates in natural waters. *Environmental Science & Technology*, v.15, n.12, p.1488–1493.
- LAUE, H.; COOK, A M. (2000). Biochemical and molecular characterization of taurine:pyruvate aminotransferase from the anaerobe *Bilophila wadsworthia*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, v.267, n.23, p.6841–6848.
- LAUE, H.; DENGGER, K.; COOK, A. M. (1997). Taurine reduction in anaerobic respiration of *Bilophila wadsworthia* RZATAU. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.5, p.2016–2021, May.
- LAZAREV, V. N. et al. (2011). Complete genome and proteome of *Acholeplasma laidlawii*. *Journal of Bacteriology*, v.193, n.18, p.4943–4953, July.
- LEE, B. K. H. (1970). The effect of anionic and nonionic detergent on soil microfungi. *Can. J. Bot.*, v.48, pp.583–589.
- LEE, Y. J. et al. (2006). *Gracilibacter thermotolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2089–2093.
- LEO, A. J.; HANSCH, C. (1979). Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. New York: Wiley.
- LETTINGA, G. (1984). High rate anaerobic wastewater treatment using the UASB reactor under a wide range of temperature conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering**, v.2, p.252–84.
- LI, F.; WICHMANN, K.; OTTERPOHL, R. (2009). Review of the technological approaches for grey water treatment and reuses. **Science of The Total Environment**, v.407, n.11, p.3439–3449.
- LI, H. Q.; SCHRODER, H. F. (2000). Surfactants - standard determination methods in comparison with substance specific mass spectrometric methods and toxicity testing by *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Water Science and Technology**, v.42, p.391– 398.
- LI, J.-L.; BAI, R. (2005). Effect of a commercial alcohol ethoxylate surfactant (C11-15E7) on biodegradation of phenanthrene in a saline water medium by *Neptunomonas naphthovorans*. **Biodegradation**, v.16, n.1, p.57–65.
- LIAO, R. et al. (2013). The Performance and microbial diversity of an expanded granular sludge bed reactor for high sulfate and nitrate waste brine treatment. **Journal of Environmental Sciences**, v.25, n.1, DOI: 10.1016/S1001-0742(13)60479-9.

- LIESACK, W. et al. (1994). *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. **Archives of Microbiology**, v.162, n.1/2, p.85-90, July.
- LINO, F.A.M. et al. (2010). Energy impact of waste recycleable in a Brazilian metropolitan. **Resources, Conversion and Recycling**, v.54, n.11, p.916-922, Sept.
- LIU, B.; FROSTEGÅRD, Å.; SHAPLEIGH, P. (2013). Draft genome sequences of five strains in the genus *thauera*. **Genome Announcements**, v.1, n.1, p.1–2, Jan./Feb.
- LIU, Y. et al. (1997). Characterization of the anaerobic propionate- degrading syntrophs *smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *synthrophobacter wolenii*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.44, pt.2, p.545-556, Apr.
- LIU, Y. et al. (2010). *Dongia mobilis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Rhodospirillaceae isolated from a sequencing batch reactor for treatment of malachite green effluent. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, pt 12, p. 2780–2785.
- LIU, Y. et al. (2011). Enantioselective degradation and unidirectional chiral inversion of 2-phenylbutyric acid, an intermediate from linear alkylbenzene, by *xanthobacter flavus* PA1. **Journal of Hazardous Materials**, v.192, n.3, p.1633–1640.
- LIU, Z. et al. (2012). Complete genome of *Ignavibacterium album*, a metabolically versatile, flagellated, facultative anaerobe from the phylum chlorobi. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.185. DOI:10.3389/fmicb.2012.00185.
- LIU, Z.; EDWARDS, D. A.; LUTHY, R. G. (1992). Sorption of non-ionic surfactants onto soil. **Water Research**, v.10, n.26, p.1337–1345.
- LIZOTTE JR., R. E. et al. (1999). Environmental contamination and toxicology effects of a homologous series of linear alcohol ethoxylate surfactants on fathead minnow early life stages. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.37, n.4, p.536–541.
- LOBNER, T. et al. (2005). Effects of process stability on anaerobic biodegradation of LAS in UASB reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.89, n.7, p.759-765.
- LOYO-ROSALES, J. E.; RICE, C. P.; TORRENTS, A. (2007). Octyl and nonylphenol ethoxylates and carboxylates in wastewater and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v.68, n.11, p.2118–2127.
- LOZADA, M. et al. (2004). Bacterial community shifts in nonylphenol polyethoxylates-enriched activated sludge. **Water Research**, v.8, n.38, p.2077–2086.
- LOZADA, M. et al. (2006). Replicability of dominant bacterial populations after long-term surfactant-enrichment in lab-scale activated sludge. **Environmental Microbiology**, v.8, n.4, p.625–638.
- MAKI, H. et al. (1994). Degradation of alkylphenol ethoxylates by *Pseudomonas* sp. strain TR01. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.7, p. 2265–2271.

- MALIK, A.; KIMCHHAYARASY, P.; KAKIL, K. (2005). Effect of surfactants on stability of acinetobacter johnsonii S35 and oligotropha carboxidovorans S23 coaggregates. **FEMS Microbiology Ecology**, v.51, n.3, p.313–321, Feb.
- MANRESA, F. N. et al. (2000). Uso del carbon activado la zeolita natural com materiales de soporte, en reactores anaerobios de lecho fluidificado, para el tratamiento de vinaza. In: Oficina E Seminário Latino-Americano De Digestão Anaeróbia, 6., 2000, Pernambuco. **Anais...** Pernambuco: [s.n.]. v.1, p.14-21.
- MARCOMINI, A. et al. (2000). Aerobic biodegradation of monobranched aliphatic alcohol polyethoxylates. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.19, n.3, p.555-560.
- MARGULIES, M. et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v.437, n.7037, p.376-380, July.
- MARIN, M. et al. (1994). Effects and fate of sediment sorbed linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the bivalve mollusk mitilus galloprovincialisLmk. **Water Research**, v.28, n.1, p.85–90, Jan.
- MATSUYAMA, H. et al. (1999). Microbacterium kitamiense sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from the wastewater of a sugar-beet factory. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, pt.4, p.1353-1357.
- MATTHIJS, E. et al. (2004). Determination of alcohol ethoxylate components in sewage sludge. **Tenside Surfactants Detergents**, v.41, n.3, p.113–120.
- MCCRADY, M. H. 1915. The numerical interpretation of fermentation-tube results. **J.**
- MECHICHI, T. et al. (2002). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of thauera phenylacetica sp. nov., thauera aminoaromaticasp. nov., and azoarcus buckelii sp. nov. **Archives Microbiology**, v.1, n.178, p.26-35.
- MEDINGER, R. et al. (2010) Diversity in a hidden word: potencial and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. **Mol. Ecol.** v.19. s.1, pp. 32-40.
- MEISSNER, C.; ENGELHARDT, H. (1999). Trace analysis of surfactants derived from fatty alcohols I. Optimization of derivatization reaction. **Chromatographia**, v.49, n.1/2, p.7–11.
- MENDONÇA, L. C. (2002). **Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- MENDONÇA, N. M. (2004). **Tratamento de esgoto sanitário empregando reator de leito expandido em escala plena com zonas anaeróbias e aeróbias sobrepostas, construção e operação**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

- MENDONÇA, N. M. et al. (2004). Full scale fluidized bed anaerobic reactor for domestic wastewater treatment: performance, sludge production and biofilm. **Water Science and Technology**, v.49, n.11/12, p.319–325.
- MERRETTIG-BRUNS, U.; JELEN, E. (2009). Anaerobic biodegradation of detergent surfactants. **Materials**, v.2, n.1, p.181–206.
- METCALF & EDDY. (2003). **Wastewater engineering treatment and reuse**. 4thed. New York: McGraw – Hill Book.
- MEZZANOTTE, V. et al. (2002). Anaerobic removal of linear alcohol ethoxylates. **Bioresource Technology**, v.82, n.2, p.151–156.
- MIQUELETO, A. P. et al. (2010). Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v.101, pp. 1324–1330
- MORENO, C. E.; HALFFTER, G. (2001). Spatial and temporal analysis of alfa, beta and gama diversities of bats in a fragmente landscape. **Biodiversity and Conservation**, v.10, n.3, p.367–382, Mar.
- MOROTOMI, M.; NAGAI, F.; SAKON, H. Genus megamonas should be placed in the lineage of Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; 'Acidaminococcaceae'; Megamonas. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.57, Pt7, p.1673–1674.
- MORRALL, S. W. et al. (2006). Removal and environmental exposure of alcohol ethoxylates in US sewage treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, n.1, p.3–13, May.
- MÖSCHE, M. (2004). Anaerobic degradability of alcohol ethoxylates and related non-ionic surfactants. **Biodegradation**, v.15, n.5, p.327–336.
- MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. (2008). Occurrence of anionic surfactants in treated sewage: risk assessment to aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v.160, n.2/3, p.362–370.
- MURPHY, E. F. et al. (2010). Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. **Gut**, v.59, n.12, p.1635–1642.
- MURRAY, R. G. E. (1984). The Higher taxa, or, a place for everything...?. In: HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. v.1, p.31–34.
- NAETHER, A. et al. (2012). Environmental factors affect acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. **Applied Environmental Microbiology**, v.78, n.20, p.7398–7406, Aug.
- NATION, J.L. (1983). A New method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. **Biotechnic & Histochemistry**, v.58, n.6, p.347–351.

NAWROCKI, E. P.; KOLBE, D. L. E.; EDDY, S. R. (2009). Infernal 1.0: inference of RNA alignments. **Bioinformatics**, v.25, n.10, p.1335-1337, Mar.

NAWROCKI, E.P.; EDDY, S. R. (2007). Query-dependent banding (QDB) for faster RNA similarity searches. **PLOS Computational Biology**, v.3, n.3, e56.
DOI:10.1371/journal.pcbi.0030056.

NÜBEL, U. et al. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.19, p.5636-5643, Oct.

ODA, Y. et al. (2004). Analysis of diversity among 3-chlorobenzoate-degrading strains of *rhodospseudomonas palustris*. **Microbiology Ecology**, v.47, n.1, p.68-79, Jan.

OHNISHI, M.; SAGITANI, H. (1993). The Effect of nonionic surfactant structure on hemolysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.7, p.679-684, July.

OHTA, H.; HATTORI, T. (1983). *Agromonas oligotrophica* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing oligotrophic bacterium. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.49, n.4/5, p.429-446

OKADA, D. Y. (2012). **Degradação de surfactante aniônico em reator UASB com água residuária de lavanderia**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

OKADA, D. Y. et al. (2013). Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate. **Bioresource Technology**, v.128, p.125-133, Jan.

OLIVEIRA, L. et al. (2009). Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. **Journal of Environmental Management**, v.90, n.2, p.1261-1268.

OLIVEIRA, L. L. D. E. (2010). **Remoção de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

OLIVEIRA, L. L. et al. (2010a). Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate in fluidized bed reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.27, n.4, p.539-543, Oct./Dec.

OLIVEIRA, L. L. et al. (2010b). Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials. **Bioresource Technology**, v.101, n.14, p.5112-5122, July.

OLIVERIA, L. L. et al. (2013). LAS degradation in a fluidized bed reactor and phylogenetic characterization of the biofilm. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.30, n. 03, pp. 521-529.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). (2003). **Anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – method by measurement of gas production**. Draft new guideline 311 (October 2003 version). Paris.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). (2002). **Guideline 308 for the testing of chemicals: aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems**. Paris.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). (2006). Annual Report. **Public Affairs and Communications Directorate**. Paris.

OVERMANN, J. (2006). The Family chlorobiaceae. In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. Dordrecht: Springer. v.7, p.359–380.

PANDAY, D.; DAS, S. K. (2010). Chelatococcus sambhunathii sp. nov., a moderately thermophilic alphaproteobacterium isolated from hot spring sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, pt 4, p.861–865.

PAUL, D. et al. (2008). Genome announcement. genome sequence of the chemolithoautotrophic bacterium oligotropha carboxidovorans OM5. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.15, p.5531–5532, Aug.

PEI, C. X. et al. (2010). Diversity and abundance of the bacterial 16S rRNA gene sequences in forestomach of alpacas (Lama pacos) and sheep (Ovis aries). **Anaeroben**, v.16, n.4, p.426–432, Aug.

PEIXOTO, G. et al. (2012). Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.168, n.3, p.651–671.

PENTEADO, E. D. (2012). **Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

PERALES, J.A. et al. (1999). Biodegradation kinetics of LAS in river water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.43, n.4, p.155–160, June.

PETROVIC, M. et al. (2002). Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal, waters and sediments in Spain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.21, n.1, p.37–46, Jan.

PIELOU, E. C. (1969). **An Introduction to mathematical ecology**. New York: Wiley-Interscience.

PIKUTA, E. V. et al. (2009). Proteocatella spheniscigen. nov., sp. nov., a psychrotolerant, spore-forming anaerobe isolated from penguin guano. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, n.9, p.2302–2307, Sept.

PIVELI, R. P. (2002). **Qualidade das águas**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública/USP. Apostila.

PODOSOKORSKAYA, O. et al. Characterization of melioribacter roseus gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class

Ignavibacteria, and a proposal of a novel bacterial phylum Ignavibacteriae. **Environmental Microbiology**, v.15, n.6, p.1759-1771, June.

POINDEXTER, J. S. (1964). Biological properties and classification of the caulobacter group. Bacteriological reviews. **American Society for Microbiology**, v.28, n.3, p.231-295.

QIU, Y. L. et al. (2008). Syntrophorhabdus aromaticivorans gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.7, p.2051-2058. DOI:10.1128/AEM.02378-07.

QUAISER, A. et al. (2003). Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**, v.50, n.2, p.563-575, Oct.

QUAN, Z.; IM, W.; LEE, S. (2006). Azonexus caeni sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, pt.5, p.1043-1046, May.

QUIROGA J. M. et al. (1999). Biodegradation kinetics of surfactants in seawater. **Chemosphere**, v.39, n.11, p.1957-1969.

REID, S. J.; ABRATT, V. R. (2005). Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.3, p.312-321, May.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. (2006). **The Genera Azoarcus, Azovibrio, Azospira and Azonexus**. New York: Springer. v.5, p.873-891.

RIBOSA, I. et al. (1993). Photobacterium phosphoreum test data of non-ionic surfactants. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v.39, n.3/4, p.237-241.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal Water Pollution Control Federation**, v.8, n.5, p.406-411, May.

RIVIÈRE, D. et al. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. **The ISME Journal**, v.3, n.6, p.700-714, June.

ROBERTS, D. W.; MARSHALL, S. J. (1995). Application of hydrophobicity parameters to prediction of the acute toxicity of commercial surfactant mixtures. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v.4, n.2/3, p.167-176.

RODRIGUES, L. S. (2008). **Concepção e avaliação de sistema de tratamento com reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) e lagoa de polimento para águas residuárias de suinocultura**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

RYUICHIRO, K.; KAYO M.; SAWAKO, N. (2011). **Bacterium for wastewater treatment, wastewater treatment method using the same and defoaming agent for wastewater**. Japanese Patent JP2011050277. Japanese Application Publication (Source: PAJ). Application Number: JP 2009-200308.

SAKAMOTO, I. K. (1996). **Comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo anaeróbio granulado metanogenico, submetido a adições crescente de sulfato**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.

SANCINETTI, G. P. et al. (2012). Phenol degradation in an anaerobic fluidized bed reactor packed with low density support materials. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.1, p.87–98.

SANZ, I., POLANCO, F. (1990). Low temperature treatment of municipal sewage in anaerobic fluidized bed reactors. **Water Research**, v.24, n.4, p.463–469, Apr.

SANZ, J. L. et al. (2003). Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. **Biodegradation**, v.14, n.1, p.57-64, Jan.

SASS, H. et al. (1998). High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. **Archives Microbiology**, v.170, n.4, p.243-251, Sept.

SASS, H. et al. (2004). Desulfosporomusa polytropa gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium from sediments of an oligotrophic lake. **Archives of Microbiology**, v.182, n.2/3, p.204–211.

SCHARER, D. H.; KRAVETZ, L.; CARR J. B. (1979). Biodegradation of nonionic surfactants. **Tappi**, n.62, v.10, pp.75-78.

SCHINK, B.; STIEB, M. (1983). Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, pelobacter venetianus sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.6, p.1905-1913, June.

SCHLEHECK, D. et al. (2000). An Alpha-proteobacterium converts linear alkylbenzenesulfonate surfactants into sulfophenylcarboxylates and linear alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants into sulfodiphenylethercarboxylates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p.1911–1916.

SCHLEIFER, K. H. et al. (1991). The Genus magnetospirillum gen.nov. description of magnetospirillum gryphiswaldense sp.nov. and transfer of aquaspirillum magnetotacticum to magnetospirillum magnetotacticum comb.nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.14, n.4, p.379-385, Oct.

SCHORIES, S.; MEYER, M. K.; SCHARTL, M. (2009). Description of poecilia (Acanthophaelus) obscura n. sp., (Teleostei: Poeciliidae), a new guppy species from western Trinidad, with remarks on P. wingei and the status of the 'Endler's guppy'. **Zootaxa**, n.2266, p.35-50, Oct.

SCHRAMM, E.; SCHINK, B. (1991). Ether-cleaving enzyme and diol dehydratase involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by a new Acetobacterium sp. **Biodegradation**, v.2, n.2, p.71–79, June.

- SCOTT, M. J.; JONES, M. N. (2000). The Biodegradation of surfactants in the environment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, n.1/2, p.235–251.
- SEGHEZZO, L. et al. (1998). A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, v.65, n. 3, p. 175-190.
- SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. (1999). **Isolation of two syntrophic butyrate-oxidizing bacteria from anaerobic wastewater treatment processes**. Published Only in Database 1999.
- SHCHERBAKOVA, V. A.; LAURINAVICHUS, K. S.; AKIMENKO, V. K. (1999). Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. **Chemosphere**, v.29, n.9/11, p.1861-1890, Dec.
- SILVA, E. L. (1985). **Tratamento anaeróbio de fenol em reator de leito fluidificado trifásico**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1985.
- SILVA, M. R. L. (2012). **Caracterização da comunidade microbiana de biofilme anaeróbio em presença de bifenilas policloradas**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- SMALL, F. J.; ENSIGN, S. A. (1995). Carbon dioxide fixation in the metabolism of propylene and propylene oxide by xanthobacter strain Py2. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.21, p.6170–6175, Nov.
- SOHN, J. H. et al. (2004). *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, n.5, p.1483–1487, Sept.
- SPEECE, R. E. (1996). **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Nashville: Archae.
- STALMANS, M. et al. (1995). European life-cycle inventory for detergent surfactant production. **Tenside Surfactants Detergents**, n.32, p.84-109.
- STANDARD Methods for the examination of water and wastewater. (1998). 20th ed. Washington: APHA; AWWA; WEF.
- STANDARD Methods for the examination of water and wastewater. (2005). 21th ed. Washington: APHA; AWWA; WEF.
- STEBER, J.; WIERICH, P. (1985). Metabolites and biodegradation pathways of fatty alcohol ethoxylates in microbial biocenoses of sewage treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, n.3, p.530–537.
- STEBER, J.; WIERICH, P. (1987). The Anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. **Water Research**, v.21, n.6, p.661–667, June.

STERZEL, W. et al. (1990). Comparison of two in vitro and two in vivo methods for measurement of irritancy. **Toxicology In Vitro**, v.4, n.4/5, p.698-701.

SUNG, Y. et al. (2006). *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p.2775-2782.

TALMAGE, S. S. (1994). **Environmental and human safety of major surfactants - alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates**. Oak Ridge: SDA.

TAMAKI, H. et al. (2011). *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, Armatimonadetes phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.61, p.1442-1447.

TAYLOR, P. et al. (2013). Pphotobacterium phosphoreum test data of non-ionic surfactants. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v.39, n.3/4, p.37-41, Apr.

TEDERSOO, L. et al. (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytol.* v.188, n.1, pp. 291-301.

TERRIER, P. et al. (2005). Analysis of poly(oxyethylene) and poly(oxypropylene) triblock copolymers by MALDI-TOF mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.77, n.10, p.3292-3300.

TIDSWELL, E. C.; RUSSELL, N. J.; WHITE, G. F. (1996). Ether-bond scission in the biodegradation of alcohol ethoxylate nonionic surfactants by *Pseudomonas* sp. strain SC25A. **Microbiology**. v.142, n.5, pp.1123-1131.

TORRES, P. (1992). **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simunado esgoto sanitário sob diferentes condições de operação**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

TSOMIDES, H. J. et al. (1995). Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.14, n.6, p.953–959, June.

TURNER, S. et al. (1999). Investigating deep phylogenetic relationship among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, n.4, p.327-338.

UEKI, A. et al. (2006). *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.56, pt.1, p.39-44.

VANDIEKEN, V.; THAMDRUP, B. (2013). Identification of acetate-oxidizing bacteria in a coastal marine surface sediment by RNA-stable isotope probing in anoxic slurries and intact cores. **FEMS Microbiology Ecology**, v.84, n.2, p.373-386, May.

VARROT, A. et al. (2005). NAD⁺ and metal-ion dependent hydrolysis by family 4 glycosidases: structural insight into specificity for phospho-beta-D-glucosides. **Journal of Molecular Biology**, v.346, n.2, p.423-435, Feb.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. (2007). The Division synergistes. **Anaerobe**, v.13, n.3/4, p.99-106, June/Aug.

VEECH, J. A. et al. (2002). The Additive partitioning of species diversity: recente revival of na old idea. **Oikos**, v.99, n.1, p.3-9, Oct.

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

WAGENER, S.; SCHINK, B. (1988). Fermentative degradation of nonionic surfactants and polyethylene glycol by enrichment cultures and by pure cultures of homoacetogenic and propionate-forming bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.2, p.561-565.

WAGNER, I. D.; WIEGEL, J. (2008). Diversity of thermophilic anaerobes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1125, n.1, p.1-43, Mar.

WAHLUND, T. M.; TABITA, F. R.(1997). The Reductive tricarboxylic acid cycle of carbon dioxide assimilation: initial studies and purification of ATP-citrate lyase from the green sulfur bacterium. *Chlorobium tepidum*. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.15, p.4859–4867, Aug.

WANG, L. et al. (2007). Cloud point extraction coupled with HPLC-UV for the determination of phthalate esters in environmental water samples. **Journal of Environmental Science**, v.19, n.7, p.874-878.

WANG, Q. et al. (2007). Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.16, p.5261-5267, Aug.

WARD, N. L. et al. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.7, p.2046–2056.

WARHURST, A. M. (1995). **An Environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols**. Scotland: Friends of the Earth.

WARNE, M. S.; SCHIFKO, A D. (1999). Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, n.2, p.196–206, Oct.

WEAVER, P. F.; WALL, J. D.; GEST, H. (1975). Characterization of rhodopseudomonas capsulata. **Archives Microbiology**, v.105, n.1, p.207-216, Jan.

WEST C.C.; HARWELL, J. H. (1992). Surfactant and surfaces remediation. **Environmental Science and Technology**, v.26, n.12, p.2324-2330, Dec.

WHITE, G. F.; RUSSEL, N. J.; TIDSWELL, E. C. (1996). Bacterial scission of ether bonds. **Microbiological Review**, v.60, n.1, p.216-232, Mar.

- WHITTAKER, R. H. (1960). Vegetation of the siskiyou mountains, Oregon and California. **Ecological Monographs**, v.30, n.3, p.279-338, July.
- WHITTAKER, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. **Taxon**, v.21, n.2/3, p.213-251, May.
- WHITTAKER, R. J.; WILLIS, K. J.; FIELD, R. (2001). Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. **Journal of Biogeography**, v.28, n.4, p.453-470, Apr.
- WOLF, W.; FEIJTEL, T. (1998). Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils. **Chemosphere**, v.36, n.6, p.1319-1343.
- WONG, D. C. L.; DORN, P. B.; CHAI, E. Y. (1997). Acute toxicity and structure-activity relationships of nine alcohol ethoxylate surfactants to fathead minnow and *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, n.10, p.1970-1976, Oct.
- WRIGHT, E. S. et al. (2012). Search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.3, p.717-725, Nov.
- YAMADA, T. et al. (2006). Anaerolinea thermolimosa sp. nov., Levilinea saccharolytica gen. nov., sp. nov. and Leptolinea tardivitalis gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1331-1340.
- YAMADA, T. et al. (2007). Bellilinea caldifistulae gen. nov., sp. nov. and Longilinea arvoryzae gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2299-2306.
- YARZA, P. et al. (2008). The All-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. **Systematic and Applied Microbiology**, v.31, n.4, p.241-250.
- YE, F.; CHEN, Y.; FENG, X. (2005). Advance start-up of anaerobic attached film expanded bed reactor by pre-aeration of biofilm carrier. **Bioresource Technology**, v.96, n.1, p.115-119, Jan.
- YING, G.G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environment International**, v.32, n.3, p.417-431.
- ZEMB, O. et al. (2011). Improvement of RNA-SIP by pyrosequencing to identify putative 4-n-nonylphenol degraders in activated sludge. **Water Research**, v.46, n.3, p.601-661, Mar.
- ZOETENDAL, E. G. et al. (2003). Victivallis vadensis gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.53, Pt.1, p.211-215.
- ZWIETERING, M. H. et al. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p.1875-1881.

9 – ANEXOS

Anexo 1 – Figura 53.

Figura 53 – Histograma da seleção de sequencias das amostras de pirosequenciamento

(A) – Histograma da seleção de sequencias. Amostra do material suporte (areia) Fase IV – MS-C. Total de sequencias 4.958, após *trimming* 3.666.

(B) - Histograma da seleção de sequencias. Amostra do Separador de fases Fase IV SP-C. Total de sequencias 3.997, após *trimming* 2.991.

(C) – Histograma da seleção de sequencias. Amostra do material suporte (areia) Fase V MS-S. Total de sequencias 5.434, após *trimming* 4.193

(D) – Histograma da seleção de sequencias. Amostra do separador de fases Fase V SP-S. Total de sequencias 5.409, após *trimming* 4.102

Anexo 2 – Tabela com descrição dos táxons das amostras de pirosequenciamento do material suporte e separador de fases das Fases IV e V, com respectivos números de sequencias e UTOs.

Táxons	Número de Seqüências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
0_unclassified ⁽¹⁾	359	476	228	1010	35	40	29	41
0_unclassified ⁽²⁾	359	476	228	1010	35	40	29	41
0_unclassified ⁽³⁾	359	476	228	1010	35	40	29	41
0_unclassified ⁽⁴⁾	359	476	228	1010	35	40	29	41
0_unclassified ⁽⁵⁾	359	476	228	1010	35	40	29	41
Acidobacteria ⁽¹⁾	46	148	1017	437	5	5	12	10
Acidobacteria_Gp17 ⁽²⁾	0	0	2	0	0	0	1	0
Gp17 ⁽³⁾	0	0	2	0	0	0	1	0
Gp17 ⁽⁴⁾	0	0	2	0	0	0	1	0
Gp17 ⁽⁵⁾	0	0	2	0	0	0	1	0
Holophagae ⁽²⁾	46	148	1015	437	5	5	11	10
Holophagales ⁽³⁾	46	148	1015	437	5	5	11	10
Holophagaceae ⁽⁴⁾	46	148	1015	437	5	5	11	10
Holophaga ⁽⁵⁾	46	148	1015	437	5	5	11	10
Actinobacteria ⁽¹⁾	0	0	0	6	0	0	0	2
Actinobacteria ⁽²⁾	0	0	0	6	0	0	0	2
Actinomycetales ⁽³⁾	0	0	0	6	0	0	0	2
Microbacteriaceae ⁽⁴⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
Nocardiaceae ⁽⁴⁾	0	0	0	4	0	0	0	1
Gordonia ⁽⁵⁾	0	0	0	4	0	0	0	1

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Armatimonadetes ⁽¹⁾	0	2	0	0	0	1	0	0
Armatimonadetes_gp2 ⁽²⁾	0	2	0	0	0	1	0	0
Armatimonadetes_gp2 ⁽³⁾	0	2	0	0	0	1	0	0
Armatimonadetes_gp2 ⁽⁴⁾	0	2	0	0	0	1	0	0
<i>Armatimonadetes_gp2</i> ⁽⁵⁾	0	2	0	0	0	1	0	0
Bacteroidetes ⁽¹⁾	20	102	54	298	6	11	5	11
0_unclassified ⁽²⁾	0	2	0	2	0	1	0	1
0_unclassified ⁽³⁾	0	2	0	2	0	1	0	1
0_unclassified ⁽⁴⁾	0	2	0	2	0	1	0	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	2	0	2	0	1	0	1
Bacteroidia ⁽²⁾	15	46	48	134	4	4	3	3
Bacteroidales ⁽³⁾	15	46	48	134	4	4	3	3
Porphyromonadaceae ⁽⁴⁾	15	46	48	134	4	4	3	3
0_unclassified ⁽⁵⁾	11	39	42	110	2	3	2	2
<i>Paludibacter</i> ⁽⁵⁾	2	7	6	24	1	1	1	1
<i>Tannerella</i> ⁽⁵⁾	2	0	0	0	1	0	0	0

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Flavobacteria ⁽²⁾	3	49	4	149	1	4	1	4
Flavobacteriales ⁽³⁾	3	49	4	149	1	4	1	4
Cryomorphaceae ⁽⁴⁾	3	32	4	137	1	2	1	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	3	26	4	117	1	1	1	1
<i>Wandonia</i> ⁽⁵⁾	0	6	0	20	0	1	0	1
Flavobacteriaceae ⁽⁴⁾	0	17	0	12	0	2	0	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	5	0	0	0	1	0	0
<i>Cloacibacterium</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
<i>Flavobacterium</i> ⁽⁵⁾	0	12	0	10	0	1	0	1
Sphingobacteria ⁽²⁾	2	5	2	13	1	2	1	3
Sphingobacteriales ⁽³⁾	2	5	2	13	1	2	1	3
0_unclassified ⁽⁴⁾	0	3	2	0	0	1	1	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	3	2	0	0	1	1	0
Chitinophagaceae ⁽⁴⁾	2	2	0	11	1	1	0	2
<i>Ferruginibacter</i> ⁽⁵⁾	0	2	0	11	0	1	0	2
<i>Terrimonas</i> ⁽⁵⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
Cytophagaceae ⁽⁴⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
<i>Meniscus</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
Chlorobi ⁽¹⁾	4	0	0	0	1	0	0	0
Ignavibacteria ⁽²⁾	4	0	0	0	1	0	0	0
Ignavibacteriales ⁽³⁾	4	0	0	0	1	0	0	0
Ignavibacteriaceae ⁽⁴⁾	4	0	0	0	1	0	0	0
<i>Ignavibacterium</i> ⁽⁵⁾	4	0	0	0	1	0	0	0

Continua...

Táxons	Número de Secuencias				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Chloroflexi ⁽¹⁾	106	25	3	8	16	5	1	3
Anaerolineae ⁽²⁾	106	25	3	6	16	5	1	2
Anaerolineales ⁽³⁾	106	25	3	6	16	5	1	2
Anaerolineaceae ⁽⁴⁾	106	25	3	6	16	5	1	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	93	19	3	0	12	3	1	0
<i>Bellilinea</i> ⁽⁵⁾	2	2	0	2	1	1	0	1
<i>Levilinea</i> ⁽⁵⁾	4	0	0	0	1	0	0	0
<i>Longilinea</i> ⁽⁵⁾	7	4	0	4	2	1	0	1
Ktedonobacteria ⁽²⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
Ktedonobacterales ⁽³⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
Ktedonobacteraceae ⁽⁴⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
<i>Ktedonobacter</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
Firmicutes ⁽¹⁾	925	746	484	928	56	54	51	77
0_unclassified ⁽²⁾	65	96	110	388	13	10	11	16
0_unclassified ⁽³⁾	65	96	110	388	13	10	11	16
0_unclassified ⁽⁴⁾	65	96	110	388	13	10	11	16
0_unclassified ⁽⁵⁾	65	96	110	388	13	10	11	16
Bacilli ⁽²⁾	0	0	0	5	0	0	0	1
Lactobacillales ⁽³⁾	0	0	0	5	0	0	0	1
0_unclassified ⁽⁴⁾	0	0	0	5	0	0	0	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	0	0	5	0	0	0	1

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Clostridia ⁽²⁾	505	374	265	281	27	30	32	45
0_unclassified ⁽³⁾	2	0	0	2	1	0	0	1
0_unclassified ⁽⁴⁾	2	0	0	2	1	0	0	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	2	0	0	2	1	0	0	1
Clostridiales ⁽³⁾	503	374	265	279	26	30	32	44
0_unclassified ⁽⁴⁾	372	222	71	103	16	12	12	20
0_unclassified ⁽⁵⁾	372	222	71	103	16	12	12	20
Clostridiaceae 1 ⁽⁴⁾	3	0	22	6	1	0	2	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	3	0	22	6	1	0	2	2
Clostridiales_Incertae Sedis XI ⁽⁴⁾	65	66	94	101	3	5	6	7
<i>Sedimentibacter</i> ⁽⁵⁾	65	66	94	101	3	5	6	7
Clostridiales_Incertae Sedis XIII ⁽⁴⁾	0	6	9	12	0	2	1	2
<i>Anaerovorax</i> ⁽⁵⁾	0	6	9	12	0	2	1	2
Gracilibacteraceae ⁽⁴⁾	0	8	7	9	0	2	2	3
<i>Gracilibacter</i> ⁽⁵⁾	0	8	7	9	0	2	2	3
Lachnospiraceae ⁽⁴⁾	2	20	2	6	1	2	1	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	20	2	6	0	2	1	1
<i>Clostridium XIVb</i> ⁽⁵⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
Peptococcaceae 1 ⁽⁴⁾	0	0	4	6	0	0	1	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	0	4	6	0	0	1	1

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Peptostreptococcaceae ⁽⁴⁾	32	27	28	27	2	2	4	4
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	0	3	2	0	0	1	1
<i>Acetoanaerobium</i> ⁽⁵⁾	0	0	9	13	0	0	2	2
<i>Proteocatella</i> ⁽⁵⁾	32	27	16	12	2	2	1	1
Ruminococcaceae ⁽⁴⁾	5	22	23	4	1	4	2	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	12	12	2	0	2	1	1
<i>Clostridium III</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
<i>Papillibacter</i> ⁽⁵⁾	5	10	11	0	1	2	1	0
Syntrophomonadaceae ⁽⁴⁾	24	3	5	5	2	1	1	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	7	3	0	0	1	1	0	0
<i>Syntrophomonas</i> ⁽⁵⁾	17	0	5	5	1	0	1	2
Negativicutes ⁽²⁾	355	276	109	254	16	14	8	15
Selenomonadales ⁽³⁾	355	276	109	254	16	14	8	15
0_unclassified ⁽⁴⁾	5	30	12	59	1	1	1	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	5	30	12	59	1	1	1	1
Acidaminococcaceae ⁽⁴⁾	3	3	0	10	1	1	0	1
<i>Succinispira</i> ⁽⁵⁾	3	3	0	10	1	1	0	1
Veillonellaceae ⁽⁴⁾	347	243	97	185	14	12	7	13
0_unclassified ⁽⁵⁾	52	21	81	116	3	3	4	5
<i>Anaerosinus</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
<i>Desulfosporomusa</i> ⁽⁵⁾	9	3	0	4	2	1	0	1
<i>Sporomusa</i> ⁽⁵⁾	286	219	16	63	9	8	3	6

Continua...

Táxons	Número de Seqüências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Fusobacteria ⁽¹⁾	10	6	4	6	3	3	1	2
Fusobacteria ⁽²⁾	10	6	4	6	3	3	1	2
Fusobacteriales ⁽³⁾	10	6	4	6	3	3	1	2
Fusobacteriaceae ⁽⁴⁾	10	6	4	6	3	3	1	2
<i>Cetobacterium</i> ⁽⁵⁾	10	6	4	6	3	3	1	2
Gemmatimonadetes ⁽¹⁾	13	4	0	2	1	2	0	1
Gemmatimonadetes ⁽²⁾	13	4	0	2	1	2	0	1
Gemmatimonadales ⁽³⁾	13	4	0	2	1	2	0	1
Gemmatimonadaceae ⁽⁴⁾	13	4	0	2	1	2	0	1
<i>Gemmatimonas</i> ⁽⁵⁾	13	4	0	2	1	2	0	1
Lentisphaerae ⁽¹⁾	4	41	0	0	1	3	0	0
Lentisphaeria ⁽²⁾	4	41	0	0	1	3	0	0
Victivallales ⁽³⁾	4	41	0	0	1	3	0	0
Victivallaceae ⁽⁴⁾	4	41	0	0	1	3	0	0
<i>Victivallis</i> ⁽⁵⁾	4	41	0	0	1	3	0	0
Proteobacteria ⁽¹⁾	1895	1175	2186	760	75	77	60	55
0_unclassified ⁽²⁾	25	105	98	57	4	4	5	6
0_unclassified ⁽³⁾	25	105	98	57	4	4	5	6
0_unclassified ⁽⁴⁾	25	105	98	57	4	4	5	6
0_unclassified ⁽⁵⁾	25	105	98	57	4	4	5	6

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Alphaproteobacteria ⁽²⁾	37	60	128	44	11	10	10	9
0_unclassified ⁽³⁾	0	5	46	0	0	1	2	0
0_unclassified ⁽⁴⁾	0	5	46	0	0	1	2	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	5	46	0	0	1	2	0
Caulobacterales ⁽³⁾	10	26	50	18	2	3	2	4
Caulobacteraceae ⁽⁴⁾	10	26	50	18	2	3	2	4
<i>Caulobacter</i> ⁽⁵⁾	0	0	7	7	0	0	1	2
<i>Phenylobacterium</i> ⁽⁵⁾	10	26	43	11	2	3	1	2
Rhizobiales ⁽³⁾	16	11	16	11	4	4	3	2
Beijerinckiaceae ⁽⁴⁾	0	0	4	0	0	0	1	0
<i>Chelatococcus</i> ⁽⁵⁾	0	0	4	0	0	0	1	0
Bradyrhizobiaceae ⁽⁴⁾	13	9	9	9	3	3	1	1
<i>Agromonas</i> ⁽⁵⁾	4	3	0	0	1	1	0	0
<i>Bosea</i> ⁽⁵⁾	0	0	9	0	0	0	1	0
<i>Oligotropha</i> ⁽⁵⁾	4	3	0	0	1	1	0	0
<i>Rhodopseudomonas</i> ⁽⁵⁾	5	3	0	9	1	1	0	1
Methylocystaceae ⁽⁴⁾	0	2	3	0	0	1	1	0
<i>Pleomorphomonas</i> ⁽⁵⁾	0	2	3	0	0	1	1	0
Xanthobacteraceae ⁽⁴⁾	3	0	0	2	1	0	0	1
<i>Pseudolabrys</i> ⁽⁵⁾	3	0	0	0	1	0	0	0
<i>Xanthobacter</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Rhodospirillales ⁽³⁾	9	14	3	9	4	1	1	2
0_unclassified ⁽⁴⁾	3	14	0	0	1	1	0	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	3	14	0	0	1	1	0	0
Acetobacteraceae ⁽⁴⁾	2	0	3	0	1	0	1	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
<i>Rhodovarius</i> ⁽⁵⁾	0	0	3	0	0	0	1	0
Rhodospirillaceae ⁽⁴⁾	4	0	0	9	2	0	0	2
<i>Dongia</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
<i>Magnetospirillum</i> ⁽⁵⁾	2	0	0	7	1	0	0	1
<i>Oceanibaculum</i> ⁽⁵⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
Sphingomonadales ⁽³⁾	2	4	13	6	1	1	2	1
Erythrobacteraceae ⁽⁴⁾	0	0	7	0	0	0	1	0
<i>Croceicoccus</i> ⁽⁵⁾	0	0	7	0	0	0	1	0
Sphingomonadaceae ⁽⁴⁾	2	4	6	6	1	1	1	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
<i>Novosphingobium</i> ⁽⁵⁾	0	4	0	0	0	1	0	0
<i>Sphingobium</i> ⁽⁵⁾	0	0	6	6	0	0	1	1
Betaproteobacteria ⁽²⁾	1173	291	337	66	20	20	13	14
0_unclassified ⁽³⁾	0	0	2	0	0	0	1	0
0_unclassified ⁽⁴⁾	0	0	2	0	0	0	1	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	0	2	0	0	0	1	0

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Burkholderiales ⁽³⁾	4	13	25	18	1	4	5	7
0_unclassified ⁽⁴⁾	4	0	4	4	1	0	1	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	4	0	4	4	1	0	1	1
Burkholderiales_incertae_sedis ⁽⁴⁾	0	6	9	4	0	2	1	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	2	9	2	0	1	1	1
<i>Aquabacterium</i> ⁽⁵⁾	0	4	0	2	0	1	0	1
Comamonadaceae ⁽⁴⁾	0	7	12	10	0	2	3	4
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	7	9	10	0	2	2	4
<i>Delftia</i> ⁽⁵⁾	0	0	3	0	0	0	1	0
Hydrogenophilales ⁽³⁾	3	0	0	0	1	0	0	0
Hydrogenophilaceae ⁽⁴⁾	3	0	0	0	1	0	0	0
<i>Thiobacillus</i> ⁽⁵⁾	3	0	0	0	1	0	0	0
Neisseriales ⁽³⁾	0	20	0	5	0	1	0	1
Neisseriaceae ⁽⁴⁾	0	20	0	5	0	1	0	1
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	20	0	5	0	1	0	1
Nitrosomonadales ⁽³⁾	2	17	0	0	1	2	0	0
Nitrosomonadaceae ⁽⁴⁾	2	17	0	0	1	2	0	0
<i>Nitrosomonas</i> ⁽⁵⁾	2	17	0	0	1	2	0	0

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Rhodocyclales ⁽³⁾	1164	241	310	43	17	13	7	6
Rhodocyclaceae ⁽⁴⁾	1164	241	310	43	17	13	7	6
0_unclassified ⁽⁵⁾	1130	122	0	3	9	6	0	1
<i>Azonexus</i> ⁽⁵⁾	12	64	299	31	3	3	3	2
<i>Azospira</i> ⁽⁵⁾	6	0	0	3	2	0	0	1
<i>Azovibrio</i> ⁽⁵⁾	9	24	0	0	1	1	0	0
<i>Dechloromonas</i> ⁽⁵⁾	0	0	3	0	0	0	1	0
<i>Propionivibrio</i> ⁽⁵⁾	0	0	6	0	0	0	2	0
<i>Thauera</i> ⁽⁵⁾	5	0	0	0	1	0	0	0
<i>Zoogloea</i> ⁽⁵⁾	2	31	2	6	1	3	1	2
Deltaproteobacteria ⁽²⁾	554	511	1565	572	27	27	29	22
0_unclassified ⁽³⁾	2	7	0	0	1	2	0	0
0_unclassified ⁽⁴⁾	2	7	0	0	1	2	0	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	2	7	0	0	1	2	0	0
Desulfobacterales ⁽³⁾	208	81	609	69	4	4	6	2
Desulfobulbaceae ⁽⁴⁾	208	81	609	69	4	4	6	2
<i>Desulfobulbus</i> ⁽⁵⁾	208	81	609	69	4	4	6	2
Desulfovibrionales ⁽³⁾	55	89	483	222	8	6	11	7
0_unclassified ⁽⁴⁾	12	14	10	9	2	1	2	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	12	14	10	9	2	1	2	2
Desulfovibrionaceae ⁽⁴⁾	43	75	473	213	6	5	9	5
0_unclassified ⁽⁵⁾	32	71	463	211	3	3	6	4
<i>Bilophila</i> ⁽⁵⁾	11	4	10	2	3	2	3	1

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Desulfuromonadales ⁽³⁾	220	292	468	273	7	9	10	10
Geobacteraceae ⁽⁴⁾	220	292	468	273	7	9	10	10
<i>Geobacter</i> ⁽⁵⁾	220	292	468	273	7	9	10	10
Syntrophobacterales ⁽³⁾	13	5	0	2	3	1	0	1
Syntrophaceae ⁽⁴⁾	11	5	0	2	2	1	0	1
<i>Smithella</i> ⁽⁵⁾	11	5	0	2	2	1	0	1
Syntrophobacteraceae ⁽⁴⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
Syntrophorhabdaceae ⁽³⁾	56	37	5	6	4	5	2	2
Syntrophorhabdaceae ⁽⁴⁾	56	37	5	6	4	5	2	2
<i>Syntrophorhabdus</i> ⁽⁵⁾	56	37	5	6	4	5	2	2
Epsilonproteobacteria ⁽²⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
Campylobacterales ⁽³⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
Campylobacteraceae ⁽⁴⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
<i>Arcobacter</i> ⁽⁵⁾	2	0	0	0	1	0	0	0
Gammaproteobacteria ⁽²⁾	104	208	58	21	12	16	3	4
Aeromonadales ⁽³⁾	22	50	49	17	3	4	2	2
Aeromonadaceae ⁽⁴⁾	22	50	49	17	3	4	2	2
0_unclassified ⁽⁵⁾	0	2	0	0	0	1	0	0
<i>Aeromonas</i> ⁽⁵⁾	20	46	49	17	2	2	2	2
<i>Tolumonas</i> ⁽⁵⁾	2	2	0	0	1	1	0	0

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Chromatiales ⁽³⁾	14	18	0	0	2	2	0	0
Halothiobacillaceae ⁽⁴⁾	14	18	0	0	2	2	0	0
<i>Thiovirga</i> ⁽⁵⁾	14	18	0	0	2	2	0	0
Enterobacteriales ⁽³⁾	8	31	0	0	2	2	0	0
Enterobacteriaceae ⁽⁴⁾	8	31	0	0	2	2	0	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	4	15	0	0	1	1	0	0
<i>Rahnella</i> ⁽⁵⁾	4	16	0	0	1	1	0	0
Pseudomonadales ⁽³⁾	60	106	9	2	5	7	1	1
Moraxellaceae ⁽⁴⁾	2	0	9	2	1	0	1	1
<i>Acinetobacter</i> ⁽⁵⁾	2	0	9	2	1	0	1	1
Pseudomonadaceae ⁽⁴⁾	58	106	0	0	4	7	0	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	20	14	0	0	2	4	0	0
<i>Serpens</i> ⁽⁵⁾	38	92	0	0	2	3	0	0
Xanthomonadales ⁽³⁾	0	3	0	2	0	1	0	1
Xanthomonadaceae ⁽⁴⁾	0	3	0	2	0	1	0	1
<i>Rhodanobacter</i> ⁽⁵⁾	0	3	0	0	0	1	0	0
<i>Thermomonas</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	2	0	0	0	1
Spirochaetes ⁽¹⁾	0	0	0	5	0	0	0	1
Spirochaetes ⁽²⁾	0	0	0	5	0	0	0	1
Spirochaetales ⁽³⁾	0	0	0	5	0	0	0	1
Leptospiraceae ⁽⁴⁾	0	0	0	5	0	0	0	1
<i>Leptonema</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	5	0	0	0	1

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Synergistetes ⁽¹⁾	130	90	79	306	8	8	8	10
Synergistia ⁽²⁾	130	90	79	306	8	8	8	10
Synergistales ⁽³⁾	130	90	79	306	8	8	8	10
Synergistaceae ⁽⁴⁾	130	90	79	306	8	8	8	10
0_unclassified ⁽⁵⁾	26	28	54	272	4	4	5	6
<i>Aminomonas</i> ⁽⁵⁾	22	17	8	13	1	1	1	1
<i>Synergistes</i> ⁽⁵⁾	82	45	17	21	3	3	2	3
Tenericutes ⁽¹⁾	0	0	0	121	0	0	0	2
Mollicutes ⁽²⁾	0	0	0	121	0	0	0	2
Acholeplasmatales ⁽³⁾	0	0	0	121	0	0	0	2
Acholeplasmataceae ⁽⁴⁾	0	0	0	121	0	0	0	2
<i>Acholeplasma</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	121	0	0	0	2
Verrucomicrobia ⁽¹⁾	16	22	12	6	5	6	3	2
0_unclassified ⁽²⁾	3	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified ⁽³⁾	3	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified ⁽⁴⁾	3	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified ⁽⁵⁾	3	0	0	0	1	0	0	0
Spartobacteria ⁽²⁾	0	0	0	3	0	0	0	1
Spartobacteria_incertain_sedis ⁽³⁾	0	0	0	3	0	0	0	1
Spartobacteria_incertain_sedis ⁽⁴⁾	0	0	0	3	0	0	0	1
<i>Spartobacteria_incertain_sedis</i> ⁽⁵⁾	0	0	0	3	0	0	0	1

Continua...

Táxons	Número de Sequências				Número de UTOs			
	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S	MS-C	SF-C	MS-S	SF-S
Subdivision3 ⁽²⁾	7	9	6	0	2	3	2	0
Subdivision3_incertae_sedis ⁽³⁾	7	9	6	0	2	3	2	0
Subdivision3_incertae_sedis ⁽⁴⁾	7	9	6	0	2	3	2	0
<i>Subdivision3_incertae_sedis</i> ⁽⁵⁾	7	9	6	0	2	3	2	0
Subdivision5 ⁽²⁾	2	7	0	0	1	2	0	0
Subdivision5_incertae_sedis ⁽³⁾	2	7	0	0	1	2	0	0
Subdivision5_incertae_sedis ⁽⁴⁾	2	7	0	0	1	2	0	0
<i>Subdivision5_incertae_sedis</i> ⁽⁵⁾	2	7	0	0	1	2	0	0
Verrucomicrobiae ⁽²⁾	4	6	6	3	1	1	1	1
Verrucomicrobiales ⁽³⁾	4	6	6	3	1	1	1	1
Verrucomicrobiaceae ⁽⁴⁾	4	6	6	3	1	1	1	1
<i>Luteolibacter</i> ⁽⁵⁾	4	6	6	3	1	1	1	1
Total geral	3528	2837	4067	3893	212	215	170	217

OTUs (*Operation Taxonomic Units*). (1) – Filo; (2) – Classe; (3) – Ordem; (4) – Família; (5) – Gênero