RECUPERAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS CONTAMINADAS POR GASOLINA USANDO REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP
EXEMPLAR REVISADO
Data de entrada no Serviço.....10/01/06
Ass.: <i>Casan</i>

Rogers Ribeiro

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
Engenharia Civil

ORIENTADOR: Prof. Ass. Marcelo Zaiat

São Carlos
2005

DEDALUS - Acervo - EESC

31100053646

Class.	TESE-EESC ✓
Cutt.	4770
Tombo	T009/06
Sysno	1489167

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

R484r Ribeiro, Rogers
Recuperação da qualidade de águas contaminadas por
gasolina usando reator anaeróbio de leito fixo / Rogers
Ribeiro. -- São Carlos, 2005.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São
Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.
Área: Hidráulica e Saneamento.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat.

1. Gasolina. 2. Biorremediação ex situ. 3. BTEX.
4. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo.
5. Modelagem cinética. 6. FISH. 7. DGGE. 8. PCR.
- I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **ROGERS RIBEIRO**

Tese defendida e julgada em 25-02-2005 perante a Comissão Julgadora:

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

Aprovado

Prof. Dr. **JOSÉ ALBERTO DOMINGUES RODRIGUES**
(Escola de Engenharia de Mauá)

Aprovado

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

Aprovado

Prof. Dr. **GERALDO LIPPEL SANT'ANNA JÚNIOR**
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)

Aprovado.

Prof. Dr. **LUIZ OLINTO MONTEGGIA**
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS)

Aprovado

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

 

“A vida, não tente compreendê-la,
e então ela será como uma festa.
E que cada dia te aconteça
como a uma criança que, ao caminhar,
de cada sopro de vento
vai recebendo presentes de flores.

Apanha-las e guarda-las,
nem isso pensa a criança.
Tira-las devagar do cabelo
onde se sentiam tão bem,
e estende as mãos aos jovens anos
para receber novas flores.”

(Rainer Maria Rilke)

*À razão da minha vida,
Ana Clara.*

*Ao meu grande amor,
Samantha
que vem me guiando pelos caminhos da vida.*

 

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marcelo Zaiat, pela amizade, orientação, incentivo e principalmente por ser um exemplo que pretendo seguir pela vida inteira.

Ao Prof. Eugenio Foresti, pelo exemplo de honestidade e competência, e pela confiança em mim depositada.

À Maria Bernadete Varesche, pela amizade, pela atenção e pelo valioso aprendizado principalmente no que diz respeito à dedicação à pesquisa e ao trabalho.

A profª Elisabeth Moraes e Maria Ângela Talarico pela dedicação, pela grande amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos grandes amigos Fernandão, Douglas, André Campos, Luciana Mendonça, Neyson, Giovana, Claudião, Cássia, Katt Lapa, Luis Hamilton, Karina, Valmir, André Mineiro, Ana Flávia, Gunther, Drica, Selma, Edson Rivelino e Márcio Barboza.

À Bruna Soares Fernandes, pela inestimável ajuda na operação dos reatores alimentados com efluente contaminado com gasolina.

Ao Fábio Alexandre Chinalia, pela realização de exames microbiológicos empregando as técnicas de PCR/DGGE.

À Mércia Regina Domingues, pela realização de exames microbiológicos empregando a técnica de FISH.

À Dalva de Souza, pela ajuda na operação dos reatores operados em batelada seqüências.

À Ana Paula Paim, pela competência e disposição em auxiliar nas análises realizadas no LATAR.

Aos companheiros de LPB: Flávia, Betão, Ariovaldo, Valquíria, Sávia, Dirlane, Arnaldo, Andréa, Luis Ricardo, Cattony, Estela, Larissa, Ana Paula, Isabel, Sidiney, Sandra, Júlia, Iolanda, Márcia Damianovic, Luana, Leonídia e Cristina.

À FAPESP pelo financiamento do projeto e pela bolsa.

À FINEP pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. Revisão da Literatura	5
3.1. O problema da contaminação dos aquíferos	5
3.2. O problema da contaminação dos aquíferos por gasolina	8
3.3. Composição da gasolina	10
3.4. Compostos aromáticos	11
3.5. Fases de Contaminação do Aquífero	13
3.6. Tecnologias empregadas na remediação de aquíferos	15
3.7. Degradação de BTEX em biorreatores	19
3.7.1. Reatores baseados em crescimento suspenso dos microrganismos	19
3.7.2. Reatores com biomassa imobilizada	21
3.8. Obtenção dos parâmetros cinéticos de consumo dos BTEX	24
3.9. Formação e caracterização microbiana do biofilme anaeróbio	27
3.10. Considerações Finais	30

4.	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1.	Descrição geral dos experimentos	31
4.2.	Inóculo	32
4.3.	Imobilização da Biomassa Anacróbia	33
4.4.	Configuração do reator anacróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)	33
4.5.	Caracterização físico-química da gasolina utilizada na alimentação dos RAHLF's	34
4.6.	Extração da gasolina para alimentação do RAHLF	34
4.7.	Operação dos reatores anacróbios horizontais de leito fixo	36
4.7.1.	Fase 1 - Formação do biofilme anacróbio	38
4.7.2.	Fase 2 - Aumento da concentração de BTX na alimentação	38
4.7.3.	Fase 3 - Otimização do tempo de detenção hidráulico (TDH)	39
4.8.	Avaliação da cinética de degradação dos BTX utilizando reator anacróbio operado em bateladas seqüenciais, contendo biomassa imobilizada	40
4.9.	Montagem experimental utilizando reator anacróbio operado em bateladas seqüenciais	41
4.9.	Composição da água contaminada utilizada na alimentação dos reatores anacróbios operados em bateladas seqüenciais	42
4.11.	Análises Físico-Químicas	43
4.11.1.	Determinação de BTX por cromatografia gasosa	44
4.11.2.	Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa	45
4.11.3.	Composição dos Gases	45
4.11.4.	Quantificação da Biomassa Aderida	46
4.12.	Formação e Caracterização Morfológica do Biofilme no RAHLF	47
4.13.	Hibridação Fluorescente In Situ (Fish)	47
4.13.1.	Sondas de oligonucleotídeos fluorescentes	47
4.13.2.	Preparação das amostras	48
4.13.3.	Fixação das amostras	48
4.13.4.	Tratamento das lâminas de vidro	49
4.13.5.	Teste de desprendimento celular por sonicação	49
4.13.6.	Hibridação in situ	49

4.14.	Caracterização molecular da diversidade microbiana no RAHLF através de técnicas de PCR/DGGE	51
4.14.1.	Extração de DNA de comunidade microbiana.	51
4.14.2.	Análise de comunidades por meio de DGGE	52
4.15.	Modelagem matemática	53
4.15.1.	Modelo cinético de primeira ordem com concentração residual (RAHLF)	53
4.15.2.	Modelo cinético de reações em série paralelo para consumo de matéria orgânica e BTX (Reator Anaeróbio Operado em Bateladas Sequenciais)	54
4.15.2.	Validação do modelo cinético de reações em série paralelo para consumo de matéria orgânica e BTX (Reator Anaeróbio Operado Em Batelada Sequencial)	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1.	Operação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo	60
5.1.1.	Fase 1 - Formação do biofilme anaeróbio	60
5.1.2.	Fase 2 - Aumento da concentração de BTX na alimentação	65
5.1.2.1.	Operação do reator desnitrificante	71
5.1.2.2.	Operação do reator metanogênico	80
5.1.3.	Fase 3 - Otimização do tempo de detenção hidráulica (TDH)	88
5.2.	Quantificação da Biomassa Aderida	99
5.3.	Caracterização Microbiana	101
5.3.1.	Reator desnitrificante	101
5.3.1.1.	Caracterização molecular da diversidade microbiana no reator	105
5.3.2.	Reator metanogênico	109
5.3.2.1.	Caracterização molecular da diversidade microbiana no reator	113

5.4.	Avaliação do reator anaeróbio com biomassa imobilizada operado em bateladas sequenciais	118
5.4.1.	Reator alimentado com benzeno	118
5.4.2.	Reator alimentado com tolueno	124
5.4.3.	Reator alimentado com meta-xileno	126
6.	CONCLUSÕES	129
7.	SUGESTÕES	133
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

LISTA DE SÍMBOLOS

θ_H - tempo de detenção hidráulica teórico

r_S - a velocidade de consumo de substrato

$k^{aparente}$ - coeficiente cinético aparente de primeira ordem

C_S - concentração de substrato

C_{SR} - concentração residual de substrato

C_{S0} - concentração inicial de substrato

$K^{aparente}$ - coeficiente cinético aparente de primeira ordem

D - diâmetro do reator

L - comprimento do reator

v_S - velocidade superficial do líquido

Q - vazão do líquido

ε - porosidade do leito

A_{reator} - área da seção transversal do reator

C_{etanol} - concentração de etanol

$C_{acético}$ - concentração de ácido acético

$C_{propiónico}$ - concentração de ácido propiónico

$C_{aromático}$ - concentração de compostos aromáticos

C_{AR-R} - concentração residual de compostos aromáticos

C_{SBRUTA} - concentração de matéria orgânica medida como DQO bruta

$C_{SFILTRADA}$ - concentração de matéria orgânica medida como DQO filtrada

$v_{máx}$ - velocidade máxima de consumo de substrato

$U_{máx}$ - velocidade máxima de consumo de substrato

K_m constante de saturação do substrato, que equivale à concentração de substrato na qual

$v_{máx}$ atinge a metade de seu valor para o modelo de Michaelis-Menten (sic).

$k_{I-PROPIÓNICO}$ e $k_{I-ACÉTICO}$ - coeficientes cinéticos aparentes de inibição competitiva da degradação dos compostos aromáticos devido à presença de ácido propiónico e ácido

acético, respectivamente.

k_{1-AD} e k_{2-AD} - coeficientes empíricos da isoterma de adsorção de Langmuir

F_{calc} - relação entre o erro obtido pela falta de ajuste de um dado modelo e a estimativa do erro experimental

s_c^2 - estimativa da variância do erro do modelo

n - número de pontos por variável

v - número de variáveis

$(nv)_c$ - número de pontos ajustados (para todos os ensaios e variáveis)

p - número de parâmetros

$\sim$

$\hat{y}_{ij}$ - valor da variável calculado pelo modelo

y_{ij} - valor experimental da variável

s_e^2 - estimativa da variância do erro experimental

$(nv)_e$ - número de pontos experimentais (para todos os ensaios e variáveis)

$\bar{y}_{ij}$ - média da variável para os ensaios repetidos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP - Agência Nacional Do Petróleo

ASBBR - Reator Anacróbio Operado Em Bateladas Sequenciais Contendo Biomassa Imobilizada

AVT - Ácidos Voláteis Totais

BTX - Benzeno, Tolueno e Xilenos.

BTEX - Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

COV - Carga Orgânica Volumétrica

DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DQO - Demanda Química de Oxigênio

FA - Fase Aquosa

FISH - Hibridação Fluorescente In Situ

FO - Fase Orgânica

MEV - Microscopia Eletrônica De Varredura

N-NO₂⁻ - Nitrogênio como Nitrito

N-NO₃⁻ - Nitrogênio como Nitrato

Pespuma - Peso dos cubos de espuma

PCP - Pentaclorofenol

PCR - Polymerase Chain Reaction

RAHLF - Reator Anacróbio Horizontal De Leito Fixo

RMSP - Região Metropolitana de São Paulo

SSV - Sólidos Suspensos Voláteis

ST - Sólidos Totais

SVT - Sólidos Voláteis Totais

TAS - Tanques de Armazenagem Subterrânea

TDH - Tempo De Detenção Hidráulica

UASB - Reator Anaeróbio de manta de Lodo com Fluxo Ascendente

U.S. EPA - United States Environmental Agency

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 : Distribuição das áreas contaminadas em relação ao contaminante (Fonte: CETESB, 2002).	6
Figura 3.2 Distribuição das áreas contaminadas no estado de São Paulo por atividade - maio de 2002 (CETESB, 2002).	7
Figura 3.3 Distribuição das áreas contaminadas no estado de São Paulo por atividade - outubro de 2003 (CETESB, 2003).	7
Figura 3.4 : Estrutura química de alguns compostos presentes na composição da gasolina.	11
Figura 3.5 : Visão esquemática de aquífero contaminado por combustível oriundo de um TAS. (U.S. EPA, 1999).	14
Figura 3.6 : Visão esquemática do sistema de “air sparging”. (U.S. EPA, 1994).	16
Figura 3.7 : Visão esquemática do sistema de biorremediação <i>in situ</i> . (U.S. EPA, 1995).	17
Figura 4.1 : Fluxograma da etapa experimental 1: operação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo.	32
Figura 4.2 : fluxograma da etapa experimental 2: avaliação da cinética de degradação dos BTX utilizando reator anaeróbio com biomassa imobilizada operado em bateladas sequenciais.	32
Figura 4.3 : esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF).	33
Figura 4.4 : variação da Concentração de BTX em relação à fração de etanol na fase aquosa.	35

- Figura 4.5 : esquema da instalação experimental. (a) motor; (b) eixo de agitação;
 (c) camisa de aquecimento para manutenção da temperatura do meio líquido;
 (d) cesto contendo biomassa; (e) banho ultratermostatizado para manutenção da
 temperatura da água da camisa; (f) bomba de deslocamento positivo, para
 alimentação do reator; (g) bomba de deslocamento positivo com diafragma,
 para descarte do reator; (h) impelidores (2). 42
- Figura 4.6 : lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridação *in situ*. 49
- Figura 4.7 : mecanismos cinéticos propostos para degradação anaeróbia de etanol (a) e
 benzeno (b) no reator anaeróbio em batelada sequencial. 55
- Figura 5.1 : Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – fase 1: (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$;
 (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais;
 (d) - $N\text{-NO}_3^-$ e $N\text{-NO}_2^-$. 61
- Figura 5.2 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – fase 1:
 (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos
 voláteis totais. 62
- Figura 5.3 : Perfis de Concentração ao longo do reator desnitrificante – fase 1:
 (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - $N\text{-NO}_3^-$; (d) - $N\text{-NO}_2^-$. 63
- Figura 5.4 : Perfis de Concentração ao longo do reator metanogênico – fase 1:
 (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$. 64
- Figura 5.5 : Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – fase 2 - adaptação:
 (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e
 (b) ácidos voláteis totais; (d) - $N\text{-NO}_3^-$ e $N\text{-NO}_2^-$. 65
- Figura 5.6 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – fase 2 - adaptação:
 (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis
 totais. 66
- Figura 5.7 : Perfis de Concentração ao longo do reator desnitrificante – fase 2 – adaptação:
 (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - $N\text{-NO}_3^-$ e $N\text{-NO}_2^-$; (d) – ácidos voláteis
 analisados por cromatografia. 68
- Figura 5.8 : Perfis de Concentração ao longo do reator metanogênico – fase 2 – adaptação:
 (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - ácidos voláteis analisados
 por cromatografia. 69

- Figura 5.9 : Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante -- fase 2 --
 Concentração 1: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato;
 (d) - ácidos voláteis totais; (e) - ácidos voláteis analisados por cromatografia;
 (f) - produção de metano. 72
- Figura 5.10 : Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante -- fase 2 --
 Concentração 1: (a) - $N\text{-NO}_3^-$; (b) - $N\text{-NO}_2^-$; (c) - sólidos suspensos voláteis. 73
- Figura 5.11 : Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante -- fase 2 --
 Concentração 1: (a) - benzeno; (b) - tolueno; (c) - meta-xileno; (d) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$. 74
- Figura 5.12 : Perfis de Concentração ao longo do reator desnitrificante -- fase 2 --
 Concentração 1 -- avaliação parcial: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$;
 (c) - ácidos voláteis analisados por cromatografia; (d) - $N\text{-NO}_3^-$ e $N\text{-NO}_2^-$;
 (e) - benzeno, tolueno e meta-xileno; (f) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$. 76
- Figura 5.13 : Perfis de Concentração ao longo do reator desnitrificante -- fase 2 --
 Concentração 1 -- avaliação final: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$;
 (c) - ácidos voláteis analisados por cromatografia; (d) - $N\text{-NO}_3^-$ e $N\text{-NO}_2^-$;
 (e) - benzeno, tolueno e meta-xileno; (f) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$. 78
- Figura 5.14 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico -- fase 2:
 (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato; (d) - ácidos
 voláteis totais; (e) - sólidos suspensos voláteis; (f) - produção de gás. 81
- Figura 5.15 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico -- fase 2:
 (a) - benzeno; (b) - tolueno; (c) - meta-xileno; (d) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$. 82
- Figura 5.16 : Perfis de Concentração ao longo do reator metanogênico -- fase 2:
 (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - ácidos voláteis analisados por cromatografia
 para Concentração 1; (d) - ácidos voláteis analisados por cromatografia
 para Concentração 2; (e) - ácidos voláteis analisados por cromatografia
 para Concentração 3. 85
- Figura 5.17 : Perfis de Concentração ao longo do reator metanogênico -- fase 2:
 (a) - benzeno; (b) - tolueno, (c) - m-xileno; (d) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$. 87
- Figura 5.18 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico -- fase 3:
 (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato;
 (d) - ácidos voláteis totais; (e) - sólidos suspensos voláteis;
 (f) - produção de gás. 89

Figura 5.19 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – fase 3: (a) - benzeno; (b) - tolueno; (c) - meta-xileno; (d) - BTX_{TOTAL} ; (e) - ácidos voláteis analisados por cromatografia.	92
Figura 5.20 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico (COV, C_S efluente; eficiência):(a) $C_{S\ FILTRADA}$; (b) - benzeno; (c) - tolueno; (d) - meta-xileno.	93
Figura 5.21 : Perfis de concentração ao longo do reator metanogênico – fase 3: (a) - $C_{S\ BRUTA}$; (b) - $C_{S\ FILTRADA}$; (c) - benzeno; (d) – tolueno, (e) – m-xileno; (f) – BTX_{TOTAL} .	95
Figura 5.22 : Perfis de concentração de ácidos voláteis ao longo do reator: (a) TDH 20h; (b) TDH 16h; (c) TDH 12h; (d) TDH 8h.	96
Figura 5.23: Valores de concentração média do efluente durante o período de monitoramento, concentração residual predita pelo modelo e o coeficiente cinético ajustado para os diferentes TDH's empregados: (a) $C_{S\ FILTRADA}$; (b) benzeno; (c) tolueno; (d) m-xileno.	97
Figura 5.24 : Retenção de biomassa, medida na forma de SVT por grama de espuma, ao longo dos reatores.	100
Figura 5.25 : Observações morfológicas sob microscopia ótica e eletrônica de varredura, referentes às amostras do RAHLF sob condições desnitrificantes alimentado com efluente simulando esgoto sanitário: (a) microrganismos semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp;(b) bacilos fluorescentes; (c) microrganismos semelhantes a <i>Methanosarcina</i> sp; (d),(e) e (f) bacilos.	103
Figura 5.26 : Observações morfológicas sob microscopia ótica e eletrônica de varredura, referentes às amostras do RAHLF sob condições desnitrificantes alimentado com efluente simulando aquífero contaminado com gasolina: (a) e (f) bacilos; (b) bacilos fluorescentes; (c) e (e) microrganismos semelhantes a <i>Methanosarcina</i> sp; (d) cocos.	104
Figura 5.27 : Extração de DNA microbiano das amostras do RAHLF sob condições desnitrificantes (a,b). Ampliação por reações de PCR das regiões específicas para o Domínio <i>Bacteria</i> (c) e <i>Archaea</i> (d).	107

- Figura 5.28 : Produto do PCR das amostras de DNA extraído de diferentes pontos do RAHLF sob condições desnitrificantes separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)- Fragmentos de DNA específico para o Domínio *Bacteria* – a: amostras retiradas ao final da fase 1 – efluente simulando esgoto sanitário; - b: amostras retiradas ao final da fase 3 – efluente simulando aquífero contaminado com gasolina. 107
- Figura 5.29 : Produto do PCR das amostras de DNA extraído de diferentes pontos do RAHLF sob condições desnitrificantes separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)- Fragmentos de DNA específico para o Domínio *Archaea* – a: amostras retiradas ao final da fase 1 – efluente simulando esgoto sanitário; - b: amostras retiradas ao final da fase 3 – efluente simulando aquífero contaminado com gasolina. 108
- Figura 5.30 : Observações morfológicas sob microscopia ótica e eletrônica de varredura, referentes às amostras do RAHLF sob condições fermentativas/metanogênicas alimentado com efluente simulando esgoto sanitário: (a) e (f) microrganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (b) microrganismos (b) semelhantes a *Methanosarcina* sp; (c) e (e) cocos; (d) bacilos fluorescentes. 111
- Figura 5.31 : Observações morfológicas sob microscopia ótica e eletrônica de varredura, referentes às amostras do RAHLF sob condições fermentativas/metanogênicas alimentado com efluente simulando aquífero contaminado com gasolina: . (a) bacilos fluorescentes; (b), (c) e (e) bacilos; (d) filamentos; (f) microrganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. 112
- Figura 5.32 : Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338). 113
- Figura 5.33 : Hibridação *in situ* das amostras do ponto zero do reator metanogênico com tempo de detenção hidráulica igual a 8. (a), (c), (e) e (g) coloração com DAPI. (c) e (d) células hibridadas com a sonda EUB338. (f) e (h) células hibridadas (d) com a sonda ARC915. Aumento de 1250 vezes. 115

Figura 5.34 : Produto do PCR das amostras de DNA extraído de diferentes pontos do RAHLF sob condições fermentativas/metanogênicas separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)- Fragmentos de DNA específico para o Domínio *Bacteria* referentes a amostras retiradas ao final da fase 1 – efluente simulando esgoto sanitário e ao final da fase 3 – efluente simulando aquífero contaminado com gasolina. 116

Figura 5.35 : Produto do PCR das amostras de DNA extraído de diferentes pontos do RAHLF sob condições fermentativas/metanogênicas separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)- Fragmentos de DNA específico para o Domínio *Archaea* – a: amostras retiradas ao final da fase 1 – efluente simulando esgoto sanitário; - b: amostras retiradas ao final da fase 3 – efluente simulando aquífero contaminado com gasolina. 116

Figura 5.36 : Parâmetros de monitoramento do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com benzeno: (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais; (d) benzeno. 119

Figura 5.37 : Valores experimentais e preditos pelo modelo referentes às concentrações de substratos e produtos intermediários do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com benzeno para concentração de etanol na alimentação de 500mg.l-1: (a) ácido propiônico, ácido acético e etanol; (b) $C_{S\text{FILTRADA}}$ e benzeno. 120

Figura 5.38 : Valores experimentais e preditos pelo modelo referentes às concentrações de substratos e produtos intermediários do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com benzeno para concentração de etanol na alimentação de 250mg.l-1: (a) ácido propiônico, ácido acético e etanol; (b) $C_{S\text{FILTRADA}}$ e benzeno. 123

Figura 5.39 : Parâmetros de monitoramento do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com tolueno: (a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais; (d) tolueno. 125

Figura 5.40 : Valores experimentais e preditos pelo modelo referentes às concentrações de substratos e produtos intermediários do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com tolueno:

(a) ácido propiônico, ácido acético e etanol ; (b) $C_{S\text{FILTRADA}}$ e tolueno. 126

Figura 5.41 : Parâmetros de monitoramento do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em batelada seqüencial e alimentado com m-xileno:

(a) - $C_{S\text{BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais; (d) m-xileno. 127

Figura 5.42 : Valores experimentais e preditos pelo modelo referentes às concentrações de substratos e produtos intermediários do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com m-xileno:

(a) ácido propiônico, ácido acético e etanol; (b) $C_{S\text{FILTRADA}}$ e m-xileno. 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Distribuição das áreas contaminadas no estado de São Paulo por região e atividade - maio de 2002.	6
Tabela 3.2: Distribuição das áreas contaminadas no estado de São Paulo por região e atividade - outubro de 2003.	7
Tabela 3.3: Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo.	9
Tabela 4.1: Composição da gasolina utilizada.	34
Tabela 4.2: Variação da concentração de BTX em relação à fração de etanol na fase aquosa.	35
Tabela 4.3: Volumes de gasolina e de água empregados no processo de extração e as respectivas concentrações de etanol e BTX obtidas para fase aquosa.	36
Tabela 4.4: Volumes de fase aquosa e de água empregados no processo de diluição e as respectivas concentrações de etanol e BTX obtidas para o substrato utilizado na alimentação do RAHLF.	36
Tabela 4.5: Composição aproximada dos substratos utilizados nas diferentes fases de operação.	37
Tabela 4.6: Concentração de micronutrientes e macronutrientes utilizados na alimentação.	37
Tabela 4.7: Frequência das amostragens e os métodos analíticos empregados no monitoramento dos parâmetros de operação do RAHLF.	43
Tabela 4.8: Frequência das amostragens e os métodos analíticos empregados no monitoramento dos parâmetros de operação do reator anaeróbio operado em batelada sequencial.	44
Tabela 4.9: Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação <i>in situ</i> .	48

Tabela 4.10: Protocolos de hibridação.	51
Tabela 4.11: Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos fragmentos de DNA.	52
Tabela 5.1: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – fase 1.	60
Tabela 5.2: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – fase 1.	61
Tabela 5.3: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator desnitrificante – fase 1.	64
Tabela 5.4: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – fase 1.	64
Tabela 5.5: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – fase 2 - adaptação.	67
Tabela 5.6: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – fase 2 - adaptação.	67
Tabela 5.7: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator desnitrificante – fase 2 - adaptação.	68
Tabela 5.8: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – fase 2 - adaptação.	70
Tabela 5.9: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – fase 2 – Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 15 mg.l^{-1} .	75
Tabela 5.10: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator desnitrificante – fase 2 – Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 10 mg.l^{-1} .	79
Tabela 5.11: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – fase 2 - Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 6 mg.l^{-1} .	83
Tabela 5.12: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – fase 2 - Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 10 mg.l^{-1} .	83
Tabela 5.13: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – fase 2 - Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 32 mg.l^{-1} .	84
Tabela 5.14: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – fase 2 - Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 6 mg.l^{-1} .	84

Tabela 5.15: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – fase 2 - Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 10 mg.l^{-1} .	84
Tabela 5.16: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – fase 2 - Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 32 mg.l^{-1} .	84
Tabela 5.17: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – TDH-16h.	90
Tabela 5.18: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – TDH-12h.	90
Tabela 5.19: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – TDH-8h.	91
Tabela 5.20: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – TDH-16h.	98
Tabela 5.21: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – TDH-12h.	98
Tabela 5.22: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – TDH-8h.	98
Tabela 5.23: Valores das constantes cinéticas aparentes de primeira ordem - k_{aparente} .	98
Tabela 5.24: Retenção de biomassa, medida na forma de SVT por grama de espuma, ao longo dos reatores.	100
Tabela 5.25: Ocorrência das morfologias observadas no reator desnitrificante ao final da operação com substrato sintético simulando esgoto sanitário (fase 1).	102
Tabela 5.26: Ocorrência das morfologias observadas no reator desnitrificante ao final da operação com substrato sintético simulando aquífero contaminado com gasolina (fase 3).	102
Tabela 5.27: Ocorrência das morfologias observadas no reator metanogênico ao final da operação com substrato sintético simulando esgoto sanitário (fase 1).	110
Tabela 5.28: Ocorrência das morfologias observadas no reator metanogênico ao final da operação com substrato sintético simulando aquífero contaminado com gasolina (fase 3).	110
Tabela 5.29: Valores dos parâmetros de monitoramento para o reator anaeróbio com biomassa imobilizada, operado em batelada sequencial e alimentado com benzeno.	119

Tabela 5.30: Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o reator alimentado com benzeno para concentração de etanol na alimentação de 500 mg. l^{-1} .	122
Tabela 5.31: Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o reator alimentado com benzeno para concentração de etanol na alimentação de 250 mg. l^{-1} .	123
Tabela 5.32: Valores dos parâmetros de monitoramento para o reator anaeróbio com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com tolueno.	124
Tabela 5.33: Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o reator alimentado com tolueno para concentração de etanol na alimentação de 250 mg. l^{-1} .	125
Tabela 5.34: Valores dos parâmetros de monitoramento para o reator anaeróbio com biomassa imobilizada, operado em batelada seqüencial e alimentado com meta-xileno.	127
Tabela 5.35: Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o reator alimentado com meta-xileno para concentração de etanol na alimentação de 250 mg. l^{-1} .	128

RESUMO

Ribeiro, R. (2005). *Recuperação da qualidade de águas contaminadas por gasolina usando reator anaeróbio de leito fixo*. São Carlos, 2005. 150p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Em razão da intensa atividade industrial e da ampla utilização de compostos derivados do petróleo pela indústria, compostos aromáticos, principalmente os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) são freqüentemente encontrados em aquíferos contaminados, em especial em casos de contaminação por vazamento de tanques de armazenagem subterrânea de combustíveis. Nesse sentido, o presente trabalho foi proposto com o intuito de desenvolver um sistema capaz de remover tanto os BTEX quanto a matéria orgânica presente em efluentes e aquíferos contaminados com gasolina. Foi constatada a viabilidade técnica da aplicação do RAHLF sob condições metanogênicas operando com TDH de 16 horas em que foi verificada a remoção de 99% da matéria orgânica e em torno de 95% dos BTX, apresentando as seguintes concentrações no efluente (benzeno - $0,62 \pm 0,41$ mg. l^{-1} ; tolueno - $0,71 \pm 0,46$ mg. l^{-1} ; meta-xileno - $0,28 \pm 0,19$ mg. l^{-1}). Os valores estimados para as constantes cinéticas pelo modelo cinético de primeira ordem com residual para a remoção dos BTX foram muitos superiores, cerca de cem vezes maiores do que os encontrados na literatura. A caracterização microbiana do RAHLF metanogênico mostrou a estratificação ao longo do leito. Segundo as análises empregando a técnica de FISH, verificou-se o predomínio do Domínios *Archaea* no primeiro trecho do reator o que ocorreu, provavelmente, devido a presença de ácido acético proveniente da degradação do etanol, constituinte principal da gasolina vendida no Brasil. Já de acordo os padrões de bandas de DGGE obtidos a partir dos primers universais para o Domínio *Bacteria* e para o Domínio *Archaea*, estes permitiram constatar certa diferença na diversidade genética entre o ponto zero e o resto do reator. Em relação ao RAHLF sob condições desnitrificantes a remoção quase total de nitrato e BTX ocorreu praticamente no primeiro trecho do reator levando a uma operação em um regime de metabolismo misto (metanogênico e desnitrificante). Em

virtude do esgotamento do íon nitrato no primeiro trecho do reator e da ausência de biomassa adaptada ao processo de metanogênese acetoclástica, o RAHLF apresentou desbalanceamento do metabolismo anaeróbico levando ao acúmulo de ácido acético nos primeiros 140 dias de operação. O estudo cinético da degradação dos BTX em solução etanólica realizado no reator anaeróbico com biomassa imobilizada operado em bateladas sequenciais levou a construção de modelo que descreveu com grande precisão os processos físicos e metabólicos principais envolvidos na degradação do etanol e remoção dos BTX. Tal modelo proporciona uma ferramenta adequada para o dimensionamento de reatores em escala piloto.

ABSTRACT

Ribeiro, R. (2005). *Recovery of the quality of water contaminated with gasoline using horizontal anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor*. São Carlos, 2005. 150p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Due to the intense industrial activity and the wide range of applications for the petroleum-derived substances by the industry, several aromatic compounds, mainly the BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes), are often found in contaminated aquifers, specially in the cases of spilling of oil storage tanks. In this sense, the present work intended to develop a system useful for simultaneous BTEX and organic matter removal present in wastewaters and aquifers contaminated with gasoline. The technical viability of the HAIB (horizontal anaerobic immobilized biomass) reactor was evidenced when it was operated with a HDT of 16 hours, condition where removal percentages of about 99% of organic matter and 95% of BTX were reached. The kinetic constants were calculated employing the apparent first-order model with residual concentration, and the results showed that the constants estimated for the BTX were approximately 100 times higher than the ones found in the literature. According to the analyses employing the FISH technique, it was verified a predominance of *Archae* in the first part of the reactor, probably due to the high concentrations of acetic acid produced by the degradation of ethanol. As for the DGGE-profile obtained from the universal primers for the *Bactéria* and *Archae*, they showed some differences among the different sample points of the reactor. As for the denitrifying HAIB, there was almost total removal of nitrate and BTX in the first section of the reactor, fact that probably led it to operate in a mixed metabolism (methanogenic and denitrifying). Due to this depletion and to the absence of biomass adapted to the acetoclastic methanogenesis, the HAIB presented disequilibria in the anaerobic metabolism, fact that caused an accumulation of acetic acid in the first 140 days of operation. The kinetic study of BTX degradation in the ethanolic solution carried out in the anaerobic reactor with immobilized biomass operated in batch mode led to a mathematical model that described with great accuracy the main

physical and metabolic processes involved in the ethanol degradation and removal of BTX. This model probably provides a suitable tool for the design of pilot scale reactors.

1. INTRODUÇÃO

Compostos aromáticos exercem papel importante na sociedade moderna, estando presentes em combustíveis à base de petróleo, agro-químicos, tintas, solventes, além de materiais de limpeza doméstica entre outros produtos. Em razão do crescente uso de tais compostos, estes são freqüentemente encontrados em aquíferos contaminados, principalmente os conhecidos como BTEX (benzeno; tolueno; etilbenzeno; xilenos).

Os BTEX são freqüentemente encontrados em produtos derivados do petróleo, como óleo diesel, óleo cru, lubrificantes e gasolina. O benzeno é utilizado na produção de materiais sintéticos como borrachas, plásticos, Nylon[®] além de inseticidas e tintas. O tolueno é usado como solvente na produção de tintas, resinas, colas e óleos. O etilbenzeno é principalmente empregado na produção de estireno. Os xilenos, por sua vez, são utilizados como solventes em borrachas e por curtumes nos processos de tingimento de couro.

As principais fontes de contaminação por BTEX são os vazamentos de tubulações e tanques de armazenagem subterrâneos (TAS), a disposição imprópria de resíduos, a lixiviação de aterros sanitários e os acidentes que acabam ocasionando derramamentos de combustíveis.

Compostos aromáticos contidos nos combustíveis são altamente poluentes, em particular devido à sua alta toxicidade, solubilidade em água, além de alguns destes, como no caso do benzeno, serem comprovadamente carcinogênicos. Em relação à solubilidade dos BTEX em água vale ressaltar que, enquanto a gasolina pura contém aproximadamente 50% de compostos alifáticos e 50% de aromáticos em massa, a fração solúvel em água contém entre 87 e 95% de aromáticos (COLEMAN *et al.* 1984).

Segundo a AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP (Despacho nº 536, 15/09/2000), havia 29.310 postos de gasolina em funcionamento no Brasil em 2000 e existe crescente interesse em relação ao impacto que estes podem causar aos recursos hídricos oriundos de águas subterrâneas. A principal preocupação está relacionada com a contaminação de águas subterrâneas por compostos tóxicos como benzeno, tolueno,

etilbenzeno e xilenos (BTEX), particularmente em estados como São Paulo onde estão localizados mais de 27% dos postos do país.

Além da corrosão nos TAS, podem ocorrer vazamentos de combustíveis em tubulações devido a instalações mal realizadas ou então advindo de danos em peças que geralmente ocorrem dentro dos primeiros 10 anos após a sua instalação. Em levantamento realizado por OLIVEIRA *et al.* (1991), do total de postos no município de São Paulo, cerca de 40% estavam em funcionamento há mais de 20 anos e, até 1995, aproximadamente 80% destes postos já atingiram esta idade. Além do problema de contaminação de aquíferos, os vazamentos podem causar problemas de segurança pública já que a maioria dos postos se localiza em áreas urbanas, onde existem galerias de águas pluviais, redes de esgoto, garagens de prédios, linhas de metrô, acarretando o risco de explosão nesses ambientes confinados.

Em virtude das características da gasolina utilizada no Brasil, a qual possui de 20 a 24% de etanol em massa na sua composição, o impacto ambiental de vazamentos é maior, pois o etanol potencializa a migração dos BTEX no aquífero, aumentando a solubilidade dos mesmos devido ao efeito de co-solvência (CORSEUIL e FERNENDES, 1999). Outra consequência da presença do etanol na gasolina é que quando ocorrem vazamentos, o etanol é utilizado preferencialmente pelos microrganismos aeróbios presentes do solo, provocando assim o esgotamento do oxigênio. Com isso, os BTEX são degradados anaerobiamente.

Várias tecnologias têm sido empregadas visando a remediação de aquíferos contaminados com gasolina. No entanto, a maioria desses sistemas foi desenvolvida em condições diferentes das encontradas no Brasil (condutividade hidráulica do solo, temperatura, propriedades da gasolina), as quais alteram a migração dos poluentes no solo, e a atividade microbiana dos organismos autóctones. Com isso, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que atentem para essas características, e que apresentem viabilidade técnica, financeira e ambiental na sua implementação.

No estado de São Paulo, em mais de 90% dos casos, o procedimento que se adota na remediação de aquíferos contaminados com gasolina é a retirada da fonte de contaminação constituída da fase livre, composta basicamente da fase "insolúvel" da gasolina, e de parte do aquífero, onde as concentrações dos BTEX apresentam-se mais elevadas. Todo esse volume necessita passar por algum tipo de tratamento. Muitas vezes são empregados métodos físico-químicos (adsorção por carvão ativado, oxidação química, termo-dessorção), os quais são muito onerosos e, na maioria dos casos, geram grandes quantidades de resíduos. Nesse sentido, a utilização de processos biotecnológicos apresenta-se como alternativa aos processos usualmente empregados.

NARDI *et al.* (2002), estudaram a viabilidade da degradação BTEX utilizando o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Os autores verificaram a completa remoção dos BTEX na presença de etanol como co-solvente. Concluiu-se que o RAHLF propicia condições favoráveis para o desenvolvimento de biofilme apto a degradar os BTEX.

Neste contexto é que se insere a importância e o caráter inovador deste trabalho. Nenhuma pesquisa até o presente momento foi desenvolvida com o objetivo de estudar o potencial de tratamento, por meio do RAHLF, de efluente simulando um aquífero contaminado por gasolina.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho de pesquisa foi a avaliação da viabilidade do tratamento de água contaminada com gasolina em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Avaliar a degradação dos BTX em RAHLF sob condições desnitrificantes e fermentativas/metanogênicas;
- Avaliar os microrganismos envolvidos na degradação anaeróbia, sob condições desnitrificantes e metanogênicas enfocando a diversidade da comunidade microbiana por meio das técnicas de biologia molecular (FISH, DGGE), microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a operação de reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais contendo biomassa imobilizada (ASBBR) tratando efluente contendo etanol e cada BTX separadamente;
- Modelar matematicamente a cinética microbiana de degradação dos BTX, utilizando os dados obtidos nos passos anteriores, visando obter os parâmetros cinéticos aparentes para degradação dos BTX, etanol, ácidos voláteis e matéria orgânica (DQO).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O PROBLEMA DA CONTAMINAÇÃO DOS AQÜÍFEROS

A atual atividade industrial tem sido responsável por lançamentos de resíduos e efluentes líquidos contendo materiais tóxicos ou de difícil degradação no ambiente. Em virtude do lançamento de efluentes industriais e esgotos domésticos sem tratamento apropriado, verifica-se ao longo dos anos acentuada deterioração da qualidade das águas superficiais. Assim, os recursos hídricos subterrâneos tornam-se uma alternativa de abastecimento, apresentando baixo custo e alta disponibilidade. Segundo relatório divulgado pela CETESB (1997), 71,6% dos municípios do Estado são total ou parcialmente abastecidos por águas subterrâneas. Este fato mostra a importância deste recurso para o abastecimento de água para consumo humano, reforçando a necessidade de proteção da qualidade de suas águas.

De acordo com o relatório anual da CETESB de áreas contaminadas de maio de 2002, verifica-se que a maioria das contaminações de águas subterrâneas se dá devido à presença de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e combustíveis derivados de petróleo, perfazendo um total de 80% dos casos (Figura 3.1). Vale ressaltar que a somatória das porcentagens apresentada na Figura 3.1 excede 100% pois foi verificada a contaminação de alguns sítios por mais de uma substância.

Vale ressaltar que de acordo com as diretrizes da CETESB, uma área é considerada contaminada quando, após uma investigação confirmatória, isto é, amostragem e análise química de solos ou águas subterrâneas, são detectados valores de concentrações de contaminantes superiores aos valores de intervenção estabelecidos (CASARINI *et al.*, 2001), ou então é detectada a presença de fase livre do contaminante (combustíveis, solventes).

Figura 3.1 : Distribuição das áreas contaminadas em relação ao contaminante (Fonte: CETESB, 2002).

Em relação à contaminação de aquíferos por combustíveis até maio de 2002 (Tabela 3.1), de um total geral de 255 casos identificados no estado de São Paulo, 136 foram devido à contaminação por hidrocarbonetos derivados de petróleo ocorridos em postos de gasolina ou de serviços automotivos (53% dos casos – Figura 3.2). Já o relatório de áreas contaminadas de outubro de 2003 (Tabela 3.2) revela o aumento significativo do número de postos de combustíveis inseridos na listagem de áreas contaminadas, cerca de 464 de um total de 727 casos de áreas contaminadas (64% dos casos – Figura 3.3). Tal fato reflete a atividade de licenciamento dessas empresas, empreendida pela CETESB, quando se exige a avaliação de passivos ambientais para os postos de serviço existentes antes da vigência da Resolução CONAMA 273.

Tabela 3.1: Distribuição das áreas contaminadas no Estado de São Paulo por região e atividade - Maio de 2002.

Região	Atividade					Total
	Comercial	Industrial	Disposição de resíduos	Postos de combustível	Outros	
São Paulo	3	9	3	65	1	81
RMSP – outros*	1	23	5	48	2	79
Interior	2	39	1	14	3	59
Litoral	1	11	3	6	0	21
Vale do Paraíba	0	12	0	3	0	15
Total	7	94	12	136	6	255

* RMSP - outros: refere-se às áreas contaminadas dos 38 municípios da Região Metropolitana de São Paulo, excluindo-se a Capital.

Tabela 3.2: Distribuição das áreas contaminadas no Estado de São Paulo por região e atividade - Outubro de 2003.

Região	Atividade					Total
	Comercial	Industrial	Disposição de resíduos	Postos de combustível	Outros	
São Paulo	19	28	14	250	1	314
RMSP - outros	7	45	10	103	2	167
Interior	20	56	15	63	6	150
Litoral	1	19	11	44	4	79
Vale do Paraíba	1	14	0	4	0	17
Total	48	162	40	464	13	727

Outros: Inclui contaminações por acidentes ferroviários, rodoviários, em dutos e atividades de serviço.

Figura 3.2 Distribuição das áreas contaminadas no Estado de São Paulo por atividade - maio de 2002 (CETESB, 2002).

Figura 3.3 Distribuição das áreas contaminadas no Estado de São Paulo por atividade - outubro de 2003 (CETESB, 2003).

3.2. O PROBLEMA DA CONTAMINAÇÃO DOS AQUIFÉROS POR GASOLINA

No Brasil, os carros utilizam gasolina contendo 24% de etanol (Decreto Lei nº 2607), em volume, cuja finalidade é o aumento do seu grau de octanagem. Devido a este fato, o etanol é frequentemente encontrado junto com benzeno, etilbenzeno, tolueno e xilenos (BTEX) em aquíferos contaminados com gasolina. Segundo CORSEUIL e ALVAREZ (1996), concentrações de etanol superiores a 2% podem aumentar a solubilização em água e, por conseguinte, a migração dos BTEX em aquíferos. Portanto, o impacto ambiental causado pela gasolina enriquecida com etanol é provavelmente maior do que o causado pela gasolina pura.

Em aquíferos contaminados por gasolina, o etanol é preferencialmente utilizado como fonte de energia e carbono pelos microrganismos existentes. Isto acarreta grande acréscimo na demanda por oxigênio e por este motivo, provavelmente a degradação de BTEX em condições aeróbicas fica comprometida em locais onde haja limitações de oxigênio (CORSEUIL *et al.*, 1998).

Em Joinville (SC), de acordo com levantamento realizado pela prefeitura, de um total de 65 postos de gasolina monitorados, em apenas um deles não foi verificado qualquer tipo de vazamento (CORSEUIL e MARINS, 1997).

Além dos vazamentos de TAS de combustíveis, quantidades consideráveis de petróleo são liberadas em águas subterrâneas e superficiais e no solo, provenientes de diversas atividades industriais, lixiviação de aterros sanitários e industriais, tubulações e derramamentos acidentais. Parte significativa do petróleo consiste de compostos aromáticos, os quais representam risco ao ambiente devido a sua elevada toxicidade (CHAUDHURI e WIESMANN, 1996).

Vários hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e clorados, entre eles os BTEX, foram identificados em amostras aquosas em instalações de tratamento de águas residuárias recebendo esgotos de origem doméstica e industrial (van LANGENHOVE *et al.*, 1985). Outras fontes constantes de contaminação de aquíferos por BTEX são os percolados de aterros industriais, os quais contêm consideráveis quantidades de BTEX dissolvidos (BOWLEN e KOSSON, 1995).

Ainda não existem muitos dados estatísticos sobre o problema de contaminação de aquíferos por BTEX no Brasil. No entanto, acredita-se que este problema seja generalizado, já que a maioria dos tanques de armazenagem subterrâneos existentes possui mais de 25 anos, estando todos eles propensos a vazamentos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

No Brasil, em relação às concentrações máximas de hidrocarbonetos aromáticos que os despejos industriais podem conter, o CONAMA, de acordo com a Resolução nº20 de 18 de junho de 1986, estabelece somente alguns teores máximos para alguns compostos orgânicos, entre eles o benzeno ($10,0 \mu\text{g.l}^{-1}$). Entretanto a Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, a qual estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, determina além do valor máximo permitido para o benzeno na água potável ($5,0 \mu\text{g.l}^{-1}$), valores para o tolueno ($170,0 \mu\text{g.l}^{-1}$), o etilbenzeno ($200,0 \mu\text{g.l}^{-1}$) e os xilenos ($300,0 \mu\text{g.l}^{-1}$). Quanto à qualidade das águas subterrâneas e do solo, a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) apresenta relatório de estabelecimento de valores orientadores para proteção da qualidade de solos e das águas subterrâneas do estado de São Paulo, no qual o Benzeno, o Tolueno e os Xilenos estão incluídos. Esses valores são apresentados na Tabela 3.3 (CASARINI, 2001).

Tabela 3.3: Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo.

Substância	Referência	Solos (mg/kg)			Águas subterrâneas ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
		Agrícola	Intervenção Residencial	Intervenção Industrial	Intervenção
Benzeno	0,25	0,6	1,5	3,0	5,0
Tolueno	0,25	30,0	40,0	140,0	170,0
Xilenos	0,25	3,0	6,0	15,0	300,0

O valor de referência indica o limite de qualidade para solo considerado limpo.

O valor de intervenção indica o limite de contaminação do solo e das águas subterrâneas, acima do qual, existe risco potencial à saúde humana e quando excedido requer alguma forma de intervenção na área avaliada.

Em virtude da grande ocorrência de contaminação de aquíferos devido a vazamentos em TAS de combustíveis, o Governo Federal formulou a Resolução nº273 de 29 de novembro de 2000 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), que estabelece diretrizes de localização, construção, operação de postos revendedores e de postos de abastecimento. Entre outras obrigações, os donos de postos, segundo a Resolução nº273, são obrigados a substituir os TAS antigos por TAS de parede dupla e de fazer o monitoramento do subsolo nas imediações dos postos a fim de diminuir os riscos de contaminação dos aquíferos. No entanto, a maior parte dos estabelecimentos ainda não cumpre esta Resolução e, em razão disso, provavelmente o número de casos de contaminação deve ser muito alto em virtude de informações preliminares acerca da extensão desse problema.

3.3. COMPOSIÇÃO DA GASOLINA

Dentre os produtos oriundos do petróleo, ao lado do óleo Diesel, a gasolina é o derivado mais largamente empregado como combustível de automóveis. A gasolina pura contém em média de 50 a 70% de hidrocarbonetos alifáticos (parafinas e naftênicos), em massa, 25 a 45% de aromáticos (benzeno e tolueno podem atingir até 3,5 e 20% em massa do total de hidrocarbonetos aromáticos, respectivamente) e até 20% de olefinas (BÉRAUD, 1997)¹ apud SEABRA 2001 (Figura 3.4).

Em relação a sua degradabilidade, pode-se dividir a gasolina em relação às classes de compostos que a formam. Dentre essas classes, os alcanos de baixa massa molecular, compostos que possuem de 5 a 9 átomos de carbono, são tóxicos a muitos microrganismos, principalmente devido ao efeito solvente, isto é, tendem a romper a estrutura da membrana lipídica. Já os alcanos de 10 a 22 átomos de carbono são normalmente facilmente metabolizados. Iso-alcanos, por sua vez, são menos prontamente utilizáveis comparando-se com os n-alcanos correspondentes. Este comportamento diferenciado se dá devido à presença do radical metila que pode retardar ou bloquear completamente a biodegradação (SEABRA, 2001).

Alcenos (olefinas) tendem a ser mais tóxicos, ao menos em condições aeróbias, sendo menos facilmente degradáveis quando comparados aos n-alcanos análogos. Os cicloalcanos de baixo peso molecular raramente servem como substrato, sendo degradados lentamente em baixas concentrações. Já os cicloalcanos altamente condensados são considerados refratários (SEABRA, 2001).

A biotransformação em condições anaeróbias de componentes aromáticos presentes na gasolina vem sendo observada para diferentes aceptores de elétrons (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Fe^{3+}). Estudos realizados por CORSEUIL *et al.* (1998) demonstraram que as velocidades de degradação de tolueno eram maiores quanto mais elevado era o potencial de oxido-redução ($\text{O}_2 > \text{NO}_3^- > \text{Fe}^{3+} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_2$).

EDWARDS e GRBIC-GALIC (1992) verificaram que o benzeno era degradado sob condições estritamente anaeróbias utilizando provavelmente sulfato comoceptor de elétrons. A biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos, também, foi observada em vários experimentos de campo sob ação de microrganismos desnitrificantes (HUTCHINS *et al.* 1991; ACTON e BARCKER, 1992; BARBARO *et al.*, 1992), presumidamente redutoras de

¹ BÉRAUD, J. F. Introduction. In: LECOMTE, P., MARIOTTI, C. (Ed.). Handbook of diagnostic procedures for petroleum-contaminated sites. Chichester: John and Wile and Sons, 1997.

sulfato e metanogênicas (ACTON e BARCKER, 1992), em presença de Fe(III) e Mn (IV) (VILLATORO-MONZON *et al.*, 2003).

Figura 3.4 : Estrutura química de alguns compostos presentes na composição da gasolina.

3.4. COMPOSTOS AROMÁTICOS

O benzeno, à temperatura ambiente, é um líquido volátil, estável e incolor. Possui ponto de ebulição relativamente baixo (80,1°C), evaporando-se rapidamente. É altamente inflamável, sendo pouco solúvel em água, mas miscível com a maior parte dos solventes orgânicos, entre eles o etanol. O benzeno é utilizado como matéria-prima para síntese de outros compostos orgânicos (estireno, fenóis, ciclohexano, etc.) e como aditivo nos combustíveis para veículos, substituindo, em parte, o chumbo. O benzeno é também utilizado em lubrificantes, peças automotivas e tintas seladoras.

Em relação aos efeitos danosos que o benzeno pode provocar nos seres humanos, foi demonstrado que a exposição aguda ao benzeno pode conduzir à depressão do sistema nervoso central, levando à perda de consciência. Já a exposição crônica pode resultar na depressão de medula óssea o que pode provocar leucopenia ou anemia. O benzeno é comprovadamente carcinogênico (causa câncer), teratogênico (causa malformações estruturais no feto, baixo peso ou disfunções metabólicas e biológicas) e tóxico para o sistema reprodutivo (causa disfunções sexuais, abortos e infertilidade). Também pode provocar deficiências imunológicas e disfunções neurológicas (GOLDSTEIN, 2000).

O tolueno é um composto altamente empregado em produtos de consumo ou materiais de construção, como filmes adesivos, tintas spray, produtos de limpeza e polimento automotivo, compensados, produtos para dar acabamento em couros e móveis, impermeabilizantes, solventes e várias tintas e materiais artísticos. Os maiores impactos ambientais associados ao tolueno são as contaminações de águas subterrâneas principalmente devido ao vazamento de combustíveis. O tolueno é comprovadamente teratogênico, podendo ainda causar disfunções hepáticas e gastrointestinais (FLOWERS, 2003).

O etilbenzeno é principalmente empregado na fabricação de estireno, sendo também utilizado como solvente em tintas e como intermediário na produção de dietilbenzeno e acetofenona. A exposição aguda pode levar a problemas respiratórios como irritação do trato respiratório e constrição do peito, além de irritação dos olhos e desmaios.

Os xilenos ou dimetilbenzenos apresentam-se em três formas isômeras: orto, meta e para. É um líquido incolor com odor adocicado. Os xilenos são largamente usados como solventes para tintas, vernizes, indústria de tinturas e corantes, preparados farmacêuticos, indústria plástica, produção de ácidos ftálicos e fibras sintéticas. Na indústria do petróleo são usados como aditivos para combustíveis com alta octanagem e como solventes em análises laboratoriais.

Os efeitos agudos na exposição ao xileno são similares aos do benzeno, surgindo fadiga, tontura, tremores e embriaguez. Em elevadas concentrações, ocorre inconsciência e morte por depressão do sistema nervoso central devido à parada respiratória. Outro mecanismo de morte é a arritmia cardíaca (fibrilação ventricular). A exemplo dos outros solventes, possuem poder irritante nas mucosas das vias respiratórias, na pele e nos olhos. Os distúrbios mais comuns na exposição crônica aos vapores dos xilenos são fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, fraqueza, perda de memória, sonolência, distúrbios do humor, distúrbios do equilíbrio, zumbido, náuseas e perda do apetite (FLOWERS *et al.*, 2003).

3.5. FASES DE CONTAMINAÇÃO DO AQUIFERO

O ambiente de subsuperfície é dividido em duas grandes zonas, zona não-saturada e zona saturada, onde a interface entre essas duas regiões representa o nível superior do aquífero (Figura 3.5). A zona não-saturada, também chamada de zona vadosa, é caracterizada pela presença de água e ar no interior de seus espaços porosos, onde a pressão hidráulica da água é próxima à pressão atmosférica, não se podendo extrair água dessa região. Logo abaixo está localizada a zona saturada, denominada de aquífero, que por sua vez apresenta todos seus espaços porosos preenchidos com água sob pressão hidráulica maior que a atmosférica, podendo-se então extrair água dessa região (SPILBORHGS, 1997).

A distribuição do contaminante na subsuperfície é função das propriedades físicas e químicas do mesmo e, também, das características hidrogeoquímicas e geoquímicas do local (WILSON e BROWN, 1989). Dependendo da solubilidade e da densidade do contaminante, este poderá se distribuir de diversas maneiras na subsuperfície. Assim, o complexo problema de contaminação por hidrocarbonetos consiste basicamente de quatro fases (Figura 3.5): produto livre móvel - fase livre (atinge as zonas não-saturada e saturada); solo saturado com hidrocarbonetos - fase adsorvida (zona não-saturada e saturada); espaços vazios do solo preenchidos com vapor - fase vapor (zona não-saturada) e água subterrânea contaminada - fase dissolvida (zona saturada).

A fase livre é constituída de uma lâmina composta por hidrocarbonetos insolúveis em água a qual apresenta espessura que pode variar de até poucos centímetros até vários metros dependendo do volume de combustível derramado, e que devido à sua menor densidade, encontra-se flutuando na parte superior do lençol freático.

Devido ao caráter hidrofóbico dos hidrocarbonetos de petróleo, estes se encontram adsorvidos ao solo onde ocorrem os derramamentos. Esta fase de contaminação é chamada de fase adsorvida, a qual constitui-se na fonte de contaminação mais difícil de ser remediada.

A fase vapor é constituída por vapores de hidrocarbonetos voláteis que permeiam os poros da zona vadosa, os quais se encontram preenchidos por ar e água. Processos de remediação que empregam a injeção de ar, volatilização desses compostos por meio do emprego de pressões negativas ou ainda a estimulação dos microrganismos autóctones por meio da injeção de ar e nutrientes são tecnologias que apresentam grande eficiência.

A fase dissolvida é composta por poluentes solubilizados ou dispersos no aquífero, os quais espalham-se primordialmente devido ao processo de convecção, seguindo a direção do fluxo do aquífero, formando assim a pluma de contaminação, a qual pode se estender a

distâncias consideráveis além da fonte. Hidrocarbonetos em altíssimas concentrações dissolvidos próximos a fase livre, juntamente com a fase livre, representam a maior fonte de contaminação.

Figura 3.5 : Visão esquemática de aquífero contaminado por combustível oriundo de um TAS. (U.S. EPA, 1999).

De acordo com POWERS *et al.* (2001), a presença de compostos oxigenados pode aumentar potencialmente a migração dos BTEX na subsuperfície. Em geral, inúmeros processos afetam a concentração dos BTEX nos aquíferos, dentre tais processos devem ser destacados: infiltração da gasolina através da zona não-saturada, propagação da gasolina no aquífero, solubilização dos hidrocarbonetos mais solúveis, volatilização, adsorção no solo e biodegradação.

Diferenças de hidrofobicidade e da biodegradabilidade do etanol em relação à gasolina padrão contribuem para aumentar o impacto da migração dos BTEX no aquífero. Com a presença de etanol, as concentrações de equilíbrio dos BTEX em água sofrem aumento, além disso, as perdas por adsorção são reduzidas. Ao mesmo tempo, a fácil biodegradabilidade do etanol resulta em significativo consumo dos aceptores de elétrons e nutrientes requeridos na degradação dos BTEX (POWERS *et al.*, 2001).

Compostos monoaromáticos associados a hidrocarbonetos de petróleo são os contaminantes mais encontrados em aquíferos. A relativa mobilidade desses hidrocarbonetos

em aquíferos contaminados contribui para a formação de uma pluma de contaminação. Estas plumas freqüentemente contêm regiões onde o potencial de oxidação torna-se muito baixo devido à abundância de compostos aceptores de elétrons (NO_3^- ; SO_4^{2-} ; Fe^{3+} ; Mn^{4+}), prevalecendo, assim, os processos anacróbios (COATES & ANDERSON, 2000). Ainda, segundo estes autores, a adição de aceptores de elétrons (NO_3^- ; SO_4^{2-}) em aquíferos contaminados pode resultar no aumento das velocidades de degradação anaeróbia de hidrocarbonetos derivados de petróleo.

Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas que visem o estudo de tecnologias econômica e tecnicamente viáveis para a recuperação de áreas degradadas bem como para tratamento de efluentes contendo BTEX.

3.6. TECNOLOGIAS EMPREGADAS NA REMEDIAÇÃO DE AQUÍFEROS

Diversas tecnologias de remediação têm sido desenvolvidas visando promover a remoção de compostos xenobióticos através de processos físicos e químicos ou então por meio do emprego de microrganismos adaptados à degradação dos mesmos.

Nos Estados Unidos, até 1997, havia cerca de 19.200 casos onde foram empregadas tecnologias na remediação de aquíferos contaminados por vazamentos de tanques de armazenagem subterrânea (TAS). Segundo KREMER (1998), as tecnologias mais empregadas foram biorremediação intrínseca – 46%, “pump and treat” – 25%, “air sparging” – 16% e biorremediação *in situ* – 8%, sendo utilizadas outras tecnologias nos 5% dos casos restantes.

A biorremediação intrínseca é a tecnologia mais empregada na recuperação de aquíferos contaminados. A técnica consiste no acompanhamento da pluma de contaminação por meio de poços de monitoramento. Não há adição de qualquer substância no solo para acelerar a remoção dos contaminantes. A tecnologia de biorremediação intrínseca é mais bem empregada quando a fonte de contaminação é retirada, restando apenas pequenas quantidades do contaminante adsorvidos ao solo e dissolvidos no aquífero, havendo, nesse caso, uma redução significativa do tempo de monitoramento.

Tecnologias que visam a estimulação da atividade de degradação de microrganismos autóctones através da injeção de ar e nutrientes, ou então a remoção física através da volatilização de poluentes contidos no solo sem que haja a remoção do material contaminado são chamadas tecnologias *in situ*, dentre as quais se destacam as tecnologias de “air sparging” e a biorremediação *in situ*.

A tecnologia de “air sparging” é baseada na remoção dos contaminantes do solo por meio da injeção de ar na subsuperfície promovendo a vaporização e o arraste dos mesmos. Nesta tecnologia, poços de injeção ou poços de ventilação, promovem a injeção de ar no solo, os contaminantes são vaporizados e/ou arrastados através da zona vadosa onde são retirados por meio dos poços de extração (Figura 3.6). O ar utilizado no processo estimula a degradação biológica dos contaminantes. Os poços de extração são ligados a sistemas de vácuo por onde, os contaminantes são retirados para em seguida serem levados até equipamentos onde se promove a limpeza do ar. Nos equipamentos de controle de poluição do ar os contaminantes são adsorvidos ou condensados para, em seguida, serem tratados ou dispostos adequadamente.

A biorremediação *in situ* é um processo que utiliza os microrganismos autóctones, adaptados ou não adaptados para biodegradar contaminantes que foram liberados na subsuperfície (Figura 3.7). Este processo consiste na combinação de poços de injeção (galerias ou trincheiras) e um ou mais poços de bombeamento. A água subterrânea é bombeada para a superfície onde são adicionados nutrientes e oxigênio, sendo depois re-injetada. O sistema de tratamento *in situ* pode ser complementado com reatores biológicos, torres de extração de voláteis ou de carvão ativado, ou ainda outros tratamentos combinados (SPILBORGH, 1997).

Figura 3.6 : Visão esquemática do sistema de “air sparging”. (U.S. EPA, 1994).

Figura 3.7 : Visão esquemática do sistema de biorremediação *in situ*. (U.S. EPA, 1995).

Tecnologias chamadas de *ex situ* são aquelas que procuram remover o material contaminado, seja solo, sedimento ou parte do aquífero, dos locais onde estes se encontram para que se realize futuro tratamento ou disposição. Os altos custos associados à remoção do material contaminante, ao capital requerido para a construção dos equipamentos necessários para a limpeza do sítio, além da necessidade emprego de insumos e de energia são fatores que muitas vezes inviabilizam o emprego dessa tecnologia. Nesse sentido, o tratamento *ex situ* é usualmente empregado em situações em que os custos do *in situ* são proibitivos devido às propriedades do resíduo ou do sítio contaminado, ou então, de acordo com análises de risco, quando se faz necessário à retirada imediata da fonte de poluição, como no caso da contaminação por combustíveis em que há o risco de explosão.

A linha divisória entre tecnologias que empregam tratamento *ex situ* e *in situ* não é muito clara, como no caso da tecnologia de “pump and treat”, onde o contaminante é tratado imediatamente nas adjacências ou acima do sítio contaminado. Essa tecnologia, como o próprio nome diz, consiste no bombeamento do contaminante para a superfície seguido de tratamento físico, químico ou biológico. Na remoção de hidrocarbonetos, a fase livre e dissolvida, depois de bombeada, passa por um separador de fases onde a fase aquosa é separada dos contaminantes insolúveis. Os tratamentos da fase aquosa mais empregados são a adsorção por carvão ativado, o arraste com ar (air stripping) e os tratamentos biológicos.

Geralmente, os processos de remediação de áreas contaminadas com gasolina, em uma primeira etapa consistem na retirada da fonte de contaminação, a fase livre, que se encontra na parte superior do lençol freático, prevenindo a migração da pluma de contaminação. O bombeamento dessa fase livre traz consigo elevada quantidade de água contaminada com hidrocarbonetos. Essa água necessita passar por algum tratamento antes de ser descartada ou utilizada como recarga do aquífero.

A utilização de biorreatores é comumente empregada na degradação de poluentes presentes em gases, líquidos e sólidos contaminados. Seu emprego na remediação de sítios contaminados é financeiramente atrativo já que os custos de implementação e operação são freqüentemente menores que os custos usuais associados a tecnologias *ex situ* que utilizam a remoção do contaminante e subsequente disposição de resíduos gerados (adsorção; oxidação química).

Segundo LANGWALDT e PUHAKKA (2000), projetos que empreguem biorreatores na descontaminação de aquíferos devem atentar para o fato das concentrações dos poluentes serem baixas, as quais proporcionam reduzidas velocidades de crescimento da biomassa, ocasionando possíveis problemas de partida dos sistemas. As concentrações a serem alcançadas ao final do tratamento correspondem, muitas vezes, a padrões de potabilidade exigidos, na faixa dos $\mu\text{g.L}^{-1}$, valores muito mais baixos do que os utilizados em projetos de sistemas de tratamento de efluentes. Além disso, os sistemas devem ser flexíveis, especialmente quanto a variações de carga orgânica, principalmente ao final do processo de remediação, em que as concentrações são menores. Os custos operacionais devem ser baixos para permitir longos tempos de operação. Outro fator a ser considerado é a temperatura da água subterrânea, caso esta seja muito baixa pode inviabilizar o tratamento biológico já que seu aquecimento pode ser inviável economicamente. Adição de macro e micronutrientes pode, também, ser necessária.

Nesse contexto, utilização de biorreatores no tratamento de aquíferos contaminados com gasolina representa proposta potencial de aplicação prática, principalmente porque os sistemas contendo biomassa imobilizada são unidades compactas que permitem que o sistema trabalhe com alta concentração de microrganismos adaptados à degradação dos hidrocarbonetos.

3.7. DEGRADAÇÃO DE BTEX EM BIORREATORES

Ampla variedade de tecnologias são empregadas no tratamento de compostos tóxicos presentes em solos contaminados, sedimentos e aquíferos, muitas delas executam o tratamento próximo aos locais onde estes se encontram. Dentre estas tecnologias, o emprego de biorreatores na remoção de compostos tóxicos e seus intermediários vêm se constituindo em alternativa atrativa do ponto de vista técnico-econômico se comparado aos métodos de disposição, em situações em que, devido às propriedades dos resíduos ou do sítio contaminado, tornam a utilização de tecnologias *in situ* impraticável.

Os biorreatores empregados na descontaminação de solos podem ser divididos, em relação à retenção de biomassa, em duas categorias: reatores baseados no crescimento suspenso dos microrganismos e os com biomassa imobilizada.

3.7.1. Reatores baseados em crescimento suspenso dos microrganismos

Em sistemas que apresentam crescimento suspenso dos microrganismos concentrações elevadas de substrato geralmente são necessárias para a adequada formação de flocos ou grânulos. No entanto, na maior parte dos casos de descontaminação de aquíferos, os contaminantes são encontrados em baixas concentrações, inviabilizando o crescimento em suspensão. Então, a utilização desses sistemas é limitada a situações em que são necessárias tecnologias *ex situ* em que o contaminante é degradado em estações de tratamento de efluentes. Nessas condições, os contaminantes representam pequena parte do montante a ser tratado, não sendo possível se fazer a otimização do sistema em função da degradação do contaminante (LANGWALDT e PUHAKKA, 2000). Entre os sistemas mais empregados que apresentam crescimento em suspensão destacam-se os reatores aerados denominados lodos ativados, as lagoas aeradas e o reator de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB).

Lagoas aeradas vêm sendo utilizadas na biorremediação de resíduos e efluentes gerados em refinarias de petróleo. VAIL (1991) avaliou o tratamento de 7.000 m³ de lodo rico em óleos e graxas, o qual continha aproximadamente 2.000 mg de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)/kg de lodo e 200 mg de BTEX/kg de lodo. As remoções verificadas ao final do processo foram de 98% para o benzeno, 94% para o tolueno e 99% para o etilbenzeno.

Reatores operados em bateladas sequenciais têm sido empregados na remediação de sítios contaminados. A flexibilidade e a facilidade de operação, características que

proporcionam a adaptação dos microrganismos à degradação de compostos tóxicos, são determinantes na aplicação dessa configuração de reator. Os reatores podem ser agitados, aerados, ou ambos durante o período de reação. YOCUM *et al.* (1995) utilizaram reator operado em bateladas sequenciais no tratamento de sítio contaminado com combustível de avião sendo verificada a remoção quase que completa dos BTEX.

CHAUDHURI e WIESMANN (1996) utilizaram reator contendo biomassa suspensa sob diferentes regimes de operação (batelada e contínuo), visando a remoção de tolueno em cultura mista sob condições metanogênicas. O inóculo utilizado era constituído por uma mistura de esterco de vaca e por cultura adaptada à remoção de benzeno. Quando o reator foi operado em batelada, verificou-se que, após 70 horas, o tolueno era completamente removido. Já quando a operação se deu de modo contínuo, os tempos de detenção hidráulica (TDH) foram variados de 12 horas a 8 dias, sendo observado que para TDH maiores que 96 horas a concentração de tolueno efluente permaneceu abaixo de 1 mg.l^{-1} , para uma concentração afluente de 150 mg.l^{-1} .

ZILVERENTANT (1997) avaliou a aplicação de reatores operados em bateladas sequenciais em escala real no tratamento de efluentes de sistema de limpeza de tanques de armazenagem de diversos produtos químicos. Remoções de BTEX da ordem de 99% foram verificadas após o período de partida do sistema, o qual durou aproximadamente 10 semanas. Mesmo em condições de alimentação em que as concentrações de BTEX na alimentação dos reatores eram relativamente elevadas (acima de 10 mg.l^{-1}), os reatores apresentaram efetiva remoção dos BTEX, pois as concentrações de BTEX no efluente permaneceram abaixo dos 100 µg.l^{-1} . Adicionalmente foi empregado carvão ativado como adsorvente dentro do reator. Entretanto, nenhum benefício adicional pôde ser observado em relação à remoção dos contaminantes.

Reatores anaeróbios de manta de lodo (UASB) foram utilizados com sucesso no tratamento de efluentes de indústrias petroquímicas, nos quais era verificada elevada concentração de ácido tereftálico (KLEEREBEZEM *et al.* 1997, NOYOLA *et al.* 2000).

MA e LOVE (2001) avaliaram a degradação de compostos aromáticos (BTX) presentes em efluentes utilizando reator operado em bateladas sequenciais sob diferentes condições (anóxicas/microaeróbias). Foi verificada a degradação de tolueno e meta-xileno na presença de nitrato. Benzeno, orto- e para-xileno, somente, foram degradados sob condições micro-aeróbias. Diante dos resultados, os autores concluíram que o metabolismo micro-aeróbio foi o mais adequado para degradação de compostos aromáticos.

3.7.2. Reatores com biomassa imobilizada

Microrganismos aderidos a materiais suportes usualmente apresentam atividades específicas mais elevadas quando comparadas às de sistemas que apresentam crescimento microbiano suspenso. HOLLADAY *et al.* (1978) e RITTMANN (1982) já haviam verificado que, para diferentes biofilmes presentes em diferentes configurações de reatores, os reatores fluidificados operados com elevadas cargas orgânicas apresentaram os melhores desempenhos para diferentes contaminantes.

Durante o processo de aderência dos microrganismos ao suportes, ocorre a produção de polímeros extracelulares que juntamente com os microrganismos formam o biofilme. Essa estrutura confere proteção às células envolvidas na matriz polimérica, formando uma barreira física entre a interface líquido/polímero onde o contaminante encontra-se adsorvido à membrana citoplasmática, reduzindo assim a concentração dos compostos tóxicos próximos aos microrganismos (HU *et al.*, 1994).

Os reatores contendo biomassa imobilizada são conhecidos por trabalharem sob operação contínua sem que ocorra o processo de arraste dos microrganismos com conseqüente perda da biomassa aderida aos suportes dentro do reator, proporcionando assim elevados tempos de retenção celular. Além desta vantagem, este tipo de reator tem como característica o acréscimo do tempo disponível para a função catalítica desempenhada pelas células em uma reação ou séries de reações (FAN. *et al.* 1989).

van der HOEK *et al.* (1989) operaram três reatores aeróbios contendo biomassa imobilizada (filtro biológico, biodisco e reator de filme fixo e fluxo ascendente preenchido com espuma de poliuretano) visando a remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, BTEX e compostos fenólicos presentes em águas subterrâneas. Nesse trabalho, os autores verificaram que o reator preenchido com partículas de espuma de poliuretano apresentou as maiores eficiências de remoção em relação aos compostos tóxicos.

SHIM e YANG (1999) estudaram a degradação de BTEX em reator de leito fixo com células imobilizadas com co-cultura de *Pseudomonas putida* e *P. fluorescence* em matriz composta por tela de aço inox enrolada em espiral. Estes autores constataram que as velocidades de consumo de BTEX pelas células aderidas foram de 9 a 75 vezes maiores do que as das células livres. Eles atribuíram este resultado à capacidade desta configuração de reator em trabalhar com alta concentração de células adaptadas e capazes de degradar os BTEX.

YEOM E YOO (1999) utilizaram reator híbrido, constituído de duas câmaras, no tratamento de efluentes contendo BTEX. Na primeira, microrganismos aeróbios

imobilizados em alginato eram os responsáveis pela degradação dos BTEX. A corrente de ar contaminada por BTEX que deixava a parte inferior do reator era tratada, então, por um biofiltro colocado na parte superior. A remoção global de BTEX para um TDH de 15 min foi maior que 90%.

MASON *et al.* (2000) utilizou reator aeróbio fluidificado preenchido com carvão ativado em pó no tratamento de efluente contendo 50 mg.l^{-1} de BTEX. Os autores verificaram que a remoção dos BTEX se dava por meio de um processo em que a adsorção e a biodegradação dos compostos ocorriam simultaneamente, otimizando, assim, a transferência das moléculas de BTEX do meio líquido até as células.

Du PLESSIS *et al.* (2001) estudaram a degradação dos BTEX em biofiltro aeróbio com biomassa adaptada à degradação de tolueno. Na primeira etapa, os experimentos foram realizados utilizando benzeno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno como substratos. Em seguida foi adicionado tolueno na proporção de 1:1 em relação a cada um dos outros compostos aromáticos, mantendo-se a mesma carga orgânica. As velocidades de degradação foram comparadas a partir dos parâmetros cinéticos ($v_{\text{máx}}$ velocidade máxima de consumo de substrato; K_m constante de saturação do substrato, que equivale à concentração de substrato na qual $v_{\text{máx}}$ atinge a metade de seu valor) do modelo de Michaelis-Menten (sic). O reator foi capaz de remover todos os BTEX, mesmo na ausência de tolueno. A eficiência de remoção dos compostos aromáticos, excluindo-se o tolueno, seguiu a seguinte ordem: etilbenzeno > benzeno > o-xileno > m-xileno > p-xileno. A eficiência de remoção do tolueno sofreu redução quando da presença dos outros compostos, principalmente quando foi adicionado benzeno. Deve ficar claro, entretanto, que o modelo cinético de Michaelis-Menten foi desenvolvido para reações enzimáticas envolvendo uma enzima pura e um substrato. O mais correto seria aplicar a equação cinética de Monod, desenvolvida em bases experimentais para crescimento microbiano e com mesmo comportamento hiperbólico de Michaelis-Menten.

GUERIN (2002) empregou duas configurações de reatores aeróbios no tratamento de águas subterrâneas contaminadas com BTEX, reator de leito fixo submerso e reator fluidificado, empregando carvão mineral e carvão vegetal como meio suporte, respectivamente. Foram verificadas eficiências de remoção acima de 99% para o benzeno, tolueno e xilenos e acima de 97% para o tolueno, demonstrando, assim, a eficácia dos reatores de filme fixo na remoção de compostos aromáticos.

LEAHY *et al.* (1997) e PRUDEN *et al.* (2003) empregaram reatores aeróbios fluidificados na remoção de BTEX de águas subterrâneas sendo verificada a completa remoção desses compostos. WRIGHT *et al.* (1997), empregando um biofiltro aerado no

tratamento de água de lavagem de vapores contaminados com gasolina, verificaram a eficiente degradação dos BTEX.

A configuração de células imobilizadas permite que estes reatores apresentem bom desempenho com grande estabilidade do processo devido à capacidade de trabalhar com altos tempos de retenção celular quando operados com baixos tempos de detenção hidráulica (ZAIAT *et al.* 1997a). Com base nesse conceito, ZAIAT *et al.* (1997a) desenvolveram o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (SHS/EESC/USP).

O RAHLF tem como principais vantagens sobre os demais sistemas anaeróbios o tempo de partida curto, estabilidade de operação, grande flexibilidade de operação em relação às cargas orgânicas aplicadas, altos tempos de retenção celular e alto desempenho na degradação de compostos tóxicos (PCP: DAMIANOVIC, 1997; Fenol: BOLAÑOS, 2001; Formaldeído: OLIVEIRA, 2001; BTEX: NARDI, 2002).

DAMIANOVIC (1997) empregou dois RAHLF's no tratamento de efluente contendo pentaclorofenol (PCP) em conjunto com várias fontes de carbono (glicose, ácido fórmico e ácido acético). Análises da biomassa imobilizada retirada ao logo do reator indicaram que a adsorção de PCP e outros metabólitos foi desprezível quando comparada às quantidades adicionadas, mostrando que o PCP foi degradado pelos microrganismos presentes nos reatores. Os resultados indicaram que a remoção de matéria orgânica na forma de DQO não foi afetada pela presença de PCP.

BOLAÑOS (2001), operando RAHLF contendo biomassa anaeróbia aderida à matrizes de poliuretano, verificou a viabilidade do tratamento de efluentes contendo fenol. Nesse estudo, o RAHLF foi previamente alimentado com substrato sintético, no qual a fonte de carbono era constituída de glicose, ácido acético, ácido fórmico, perfazendo DQO de 1028 mg.*l*⁻¹. Em seguida o reator foi alimentado com concentrações crescentes de fenol (50, 100, 300, 600, 900 e 1200 mg.*l*⁻¹), sendo observadas eficiências de remoção da ordem de 99% para cada condição.

OLIVEIRA (2001) utilizou o RAHLF pré-adaptado com fenol no tratamento de efluente contendo formaldeído. As concentrações de estudo variaram de aproximadamente 30 a 1500 mg.*l*⁻¹ de formaldeído, atingindo-se eficiências de remoção de até 99,7% e 92% de formaldeído e DQO, respectivamente. De acordo com o modelo cinético ajustado (Monod), não foi verificada qualquer inibição no processo de degradação do formaldeído para a faixa de concentração estudada.

NARDI (2002) empregando o RAHLF, com tempo de detenção hidráulica de 11,4 horas, no tratamento de água residuária composta de solução etanólica e BTEX verificou a remoção satisfatória dos BTEX, os quais encontravam-se em concentrações de até 15 mg.l⁻¹ para cada composto. As velocidades de degradação dos BTEX, estimadas nesse trabalho, foram cerca de 10 a 94 vezes maiores que as encontradas na literatura para ensaios realizados em microcosmos (colunas de contendo sedimento). Esse resultado se deve, provavelmente, à maior concentração de microrganismos adaptados à degradação dos BTEX.

Os resultados obtidos até o momento tornam a aplicação do RAHLF em processos tecnológicos de biodegradação de poluentes tóxicos bastante promissora. O RAHLF pode ser usado como importante ferramenta para induzir, selecionar, enriquecer culturas capazes de degradar compostos tóxicos, como os BTEX, presentes em efluentes e aquíferos contaminados com gasolina.

3.8. OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CONSUMO DOS BTEX

A compreensão dos mecanismos que governam o crescimento dos microrganismos, o consumo de substratos e a formação de produtos é indispensável no desenvolvimento de tecnologias que visem a degradação de compostos xenobióticos. Por meio de modelos matemáticos que representem a dinâmica desses processos, é possível entender como a temperatura, pH, salinidade, presença de substâncias inibitórias ou nutrientes, entre outros fatores interferem nas velocidades de reação. De posse das informações obtidas por meio dos modelos cinéticos torna-se possível o dimensionamento de reatores otimizados sob bases racionais, podendo-se ainda prever o acúmulo de produtos intermediários, ácidos voláteis no caso da digestão anaeróbia, que porventura possam causar o desequilíbrio do sistema.

Para a maioria dos processos bioquímicos, a velocidade específica de consumo de substrato r/X pode ser expressa em função da concentração do substrato de forma hiperbólica, conforme proposto por Monod (1950):

$$\frac{r}{X} = \frac{r_{\max}}{X} \frac{S}{K_s + S} \quad (3.1)$$

$$\frac{r_{\max}}{X} * Y_{X/S} = \mu_{\max} \quad (3.2)$$

Nesta expressão, $r_{\text{máx}}$ é a máxima velocidade de consumo de substrato (T^{-1}), K_S é a constante de saturação do substrato ($M.L^{-3}$), X é a concentração de biomassa ($M.L^{-3}$) e $Y_{X/S}$ é o coeficiente de rendimento celular ou produção bruta de microrganismos por unidade de massa de substrato ($M_{\text{células}}/M_{\text{substrato}}$).

A maioria dos experimentos realizados visando a obtenção dos parâmetros cinéticos, utilizando reatores anacróbios com biomassa imobilizada, não levaram em conta a resistência à transferência de massa do substrato do seio do líquido até à superfície da partícula, além de desconsiderarem a resistência à transferência de massa intraparticular. Para estas situações, a observação da velocidade específica de consumo de substrato (r/X) não permite a obtenção direta do parâmetro cinético intrínseco, já que a velocidade específica de consumo de substrato está sujeita às diferentes condições de resistência à transferência de massa.

Em consequência, para a maioria dos experimentos reportados na literatura, os parâmetros cinéticos não podem ser obtidos pela equação (3.1), mas sim pela equação (3.3) a seguir, em função da velocidade observada (r_{obs}):

$$\frac{r_{\text{obs}}}{X} = \frac{\mu_{\text{máx}}^{\text{ap}}}{Y_{X/S}} \frac{S_b}{K_S^{\text{ap}} + S_b} \quad (3.3)$$

Em que $\mu_{\text{máx}}^{\text{ap}}$ e K_S^{ap} são parâmetros cinéticos aparentes e S_b é a concentração do substrato no seio do líquido.

Os parâmetros cinéticos aparentes $\mu_{\text{máx}}^{\text{ap}}$ e K_S^{ap} tornam a equação (3.3) adequada para representar as velocidades observadas sob as condições empíricas específicas. No entanto, esta aproximação pode levar a erros na avaliação das velocidades de utilização de substrato, já que não leva em conta a dependência dos parâmetros cinéticos aparentes em relação às características hidrodinâmicas dos fluidos próximos à interface sólido-líquido (BAILEY e OLLIS, 1996).

De acordo com ZAIAT (1996), a resistência à transferência de massa de um leito de matrizes de poliuretano contendo biomassa anaeróbia pode ser minimizada gradualmente incrementando-se os valores de velocidades superficiais de líquido (v_s). Isto permite obter uma expressão de r_{obs}/X em função de v_s , possibilitando a determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos sob condições, tais que a influência da resistência à transferência de massa externa seja desprezível.

HUTCHINS *et al.* (1991) estudou a degradação de tolueno, sob condições desnitrificantes, utilizando dois microcosmos preparados com sedimentos de dois aquíferos

diferentes. Em ambos os casos, os dados experimentais indicaram que a cinética de degradação do tolueno seguiu modelo de ordem zero. No entanto, quando se variou a concentração inicial de tolueno, as velocidades de degradação encontradas variaram proporcionalmente em relação às concentrações iniciais utilizadas, resultando em modelo similar ao de primeira ordem. O autor conclui que os dados obtidos em microcosmos são úteis na avaliação das velocidades de biodegradação de locais contaminados.

SHIRMER *et al.* (2000) estudaram a cinética de degradação aeróbia de compostos aromáticos em aquífero contaminado por gasolina. Este estudo consistiu em comparar resultados obtidos em laboratório e os obtidos em campo por meio de simulações matemáticas utilizando o modelo cinético de Monod. Os autores concluíram que os parâmetros cinéticos obtidos em laboratório descreviam adequadamente as velocidades de degradação encontradas em campo.

BIELEFELDT & STENSEL (1999) investigaram a cinética de degradação aeróbia dos BTEX, em escala laboratorial, em sistemas alimentados com benzeno, tolueno, xilenos, etilbenzeno individualmente e com uma mistura dos BTEX. Os modelos de inibição competitiva e um modelo simplificado (baseado na razão entre a concentração de determinado composto aromático e a soma das concentrações de todos os componentes presentes na mistura) foram aplicados aos dados experimentais. Segundo os autores, os resultados mostraram que o modelo de inibição competitiva, mediante algumas restrições, pode ser simplificado, mostrando assim, que a velocidade de biodegradação de qualquer composto em mistura multicomponente pode ser proporcional à velocidade de degradação máxima específica desse composto e proporcional à razão entre a sua concentração e a concentração total da mistura.

Em estudo realizados por NARDI (2002), utilizando o RAHLF (TDH de 11,4 horas) no tratamento de água residuária composta de solução etanólica e BTEX em que o regime de escoamento foi considerado semelhante ao de um reator tubular ideal, foi empregado o modelo de primeira ordem com concentração residual para a obtenção de parâmetros cinéticos aparentes para a degradação dos BTEX. Os valores estimados pelo modelo apresentaram-se bem superiores aos descritos pela literatura. Esse comportamento se deveu, segundo a autora, a elevada concentração celular, melhoramentos dos consórcios microbianos do reator, minimização à resistência a transferência de massa na fase líquida e favoráveis condições hidrodinâmicas.

A obtenção de parâmetros cinéticos para a degradação dos BTX e da matéria orgânica é de extrema, pois permite a melhor compreensão dos processos metabólicos

envolvidos, além de possibilitar a comparação entre diferentes sistemas, propiciando ainda a obtenção de parâmetros visando o aumento de escala empregando bases mais racionais.

3.9. FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA DO BIOFILME ANAERÓBIO

Embora vários estudos venham sendo realizados no sentido de desenvolver sistemas para a biorremediação e/ou biotratamento dos BTEX, pouco se conhece sobre os microrganismos envolvidos e interações que conduzem à adaptação das comunidades microbianas ao metabolismo destes compostos. Em geral, verifica-se a reação associada às comunidades sintróficas complexas. O entendimento da ecologia destas comunidades é fundamental na implementação do uso da tecnologia anaeróbia em processos de descontaminação ambiental (FIELD *et al.*, 1995).

Para se estudar comunidades microbianas em ambientes poluídos por xenobióticos são necessárias informações a respeito da composição, estrutura e estabilidade dessas comunidades, bem como a atividade e função de seus componentes (AMANN *et al.*, 1995). Neste contexto, a aplicação de técnicas da Biologia Molecular, além de oferecer novas ferramentas para a obtenção de tais informações, possibilita a determinação da diversidade genética das comunidades em questão.

Uma das técnicas que apresenta elevado poder de resolução mais freqüentemente utilizada compreende a amplificação do DNA ribossomal (DNAr), por meio da metodologia de PCR ("*polymerase chain reaction*") e subsequente separação de fragmentos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gradiente linear de agentes desnaturantes de DNA (DGGE - "*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*") (MANFIO *et al.*, 1999).

Para estudar a diversidade estrutural de comunidades microbianas, o gene para RNAr 16S é especialmente útil devido à existência de seqüências alternadas em regiões altamente conservadas e variáveis ao longo da molécula. As regiões conservadas podem ser usadas para ancorar *primers* para PCR, e as regiões variáveis podem ser usadas para distinguir seqüências umas das outras, e conseqüentemente, identificação filogenética dos microrganismos (MANFIO *et al.*, 1999).

A extração de DNA de uma amostra, seguida de amplificação por PCR dos genes do RNAr 16S, gera uma mistura de fragmentos de DNA representando todas as espécies presentes naquela amostra (MANFIO *et al.*, 1999). Quando se utiliza um conjunto de *primers* universais, o padrão de bandas obtido (*fingerprint*) representa fragmentos amplificados a partir de cópias do DNA 16S dos organismos mais dominantes nestas

populações. O *fingerprint* por DGGE, associado ao seqüenciamento das bandas e análise filogenética, é uma das técnicas mais promissoras para o estudo da diversidade estrutural de comunidades microbianas (MANFIO *et al.*, 1999).

Numerosos protocolos têm sido desenvolvidos para a extração e purificação de DNA. Algumas técnicas requerem a separação das células microbianas da matriz onde estão aderidas antes da lise (HOLBEN *et al.*, 1988, JACOBSEN e RASMUNEN, 1992). No entanto, acredita-se que tais métodos de extração de DNA podem produzir amostras que não representam a diversidade genética original do ambiente estudado (SELENSKA-POBELL, 1995). O método de extração direta de DNA utilizando a abrasão física com *glass beads* tem sido referenciado como sendo o mais eficiente para obter amostras significativas de DNA (OGRAM *et al.*, 1987 e LEFF *et al.*, 1995).

Outro importante fator que determina a qualidade das amostras de DNA é a presença de substâncias que inibem a ampliação do DNA por reação de PCR. Em muitos casos, várias substâncias podem ser extraídas simultaneamente com o DNA e inibir as reações de PCR. Por isso faz-se necessário à aplicação de protocolos de extração que minimizem esses efeitos, produzindo assim bandas uniformes que na subsequente separação em gel com gradiente desnaturante (DGGE) formem um padrão consistente de bandas individuais.

Muito embora o padrão de bandas de DGGE ofereça uma maneira prática de avaliar a diversidade genética de reatores, cálculos da diversidade devem ser feitos com coerência, levando-se em conta as limitações e possíveis erros associados ao método. Bandas de DNA em um mesmo gradiente desnaturante do DGGE não correspondem necessariamente às mesmas espécies (MUYZER *et al.*, 1993). Por razões de cunho prático, no entanto, MUYZER *et al.* (1994) sugere que cada banda seja tratada como uma unidade taxonômica distinta. COLE *et al.* (1994) e NUBEL *et al.* (1996), por outro lado, criticam essa metodologia. Estes autores explicam que uma banda de DNA no gel de DGGE pode ser originária de várias espécies e uma só espécie pode estar representada por várias bandas de acordo com o número original de cópias do DNA ribossomal de cada espécie.

A presença de diferentes cópias de DNA ribossomal em uma única espécie de bactéria pode estar associada a sua fisiologia. Bactérias que apresentam crescimento lento possuem menores quantidades de cópias de DNA ribossomal que as que crescem mais rapidamente (KRAWIEC e RILEY, 1990). Além dessas características, JENSEN *et al.* (1998) reportaram que bandas na mesma posição de um gel de DGGE eram diferentes em suas seqüências de bases e que por isso o método de separação era passível de falhas.

Técnicas que utilizam hibridação *in situ* têm sido extensivamente empregadas na detecção direta de microrganismos ou de grupos específicos de microrganismos para ampla variedade de amostras. Os métodos mais comuns baseiam-se no emprego de sondas compostas de fragmentos específicos de DNA clonado ou de nucleotídeos sintetizados as quais possibilitam a identificação de um microrganismo alvo com elevada especificidade em sistemas que contenham grande variedade de espécies. Em suma, a técnica baseia-se no anelamento de um fragmento específico de DNA, marcado de alguma maneira, com a sequência complementar presente na molécula alvo desnaturada oriunda do microrganismo a ser identificado (MANFIO *et al.*, 1999).

Nesse sentido, a caracterização microbiana do biofilme possibilita a verificação da estratificação do leito, que por meio de técnicas de microscopia ótica e eletrônica de varredura permite observar a distribuição morfológica dos microrganismos no reator. Em complemento às técnicas de microscopia, o emprego de técnicas de biologia molecular permite obter maiores informações a respeito da distribuição do perfil filogenético ao longo do reator, possibilitando assim, um maior entendimento dos metabolismos associados aos microrganismos presentes.

3.10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a revisão da literatura verifica-se a importância e a urgência no desenvolvimento de tecnologias simples, baratas e eficazes para o tratamento de efluentes e aquíferos contaminados com gasolina.

Vários são os trabalhos descritos na literatura enfocando a biodegradação de compostos aromáticos em reatores. Todavia, quase todos dos estudos se deram em condições aeróbias, sendo que os trabalhos enfocando a degradação anaeróbia dos BTEX foram realizados em microcosmos, onde características como concentração de biomassa, biodisponibilidade do xenobiótico, transferência de massa entre outras, diferem muito daquelas encontradas em biorreatores, levando a resultados completamente distintos.

De acordo com as informações reunidas na revisão bibliográfica, pode-se constatar a viabilidade do emprego do reator anaeróbio horizontal de leito fixo no tratamento de efluentes e aquíferos contaminados com diversos compostos tóxicos (BTEX, fenol, PCP, formaldeído). Especificamente em relação à remoção de BTEX no RAHLF, foi verificado que a adição de nitrato estimula a degradação de benzeno e tolueno em mais de 40% (NARDI 2002). Devido a este resultado, faz-se necessário a avaliação de como a adição de nitrato influencia na remoção de BTEX em efluentes contaminados com gasolina.

Apesar de constatada a viabilidade técnica do RAHLF na remoção de compostos tóxicos recalcitrantes, ainda faltam estudos objetivando analisar mais profundamente aspectos fundamentais, como a diversidade microbiana por meio de técnicas de biologia molecular em reatores de leito fixo, além de aspectos relacionados com a otimização dos reatores, visando o aumento de escala.

Por outro lado, em todos esses trabalhos foram levantados dados a respeito da cinética de degradação dos seus respectivos compostos tóxicos, entretanto, devido aos aspectos construtivos do RAHLF, pequeno número de pontos de amostragem e consumo das substâncias alvo no primeiro trecho do reator, não foi possível o estudo mais aprofundado dos mecanismos cinéticos envolvidos. Em virtude disso, o reator operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada, devido à facilidade de operação, controle estrito das condições de reação e possibilidade de coleta de um grande número de amostras, possui características que contribuem para a elucidação dos mecanismos cinéticos envolvidos nos processos biológicos (ZAIAT *et al.*, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESCRIÇÃO GERAL DOS EXPERIMENTOS

O trabalho de doutorado foi dividido em duas etapas experimentais distintas, conforme ilustrado nas Figuras 4.1 e 4.2. A etapa 1 objetivou avaliar a operação do RAHLF na remoção de BTX para diferentes condições de degradação em relação aos oxidantes presentes (desnitrificante e metanogênica), enfocando a estimativa dos parâmetros cinéticos de degradação dos BTX e de matéria orgânica, além de verificar os microrganismos envolvidos. A etapa 2 teve como objetivo obter de forma mais eficaz os parâmetros cinéticos aparentes para degradação dos BTX, etanol, ácidos voláteis e matéria orgânica. Por meio da utilização do reator anaeróbio operado em bateladas seqüenciais, com biomassa imobilizada, o qual permitia a obtenção de um maior número de dados experimentais.

De posse dos dados experimentais foram propostos alguns modelos matemáticos para descrever a degradação de matéria orgânica, etanol, BTX e a produção e o consumo de ácidos voláteis.

Figura 4.1 : Fluxograma da etapa experimental 1: operação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo.

**Avaliação da Cinética de Degradação dos BTX
utilizando reator anaeróbio com biomassa
imobilizada operado em bateladas seqüenciais**

Figura 4.2 : Fluxograma da etapa experimental 2: Avaliação da Cinética de Degradação dos BTX utilizando reator anaeróbio com biomassa imobilizada operado em bateladas seqüenciais.

4.2. INÓCULO

A biomassa para inóculo empregada em ambos reatores, RAHLF e reator anaeróbio com biomassa imobilizada operado em bateladas seqüenciais, foi obtida de reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente, instalado em abatedouro de aves no município de Tietê, SP. Esse inóculo foi utilizado em projeto de Doutorado no Laboratório de

Processos Biológicos, com boa adaptabilidade para degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (NARDI, 2002). Vale ressaltar que a cada mudança de operação, o reator não era reinoculado.

4.3. IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA ANAERÓBIA

A biomassa anaeróbia foi imobilizada em partículas cúbicas de espuma de poliuretano, com aresta de 0,50 cm, conforme metodologia proposta por ZAIAT *et al.* (1994). As espumas de poliuretano foram colocadas em um recipiente e a biomassa foi adicionada até que todas as espumas estivessem em contato com a suspensão. Este contato se deu por 24 horas. Decorrido esse período, os reatores foram preenchidos com as matrizes, nas quais as células estavam aderidas, e em seguida fez-se a alimentação dos mesmos.

4.4. CONFIGURAÇÃO DO REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO (RAHLF)

Na primeira etapa, foram empregados dois reatores, os quais apresentaram volume total de 1995 ml (volume de escoamento de 798 ml - ZAIAT *et al.*, 1994), com comprimento de 100 cm, diâmetro de 5 cm e relação L/D igual a 20. Os reatores eram dotados de 5 pontos intermediários para amostragem, os quatro primeiros espaçados 20 cm entre si e o último a 5 cm da saída. Os reatores eram mantidos em câmara termostatzada com controle de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Os reatores também possuíam sistema coletor de gás (Figura 4.3).

Figura 4.3 : Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF).

4.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA GASOLINA UTILIZADA NA ALIMENTAÇÃO DOS RAHLF'S

A caracterização físico-química da gasolina utilizada no presente trabalho foi realizada pelo Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP do *Campus* de Araraquara, utilizando-se a técnica de infravermelho próximo. A gasolina apresentou densidade de $0,7535 \text{ g.cm}^{-3}$ e composição química apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição da gasolina utilizada

COMPOSTO	VOLUME%	MASSA%
Etanol	22,7	23,8
Benzeno	0,49	0,57
Tolueno	1,6	1,9
m-Xileno	1,0	1,1
o-Xileno	0,3	0,3
p-Xileno	0,1	0,1
Propilbenzeno	2,4	2,8
2-Etiltolueno	0,1	0,1
3-Etiltolueno	0,7	4,3
4-Etiltolueno	2,6	3,0
Pseudocumeno	1,5	1,7
AROMATICOS	13,8	15,9
OLEFINAS	17,3	16,7
SATURADOS	46,2	43,6

De acordo com a Tabela 4.1, a gasolina utilizada não continha etilbenzeno, por esse motivo o presente trabalho não abordou aspectos a respeito da remoção do mesmo.

4.6. EXTRAÇÃO DA GASOLINA PARA ALIMENTAÇÃO DO RAHLF

Para extração da gasolina e preparação de água contaminada para a alimentação dos reatores, frações de gasolina e água foram colocadas em funil de separação simulando a contaminação de aquíferos. Variou-se a proporção de gasolina em relação à água na fase de extração a fim de se verificar a influência da concentração de etanol no processo de co-solvência dos BTX em água, sendo utilizadas as proporções descritas na Tabela 4.2. Com esses resultados, construiu-se o gráfico de concentração de etanol na fase aquosa em função da concentração de BTX na fase aquosa (Figura 4.4). Esses dados foram utilizados como parâmetros na estratégia de alimentação dos reatores.

Tabela 4.2: Variação da concentração de BTX em relação à fração de etanol na fase aquosa.

Volume gasolina em relação ao volume de água	Fração mássica de etanol na fase aquosa (g/g)	Benzeno (mg.l ⁻¹)	Tolueno (mg.l ⁻¹)	m-Xileno (mg.l ⁻¹)
1:1	0,146	56,1	70,8	40,0
1:2	0,072	45,2	67,2	38,4
1:6	0,030	46,0	69,0	37,0
1:9	0,019	44,1	60,0	24,2
1:12	0,015	48,0	63,0	28,5
1:19	0,009	37,2	58,0	30,3
1:45	0,004	11,6	10,0	3,0
1:80	0,002	14,5	12,5	5,5

Figura 4.4 : Variação da concentração de BTX em relação à fração de etanol na fase aquosa.

No preparo da água contaminada para alimentação dos reatores, a mistura gasolina-água era agitada durante duas horas, com frequência de agitação de 160 rpm em frasco de 4 l, a fim de otimizar a extração dos BTX. Em seguida, o frasco utilizado na extração era deixado em repouso por 15 minutos para proporcionar a separação entre as fases. A Fase Orgânica (FO) era descartada e a Fase Aquosa (FA) era utilizada para alimentação dos reatores.

A concentração final de BTX e de matéria orgânica na Fase Aquosa era função das proporções de gasolina e água empregadas no processo de extração e do fator de diluição utilizado subsequentemente. A fim de possibilitar o aumento progressivo da concentração de BTX sem que a concentração de matéria orgânica fosse alterada, foram utilizadas diferentes quantidades de gasolina e água no processo de extração e diferentes fatores de diluição. As estratégias de preparação do substrato em função das quantidades de gasolina utilizadas no

processo de extração e das razões de diluição empregadas estão descritas nas Tabelas 4.3, 4.4.

Tabela 4.3: Volumes de gasolina e de água empregados no processo de extração e as respectivas concentrações de etanol e BTX obtidas para Fase Aquosa.

Volume de gasolina (ml)	Volume de Água (l)	Composição da Fase Aquosa				
		DQO (mg.l ⁻¹)	Conc. de etanol (mg.l ⁻¹)	Conc. de BTX (mg.l ⁻¹)		
				benzeno	tolueno	m-xileno
500	1	160000*	78400*	**	**	**
45	1	16000	8000	11,6	10,0	3,2
45	2	8000	4000	9,5	8,5	2,6
45	4	4000	2000	14,5	12,5	5,5

*valores estimados com base na composição da gasolina e dos volumes de água e gasolina utilizados no processo de extração

**devido à elevada concentração de etanol, não foram realizadas análises referentes à concentração dos BTX.

Os valores de DQO e etanol forma estimas de acordo com a composição original da gasolina empregada. Já as concentrações de BTX foram obtidas experimentalmente.

Tabela 4.4: Volumes de Fase Aquosa e de água empregados no processo de diluição e as respectivas concentrações de etanol e BTX obtidas para o efluente.

Volume de Fase Aquosa (l)	Volume de água (l)	DQO (mg.l ⁻¹)	Concentração de etanol (mg.l ⁻¹)	Concentração de BTX (mg.l ⁻¹)		
				benzeno	tolueno	m-xileno
0,026	4	1000	500	< LD	< LD	< LD
1	3	4000	2000	2,9±0,4	2,5±0,5	0,8±0,2
2	2	4000	2000	4,7±0,8	4,3±0,4	1,3±0,1
4	0	4000	2000	14,5±2,9	12,5±2,1	5,5±2,0

LD corresponde ao limite de detecção do método: 178 µg.l⁻¹ para benzeno, 157 µg.l⁻¹ para tolueno e 132 µg.l⁻¹ para m-xileno.

4.7. OPERAÇÃO DOS REATORES ANAERÓBIOS HORIZONTAIS DE LEITO FIXO

Primeiramente, dois RAHLF's foram operados concomitantemente sob as mesmas condições de operação (25°C) diferindo apenas na composição do afluente em relação ao acceptor final de elétrons. A operação dos RAHLF's foi dividida em três fases distintas: formação do biofilme anaeróbio (fase1), aumento da concentração de BTX na alimentação (fase 2) e otimização do tempo de detenção hidráulica (fase 3). Em cada uma dessas fases, foram utilizadas diferentes composições do efluente na alimentação, todas descritas na Tabela 4.5. Micronutrientes e macronutrientes foram adicionados em todas as fases ao efluente seguindo a composição utilizada por DEL NERY (1987), conforme apresentado na Tabela 4.6.

Tabela 4.5: Composição aproximada dos efluentes utilizados nas diferentes fases de operação.

Fase	Sub-Fase	Composto	Concentração (mg.l ⁻¹)	Equivalente em DQO (mg.l ⁻¹)
1		Sacarose	35	40
		Amido	114	120
		Celulose	34	40
		Extrato de carne	208	250
		Óleo de soja*	51 (0,056 ml)	50
2	Adaptação	Etanol	500	1000
		Benzeno	> 0,5	> 1,5
		Tolueno	> 0,5	> 1,5
		meta- Xileno	> 0,5	> 1,5
	Concentração 1	Etanol	2000	4000
		Benzeno	3,0	9,0
		Tolueno	2,5	7,5
		meta- Xileno	0,7	2,1
	Concentração 2	Etanol	2000	4000
		Benzeno	4,7	14,1
		Tolueno	3,3	9,9
		meta- Xileno	1,0	3,0
	Concentração 3	Etanol	2000	4000
		Benzeno	14,5	43,5
		Tolueno	12,5	37,5
		meta- Xileno	5,5	16,5
3	20h; 16h; 12h; 8h	Etanol	2000	4000
		Benzeno	15,5	46,5
		Tolueno	20,6	61,8
		meta- Xileno	8,3	24,9

*A fim de emulsionar o óleo, foram adicionadas 3 gotas de detergente comercial por litro de solução. Os reatores fermentativo/metanogênico e desnitrificante foram alimentados com substratos de mesma composição diferindo apenas em relação à adição de nitrato ao reator desnitrificante.

Tabela 4.6: Concentração de micronutrientes e macronutrientes utilizados na alimentação.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (mg.l ⁻¹)
Sulfato de níquel (NiSO ₄ .6.H ₂ O)	1,0
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7.H ₂ O)	5,0
Cloreto férrico (FeCl ₃ .6.H ₂ O)	0,5
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2.H ₂ O)	47,5
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .6.H ₂ O)	0,08
Óxido de selênio (SeO ₂)	0,07
Fosfato de potássio monobásico (KHPO ₃)	8,5
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₃)	21,7
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₃)	33,4
Bicarbonato de sódio NaHCO ₃	800*
Uréia	250

Fonte: DEL NERY (1987)

* na Fase de aumento da concentração de BTX, a concentração de NaHCO₃ utilizada na alimentação do reator desnitrificante foi de 1600 mg.l⁻¹, a fim de evitar o desbalanceamento do reator.

4.7.1. Fase 1 - Formação do biofilme anaeróbico

Nessa primeira fase, os reatores foram operados com tempo de retenção hidráulica de 20 horas e alimentados com substrato sintético, composto por lipídios, glicídios e proteínas, para que houvesse a formação de biofilme aderido às matrizes de espuma. Esse substrato foi utilizado com a intenção de simular o esgoto sanitário, o qual representa fonte complexa de carbono adequada para o desenvolvimento do biofilme. RIBEIRO (2001) observou, quando da utilização de fonte complexa de carbono, o reduzido tempo de partida de reatores de leito fixo preenchidos com espuma de poliuretano. Essa característica está vinculada provavelmente à rápida aderência dos organismos às matrizes de poliuretano.

Outra vantagem associada ao uso de esgoto sanitário seria sua disponibilidade. Em sua fase de partida, sistemas compactos de tratamento de BTX seriam submetidos ao tratamento de efluentes provenientes de sistemas de coleta de esgoto até que o biofilme anaeróbico se formasse. Em seguida esses reatores poderiam ser utilizados no tratamento de efluentes contendo BTX, desde que fosse adotada estratégia adequada de operação. Sendo assim, não haveria a necessidade de inóculo pré-adaptado ao tratamento dos BTX, diminuindo, então, o custo do processo de implantação.

Na alimentação do reator desnitrificante, utilizou-se uma razão de 5:1 entre a concentração de matéria orgânica (mg DQO.l^{-1}) e a concentração de nitrato (NARDI, 2002), visando estimular a degradação anaeróbia dos BTX sob condições desnitrificantes.

Após caracterizada a estabilidade dos sistemas por meio da satisfatória remoção de matéria orgânica (DQO), produção de gás metano para o reator metanogênico e remoção de nitrato para o reator desnitrificante, foram retiradas amostras da biomassa presente ao longo dos dois reatores para análises posteriores de microscopia e biologia molecular. Perfis espaciais foram realizados a fim de se obter parâmetros cinéticos aparentes de consumo dos respectivos substratos.

4.7.2. Fase 2 - Aumento da concentração de BTX na alimentação

O reator controle (metanogênico) foi então alimentado com a fase aquosa do processo de extração e solução contendo macronutrientes, micronutrientes e bicarbonato de sódio. Na alimentação do reator desnitrificante foi adicionado N-NO_3^- , na forma de nitrato de potássio, macronutrientes, micronutrientes e bicarbonato de sódio à fase aquosa do processo de extração. Os dois reatores foram operados utilizando tempo de retenção hidráulica de 20 horas.

Primeiramente, os reatores foram submetidos à fase de adaptação dos microrganismos à degradação dos possíveis hidrocarbonetos solúveis presentes, cujo valor da concentração de matéria orgânica, medida na forma de DQO, foi por volta de 1000 mg.l⁻¹. Em seguida, foram utilizadas concentrações crescentes de BTX na alimentação (Tabela 4.5), além de um valor superior de DQO (aproximadamente 4000 mg.l⁻¹). A performance dos reatores foi avaliada em relação à remoção dos BTX concomitantemente com a remoção de DQO. Para o reator desnitrificante também foi avaliada a remoção do íon nitrato.

O reator metanogênico foi operado até que se atingisse o estado de equilíbrio dinâmico aparente em relação à remoção dos BTX, para em seguida aumentar-se a concentração dos mesmos (Tabela 4.5), com isso, objetivou-se adotar como estratégia de partida do sistema a adaptação contínua da biomassa às concentrações crescentes de BTX na alimentação. Por sua vez, o reator desnitrificante apresentou processo de desbalanceamento da digestão anaeróbia, impossibilitando a utilização de valores maiores de concentração de BTX na alimentação além de inviabilizar a otimização do tempo de detenção hidráulica. Este fato será detalhado na etapa de discussão dos resultados.

Perfis espaciais de concentração dos BTX, nitrato, nitrito, demanda química de oxigênio (DQO) e ácidos voláteis obtidos em estado estacionário serviram de base para obtenção de parâmetros cinéticos aparentes.

4.7.3. Fase 3 - Otimização do tempo de detenção hidráulico (TDH)

Na terceira fase, em que apenas o reator metanogênico pôde ser avaliado, trabalhou-se com diferentes tempos de detenção hidráulica (20, 16, 12, 8 horas), a fim de se otimizar a operação do sistema. O reator foi operado até que se atingisse o estado de equilíbrio dinâmico para cada condição. Depois do equilíbrio atingido, foram realizados perfis de demanda química de oxigênio (DQO), ácidos voláteis por cromatografia e BTX ao longo do reator a partir de amostras coletadas nos pontos 1, 2, 3, 4, 5 (Figura 4.3) e na entrada e saída do reator. Os perfis obtidos foram utilizados para obtenção de parâmetros cinéticos aparentes.

4.8. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DOS BTX UTILIZANDO REATOR ANAERÓBIO OPERADO EM BATELADAS SEQUENCIAIS, CONTENDO BIOMASSA IMOBILIZADA

Com o objetivo de se determinar os parâmetros cinéticos de degradação dos BTX, matéria orgânica (DQO) e etanol, foi empregado o reator contendo biomassa imobilizada em espuma de poliuretano, operado em bateladas sequenciais e com agitação mecânica. A fim de se verificar a cinética de remoção de cada um dos BTX, foram utilizados três reatores, cada qual alimentado com solução contendo etanol e benzeno, tolueno e meta-xileno, respectivamente. O tempo de ciclo empregado foi o de 24 horas, ao final do qual o reator era descarregado e novamente alimentado com substrato. A retirada de amostras para monitoramento eram realizadas ao final da etapa de enchimento do reator, na válvula de entrada do reator, e ao final da batelada, quando o reator era descarregado.

Cada operação teve a duração de aproximadamente 60 dias e após o período de adaptação da biomassa, em que foi observada pequena variação nos parâmetros de monitoramento do efluente do sistema (alcalinidade a bicarbonato, ácidos voláteis, remoção de DQO e BTX), foram realizados perfis temporais de decaimento de matéria orgânica, variação na concentração de ácidos voláteis, consumo de etanol e remoção do respectivo BTX. Assim, a partir dos perfis temporais pode-se estudar separadamente a cinética de degradação de cada um dos BTX associado à degradação de etanol e de ácidos voláteis intermediários.

A temperatura adotada para todos os reatores foi de 25°C. O inóculo foi o mesmo que foi empregado na inoculação dos RAHLF's, assim como foi mantido o mesmo tamanho de partículas cúbicas de espuma de poliuretano, com volume equivalente a uma esfera de raio 0,30 cm. Amostras do gás presente na parte superior do reator ("head space") foram coletadas ao final das bateladas a fim de se verificar a perda de BTX para a atmosfera. Amostras da biomassa presente em cada um dos reatores foram retiradas para a quantificação da biomassa presente no reator.

Os protocolos experimentais referentes à obtenção dos parâmetros cinéticos e métodos analíticos empregados estão descritos em itens posteriores.

4.9. MONTAGEM EXPERIMENTAL UTILIZANDO REATOR ANAERÓBIO OPERADO EM BATELADAS SEQUENCIAIS

A montagem experimental utilizada, a qual é mostrada na Figura 4.5, é semelhante às empregadas nos trabalhos de CUBAS *et al.* (2002), PINHO *et al.* (2004) os quais visavam a determinação de parâmetros cinéticos de degradação. O reator anaeróbio utilizado possuía volume útil de 7 litros. O cesto para colocação da biomassa foi construído em tela de aço inox 316, malha de 0,5 cm, sustentado por arestas feitas com anéis de acrílico, com dimensões de 17,5 cm o externo e orifício central de 7 cm, a altura do cesto era de 18 cm. Neste orifício central foi introduzido o eixo de agitação com 2 impelidores (pás planas verticais) de 6 cm de diâmetro cada (agitador mecânico modelo MA259, Marconi), espaçados por 6 cm de distância entre eles e o impelidor encontrava-se a 6 cm da base do cesto. As matrizes cúbicas de poliuretano utilizadas para imobilizar a biomassa apresentavam aresta de 5cm, dimensões estas semelhantes às empregadas como recheio no RAHLF. Foram utilizados 32 g de matrizes de poliuretano como recheio do reator.

O motor utilizado para movimentar o eixo foi de indução magnética e a frequência de agitação empregada foi de 200 rpm, a qual foi adotada baseada em estudos hidrodinâmicos realizados por CUBAS (2001) e PINHO (2001).

As bombas utilizadas para carga e descarga do reator foram de deslocamento positivo tipo diafragma (modelo Concept, Prominent). Durante a etapa de reação o reator encontrava-se hermeticamente fechado por meio de um selo mecânico.

A temperatura no interior do reator era mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por meio de uma camisa externa a qual encontrava-se conectada ao banho termostatizado conforme a Figura 4.5.

Ao final de cada operação, quando o reator era desmontado, foram retiradas amostras das matrizes de espumas localizadas na parte superior, no centro e na parte inferior do cesto, a fim de verificar a distribuição da biomassa no reator.

Figura 4.5 : Esquema da instalação experimental. (a) Motor; (b) eixo de agitação; (c) camisa de aquecimento para manutenção da temperatura do meio líquido; (d) cesto contendo biomassa; (e) banho ultratermostatzado para manutenção da temperatura da água da camisa; (f) bomba de deslocamento positivo, para alimentação do reator; (g) bomba de deslocamento positivo com diafragma, para descarte do reator; (h) impelidores (2).

4.10. COMPOSIÇÃO DA ÁGUA CONTAMINADA UTILIZADA NA ALIMENTAÇÃO DOS REATORES ANAERÓBIOS OPERADOS EM BATELADAS SEQUÊNCIAIS

Os reatores foram alimentados com solução etanólica (500 mg/L), fonte de nitrogênio (uréia, 60 mg/L), bicarbonato de sódio (200 mg/L) e solução de sais, descrita na Tabela 4.6 (baseado em DEL NERY, 1987). Para cada operação foram adicionados, à água, 10 mg.L⁻¹ de composto aromático individualmente (benzeno, tolueno e m-xileno).

4.11. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Reator Anaeróbio Horizontal De Leito Fixo

Durante a operação dos RAHLF's as composições químicas do afluente e do efluente líquido foram acompanhadas através do monitoramento dos seguintes parâmetros: demanda química de oxigênio (DQO) de amostras brutas e filtradas, nitrato (N-NO_3^-), nitrito (N-NO_2^-), sólidos totais, suspensos e dissolvidos segundo STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998); Ácidos Voláteis Totais (AVT), Alcalinidade na forma de CaCO_3 , e pH de acordo com metodologia descrita por DILLALO e ALBERTSON (1961) e modificado por RIPLEY *et al.* (1986). Na Tabela 4.7 estão apresentados a frequência das amostragens e os métodos utilizados na avaliação dos parâmetros monitorados durante o período de operação dos reatores.

Tabela 4.7: Frequência das amostragens e os métodos analíticos empregados no monitoramento dos parâmetros de operação do RAHLF.

Parâmetro	Local de amostragem	Frequência na semana	Método analítico
DQO	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Espectrofotométrico
Alcalinidade	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Titulométrico
pH	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Potenciométrico
Temperatura	Controle de temperatura da câmara	Diária	-
Nitrato	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Espectrofotométrico
Nitrito	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Espectrofotométrico
Composição do biogás	Sistema de captação de gases	2 a 3 vezes	Cromatográfico
Volume do biogás	Sistema de captação de gases	Diária	-
Ácidos voláteis	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Titulométrico
*Ácidos voláteis	Efluente	2 a 3 vezes	Cromatográfico
BTX	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Cromatográfico
SSV	Afluente e efluente	2 a 3 vezes	Gravimétrico

*monitoramento realizado apenas na fase de alimentação com efluente contaminado com gasolina.

Reator Anaeróbio Operado em Bateladas Sequenciais

As composições químicas no início e ao final das bateladas foram acompanhadas através do monitoramento dos seguintes parâmetros: demanda química de oxigênio (DQO) total e filtrada; Ácidos Voláteis Totais (AVT), Alcalinidade na forma de CaCO_3 , e pH. Na Tabela 4.8 estão apresentados a frequência das amostragens e os métodos utilizados na avaliação dos parâmetros monitorados durante o período de operação dos reatores.

Tabela 4.8: Frequência das amostragens e os métodos analíticos empregados no monitoramento dos parâmetros de operação do reator anaeróbio operado em batelada sequencial.

Parâmetro	Local de amostragem	Frequência na semana	Método analítico
DQO	Início e Final da Batelada	2 a 3 vezes	Espectrofotométrico
Alcalinidade	Início e Final da Batelada	2 a 3 vezes	Titulométrico
pH	Início e Final da Batelada	2 a 3 vezes	Potenciométrico
Temperatura	Controle de temperatura da camisa do reator	Diária	-
Composição do biogás	Sistema de captação de gases	2 a 3 vezes	Cromatográfico
Volume do biogás	Sistema de captação de gases	Diária	-
Ácidos voláteis	Início e Final da Batelada	2 a 3 vezes	Titulométrico
BTX	Início e Final da Batelada	2 a 3 vezes	Cromatográfico

4.11.1. Determinação de BTX por cromatografia gasosa

A determinação de BTX por cromatografia foi realizada de acordo com metodologia desenvolvida por NARDI (2002), a qual utiliza a técnica de enriquecimento por “headspace” estático, que consiste na análise da fase vapor a qual encontra-se em equilíbrio com a amostra líquida. A informação química contida na fase vapor é usada para determinar a natureza e a composição da fase condensada com a qual está em equilíbrio dinâmico. Em suma, na técnica de “headspace” estático ocorre a vaporização da substância a ser analisada a partir de uma solução (GOBATO, 1995). Anilina destilada foi utilizada como padrão interno.

Condições em que foram realizadas as análises cromatográficas de BTX:

Cromatógrafo a gás: HP 6869

Coluna capilar: HP1-30m (diâmetro interno 0,53 mm e espessura do filme 2,65 µm)

Temperatura do injetor: 250°C

Temperatura do detector: 300°C

Programação de temperatura da coluna:

Temperatura inicial: 70°C (3 min)

Taxa de aquecimento: 4°C.min⁻¹

Temperatura final: 110°C (3min)

Razão de split: 40

Vazão de H₂ para alimentar a chama: 30 ml.min⁻¹

Vazão de ar sintético: 300 ml.min⁻¹

Vazão de gás de make up (N_2): $30,8 \text{ ml.min}^{-1}$

Detector: ionização de chama

Volume de amostra de “headspace”: $400 \mu\text{l}$

Volume de amostra líquida: 2 ml

Tempo de aquecimento dos frascos utilizados na técnica por “headspace”: 10 min

4.11.2. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa

A metodologia desenvolvida por MORAES *et al.* (2000), utilizando ácido crotônico como padrão interno em meio ácido (ácido sulfúrico) e extração com éter dietílico, foi empregada na determinação ácidos voláteis por cromatografia.

Condições em que foram realizadas as análises cromatográficas de ácidos voláteis:

Cromatógrafo a gás: HP 6869

Coluna capilar: HP INNOWAX-30m (diâmetro interno $0,25 \text{ mm}$ e espessura do filme $0,25 \mu\text{m}$)

Temperatura do injetor: 250°C

Temperatura do detector: 300°C

Programação de temperatura da coluna:

Temperatura inicial: 100°C (3 min)

Taxa de aquecimento: 5°C.min^{-1}

Temperatura final: 180°C (5min)

Razão de split: 20

Vazão de H_2 para alimentar a chama: 30 ml.min^{-1}

Vazão de ar sintético: 300 ml.min^{-1}

Vazão de gás de make up (N_2): 33 ml.min^{-1}

Detector: ionização de chama

Volume de amostra após a extração com éter: $1,0 \mu\text{l}$

Volume de amostra líquida: $2,0 \text{ ml}$

4.11.3. Composição dos Gases

A composição dos gases gerados pela degradação anaeróbia foi monitorada por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo Gow-Mac com detector de condutividade

térmica e coluna “Porapaq Q” (2m x ¼” – 80 a 100 mesh). O gás de arraste foi o hidrogênio a 1 ml.s^{-1} .

4.11.4. Quantificação da Biomassa Aderida

Para quantificar a biomassa aderida ao suporte, foram pesados 10 cubos de espuma, os quais foram retirados nas entradas e ao logo dos RAHLF's (pontos de amostragem 1, 2, 3, 4, e 5) e dos cestos dos reatores anaeróbios operados em bateladas seqüenciais, sendo os suportes transferidos para um frasco de 40 *ml*. A estes cubos foram adicionadas pérolas de vidro, em quantidade quatro vezes maior em relação à massa de espuma pesada, e 10 *ml* de água destilada. Em seguida, lacrou-se o frasco e promoveu-se a agitação manual do mesmo, em ângulo de 45°, durante 20 minutos para que a biomassa aderida soltasse das matrizes de espuma.

O líquido foi separado das pérolas de vidro e das espumas para em seguida ser transferido para tubos de polipropileno de 15 *ml*. Foram utilizados mais 5 *ml* de água destilada para a lavagem das pérolas de vidro. Todo líquido utilizado foi transferido para o tubo, perfazendo um volume final de 15 *ml*. As espumas foram levadas para uma estufa com temperatura de 100°C, onde permaneceram por 24 horas. Posteriormente, as espumas foram transferidas para o dessecador até que se atingisse a temperatura ambiente, em seguida, as massa das espumas foram medidas em balança analítica (P_{espuma}).

O líquido foi centrifugado por 10 minutos a frequência de 3500 rpm. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os sólidos foram ressuspensos com 10 *ml* de água destilada, sendo transferidos para uma cápsula de porcelana previamente pesada (P_0), e mantidos em estufa a temperatura de 105°C, por 24 horas. Logo após, a massa cápsula foi aferida (P_1). Na última etapa, a cápsula foi transferida para forno mufla, ajustado para temperatura de 550°C, onde permaneceu por 2 horas. Em seguida mediu-se novamente a massa da cápsula obtendo-se o valor de (P_2).

Este procedimento foi executado ao final da operação com substrato simulando esgoto sanitário e ao final da operação com efluente simulando aquífero contaminado com gasolina.

Os valores de sólidos totais por grama de espuma (ST_{espuma}) e sólidos voláteis totais por grama de espuma (SVT_{espuma}) foram, então, obtidos a partir das seguintes expressões:

$$ST_{\text{espuma}} = \frac{(P_1 - P_0)}{P_{\text{espuma}}} \quad (4.1)$$

$$SVT_{espuma} = \frac{(P_1 - P_2)}{P_{espuma}} \quad (4.2)$$

4.12. FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO BIOFILME NO RAHLF

Ao final da fase de operação dos reatores, foi realizada a caracterização morfológica do biofilme anaeróbio ao longo dos reatores. Foram coletadas amostras das matrizes de espuma de poliuretano logo após a entrada e nos pontos de coleta ao longo dos reatores (Figura 4.3.). Amostras do inóculo também foram coletadas. Posteriormente essas amostras foram examinadas por microscopia óptica, contraste de fase, fluorescência e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras destinadas à análise por MEV foram preparadas segundo a técnica desenvolvida por NATION (1983) e adaptada por ARAÚJO (1994) para biofilmes constituídos de bactérias. As análises por MEV foram feitas utilizando-se um microscópio de varredura digital Zeiss DSM-960.

Foram realizados exames microscópicos das amostras empregando-se microscopia óptica de contraste de fase e de fluorescência, em aparelho LEICA DMLB, com sistema de câmera digital Optronics. O *software* utilizado para a aquisição das imagens foi o *Image Pro-Plus* versão 4.5.0. Através desse equipamento foi possível captar as imagens e registrar os tipos morfológicos presentes nas amostras.

Para a realização dos exames microscópicos, as matrizes de poliuretano provenientes do RAHLF foram acondicionadas em frasco de antibiótico e submetidas à atmosfera de nitrogênio (100%). Todas as amostras foram examinadas em lâminas de vidro cobertas com filme de Agar 2%.

4.13. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada para a quantificação dos microrganismos presentes nos reatores horizontais anaeróbios de leito fixo. A metodologia utilizada foi a mesma descrita em DOMINGUES (2002).

4.13.1. Sondas de oligonucleotídeos fluorescentes

As amostras foram hibridadas com sondas de oligonucleotídeos específicos ao RNAr 16S dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*. As sondas utilizadas foram marcadas com o corante

fluorescente rodamina, na extremidade 5'. A sonda EUB338 foi utilizada para detectar organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* (AMANN *et al.*, 1990). Para o Domínio *Archaea* foi utilizada a sonda ARC915 (RASKIN *et al.*, 1994).

A sonda NON338, cuja seqüência de nucleotídeos não se hibrida ao RNAr microbiano (MANZ *et al.*, 1992), foi utilizada como controle negativo para quantificar as porcentagens de hibridações não específicas e de células autofluorescentes.

As especificidades das sondas, as seqüências de bases dos oligonucleotídeos e posições de hibridação do RNAr 16S estão descritas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação *in situ*.

SONDA	ESPECIFICIDADE	SEQÜÊNCIA (5'→3')*	REFERÊNCIA
NON338	Controle Negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	MANZ <i>et al.</i> , 1992
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	AMANN <i>et al.</i> , 1990
ARC915	Domínio <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	STAHL & AMANN., 1991

*Seqüência de bases obtidas por AMANN *et al.* (1995).

4.13.2. Preparação das amostras

Para cada ponto estudado foram retiradas 3 espumas de poliuretano, com auxílio de pinça estéril, transferidas para frasco de antibiótico contendo 2,5 g de pérolas de vidro e 5,0 ml de tampão salino fosfato (PBS: 130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM Na₂H₂PO₄). Este sistema foi mantido sob atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30) por 5 minutos, submetido à agitação manual em ângulo de 45°C, durante 20 minutos, e agitado em vórtex por mais 5 minutos para adequada separação dos arranjos celulares. Após o desprendimento, as amostras foram acondicionadas, em duplicata, em tubos de micro-centrífuga de 1,5 ml para o procedimento de fixação.

4.13.3. Fixação das amostras

Para a fixação, as amostras acondicionadas foram centrifugadas, sob refrigeração, durante 1 minuto a 9000 rpm, lavadas duas vezes com o mesmo volume em PBS (10x); ressuspensas em 200 µl de PBS (10x) mais 600 µl de tampão de fixação com paraformaldeído 4%, por 14 horas a 4°C. Após esse período, as amostras foram lavadas 3 vezes, por 1 minuto, em PBS (10x) e 0,1% de detergente NONIDET P-40 e armazenadas a -20°C em tubos de microcentrífuga contendo 50% de etanol e 50% PBS (10x).

4.13.4. Tratamento das lâminas de vidro

Para a realização da técnica de hibridação *in situ* foram utilizadas lâminas de vidro (CEL-LINE/ERIE SCIENTIFIC CO.), revestidas com teflon, com 12 pocinhos de 7 mm de diâmetro cada (Figura 4.6).

As lâminas foram mantidas em solução de hidróxido de potássio 10%, durante 40 minutos, enxaguadas com água destilada e secas posteriormente em estufa a 45°C (DOMINGUES, 2001).

Figura 4.6 : Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridação *in situ*.

4.13.5. Teste de desprendimento celular por sonicação

Para tentar facilitar a quantificação das amostras pela técnica de hibridação fluorescente *in situ* foram realizados testes de desprendimento celular por sonicação em aparelho 550 SONIC DESMEMBRATOR F FISHER SCIENTIFIC.

Alíquotas de 1,0 ml das amostras fixadas foram diluídas em PBS e etanol (1:1) em volume final de 5 ml, em tubo Falcon, e colocadas em banho de gelo para realizar o procedimento de sonicação. As amostras foram sonicadas durante 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, em intervalos de 30 segundos, e subsequentemente analisadas por microscopia óptica de contraste de fase para verificar o desprendimento das células e a integridade da parede celular.

4.13.6. Hibridação *in situ*

As amostras mantidas em 50% de etanol/PBS (1x) foram retiradas do freezer e homogeneizadas em agitador de tubos por 1 minuto. Com auxílio de pipeta automática, alíquota de 1 µl de cada amostra foi espalhada sobre o poço da lâmina de vidro e subsequentemente colocada em forno de hibridação a 45°C, durante 20 minutos, para aumentar a adesão das células sobre a lâmina. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries gradativas de etanol 50%, 80% e 100%, durante 3 minutos cada.

Após a desidratação, as amostras foram cobertas com 9 µl de tampão de hibridação pré-aquecido em temperatura específica e 1 µl de sonda. As composições dos tampões de

hibridação, de lavagem e as respectivas temperaturas de hibridação para cada sonda utilizada seguem o protocolo descrito na Tabela 4.10.

Após a hibridação, a lâmina, com as amostras, foi mergulhada e mantida em tubo Falcon contendo 50 ml do respectivo tampão de lavagem. As temperaturas e tempos de lavagem específicos estão apresentados na Tabela 4.10. Em seguida, as lâminas foram lavadas suavemente com água destilada, para remoção dos sais, e secas a temperatura ambiente.

Para a contagem total de células, as amostras foram coradas com 8 μ l, por pocinho, de solução DAPI 10 μ g/ml (4',6-diamidino-2-fenil indol), durante 10 minutos, em temperatura ambiente e ausência de luz. Em seguida a lâmina contendo as amostras foi lavada gentilmente com água destilada para remover o excesso do corante DAPI.

Para a observação e contagem das células, a lâmina foi montada com 1,4 μ l de glicerol/PBS (80/20 v/v), em cada pocinho, coberta com lamínulas e observada em microscópio de fluorescência LEICA DMLB, usando filtros específicos para DAPI e rodamina. As imagens foram fotografadas e congeladas com sistema de câmera de vídeo digital Optronics com tempos de exposição de 0,08 s para contraste de fase e luz comum e entre 0,5 s e 4,0 s para epifluorescência. As microscopias de contraste de fase e de luz comum foram utilizadas para verificar a morfologia das células bem como identificar as partículas abióticas que, às vezes, apresentavam fluorescência sob luz ultravioleta.

Para a contagem das células, duas imagens foram congeladas e fotografadas, em mesmo campo microscópico, uma correspondente a excitação do DAPI, referente ao total de células, e a outra correspondente a excitação da rodamina, referente às células hibridadas com sondas específicas. Antes da contagem, as duas imagens foram sobrepostas para confirmar se as partículas coradas com rodamina eram realmente células hibridadas, ou seja, se correspondiam às células coradas com DAPI.

Para cada sonda e para cada amostra foram contadas entre 800 e 1000 células coradas com DAPI em 20 a 25 campos microscópicos aleatórios. A porcentagem de células hibridadas com sondas específicas, em cada campo microscópico, foi calculada em relação ao total de células coradas com DAPI.

Tabela 4.10: Protocolos de hibridação.

SONDAS	TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO	TAMPÃO DE HIBRIDAÇÃO	TEMPERATURA E TEMPOS DE LAVAGEM	TAMPÃO DE LAVAGEM
NON338	46°C por 1,5h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 15 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225mM NaCl
EUB338	46°C por 1,5h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 15 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225mM NaCl
ARC915	45°C por 2,0h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 20 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225mM NaCl
MB1174	37°C por 4,0h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,1% SDS (pH 7,2) + 40% formamida	37°C por 20 minutos	Igual ao tampão de hibridação
MX825	37°C por 4,0h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 40% formamida	37°C por 20 minutos	Igual ao tampão de hibridação

Fonte: RASKIN *et al.* (1994), ABE (1998), DOMINGUES (2001).

4.14. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DIVERSIDADE MICROBIANA NO RAHLF ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE PCR/DGGE

Para o estudo da diversidade microbiana por meio de DGGE, o DNA total da comunidade microbiana foi extraído de amostras do inóculo e das matrizes de espuma dos reatores ao final das operações dos RAHLF's. Os DNAr 16S foram amplificados por PCR com a utilização de *primers* universais para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Posteriormente, os produtos de PCR foram separados por DGGE, segundo metodologia descrita a seguir:

4.14.1. Extração de DNA de comunidade microbiana.

DNA da comunidade microbiana presente nas amostras de espuma coletadas do reator foi extraído por meio do método de lise direta (TSAI & OLSON, 1992; SMALLA *et al.*, 1993). A purificação do DNA genômico foi realizada em coluna *Wizard* (Promega), a

fim de eliminar inibidores freqüentemente associados a este tipo de amostra. A quantidade e integridade do DNA obtido foram estimadas por meio de eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.14.2. Análise de comunidades por meio de DGGE

Seqüências correspondentes a regiões variáveis do gene que codifica para RNAr 16S foram amplificadas por PCR utilizando *primers* específicos para os Domínios *Archaea* (KUDO *et al.*, 1997) e *Bacteria* (NIELSEN *et al.*, 1999), sendo estes apresentados na Tabela 4.11. Os fragmentos de DNAr 16S com diferentes seqüências foram separados em gel de DGGE, permitindo a avaliação do perfil de diversidade de microrganismos na amostra analisada (MUYZER *et al.*, 1996). Após padronização inicial do gradiente ótimo de agentes desnaturantes (MUYZER *et al.*, 1993), os produtos de PCR das amostras ambientais foram submetidos a experimentos de DGGE paralelo em equipamento BioRad. A coloração do gel foi realizada utilizando-se o corante de ácido nucléico SYBR Green I (Molecular Probes). Os resultados foram documentados em equipamento Eagle Eye II System (Stratagene). A avaliação da diversidade presente nas amostras foi realizada por meio da análise do padrão de bandas visualizados no gel DGGE, empregando-se o programa GelCompar 4.1 (Applied Maths, Kortrijk - Bélgica).

Tabela 4.11: Seqüências dos *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos de DNA.

Domínio / Primer		Seqüência (sentido 5' → 3')
<i>Bacteria</i>	968 f GC	AAC GCG AAG AAC CTT AC
	1392 r	ACG GGC GGT GTG TAC
	GC Clamp*	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG
<i>Archaea</i>	1100 f GC	AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG
	1400 r	CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC
	GC Clamp*	CGC CCG CCG CGC GCGGCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

* - a seqüência GC Clamp está ligada aos *primers* forward.

4.15. MODELAGEM MATEMÁTICA

4.15.1. Modelo cinético de primeira ordem com concentração residual (RAHLF)

Em um primeiro momento, procurou-se aplicar o modelo cinético de primeira ordem com concentração residual aos perfis espaciais de matéria orgânica (DQO) e BTX referentes às duas primeiras fases de operação dos RAHLF's. O objetivo dessa modelagem era comparar os valores dos parâmetros cinéticos ajustados com os valores obtidos por outros trabalhos.

Para o consumo de substrato foi proposto o modelo cinético de primeira ordem, com concentração residual, como:

$$r_s = k^{aparente} \cdot (C_s - C_{SR}) \quad (4.3)$$

Em que:

- r_s - a velocidade de consumo de substrato
- $k^{aparente}$ - coeficiente cinético aparente de primeira ordem
- C_s - concentração de substrato
- C_{SR} - concentração residual de substrato

Adotando-se regime escoamento pistonado baseado em NARDI *et al.* (1999) e o modelo cinético proposto, tem-se que o balanço de massa para o consumo de substrato é dado pela expressão (4.4):

$$C_s = C_{SR} + (C_{s0} - C_{SR}) \cdot \exp\left(-\frac{k^{aparente} \cdot D}{v_s} \cdot \frac{L}{D}\right) \quad (4.4)$$

Em que:

- C_s - concentração de substrato
- C_{SR} - concentração residual de substrato
- C_{s0} - concentração inicial de substrato
- $K^{aparente}$ - coeficiente cinético aparente de primeira ordem
- D - diâmetro do reator
- L - comprimento do reator

v_s – velocidade superficial do líquido

A velocidade superficial do líquido (v_s) é calculada a partir da expressão (4.5):

$$v_s = \frac{Q}{\varepsilon \cdot A_{\text{reator}}} \quad (4.5)$$

Em que:

Q – vazão do líquido

ε – porosidade do leito (Zaiat *et al.*, 1994)

A_{reator} – área da seção transversal do reator

As variações das concentrações de metabólitos intermediários na forma de ácidos voláteis não foram modeladas, pois não foi verificado o acúmulo desses compostos ao longo do reator. O baixo número de pontos de amostragem devido a limitações físicas dos RAHLF's impediram a aplicação de modelos mais elaborados.

4.15.2. Modelo cinético de reações em série paralelo para consumo de matéria orgânica e BTX (Reator Anaeróbio Operado em Bateladas Seqüenciais)

Foi proposto mecanismo cinético (Figura 4.7) para geração de modelos que representassem os dados experimentais referentes à operação do reator em batelada, com objetivo de estimar as constantes cinéticas referentes aos processos de degradação de etanol, matéria orgânica ($C_{S \text{ FILTRADA}}$), remoção de compostos aromáticos (BTX), e produção e consumo de ácidos voláteis (acético e propiônico), permitindo assim prever as suas concentrações ao longo de todo ciclo.

Figura 4.7: Mecanismos cinéticos propostos para degradação anaeróbica de etanol (a) e benzeno (b) no reator anaeróbio em batelada seqüencial.

O primeiro modelo derivado do mecanismo proposto é referente ao consumo de etanol e produção e consumo de ácidos voláteis (Figura 4.7a). Os balanços de massa realizados para o substrato (etanol) e para os compostos intermediários (ácido propiônico e acético) resultando, assim, no sistema de equações diferenciais não-lineares apresentados a seguir. Vale ressaltar que foi desconsiderada, na modelagem matemática, o crescimento microbiano, pois em todas as condições estudadas não foi verificado aumento na quantidade de biomassa aderida às espumas de poliuretano.

Degradação de etanol:

$$-\frac{dC_{\text{etanol}}}{dt} = \frac{U_{MAX1} \cdot C_{\text{etanol}}}{k_1 + C_{\text{etanol}}} + \frac{U_{MAX2} \cdot C_{\text{etanol}}}{k_2 + C_{\text{etanol}}} \quad (4.6)$$

Foram propostas duas rotas metabólicas para a degradação do etanol. A primeira via, identificada pelo índice 1, tem como produto principal o ácido acético (SPECCE 1995), e a segunda, identificada pelo índice 2, tem o ácido propiônico como produto (MADIGAN, 2000), sendo que esta segunda rota pressupõe que o meio apresentava elevada concentração de H_2 e CO_2 , condições estas necessárias para a viabilidade da produção do ácido propiônico a partir de substratos que contenham menos de três carbonos em sua estrutura.

Produção e consumo de ácido propiônico:

$$\frac{dC_{\text{propiônico}}}{dt} = \frac{Y_{\text{etanol-propiônico}} \cdot U_{\text{MAX2}} \cdot C_{\text{etanol}}}{(k_2 + C_{\text{etanol}})} - \frac{U_{\text{MAX3}} \cdot C_{\text{propiônico}}}{(k_3 + C_{\text{propiônico}})} - \frac{U_{\text{MAX5}} \cdot C_{\text{propiônico}}}{(k_5 + C_{\text{propiônico}})} \quad (4.7)$$

Foram propostas duas rotas metabólicas para o consumo de ácido propiônico. A primeira, identificada pelo índice 3, seguiu o metabolismo descrito por HARPER e POHLAND (1987), em que o ácido acético era o produto principal da degradação do ácido propiônico. Já a segunda rota proposta, identificada pelo índice 5, propõe uma relação sintrófica entre microrganismos, em que a primeira seja responsável pela degradação do ácido propiônico produzindo CO_2 e H_2 , e a segunda atue na conversão desses subprodutos em metano.

Produção e consumo ácido acético:

$$\frac{dC_{\text{acético}}}{dt} = \frac{Y_{\text{etanol-acético}} \cdot U_{\text{MAX1}} \cdot C_{\text{etanol}}}{(k_1 + C_{\text{etanol}})} + \frac{Y_{\text{propiônico-acético}} \cdot U_{\text{MAX3}} \cdot C_{\text{propiônico}}}{(k_3 + C_{\text{propiônico}})} - \frac{U_{\text{MAX4}} \cdot C_{\text{acético}}}{(k_4 + C_{\text{acético}})} \quad (4.8)$$

O segundo modelo foi proposto objetivando-se a remoção dos compostos aromáticos (BTX). Esse modelo é constituído de duas etapas, sendo que em uma primeira ocorre adsorção das moléculas dos compostos aromáticos ao biofilme e em segunda acontece a reação (Figura 4.7b). A etapa de reação foi descrita segundo modelo de inibição competitiva devido à presença de ácido propiônico e ácido acético. Vale ressaltar ainda que o modelo de degradação de matéria orgânica é independente do modelo de remoção de BTX.

$$-\frac{dC_{\text{aromático}}}{dt} = \frac{U_{\text{MAX-BZ}} \cdot (C_{\text{aromático}} - C_{\text{AR-R}})}{C_{\text{aromático}} - C_{\text{AR-R}} + k_{\text{BZ}} \left(1 + \frac{C_{\text{propiônico}}}{k_{\text{I-propiônico}}} + \frac{C_{\text{acético}}}{k_{\text{I-acético}}} \right)} \cdot \frac{(C_{\text{aromático}} - C_{\text{AR-R}}) \cdot k_{\text{I-AD}} \cdot k_{\text{2-AD}}}{(1 + k_{\text{2-AD}} \cdot (C_{\text{aromático}} - C_{\text{AR-R}}))} \quad (4.9)$$

Por fim, o terceiro modelo se refere à remoção de matéria orgânica, o qual seguiu as relações estequiométricas entre a massa molecular de cada compostos analisado (etanol, ácido acético, ácido propiônico e compostos aromáticos) e sua respectiva DQO equivalente.

$$C_{\text{S_FILTRADA}} = 3 \cdot C_{\text{aromático}} + 2 \cdot C_{\text{etanol}} + 1,51 \cdot C_{\text{propiônico}} + C_{\text{acético}} \quad (4.10)$$

Nas equações (4.6) a (4.10):

C_{etanol} = concentração de etanol (mg etanol.l^{-1})

$C_{\text{propiónico}}$ = concentração de ácido propiónico ($\text{mg ac. propiónico.l}^{-1}$)

$C_{\text{acético}}$ = concentração de ácido acético ($\text{mg ac. acético.l}^{-1}$)

$C_{\text{aromático}}$ = concentração de compostos aromáticos (mg.l^{-1})

$C_{\text{AR-R}}$ = concentração residual de compostos aromáticos (mg.l^{-1})

$C_{\text{S FILTRADA}}$ = concentração de matéria orgânica (mg DQO.l^{-1})

U_{MAX1} ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e k_1 (mg.l^{-1}) = coeficientes cinéticos aparentes de conversão de etanol a ácido acético

U_{MAX2} ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e k_2 (mg.l^{-1}) = coeficientes cinéticos aparentes de conversão de etanol a ácido propiónico

U_{MAX3} ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e k_3 (mg.l^{-1}) = coeficientes cinéticos aparentes de conversão de ácido propiónico a ácido acético

U_{MAX4} ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e k_4 (mg.l^{-1}) = coeficientes cinéticos aparentes de conversão de ácido acético a metano

U_{MAX5} ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e k_5 (mg.l^{-1}) = coeficientes cinéticos aparentes de conversão de ácido propiónico a metano

$U_{\text{MAX-AR}}$ ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e k_{BZ} (mg.l^{-1}) = coeficientes cinéticos aparentes de conversão dos compostos aromáticos a metano e CO_2

$k_{\text{I-PROPIÔNICO}}$ (mg.l^{-1}) e $k_{\text{I-ACÉTICO}}$ (mg.l^{-1}) = coeficientes cinéticos aparentes de inibição competitiva da degradação dos compostos aromáticos devido à presença de ácido propiónico e ácido acético, respectivamente.

$k_{1\text{-AD}}$ e $k_{2\text{-AD}}$ = coeficientes empíricos da isoterma de adsorção de Langmuir

Este sistema de equações foi resolvido pelo método de Runge-Kutta de 4ª ordem, com o auxílio da ferramenta Solver do Microsoft Excel®.

4.15.2. Validação do modelo cinético de reações em série-paralelo para consumo de matéria orgânica e BTX (Reator Anaeróbio Operado Em Bateladas Sequenciais)

De acordo com a metodologia empregada por BONOMI e SCHMIDELL (2001), a verificação da validade do modelo em representar satisfatoriamente o conjunto de dados

ajustados foi feita por meio da utilização do Teste F, que se baseia na obtenção do chamado “erro experimental”, obtido a partir da repetição de uma série de repetições do mesmo ensaio, ou seja, deve ser feito um certo número de experimentos repetidos, em pelo menos uma mesma condição experimental.

Definindo-se então F_{calc} como a relação entre o erro obtido pela falta de ajuste e a estimativa do erro experimental, obtêm-se:

$$F_{calc} = \frac{s_c^2}{s_e^2} \quad (4.11)$$

em que:

s_c^2 corresponde à estimativa da variância do erro do modelo

$$s_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^v \sum_{j=1}^n \left(\tilde{y}_{ij} - y_{ij} \right)^2}{(nv)_c - p} \quad (4.12)$$

n ... número de pontos por variável

v ... número de variáveis

$(nv)_c$... número de pontos ajustados (para todos os ensaios e variáveis)

p ... número de parâmetros

$\tilde{y}_{ij}$... valor da variável calculado pelo modelo

y_{ij} ... valor experimental da variável

s_e^2 corresponde à estimativa da variância do erro experimental

$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^v \sum_{j=1}^n \left(\bar{y}_{ij} - y_{ij} \right)^2}{(nv)_c - v} \quad (4.13)$$

$(nv)_c$... número de pontos experimentais (para todos os ensaios e variáveis)

$\bar{y}_{ij}$... média da variável para os ensaios repetidos.

O valores tabelados da distribuição $F_{\text{tab}}[\alpha, (nv)_c-p, (nv)_c-v]$ são muito próximos de 1 quando o valor de α é de 5%, $(nv)_c \rightarrow \infty$, $(nv)_e \rightarrow \infty$. Esta condição é atingida desde que $(nv)_c$ e $(nv)_e$ apresentem valores elevados, ou seja, um grande número de pontos experimentais. Sendo assim, para que o modelo represente adequadamente os pontos experimentais é necessário que $F_{\text{calc}} < 1$ ou que $s_c^2 < s_e^2$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OPERAÇÃO DOS REATORES ANAERÓBIOS HORIZONTAIS DE LEITO FIXO

5.1.1. Fase 1 - Formação do biofilme anaeróbio

Conforme descrito no item 4.7 do Capítulo Material e Métodos, a operação dos reatores foi constituída de três fases. Na fase inicial, na qual os reatores foram alimentados com efluente sintético com características similares ao esgoto doméstico, os reatores apresentaram rápida fase de partida, por volta de 20 dias, de acordo com os valores de DQO de amostras brutas (C_{SBRUTA}) e filtradas ($C_{SFILTRADA}$) apresentados nas Figuras 5.1 (a, b) e 5.2 (a, b), referentes aos reatores desnitrificante e metanogênico, respectivamente. Para ambos reatores, as eficiências em relação à remoção de matéria orgânica (C_s – medida na forma de DQO) foram satisfatórias, juntamente com a produção de alcalinidade e pequeno acúmulo de ácidos voláteis totais (Tabelas 5.1, 5.2). Esses resultados indicaram adequada estabilidade operacional dos dois reatores (Tabelas 5.1, 5.2; Figuras 5.1c, 5.2c).

Tabela 5.1: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – Fase 1.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
C_{SBRUTA} (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	484 ± 65 ⁽ⁿ⁾	171 ± 92 ⁽ⁿ⁾	74,2 ± 4,3
$C_{SFILTRADA}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	370 ± 56 ⁽ⁿ⁾	117 ± 73 ⁽ⁿ⁾	76,3 ± 6,9
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	174 ± 23 ⁽ⁿ⁾	663 ± 85 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	40 ± 11 ⁽ⁿ⁾	55 ± 38 ⁽ⁿ⁾	-
SSV (mg.l ⁻¹)	44 ± 25 ⁽ⁿ⁾	50 ± 32 ⁽ⁿ⁾	-
pH	7,0 - 7,8 ⁽ⁿ⁾	8,0 - 8,3 ⁽ⁿ⁾	-
N-NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	104 ± 28 ⁽ⁿ⁾	23 ± 16 ⁽ⁿ⁾	75,9 ± 14,9
N-NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	3 ± 3,5 ⁽ⁿ⁾	1 ± 1,4 ⁽ⁿ⁾	-

⁽ⁿ⁾ 73 determinações.

Tabela 5.2: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – Fase 1.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	479 ± 56 ⁽ⁿ⁾	167 ± 86 ⁽ⁿ⁾	73,8 ± 5,9
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	384 ± 53 ⁽ⁿ⁾	109 ± 68 ⁽ⁿ⁾	79,6 ± 4,4
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	167 ± 19 ⁽ⁿ⁾	488 ± 122 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	39 ± 8 ⁽ⁿ⁾	37 ± 21 ⁽ⁿ⁾	-
pH	7,0 – 8,1 ⁽ⁿ⁾	7,4 – 8,0 ⁽ⁿ⁾	-
SSV (mg.l ⁻¹)	60 ± 63 ⁽ⁿ⁾	48 ± 21 ⁽ⁿ⁾	-

⁽ⁿ⁾ 73 determinações.

Figura 5.1 : Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – Fase 1: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais; (d) - $N\text{-NO}_3^-$ e $N\text{-NO}_2^-$.

O reator desnitrificante apresentou remoção de $N\text{-NO}_3^-$ na faixa de $75,9 \pm 14,9\%$ (Figura 5.1a; Tabela 5.1). Essa remoção limitada de $N\text{-NO}_3^-$, juntamente com a baixa produção de $N\text{-NO}_2^-$, pode estar relacionada à falta de matéria orgânica necessária ao

processo de desnitrificação ou pela reduzida capacidade do substrato complexo em atuar como doador de elétrons.

Figura 5.2 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – Fase 1: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais.

Ao final da operação dos reatores, quando estes foram alimentados com substrato simulando esgoto sanitário, foram realizados perfis espaciais para a obtenção dos parâmetros cinéticos. Em relação ao reator desnitrificante, considerou-se que a matéria orgânica era o reagente limitante no processo de desnitrificação, por isso foi possível a utilização do modelo cinético de primeira ordem com concentração residual (equação 4.3) nos ajustes dos perfis de consumo de matéria orgânica ($C_{S\text{ BRUTA}}$ e $C_{S\text{ FILTRADA}}$), sendo estes apresentados nas Figuras 5.3 (a, b). Os valores dos coeficientes de correlação indicaram bom ajuste aos pontos experimentais (Tabela 5.3).

Apesar das concentrações de N-NO_3^- e N-NO_2^- variarem ao longo do reator (Figuras 5.3c, d), estas não foram consideradas na modelagem cinética do sistema, pois a

complexidade do modelo seria aumentada, sendo necessário um maior número de dados experimentais, objetivo este que estava fora do escopo desse trabalho.

Vale ressaltar que a concentração de nitrato apresentou-se elevada ao longo de todo reator, permanecendo constante, em torno de 40 mg.l^{-1} a partir do trecho correspondente ao tempo de detenção hidráulica teórico (θ_H) de 8 horas (L/D igual a 8). Esses resultados indicam que toda biomassa estava sendo submetida a concentrações condizentes à adaptação ao processo de desnitrificação (Figura 5.3c).

Figura 5.3 : Perfis de concentração ao longo do reator desnitrificante – Fase 1: (a) - $C_{S \text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S \text{ FILTRADA}}$; (c) - N-NO_3^- ; (d) - N-NO_2^- .

O modelo de primeira ordem com concentração residual ajustou-se bem aos perfis de concentração de matéria orgânica ($C_{S \text{ BRUTA}}$ e $C_{S \text{ FILTRADA}}$) referentes ao reator metanogênico (Figura 5.4a, b; Tabela 5.4).

Figura 5.4 : Perfis de concentração ao longo do reator metanogênico – Fase 1: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$.

Tabela 5.3: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator desnitrificante – Fase 1.

Parâmetro	C_{S0} (mg.L ⁻¹)	C_{SR} (mg.L ⁻¹)	k^{aparente} (h ⁻¹)	Coef. de correlação
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .L ⁻¹)	388	104 ± 10	0,51 ± 0,15	0,984
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .L ⁻¹)	320	62 ± 2	0,97 ± 0,21	0,999

Tabela 5.4: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – Fase 1.

Parâmetro	C_{S0} (mg.L ⁻¹)	C_{SR} (mg.L ⁻¹)	k^{aparente} (h ⁻¹)	Coef. de correlação
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .L ⁻¹)	384	121 ± 11	0,84 ± 0,75	0,960
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .L ⁻¹)	318	59 ± 3	0,66 ± 0,10	0,997

Em relação aos coeficientes ajustados pelo modelo, constata-se que quanto à remoção de matéria orgânica solúvel ($C_{S\text{ FILTRADA}}$), a qual está relacionada com a matéria orgânica prontamente utilizada pelos microrganismos, os valores obtidos para concentração residual (C_{SR}) foram muito próximos. No entanto, verifica-se que o valor obtido para o coeficiente cinético aparente (k^{aparente}) no reator desnitrificante foi aproximadamente 50% maior, o que indica maiores valores velocidade de degradação de matéria orgânica por meio do metabolismo desnitrificante.

Tanto para o reator desnitrificante quanto para o reator metanogênico, a etapa de formação de biofilme atendeu aos objetivos propostos, já foi verificado o desenvolvimento do biofilme em ambos sistemas, os quais apresentaram grande diversidade morfológica constatada por meio de exames microbiológicos, que estão descritos mais detalhadamente no Capítulo Caracterização Microbiana. Os dados referentes à operação dos reatores corroboraram com os resultados de caracterização microbiana, pois foram verificadas satisfatórias remoções dos respectivos substratos, com tempo de partida relativamente curto (20 dias).

5.1.2. Fase 2 - Aumento da concentração de BTX na alimentação

Os reatores foram submetidos à fase de adaptação visando promover a adaptação dos microrganismos à degradação dos hidrocarbonetos solúveis. De acordo com as Figuras 5.5a,b, 5.6a,b, as quais estão relacionadas à remoção de matéria orgânica ($C_{S\text{ BRUTA}}$ e $C_{S\text{ FILTRADA}}$), verificou-se que a fase de partida dos dois sistemas se deu por volta de dez dias, apresentando maior eficiência em comparação com a fase de formação do biofilme (Tabelas 5.5, 5.6). Este fator pode estar relacionado a maior biodegradabilidade do etanol, substrato principal dessa fase de adaptação, quando comparado a carboidratos, lipídios e proteínas.

Figura 5.5 : Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – Fase 2 - adaptação: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais; (d) - N-NO_3^- e N-NO_2^- .

Os parâmetros de monitoramento, alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais, indicam boa estabilidade operacional nos dois reatores (Figura 5.5c, 5.6c; Tabelas 5.5, 5.6). Em relação ao reator desnitrificante, a remoção de N-NO_3^- se deu de maneira mais eficiente ($98,7 \pm 1,4\%$) quando comparada com a Fase 1 - $75,9 \pm 14,9\%$ (Figura 5.1d, Tabela 5.1). Este fator pode estar relacionado com a maior concentração de substrato utilizado na alimentação e com sua composição, pois o etanol é conhecido por estimular o processo de desnitrificação (SANTOS *et al.* 2002).

Figura 5.6 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico -- Fase 2 - adaptação: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais.

Tabela 5.5: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – Fase 2 - adaptação.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	957 ± 160 ⁽ⁿ⁾	79 ± 19 ⁽ⁿ⁾	90,9 ± 3,0
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	850 ± 193 ⁽ⁿ⁾	41 ± 11 ⁽ⁿ⁾	94,6 ± 2,5
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	293 ± 37 ⁽ⁿ⁾	914 ± 35 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	48 ± 19 ⁽ⁿ⁾	99 ± 42 ⁽ⁿ⁾	-
pH	7,6 – 7,9	8,1 – 8,6	-
SSV (mg.l ⁻¹)	57 ± 29 ⁽ⁿ⁾	41 ± 36 ⁽ⁿ⁾	-
N-NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	94 ± 9 ⁽ⁿ⁾	2 ± 2 ⁽ⁿ⁾	98,7 ± 1,4
N-NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	5,2 ± 4,7 ⁽ⁿ⁾	1,4 ± 3,6 ⁽ⁿ⁾	-

⁽ⁿ⁾ 8 determinações.

Tabela 5.6: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – Fase 2 - adaptação.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	1020 ± 93 ⁽ⁿ⁾	26 ± 21 ⁽ⁿ⁾	94,6 ± 2,5
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	922 ± 126 ⁽ⁿ⁾	19 ± 19 ⁽ⁿ⁾	97,9 ± 2,0
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	290 ± 27 ⁽ⁿ⁾	668 ± 55 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	42 ± 11 ⁽ⁿ⁾	45 ± 9 ⁽ⁿ⁾	-
pH	7,4 – 8,0	7,8 – 8,2	-
SSV (mg.l ⁻¹)	51 ± 23 ⁽ⁿ⁾	32 ± 18 ⁽ⁿ⁾	-

⁽ⁿ⁾ 8 determinações.

Em relação aos perfis espaciais de concentração de matéria orgânica ($C_{S\text{ BRUTA}}$ e $C_{S\text{ FILTRADA}}$) dos dois reatores, estes apresentaram comportamentos distintos, não sendo descritos pelo mesmo modelo cinético.

O reator desnitrificante apresentou elevada remoção dos íons N-NO₃⁻ e N-NO₂⁻ já no primeiro trecho, correspondente a posição de L/D igual a 4 (Figura 5.7c). Em função desse comportamento, considerou-se que a partir desse ponto, a degradação de matéria orgânica seguia outro metabolismo, provavelmente fermentativo/metanogênico, sendo então descrito segundo modelo cinético de ordem zero (Figura 5.7a,b; Tabela 5.7).

Na fase de formação do biofilme, o reator desnitrificante encontrava-se adaptado ao processo de desnitrificação. Com o esgotamento do aceptor final de elétrons já no primeiro trecho do reator, a maior parte da biomassa presente no reator passou a utilizar o substrato no processo de fermentação/metanogênese, alterando assim seu metabolismo e conseqüentemente a cinética de degradação do substrato. Em consequência desse fato, ocorreu acúmulo de ácido acético nos primeiros pontos do reator, sendo este degradado ao longo do reator (Figura 5.7d). O consumo de ácido acético a partir do primeiro trecho do reator também pode ser representado pelo modelo cinético de ordem zero (Figura 5.7d; Tabela 5.7).

Tabela 5.7: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator desnitrificante – Fase 2 – adaptação.

Parâmetro	C_{S0} (mg. l^{-1})	k_0 aparente (mg. $l^{-1} h^{-1}$)	Coef. de correlação
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} . l^{-1})	479 ± 26	$25,3 \pm 1,8$	0,980
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} . l^{-1})	443 ± 17	$25,3 \pm 1,2$	0,991
$C_{\text{Ac. ACÉTICO}}$ (mg. l^{-1})	225 ± 15	$10,5 \pm 1,1$	0,979

*valores preditos pelo modelo para o ponto de coleta de amostra correspondente ao valor de L/D de 4.

Figura 5.7 : Perfis de concentração ao longo do reator desnitrificante – Fase 2 – adaptação: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - $N\text{-NO}_3^-$ e $N\text{-NO}_2^-$; (d) – ácidos voláteis analisados por cromatografia.

O modelo de primeira ordem com concentração residual (equação 4.3) ajustou-se bem aos perfis de concentração de matéria orgânica referentes ao reator metanogênico para a

fase de adaptação (Figura 5.8a,b; Tabela 5.8). Por se tratar de substratos diferentes, os valores de C_{SR} e $k^{aparente}$ ajustados para o reator metanogênico para a fase de adaptação diferiram dos encontrados na Fase 1. Em relação à remoção de matéria orgânica solúvel ($C_{S\text{ FILTRADA}}$), o valor de $k^{aparente}$ obtido ($0,49\text{ h}^{-1}$) foi menor que o ajustado na fase 1 ($0,66\text{ h}^{-1}$). No entanto a concentração residual encontrada (C_{SR} igual a 11 mg.l^{-1}) foi aproximadamente 6 vezes menor que a obtida na fase anterior (C_{SR} igual a 59 mg.l^{-1}). Este fato pode estar relacionado com a elevada biodegradabilidade do etanol e dos produtos intermediários gerados, ácidos propiônico e acético (Figura 5.8c), os quais são prontamente consumidos pelas bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas, respectivamente.

Observou-se o acúmulo de ácido propiônico e ácido acético no primeiro trecho do reator, entretanto em concentrações menores que as observadas quando da operação do reator desnitrificante, sendo estes degradados ao longo do reator (Figura 5.8c).

Figura 5.8 : Perfis de concentração ao longo do reator metanogênico – Fase 2 – adaptação: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - ácidos voláteis analisados por cromatografia.

Tabela 5.8: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – Fase 2 - adaptação.

Parâmetro	C_{S0} (mg. l^{-1})	C_{SR} (mg. l^{-1})	$k^{aparente}$ (h^{-1})	Coef. de correlação
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} . l^{-1})	1043	21 ± 4	$0,50 \pm 0,05$	0,999
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} . l^{-1})	1017	11 ± 4	$0,49 \pm 0,02$	0,999

Da mesma maneira que na etapa de formação do biofilme, a adaptação ao efluente contendo gasolina atendeu aos objetivos propostos já que foram verificadas satisfatórias remoções dos respectivos substratos, com tempo de partida curto (10 dias).

5.1.2.1. Operação do reator desnitrificante

Após a etapa de adaptação ao novo substrato, o reator desnitrificante foi submetido à concentração de $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de $10,0 \pm 5,6 \text{ mg.l}^{-1}$, $C_{\text{S BRUTA}}$ de $4036 \pm 437 \text{ mg.l}^{-1}$, N-NO_3^- de $403 \pm 49 \text{ mg.l}^{-1}$ e concentração de etanol de aproximadamente 2000 mg.l^{-1} .

No início da operação verificou-se o processo de acidificação do efluente (Figura 5.9 d,e) com baixa eficiência em relação à remoção de matéria orgânica (Figura 5.9 a,b). No 15º dia de operação, a alcalinidade a bicarbonato chegou a concentração de 400 mg.l^{-1} , aproximadamente 50% do valor verificado no afluente. Com isso, optou-se por elevar a concentração de NaHCO_3 na alimentação de 800 mg.l^{-1} para 1600 mg.l^{-1} , a fim de aumentar a capacidade de tamponamento do sistema, evitando assim a falência do reator.

As análises de ácidos voláteis por cromatografia revelaram que, durante o processo de desbalanceamento do reator, o efluente era constituído basicamente por ácido acético (Figura 5.9e). A concentração de ácido acético no efluente atingiu valores de até 2082 mg.l^{-1} , sem, no entanto, queda do valor do pH. Não foi verificado o acúmulo de ácido butírico ou propiônico o que acarretaria a perda do controle da pressão parcial do hidrogênio e, conseqüentemente, a falência do sistema.

Após a adição 1600 mg.l^{-1} de NaHCO_3 , os valores de alcalinidade a bicarbonato se mantiveram em um patamar elevado (aproximadamente 1400 mg.l^{-1} – Figura 5.9c), indicando a estabilidade do sistema em relação ao tamponamento do meio. Optou-se então por operar o reator até que este atingisse eficiência satisfatória em relação à remoção de BTX e matéria orgânica. Comportamento semelhante foi observado por NARDI (2002), operando RAHLF com 138 ml de volume, alimentado com água residuária sintética contendo etanol, solução de BTEX e nitrato. Nesse trabalho a autora verificou o acúmulo de ácido acético durante a fase de partida, o qual durou aproximadamente 60 dias. Nesse trabalho, a autora também não observou a diminuição do pH no efluente, o que pode ser explicado pela produção de alcalinidade durante o processo de desnitrificação.

Após 137 dias de operação nas condições apresentadas na Tabela 5.9, o reator apresentou sensível melhora da eficiência em relação à remoção de matéria orgânica, passando de aproximadamente 50% para valores acima de 90% (Figuras 5.9a,b). A alcalinidade a bicarbonato e a produção de metano (Figuras 5.9c,d) apresentaram aumentos significativos a partir do 137º dia, indicando que o reator atingiu o equilíbrio dinâmico aparente.

Figura 5.9: Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante - - Fase 2 - - Concentração 1: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato; (d) - ácidos voláteis totais; (e) - ácidos voláteis analisados por cromatografia; (f) - produção de metano.

Corroborando esses resultados, as concentrações de ácidos voláteis totais e de ácido acético, analisados por cromatografia, apresentaram grande diminuição no mesmo período de operação (Figura 5.9d,e). A concentração de ácido propiônico apresentou aumento, contudo, este não foi suficiente para prejudicar a estabilidade do sistema (Figura 5.9e).

O reator desnitrificante apresentou eficiência em relação à remoção de N-NO_3^- de $99,5 \pm 0,4\%$ (Figuras 5.10a,b). Este fato pode estar associado à alta concentração e à natureza da matéria orgânica disponível para o processo de desnitrificação. Em relação à remoção de sólidos suspensos voláteis, não foi verificado nenhum comportamento específico (Figura 5.10c).

Figura 5.10 : Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – Fase 2 – Concentração
1: (a) - N-NO_3^- ; (b) - N-NO_2^- ; (c) – sólidos suspensos voláteis.

Após atingir o estado estacionário (equilíbrio dinâmico), o reator desnitrificante apresentou alta eficiência quanto à remoção de BTX, mesmo quando este apresentou o processo de acidificação do efluente (Figura 5.11a,b,c,d; Tabela 5.9). As eficiências para remoção de benzeno, tolueno, m-xileno e BTX_{TOTAL} foram $96,3 \pm 2,3\%$; $95,7 \pm 2,0\%$; $96,3 \pm 2,4\%$ e $96,1 \pm 1,8\%$, respectivamente.

Figura 5.11: Parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante - Fase 2 - concentração 1: (a) - benzeno; (b) - tolueno; (c) - meta-xileno; (d) - BTX_{TOTAL} .

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.9, pode-se constatar que a remoção de BTX sob condições desnitrificantes foi altamente favorável. Entretanto, reatores projetados para o tratamento de efluentes contaminados por gasolina e que visem a remoção de BTX por desnitrificação devem atentar para o fato que o etanol será utilizado preferencialmente como fonte de carbono, competindo com os BTX, e por vezes ocasionado o desbalanceamento do sistema.

No sexagésimo dia de operação, foram retiradas amostras ao longo do reator para que, por meio dos perfis de concentração de matéria orgânica ($C_{S\text{ BRUTA}}$ e $C_{S\text{ FILTRADA}}$), ácidos voláteis por cromatografia, N-NO_3^- e N-NO_2^- , que fosse possível caracterizar o desbalanceamento do sistema. Verificou-se que a maior parte da remoção de matéria orgânica se dava no trecho compreendido entre a entrada do reator e o primeiro ponto de amostragem (Figuras 5.12a,b). Observou-se também a remoção quase que total do N-NO_3^- e do N-NO_2^- nesse segmento.

Nenhum modelo cinético foi ajustado aos perfis de concentração de matéria orgânica ($C_{S\text{ BRUTA}}$ e $C_{S\text{ FILTRADA}}$), N-NO_3^- e N-NO_2^- obtidos nessa condição, pois, a partir do primeiro ponto de amostragem, a partir do qual o reator encontrava-se em condições de metabolismo fermentativo/metanogênico, não foi verificada a diminuição efetiva da concentração de matéria orgânica ou de ácido acético.

Tabela 5.9: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator desnitrificante – Fase 2 – Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 15 mg.l^{-1} .

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{BRUTA}}.\text{l}^{-1}$)	$2323 \pm 539^{(n)}$	$675 \pm 201^{(n)}$	-
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{FILTRADA}}.\text{l}^{-1}$)	$529 \pm 349^{(n)}$	$194 \pm 166^{(n)}$	-
Alcalinidade a bicarbonato (mg $\text{CaCO}_3.\text{l}^{-1}$)	$4036 \pm 437^{(n)}$	$330 \pm 71^{(n)}$	$91,6 \pm 1,9$
Ácidos voláteis totais (mg $\text{CH}_3\text{COOH}.\text{l}^{-1}$)	$3730 \pm 494^{(n)}$	$250 \pm 77^{(n)}$	$93,0 \pm 2,1$
pH	7,2 – 8,0	7,7 – 8,8	
SSV (mg. l^{-1})	$70 \pm 25^{(n)}$	$85 \pm 31^{(n)}$	-
N-NO_3^- (mg. l^{-1})	$403 \pm 49^{(n)}$	$2 \pm 2^{(n)}$	$99,5 \pm 0,4$
N-NO_2^- (mg. l^{-1})	$7,2 \pm 11,5^{(n)}$	$0,1 \pm 0,7^{(n)}$	-
Benzeno (mg. l^{-1})	$4,93 \pm 1,76^{(n)}$	$0,16 \pm 0,09^{(n)}$	$96,3 \pm 2,3$
Tolueno (mg. l^{-1})	$7,21 \pm 2,61^{(n)}$	$0,28 \pm 0,11^{(n)}$	$95,7 \pm 2,0$
m-Xileno	$3,73 \pm 1,67^{(n)}$	$0,11 \pm 0,03^{(n)}$	$96,3 \pm 2,4$
$\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ (mg. l^{-1})	$15,88 \pm 5,84^{(n)}$	$0,54 \pm 0,19^{(n)}$	$96,1 \pm 1,8$
Ácido Acético (mg. l^{-1})	-	$65 \pm 31^{(n)}$	-
Ácido Propiônico (mg. l^{-1})	-	$136 \pm 72^{(n)}$	-
Produção de metano (ml.dia $^{-1}$)	$65 \pm 17^{(n)}$		-

valores obtidos a partir do centésimo trigésimo sétimo dia de operação, quando o reator atingiu o estado estacionário.

⁽ⁿ⁾ 13 determinações.

Ao final da operação, constatou-se que a remoção quase total de N-NO_3^- e N-NO_2^- ocorria praticamente também no primeiro trecho do reator (Figura 5.12d). A DQO residual ao longo do reator era praticamente constituída de ácido acético (Figura 5.12c), não sendo este efetivamente consumido até a saída do reator. O desbalanceamento do sistema pode estar ligado ao esgotamento do íon nitrato no primeiro trecho do reator e à ausência de biomassa adaptada ao processo de metanogênese acetoclástica.

Em relação à remoção de BTX, verificou-se que sua remoção se dava também no primeiro trecho do reator (Figuras 5.12e,f), sob condições desnitrificantes.

Figura 5.12 : Perfis de concentração ao longo do reator desnitrificante após 60 dias – Fase 2 – Concentração 1 – avaliação parcial: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) – ácidos voláteis analisados por cromatografia; (d) - N-NO_3^- e N-NO_2^- ; (e) – benzeno, tolueno e meta-xileno; (f) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$.

Ao final da operação do reator desnitrificante, novamente foram coletadas amostras ao longo do reator. O modelo de primeira ordem com concentração residual ajustou-se bem aos perfis de concentração de matéria orgânica - $C_{S \text{ BRUTA}}$, $C_{S \text{ FILTRADA}}$ e ácidos voláteis (Figuras 5.13a,b,c; Tabela 5.10).

Os valores de $C_{S \text{ BRUTA}}$, $C_{S \text{ FILTRADA}}$ e ácidos voláteis foram mais baixos que os encontrados no perfil realizado no sexagésimo dia. Essa diferença se deve provavelmente a alterações no consórcio microbiano presente no reator (Figura 5.12 a,b,c; 5.13 a,b,c). No sexagésimo dia de operação, a matéria orgânica era consumida apenas no primeiro trecho do reator onde o processo de desnitrificação era preponderante (Figura 5.12 a,b,d). Já ao final da operação, a degradação se dava ao longo de todo reator, na sua maior parte, na ausência de nitrato (Figura 5.13a,b,d).

A comparação entre esses perfis mostra que houve uma adaptação do sistema à nova condição. O reator desnitrificante passou a funcionar como um reator misto, onde o processo de desnitrificação se dava no primeiro trecho, produzindo grande quantidade de ácido acético. Por sua vez, o ácido acético era consumido em condições metanogênicas a partir do primeiro ponto de amostragem do reator. A produção de gás metano ao longo da operação serve para embasar essa constatação (Figura 5.9f).

Os perfis de ácidos voláteis por cromatografia mostram o acúmulo de ácido acético e ácido propiônico no primeiro trecho do reator, sendo estes consumidos ao longo do reator (Figura 5.13c). Os valores de concentração de ácido acético no perfil espacial ao final da operação foram menores do que os encontrados no perfil do sexagésimo dia, o que mostra a adaptação do reator ao consumo de ácido acético. Concentrações maiores de ácido propiônico foram observadas, no entanto, estas não foram suficientes para causar um desbalanceamento no sistema.

Figura 5.13 : Perfis de concentração ao longo do reator desnitrificante ao final da operação – Fase 2 – Concentração 1 – avaliação final: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - ácidos voláteis analisados por cromatografia; (d) - N-NO_3^- e N-NO_2^- ; (e) - benzeno, tolueno e meta-xileno; (f) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$.

De acordo com os perfis de concentração de ácidos voláteis (Figura 5.13c) e matéria orgânica (Figuras 5.13a,b), a diminuição do TDH (24h) e conseqüente redução do volume reacional necessário para a completa remoção da matéria orgânica levaria à perda significativa da qualidade do efluente, acarretando a diminuição da eficiência em relação à remoção de matéria orgânica, além de ocasionar provavelmente a acidificação do efluente. Por essa razão, a operação do reator desnitrificante foi dada como concluída. A remoção de BTX se deu praticamente no primeiro trecho do reator sob condições desnitrificantes (Figuras 5.13e,f). Entretanto, devido à ausência de pontos de amostragem próximos a entrada do reator e devido à impossibilidade de se diminuir o TDH a fim de possibilitar o alongamento do perfil de BTX no reator, não foi possível estimar os parâmetros cinéticos referentes à degradação dos BTX sob condições desnitrificantes.

As concentrações dos BTX no efluente do reator atendem os padrões de qualidade exigidos pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) do estado de São Paulo apenas quanto a emissão de meta-xileno ($300,0 \mu\text{g.l}^{-1}$), havendo então a necessidade do efluente passar por um pós-tratamento, possivelmente físico (adsorção com carvão ativado, stripping) ou químico (ozônio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio) para a remoção adequada de benzeno e tolueno.

Tabela 5.10: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator desnitrificante – Fase 2 – Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 10 mg.l^{-1} .

Parâmetro	C_{SO} (mg.l^{-1})	C_{SR} (mg.l^{-1})	k^{aparente} (h^{-1})	Coef. de correlação
$C_{S \text{ BRUTA}}$ ($\text{mg DQO}_{\text{BRUTA}}.\text{l}^{-1}$)	1542 ± 70	231 ± 140	$0,12 \pm 0,03$	0,985
$C_{S \text{ FILTRADA}}$ ($\text{mg DQO}_{\text{FILTRADA}}.\text{l}^{-1}$)	1362 ± 71	177 ± 150	$0,12 \pm 0,04$	0,980
Ácido Acético (mg.l^{-1})	812 ± 34	43 ± 23	$0,30 \pm 0,04$	0,992
Ácido Propiônico (mg.l^{-1})	1046 ± 75	108 ± 101	$0,15 \pm 0,05$	0,970

5.1.2.2. Operação do reator metanogênico

Subseqüentemente à etapa de adaptação ao novo substrato, o reator metanogênico foi submetido a três concentrações crescentes de BTX na alimentação (Tabelas 5.11, 5.12, 5.13), chamadas de concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 6, 10 e 32 mg.l^{-1} respectivamente.

Em relação à degradação de matéria orgânica, as eficiências encontradas para as três condições foram elevadas, acima de 98%, sendo praticamente iguais (Figuras 5.14a,b; Tabelas 5.12, 5.13, 5.14). Este comportamento se deve ao fato de que a maior parte da DQO era constituída por etanol, substrato de fácil degradação ao qual a biomassa encontrava-se adaptada. Mesmo aumentando-se a concentração de BTX na alimentação, esta não interferiu significativamente na DQO, já que a concentração de BTX era muito pequena frente à concentração de etanol. Nessa fase da operação do reator, a DQO residual não era constituída por BTX, já que estes foram eficientemente removidos pelo sistema (Tabelas 5.12, 5.13, 5.14).

Os parâmetros de monitoramento, alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais, indicam boa estabilidade operacional do sistema (Figuras 5.14c,d; Tabelas 5.12, 5.13, 5.14), não sendo observado o processo de acidificação do efluente ocorrido no reator desnitrificante, no entanto, os valores referentes ao método descrito por RIPLEY *et al.* (1986), para a determinação de ácidos voláteis, não coincidem nem com os valores obtidos por cromatografia gasosa, nem com os obtidos por meio da análise de DQO. Este comportamento se deu provavelmente devido a presença de alguma substância que interferiu na análise titulométrica, não sendo, portanto, uma análise recomendada para efluentes com as mesmas características do presente estudo.

Em relação aos sólidos suspensos voláteis, análise que objetivava verificar o possível arraste de biomassa em virtude do desprendimento de microrganismos não adaptados à degradação dos BTX's, não apresentou nenhum comportamento específico, mostrando que o biofilme adaptou-se bem ao novo substrato (Figura 5.14e).

A produção de gases, metano e dióxido de carbono, se deu de maneira mais acentuada na condição em que o reator estava submetido à concentração de $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 10 mg.l^{-1} . (Figura 5.14f; Tabelas 5.12, 5.13, 5.14). Aparentemente não há nenhum motivo para este comportamento, já que, em relação nas três condições, as cargas orgânicas aplicadas ($\sim 3,8 \text{ gDQO.dia}^{-1}$) e as eficiências em relação à remoção de matéria orgânica ($\sim 98\%$) eram praticamente as mesmas. Portanto, as conversões da matéria orgânica a metano e dióxido de carbono também deveriam ser semelhantes. Em relação aos volumes produzidos, as

quantidades ficaram muito abaixo das esperadas (30%), este comportamento se deve provavelmente a deficiências do sistema de captação de gases.

Figura 5.14: Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico - Fase 2: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato; (d) - ácidos voláteis totais; (e) - sólidos suspensos voláteis; (f) - produção de gás.

As Figuras 5.15a,b,c,d apresentam o monitoramento do reator metanogênico quanto à remoção de benzeno, tolueno, m-xileno e $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$, respectivamente. De acordo com esses resultados, verificou-se que o reator metanogênico apresentou alta eficiência em relação à remoção de BTX (acima de 90%) em todas as três condições. Comparando-se os dados de concentração e de eficiência para benzeno, tolueno, m-xileno e $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ (Tabela 5.11, 5.12, 5.13), constata-se que os valores de concentração efluente apresentaram ligeira alta, no entanto, sem queda na eficiência de remoção.

Apesar da elevada eficiência apresentada pelo sistema, as concentrações do efluente, quanto à concentração dos BTX, não atendem os padrões de qualidade exigidos pela CETESB (benzeno, $5,0 \mu\text{g.l}^{-1}$; tolueno, $170,0 \mu\text{g.l}^{-1}$; meta-xileno, $300,0 \mu\text{g.l}^{-1}$), sendo necessário o efluente do sistema passar por pós-tratamento.

Figura 5.15: Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico - Fase 2: (a) - benzeno; (b) - tolueno; (c) - meta-xileno; (d) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$.

O modelo de primeira ordem, com concentração residual, ajustou-se bem aos perfis de concentração de matéria orgânica ($C_{S\text{ BRUTA}}$ e $C_{S\text{ FILTRADA}}$) para as três condições (Figuras 5.16a,b; Tabelas 5.14, 5.15, 5.16). Os valores de k^{aparente} para a remoção de matéria orgânica solúvel ($C_{S\text{ FILTRADA}}$) foram praticamente iguais, mostrando que o aumento da concentração de BTX na alimentação não interferiu no processo global de remoção de matéria orgânica.

Os perfis de ácidos voláteis por cromatografia mostram o acúmulo de ácido acético e ácido propiônico no trecho do reator compreendido entre a entrada e o segundo ponto de amostragem. Entretanto, essa produção de ácidos não foi suficiente para desbalancear o sistema, sendo consumidos ao longo do reator (Figuras 5.16c,d,e).

Tabela 5.11: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – Fase 2 - Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 6 mg.l^{-1} .

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{BRUTA}}.\text{l}^{-1}$)	$4111 \pm 496^{(n)}$	$60 \pm 18^{(n)}$	$98,5 \pm 0,5$
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{FILTRADA}}.\text{l}^{-1}$)	$3682 \pm 331^{(n)}$	$42 \pm 12^{(n)}$	$98,9 \pm 0,4$
Alcalinidade a bicarbonato (mg $\text{CaCO}_3.\text{l}^{-1}$)	$421 \pm 103^{(n)}$	$1516 \pm 278^{(n)}$	-
Ácidos voláteis totais (mg $\text{CH}_3\text{COOH}.\text{l}^{-1}$)	$89 \pm 51^{(n)}$	$404 \pm 260^{(n)}$	-
pH	$7,2 - 7,6^{(n)}$	$7,5 - 8,2^{(n)}$	-
SSV (mg. l^{-1})	$43 \pm 31^{(n)}$	$42 \pm 23^{(n)}$	-
Benzeno (mg. l^{-1})	$2,90 \pm 0,44^{(n)}$	$0,14 \pm 0,07^{(n)}$	$95,1 \pm 2,4$
Tolueno (mg. l^{-1})	$2,51 \pm 0,53^{(n)}$	$0,08 \pm 0,08^{(n)}$	$96,9 \pm 2,5$
m-Xileno	$0,75 \pm 0,23^{(n)}$	$0,08 \pm 0,03^{(n)}$	$95,2 \pm 5,7$
$\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ (mg. l^{-1})	$6,16 \pm 1,16^{(n)}$	$0,26 \pm 0,16^{(n)}$	$95,8 \pm 2,3$
Produção de metano (ml.dia $^{-1}$)	$58,0 \pm 32,6^{(n)}$		-
Produção de dióxido de carbono (ml.dia $^{-1}$)	$4,4 \pm 2,5^{(n)}$		-

⁽ⁿ⁾ 12 observações.

Tabela 5.12: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – Fase 2 - Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 10 mg.l^{-1} .

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{BRUTA}}.\text{l}^{-1}$)	$3696 \pm 449^{(n)}$	$45 \pm 14^{(n)}$	$98,8 \pm 0,5$
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{FILTRADA}}.\text{l}^{-1}$)	$3535 \pm 421^{(n)}$	$36 \pm 7^{(n)}$	$99,0 \pm 0,3$
Alcalinidade a bicarbonato (mg $\text{CaCO}_3.\text{l}^{-1}$)	$592 \pm 191^{(n)}$	$1492 \pm 193^{(n)}$	-
Ácidos voláteis totais (mg $\text{CH}_3\text{COOH}.\text{l}^{-1}$)	$87 \pm 42^{(n)}$	$197 \pm 217^{(n)}$	-
pH	$7,1 - 7,9^{(n)}$	$7,8 - 8,3^{(n)}$	-
SSV (mg. l^{-1})	$54 \pm 34^{(n)}$	$34 \pm 12^{(n)}$	-
Benzeno (mg. l^{-1})	$4,66 \pm 0,83^{(n)}$	$0,34 \pm 0,15^{(n)}$	$92,8 \pm 3,1$
Tolueno (mg. l^{-1})	$4,25 \pm 0,37^{(n)}$	$0,16 \pm 0,09^{(n)}$	$96,3 \pm 2,2$
m-Xileno	$1,28 \pm 0,09^{(n)}$	$0,05 \pm 0,03^{(n)}$	$96,2 \pm 2,0$
$\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ (mg. l^{-1})	$10,18 \pm 1,23^{(n)}$	$0,56 \pm 0,26^{(n)}$	$94,7 \pm 2,6$
Produção de metano (ml.dia $^{-1}$)	$52,3 \pm 26,7^{(n)}$		-
Produção de dióxido de carbono (ml.dia $^{-1}$)	$4,4 \pm 2,7^{(n)}$		-

⁽ⁿ⁾ 7 observações.

Tabela 5.13: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – Fase 2 -
Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 32 mg.l^{-1} .

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{\text{S BRUTA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{BRUTA}}$. l^{-1})	$4335 \pm 560^{(n)}$	$60 \pm 18^{(n)}$	$98,6 \pm 0,3$
$C_{\text{S FILTRADA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{FILTRADA}}$. l^{-1})	$4228 \pm 520^{(n)}$	$47 \pm 10^{(n)}$	$98,9 \pm 0,2$
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO_3 . l^{-1})	$458 \pm 203^{(n)}$	$1032 \pm 154^{(n)}$	-
Ácidos voláteis totais (mg CH_3COOH . l^{-1})	$128 \pm 51^{(n)}$	$204 \pm 153^{(n)}$	-
pH	$7,0 - 7,9^{(n)}$	$7,7 - 8,4^{(n)}$	-
SSV (mg. l^{-1})	$43 \pm 27^{(n)}$	$60 \pm 32^{(n)}$	-
Benzeno (mg. l^{-1})	$14,47 \pm 2,93^{(n)}$	$0,56 \pm 0,42^{(n)}$	$96,1 \pm 3,0$
Tolueno (mg. l^{-1})	$12,49 \pm 2,12^{(n)}$	$0,22 \pm 0,28^{(n)}$	$98,0 \pm 2,5$
m-Xileno	$5,52 \pm 2,00^{(n)}$	$0,04 \pm 0,06^{(n)}$	$99,3 \pm 1,3$
$\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ (mg. l^{-1})	$32,48 \pm 5,01^{(n)}$	$0,82 \pm 0,61^{(n)}$	$97,4 \pm 2,1$
Produção de metano (ml.dia $^{-1}$)	$519,0 \pm 392,7^{(n)}$		-
Produção de dióxido de carbono (ml.dia $^{-1}$)	$87,7 \pm 73,9^{(n)}$		-

⁽ⁿ⁾ 10 observações.

Tabela 5.14: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – Fase 2
- Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 6 mg.l^{-1} .

Parâmetro	C_{SO} (mg. l^{-1})	C_{SR} (mg. l^{-1})	k^{aparente} (h^{-1})	Coef. de correlação
$C_{\text{S BRUTA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{BRUTA}}$. l^{-1})	4049	64 ± 9	$0,45 \pm 0,01$	0,999
$C_{\text{S FILTRADA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{FILTRADA}}$. l^{-1})	3885	71 ± 13	$0,50 \pm 0,02$	0,999
Benzeno (mg. l^{-1})	3,06	$0,21 \pm 0,04$	$0,75 \pm 0,19$	0,994
Tolueno (mg. l^{-1})	2,38	$0,16 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,20$	0,991
m-Xileno (mg. l^{-1})	0,71	$0,10 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,07$	0,996
$\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ (mg. l^{-1})	6,15	$0,47 \pm 0,08$	$0,71 \pm 0,15$	0,994

Tabela 5.15: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – Fase 2
- Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 10 mg.l^{-1} .

Parâmetro	C_{SO} (mg. l^{-1})	C_{SR} (mg. l^{-1})	k^{aparente} (h^{-1})	Coef. de correlação
$C_{\text{S BRUTA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{BRUTA}}$. l^{-1})	4630	60 ± 5	$0,70 \pm 0,01$	0,999
$C_{\text{S FILTRADA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{FILTRADA}}$. l^{-1})	3740	45 ± 5	$0,52 \pm 0,01$	0,999
Benzeno (mg. l^{-1})	6,07	$0,65 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,08$	0,998
Tolueno (mg. l^{-1})	4,95	$0,43 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,13$	0,994
m-Xileno (mg. l^{-1})	1,41	$0,12 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,21$	0,997
$\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ (mg. l^{-1})	12,42	$1,21 \pm 0,13$	$0,66 \pm 0,10$	0,998

Tabela 5.16: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – Fase 2
- Concentração $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ de 32 mg.l^{-1} .

Parâmetro	C_{SO} (mg. l^{-1})	C_{SR} (mg. l^{-1})	k^{aparente} (h^{-1})	Coef. de correlação
$C_{\text{S BRUTA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{BRUTA}}$. l^{-1})	4200	84 ± 8	$0,53 \pm 0,01$	0,999
$C_{\text{S FILTRADA}}$ (mg $\text{DQO}_{\text{FILTRADA}}$. l^{-1})	4012	61 ± 8	$0,52 \pm 0,01$	0,999
Benzeno (mg. l^{-1})	12,4	$0,32 \pm 0,11$	$0,65 \pm 0,08$	0,997
Tolueno (mg. l^{-1})	16,77	$0,38 \pm 0,15$	$0,81 \pm 0,12$	0,999
m-Xileno (mg. l^{-1})	8,84	$0,17 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,14$	0,999
$\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$ (mg. l^{-1})	38,02	$0,72 \pm 0,28$	$0,74 \pm 0,09$	0,998

Figura 5.16 : Perfis de concentração ao longo do reator metanogênico – Fase 2: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - ácidos voláteis analisados por cromatografia para concentração 1; (d) - ácidos voláteis analisados por cromatografia para concentração 2; (e) - ácidos voláteis analisados por cromatografia para Concentração 3.

De maneira análoga aos perfis de concentração de matéria orgânica, o modelo de primeira ordem com concentração residual ajustou-se bem aos perfis de concentração de BTX para as três condições (Figuras 5.17 a,b,c,d; Tabelas 5.14, 5.15, 5.16). Os valores de k^{aparente} foram semelhantes em todas condições. Com isso, constatou-se que as concentrações de BTX utilizadas na alimentação não foram suficientemente elevadas para se verificar se havia inibição pelo excesso de substrato.

Não se pôde utilizar concentrações de substrato mais elevadas devido a limitações no processo de extração da gasolina. Contudo, a água utilizada para alimentar o reator foi obtida de forma a simular uma contaminação real e os valores das concentrações aplicados na presente pesquisa encontram-se dentro da faixa usualmente encontradas em aquíferos contaminados por derivados de petróleo (Tabela 4.2).

Em relação aos demais compostos presentes na gasolina, com exceção do etanol, não foi verificada nenhuma influência aparente tanto em relação à remoção de matéria orgânica quanto à remoção dos BTX. Os resultados encontrados foram semelhantes aos encontrados em estudo realizado por NARDI (2002), empregando o RAHLF no tratamento de efluente constituído por solução etanólica de BTEX.

Figura 5.17: Perfis de concentração ao longo do reator metanogênico – Fase 2: (a) - benzeno; (b) - tolueno; (c) - m-xileno; (d) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$.

5.1.3. Fase 3 - Otimização do tempo de detenção hidráulica (TDH)

Após a Fase 2, promoveu-se apenas a otimização do reator metanogênico, já que o reator desnitrificante apresentou o processo de acidificação do efluente. O reator fermentativo/metanogênico foi submetido a diferentes tempos de detenção hidráulica (20, 16, 12, 8 horas). Vale ressaltar que, a etapa na qual o reator foi operado com a concentração de BTX denominada C3 na Fase 2 corresponde à etapa com TDH de 20 horas na Fase de otimização.

As eficiências em relação à remoção de matéria orgânica diminuíram à medida que o TDH era reduzido (Figuras 5.18a,b; Tabelas 5.17, 5.18, 5.19). Este comportamento já era esperado, já que, os coeficientes cinéticos ajustados nas fases anteriores apontavam para concentrações maiores de matéria orgânica no efluente ($C_{S \text{ efluente}}$) quando o reator fosse operado com TDH's menores (Figura 5.23a). Contudo, mesmo na condição mais desfavorável (TDH = 8 h), o reator metanogênico apresentou alta eficiência de remoção (~90%).

Os parâmetros de monitoramento, alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais, indicam boa estabilidade do sistema (Figuras 5.18c,d; Tabelas 5.17, 5.18 e 5.19), entretanto foi verificado maior acúmulo de ácidos voláteis à medida que o TDH era diminuído. Novamente, a análise de ácidos voláteis por titulometria sofreu interferência, não apresentando resultados coerentes quando comparados com os obtidos por cromatografia e DQO. Em relação ao parâmetro sólidos suspensos voláteis, não foi verificado nenhum comportamento específico (Figura 5.18e).

A produção de metano e dióxido de carbono se deu de maneira mais acentuada na condição em que o reator operou com TDH de 8 h. Este resultado foi devido à maior carga orgânica à qual o reator estava submetido (Figura 5.18f; Tabelas 5.17, 5.18 e 5.19).

Figura 5.18 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico - Fase 3: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato; (d) - ácidos voláteis totais; (e) - sólidos suspensos voláteis; (f) - produção de gás.

As Figuras 5.19a,b,c,d apresentam o monitoramento do reator metanogênico quanto à remoção de benzeno, tolueno, m-xileno e BTX_{TOTAL}, respectivamente. De acordo com

esses resultados, verificou-se que o reator metanogênico apresentou elevada eficiência em relação à remoção de BTX, sendo que a eficiência era menor à medida que o TDH era reduzido (Tabelas 5.17, 5.18 e 5.19). As elevadas concentrações de ácido acético e de ácido propiônico no efluente já eram esperadas (Figura 5.19e; Tabela 5.19), pois os perfis anteriores apontavam para maior produção de ácidos voláteis no primeiro trecho do reator, os quais com a diminuição do TDH não poderiam ser mais totalmente consumidos ao longo do reator.

Tabela 5.17: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico-TDH-16h.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência Média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	4100 ± 486 ⁽ⁿ⁾	59 ± 7 ⁽ⁿ⁾	98,5 ± 0,2
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	3723 ± 490 ⁽ⁿ⁾	43 ± 7 ⁽ⁿ⁾	98,8 ± 0,1
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	318 ± 83 ⁽ⁿ⁾	777 ± 213 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	148 ± 71 ⁽ⁿ⁾	338 ± 245 ⁽ⁿ⁾	-
pH	7,0 – 7,9 ⁽ⁿ⁾	7,7 – 8,4 ⁽ⁿ⁾	-
SSV (mg.l ⁻¹)	35 ± 22 ⁽ⁿ⁾	38 ± 17 ⁽ⁿ⁾	-
Benzeno (mg.l ⁻¹)	12,95 ± 5,64 ⁽ⁿ⁾	0,62 ± 0,41 ⁽ⁿ⁾	94,5 ± 4,0
Tolueno (mg.l ⁻¹)	17,38 ± 7,41 ⁽ⁿ⁾	0,71 ± 0,46 ⁽ⁿ⁾	95,5 ± 3,2
m-Xileno	6,68 ± 3,08 ⁽ⁿ⁾	0,28 ± 0,19 ⁽ⁿ⁾	95,4 ± 3,2
BTX _{TOTAL} (mg.l ⁻¹)	37,01 ± 16,06 ⁽ⁿ⁾	1,61 ± 1,04 ⁽ⁿ⁾	95,1 ± 3,5
Produção de metano (ml.dia ⁻¹)	778,2 ± 118,3 ⁽ⁿ⁾		-
Produção de dióxido de carbono (ml.dia ⁻¹)	114,0 ± 23,7 ⁽ⁿ⁾		-

⁽ⁿ⁾ 11 observações.

Tabela 5.18: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico-TDH-12h.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência Média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	4628 ± 529 ⁽ⁿ⁾	111 ± 30 ⁽ⁿ⁾	97,6 ± 0,6
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	4317 ± 549 ⁽ⁿ⁾	73 ± 23 ⁽ⁿ⁾	98,3 ± 0,5
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	498 ± 207 ⁽ⁿ⁾	948 ± 361 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	146 ± 64 ⁽ⁿ⁾	230 ± 83 ⁽ⁿ⁾	-
SSV (mg.l ⁻¹)	7,1 – 8,1 ⁽ⁿ⁾	7,8 – 8,5 ⁽ⁿ⁾	-
Benzeno (mg.l ⁻¹)	40 ± 20 ⁽ⁿ⁾	65 ± 23 ⁽ⁿ⁾	-
Benzeno (mg.l ⁻¹)	21,67 ± 5,96 ⁽ⁿ⁾	1,75 ± 0,86 ⁽ⁿ⁾	91,1 ± 6,6
Tolueno (mg.l ⁻¹)	28,33 ± 7,65 ⁽ⁿ⁾	2,05 ± 1,19 ⁽ⁿ⁾	91,9 ± 6,5
m-Xileno	10,89 ± 3,22 ⁽ⁿ⁾	0,60 ± 0,40 ⁽ⁿ⁾	93,8 ± 5,4
BTX _{TOTAL} (mg.l ⁻¹)	60,88 ± 16,52 ⁽ⁿ⁾	4,40 ± 2,37 ⁽ⁿ⁾	92,0 ± 6,3
Ácido acético por cromatografia (mg.l ⁻¹)	-	11 ± 4 ⁽ⁿ⁾	-
Produção de metano (ml.dia ⁻¹)	1485,7 ± 346 ⁽ⁿ⁾		-
Produção de dióxido de carbono (ml.dia ⁻¹)	264,3 ± 87,7 ⁽ⁿ⁾		-

⁽ⁿ⁾ 11 observações.

Tabela 5.19: Valores dos parâmetros de monitoramento do reator metanogênico-TDH-8h.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência Média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	4212 ± 541 ⁽ⁿ⁾	313 ± 340 ⁽ⁿ⁾	90,3 ± 8,0
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	3652 ± 573 ⁽ⁿ⁾	266 ± 120 ⁽ⁿ⁾	90,3 ± 9,0
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	804 ± 206 ⁽ⁿ⁾	1041 ± 387 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	148 ± 37 ⁽ⁿ⁾	449 ± 282 ⁽ⁿ⁾	-
pH	7,5 – 8,1 ⁽ⁿ⁾	8,0 – 8,6 ⁽ⁿ⁾	-
SSV (mg.l ⁻¹)	27 ± 13 ⁽ⁿ⁾	41 ± 20 ⁽ⁿ⁾	-
Benzeno (mg.l ⁻¹)	13,44 ± 2,99 ⁽ⁿ⁾	4,01 ± 0,87 ⁽ⁿ⁾	69,5 ± 7,4
Tolueno (mg.l ⁻¹)	17,84 ± 2,91 ⁽ⁿ⁾	4,57 ± 1,05 ⁽ⁿ⁾	73,8 ± 7,3
m-Xileno	8,05 ± 1,32 ⁽ⁿ⁾	1,83 ± 0,58 ⁽ⁿ⁾	76,6 ± 8,7
BTX _{TOTAL} (mg.l ⁻¹)	39,34 ± 6,15 ⁽ⁿ⁾	10,41 ± 1,73 ⁽ⁿ⁾	72,9 ± 6,3
Ácido acético por cromatografia (mg.l ⁻¹)	-	95 ± 56 ⁽ⁿ⁾	-
Ácido propiônico por cromatografia (mg.l ⁻¹)	-	35 ± 23 ⁽ⁿ⁾	-
Produção de metano (ml.dia ⁻¹)	2066,8 ± 330,9 ⁽ⁿ⁾	-	-
Produção de dióxido de carbono (ml.dia ⁻¹)	603,2 ± 123,8 ⁽ⁿ⁾	-	-

(n) 14 observações.

As Figuras 5.20 a,,b,c,d relacionam a carga orgânica volumétrica aplicada ($COV_{aplicada}$) para diversos compostos ($C_{S\text{ FILTRADA}}$, benzeno, tolueno e m-xileno) com a carga orgânica volumétrica removida ($COV_{removida}$). De acordo com a relação $COV_{aplicada}$ e $COV_{removida}$, o sistema não atingiu a capacidade limite de remoção de matéria orgânica e BTX para a faixa estudada. No entanto, observa-se um gradativo aumento da concentração de matéria orgânica e BTX no efluente com conseqüente perda de eficiência e aumento da concentração efluente (5.20 a,,b,c,d). Com isso, conclui-se que a relação entre $COV_{aplicada}$ e $COV_{removida}$, pode não ser o parâmetro mais indicado para avaliação e dimensionamento de sistemas que visem o tratamento de efluentes contaminados com gasolina.

Figura 5.19 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico – Fase 3: (a) - benzeno; (b) - tolueno; (c) - meta-xileno; (d) - $\text{BTX}_{\text{TOTAL}}$; (e) - ácidos voláteis analisados por cromatografia.

Figura 5.20 : Parâmetros de monitoramento do reator metanogênico (COV, C_S efluente; eficiência): (a) $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (b) - benzeno; (c) - tolueno; (d) - meta-xileno.

A fim de comparar, em um mesmo gráfico, os diferentes perfis de concentração, obtidos para diferentes tempos de detenção hidráulica, criou-se a variável tempo de detenção hidráulica teórico ($\theta_{TEÓRICO}$), a qual é definida como:

$$\theta_{TEÓRICO} = \frac{V_{REATOR}}{Q} = \frac{A_{REATOR} \cdot L}{A_{REATOR} \cdot v_s} = \frac{L}{v_s} \quad (5.1)$$

Substituindo a expressão 5.1 na expressão que representa o modelo cinético de primeira ordem com residual para o RAHLF (expressão 4.2), temos que:

$$C_s = C_{SR} + (C_{S0} - C_{SR}) \cdot \exp(-k^{aparente} \cdot \theta_{TEÓRICO}) \quad (5.2)$$

Em que:

C_s – concentração de substrato

C_{SR} – concentração residual de substrato

C_{S0} – concentração inicial de substrato

$K^{aparente}$ – coeficiente cinético aparente de primeira ordem

L – comprimento do reator

v_s – velocidade superficial do líquido

V_{REATOR} – volume do reator

A_{REATOR} – área do reator

$\theta_{TEÓRICO}$ – tempo de detenção hidráulica teórico

Da mesma maneira que nas etapas anteriores, o modelo de primeira ordem, com concentração residual, ajustou-se bem aos perfis de concentração de matéria orgânica (C_s BRUTA e C_s FILTRADA) e BTX para os TDH's utilizados (Figuras 5.21a,b,c,d,e,f; Tabelas 5.20, 5.21 e 5.22). Os valores de $k^{aparente}$ referentes à remoção de matéria orgânica solúvel (C_s FILTRADA) aumentaram à medida que o TDH era reduzido. Esta tendência pode estar associada à diminuição da resistência à transferência de massa externa devido ao aumento na velocidade superficial e possível diminuição da camada limite ao redor das matrizes de espuma de poliuretano (SARTI *et al.*, 2001). Os valores de $k^{aparente}$ verificados para remoção dos BTX para os diferentes TDH's não apresentaram qualquer comportamento específico, contudo, os valores de C_{SR} cresceram com a diminuição do TDH (Figura 5.23).

As Figuras 5.20 a,,b,c,d relacionam a carga orgânica volumétrica aplicada ($COV_{aplicada}$) para diversos compostos (C_s FILTRADA, benzeno, tolueno e m-xileno) com a carga orgânica volumétrica removida ($COV_{removida}$). De acordo com a relação $COV_{aplicada}$ e $COV_{removida}$, o sistema não atingiu a capacidade limite de remoção de matéria orgânica e BTX para a faixa estudada. No entanto, observa-se um gradativo aumento da concentração de matéria orgânica e BTX no efluente com conseqüente perda de eficiência e aumento da concentração efluente (5.20 a,,b,c,d). Com isso, conclui-se que a relação entre $COV_{aplicada}$ e $COV_{removida}$, pode não ser o parâmetro mais indicado para avaliação e dimensionamento de sistemas que visem o tratamento de efluentes contaminados com gasolina.

Figura 5.21 : Perfis de concentração ao longo do reator metanogênico – Fase 3: (a) - C_S BRUTA; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - benzeno; (d) – tolueno, (e) – m-xileno; (f) – BTX_{TOTAL} .

Figura 5.22 : Perfis de concentração de ácidos voláteis ao longo do reator: (a) TDH 20h; (b) TDH 16h; (c) TDH 12h; (d) TDH 8h.

Os perfis de concentração de ácidos voláteis por cromatografia mostram o acúmulo de ácido acético e ácido propiônico no trecho do reator compreendido entre as entrada e o segundo ponto de amostragem, como já havia sido verificado nas etapas anteriores (Figuras 5.22a,b,c,d). De acordo com estes resultados, verificou-se que com a diminuição do TDH levou à redução significativa da concentração de ácido propiônico, enquanto que a concentração de ácido acético apresentou ligeira elevação.

Foi verificada grande coerência entre os valores médios encontrados para as concentrações de $C_{\text{S FILTRADA}}$ e BTX no efluente durante o período de monitoramento do sistema e as concentrações previstas pelo modelo cinético, principalmente quanto às concentrações de matéria orgânica solúvel (Figura 5.23a).

Para as concentrações de BTX observadas para os diversos TDH's empregados, apenas os valores preditos pelo modelo para o TDH de 12 h não estão de acordo com os valores observados durante o período de monitoramento (Figura 5.23b, c, d). Provavelmente, durante a realização do perfil para TDH de 12 horas algum erro experimental pode ter ocorrido (queda de energia no dia anterior e desligamento da bomba de alimentação, problemas hidrodinâmicos devido a colmatagem do leito).

Figura 5.23 : Valores de concentração média do efluente durante o período de monitoramento, concentração residual predita pelo modelo e o coeficiente cinético ajustado para os diferentes TDH's empregados: (a) $C_{S \text{ FILTRADA}}$; (b) benzeno; (c) tolueno; (d) m-xileno.

Tabela 5.20: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – 16h.

Parâmetro	C_{S0} (mg. l^{-1})	C_{SR} (mg. l^{-1})	$k^{aparente}$ (h^{-1})	Coef. de correlação
$C_{S\ BRUTA}$ (mg DQO _{BRUTA} . l^{-1})	4235	60 ± 4	0,82 ± 0,01	0,999
$C_{S\ FILTRADA}$ (mg DQO _{FILTRADA} . l^{-1})	4095	91 ± 10	0,79 ± 0,02	0,999
Benzeno (mg. l^{-1})	9,88	1,45 ± 0,31	0,53 ± 0,14	0,968
Tolueno (mg. l^{-1})	12,30	1,46 ± 0,34	0,55 ± 0,13	0,975
m-Xileno (mg. l^{-1})	3,77	0,50 ± 0,15	0,36 ± 0,09	0,959
BTX _{TOTAL} (mg. l^{-1})	25,95	3,44 ± 0,80	0,51 ± 0,12	0,970

Tabela 5.21: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – 12h.

Parâmetro	C_{S0} (mg. l^{-1})	C_{SR} (mg. l^{-1})	$k^{aparente}$ (h^{-1})	Coef. de correlação
$C_{S\ BRUTA}$ (mg DQO _{BRUTA} . l^{-1})	4495	141 ± 19	0,88 ± 0,04	0,999
$C_{S\ FILTRADA}$ (mg DQO _{FILTRADA} . l^{-1})	4405	93 ± 15	0,91 ± 0,03	0,999
Benzeno (mg. l^{-1})	13,33	3,48 ± 0,24	0,62 ± 0,10	0,986
Tolueno (mg. l^{-1})	19,78	4,96 ± 0,30	0,67 ± 0,09	0,990
m-Xileno (mg. l^{-1})	8,11	1,37 ± 0,19	0,43 ± 0,06	0,987
BTX _{TOTAL} (mg. l^{-1})	41,22	9,98 ± 0,59	0,66 ± 0,08	0,992

Tabela 5.22: Valores dos coeficientes cinéticos ajustados para reator metanogênico – 8h.

Parâmetro	C_{S0} (mg. l^{-1})	C_{SR} (mg. l^{-1})	$k^{aparente}$ (h^{-1})	Coef. de correlação
$C_{S\ BRUTA}$ (mg DQO _{BRUTA} . l^{-1})	3807	278 ± 43	1,12 ± 0,10	0,996
$C_{S\ FILTRADA}$ (mg DQO _{FILTRADA} . l^{-1})	3470	248 ± 24	1,20 ± 0,02	0,998
Benzeno (mg. l^{-1})	12,68	3,44 ± 0,40	0,71 ± 0,16	0,966
Tolueno (mg. l^{-1})	16,13	3,48 ± 0,41	0,68 ± 0,11	0,982
m-Xileno (mg. l^{-1})	6,68	1,76 ± 0,29	0,49 ± 0,11	0,965
BTX _{TOTAL} (mg. l^{-1})	35,49	8,75 ± 0,92	0,65 ± 0,11	0,981

Em relação ao trabalho realizado por NARDI (2002), os valores encontrados para as constantes cinéticas aparentes de primeira ordem foram aproximadamente superiores em 50% (Tabela 5.23). Este fato deve ser devido às maiores concentrações de biomassa verificadas ao longo do reator (Figura 5.24b; Tabela 5.24).

Quanto aos experimentos realizados em microcosmos contendo água de aquíferos, os valores dos coeficientes cinéticos obtidos foram muito superiores, cerca de cem vezes maiores do que os encontrados na literatura (MORGAN *et al.*, 1993; SALANITRO *et al.*, 1997). Este comportamento se deve ao maior número de microrganismos adaptados à degradação dos BTEX.

Vale ressaltar mais uma vez que os componentes da gasolina (compostos parafínicos e demais aditivos) aparentemente não interferiram no processo de degradação dos BTX.

Tabela 5.23: Valores das constantes cinéticas aparentes de primeira ordem - $k^{aparente}$.

Parâmetro	NARDI (2002)	(TDH 12h)
Benzeno (d^{-1})	10,0	14,9
Tolueno (d^{-1})	11,3	16,1

5.2 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA ADERIDA

A retenção de biomassa ao longo do leito dos reatores foi verificada ao final da fase de formação do biofilme anaeróbico e ao final da operação após a alimentação com efluente contaminado com gasolina. Segundo as Figuras 5.24a,b e a Tabela 5.24 observa-se que a fase de formação do biofilme foi eficaz, em que se pôde constatar a elevada concentração de biomassa aderida às matrizes de espuma de poliuretano, obtendo-se valores médios de $0,82 \pm 0,15 \text{gSVT/g}_{\text{espuma}}$ para o reator desnitrificante e $0,73 \pm 0,225 \text{gSVT/g}_{\text{espuma}}$ para o reator fermentativo/metanogênico. Nos dois reatores, não foram considerados, para efeito de cálculo da média, os valores referentes às amostras da entrada dos reatores, já que devido à heterogeneidade do leito do reator, não foi possível medir com precisão a concentração de biomassa nesse ponto. Foi observado o decréscimo na quantidade de biomassa retida ao longo do reator fermentativo/metanogênico.

Ao final da operação em que os sistemas foram alimentados com efluente contaminado com gasolina verificou-se a elevada retenção de biomassa na entrada dos dois reatores. Esse resultado se deve possivelmente ao maior crescimento associado às elevadas concentrações de substrato verificadas nesse ponto. As maiores velocidades de degradação observadas nesse trecho também estão vinculadas às elevadas concentrações de biomassa nas entradas dos reatores. Vale ressaltar que a elevada carga de BTX aplicada, principalmente no primeiro trecho do reator, aparentemente, não inibiu o crescimento dos microrganismos.

Em virtude dessas características, o dimensionamento de sistemas de leito fixo visando o tratamento de efluentes contaminados com gasolina deve levar em conta a heterogeneidade da distribuição de biomassa ao longo dos reatores a fim de otimizar o volume reacional, atentando para possíveis problemas de entupimento. Alimentação ao longo do leito do reator, utilização de diferentes recheios e de dispositivos que permitam o descarte da biomassa de excesso são estratégias que podem ser empregadas.

Figura 5.24 : Retenção de biomassa, medida na forma de SVT por grama de espuma, ao longo dos reatores: (a) reator desnitrificante; (b) reator metanogênico.

Tabela 5.24: Retenção de biomassa, medida na forma de SVT por grama de espuma, ao longo dos reatores.

L/D	Reator Metanogênico			Reator Desnitrificante	
	SVT _{ESPUMA} (g SVT/g _{espuma})			SVT _{ESPUMA} (g SVT/g _{espuma})	
	NARDI (2002)	Fase 1	Fase 3	Fase 1	Fase 3
Entrada	-	1,08	2,78	1,06	2,66
4	0,57	0,91	1,19	0,86	0,81
8	0,58	0,73	0,64	0,67	0,68
12	0,27	0,54	0,43	0,83	0,61
16	0,26	0,61	0,43	0,64	0,49
18	-	0,54	0,35	0,85	0,47

5.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA

5.3.1. Reator desnitrificante

Ao final da operação do reator sob condições desnitrificantes alimentado com efluente simulando esgoto sanitário, as análises de microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura, as quais são apresentadas na Figura 5.25 e Tabela 5.25, indicaram a predominância de bacilos ao longo de todo reator e presença de cocos principalmente na primeira metade do reator. Esses microrganismos possivelmente podem estar vinculados às etapas de hidrólise e de desnitrificação. No segmento final do RAHLF, as análises de microscopia de epifluorescência mostraram a predominância de microrganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. e presença de morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp.. Essas morfologias estão provavelmente associadas com a presença de acetato proveniente das etapas anteriores de degradação da matéria orgânica.

Após a adição de efluente simulando aquífero contaminado com gasolina, os exames de microscopia ótica e de varredura, os quais são apresentados na Figura 5.26 e Tabela 5.26, revelaram a mudança na distribuição de morfologia ao longo do reator quando comparada com a distribuição ao final da operação com substrato sintético simulando esgoto sanitário. Ao final da Fase 3, as morfologias predominantes entre as arqueas metanogênicas foram bacilos delgados fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. e *Methanospirillum* sp., além de organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp.

Entre as bactérias, houve predomínio de bacilos com extremidades arredondadas e bacilos com extremidades afiladas sendo que, os primeiros ocorriam sozinhos ou formando aglomerados. Morfologias semelhantes foram observadas por HESS *et al.* (1997), COATES *et al.* (2001), NARDI (2001), em ambientes que se encontravam em condições desnitrificantes e presença dos BTX. Bacilos curvos foram observados depois da adição de gasolina, essa morfologia também foi observada por NARDI (2001) em RAHLF tratando efluente contendo BTEX sob condições desnitrificantes.

Esporos também foram observados, os quais estão associados provavelmente a condições adversas proporcionadas pela presença de substâncias recalcitrantes encontradas na gasolina.

Tabela 5.25: Ocorrência das morfologias observadas no reator desnitrificante ao final da operação com substrato sintético simulando esgoto sanitário (Fase 1).

Morfologia	Pontos					
Arqueas metanogênicas	0	1	2	3	4	5
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	++	++	+++	+++	++
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	+	+++	++++	++++	++++
Cistos de sarcina	-	-	-	-	-	-
Bacilos fluorescentes	+	++	+++	++	+++	+++
Bactérias						
Bacilos	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Bacilos curvos	-	-	-	-	-	-
Cocos	++++	++++	++++	++	+++	++
Espirilos	-	-	-	-	-	-
Esporos	-	-	-	-	-	-
Filamentos	+	++	+++	+++	+	+

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

Obs: o ponto zero corresponde às amostras coletadas logo na entrada do reator

Tabela 5.26: Ocorrência das morfologias observadas no reator desnitrificante ao final da operação com substrato sintético simulando aquífero contaminado com gasolina (Fase 3).

Morfologia	Pontos					
Arqueas metanogênicas	0	1	2	3	4	5
<i>Methanosarcina</i> sp.	+	++++	++++	++++	+++	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Cistos de sarcina	+	++	++	++	+	+
Bacilos fluorescentes	++++	++++	++++	++++	+++	+++
Bactérias						
Bacilos	++++	++++	++++	++++	+++	+++
Bacilos curvos	+++	+++	+++	+++	+	+
Cocos	++	++	++	++	++	++
Espirilos	++	+	-	-	-	-
Esporos	++	+++	+++	+++	++	++
Filamentos	-	-	-	-	-	-

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

Figura 5.25 : Observações morfológicas sob microscopia ótica e eletrônica de varredura, referentes às amostras do RAHLF sob condições desnitrificantes alimentado com efluente simulando esgoto sanitário: (a) microrganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (b) bacilos fluorescentes; (c) microrganismos semelhantes a *Methanosarcina* sp; (d),(e) e (f) bacilos.

Figura 5.26 : Observações morfológicas sob microscopia ótica e eletrônica de varredura, referentes às amostras do RAHLF sob condições desnitrificantes alimentado com efluente simulando aquífero contaminado com gasolina: (a) e (f) bacilos; (b) bacilos fluorescentes; (c) e (e) microrganismos semelhantes a *Methanosarcina* sp; (d) cocos.

Paralelamente aos exames por microscopia ótica e de varredura, aplicou-se à técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) nas amostras coletadas nos pontos zero, 1, 2, 3 4 e 5 (Figura 4.3) com as sondas específicas para os Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338). No entanto, não foi possível quantificar as células hibridadas nos pontos amostrais, pois as células formavam grumos, devido a presença de polímeros extracelulares, dificultando a contagem das mesmas.

Testes de desprendimento celular por sonicação foram realizados para tentar desprender as células aderidas às partículas inorgânicas e biopolímeros, facilitando assim a quantificação celular das amostras pela técnica de hibridação fluorescente *in situ*. No entanto, quando submetidas ao procedimento de sonicação, para tempos iguais a 1, 2 e 3 minutos, verificou-se por microscopia ótica que as células permaneciam aderidas aos biopolímeros. Com tempos de sonicação iguais a 4 e 5 minutos, observou-se que os arranjos celulares foram desfeitos, contudo verificou-se alteração na parede celular dos microrganismos. Por esses motivos, utilizou-se na hibridação *in situ* amostras não submetidas ao procedimento de sonicação.

5.3.1.1. Caracterização molecular da diversidade microbiana no reator

Nesse trabalho, as extrações de DNA foram feitas utilizando-se o método descrito por GRIFFITHS *et al.* (2000) o qual se mostrou satisfatório em produzir amostras de qualidade para as reações de PCR (Figuras 5.27c,d). Os resultados foram bandas uniformes que na subsequente separação em gel com gradiente desnaturante (DGGE) formaram padrão consistente de bandas individuais (Figuras 5.28, 5.29). Essas características confirmam o sucesso da técnica aplicada (NUBEL *et al.*, 1996).

O primeiro teste de extração de DNA (5.27a) foi feito com volume de 0,5 ml da amostra do reator submetido há tempo crescente de agitação com *glass beads*, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 segundos, em que as bandas resultantes dos testes podem ser visualizadas da esquerda para direita respectivamente. Um segundo teste de extração (5.27b) foi feito da mesma maneira que a anterior, porém, utilizando 1 ml da amostra do reator. Seguindo-se a extração, as amostras de DNA foram submetidas a reações de PCR que ampliaram regiões específicas para o Domínio *Bacteria* (5.27c) e *Archaea* (5.27d). Os géis de PCR (Figuras 5.27c,d) mostram as diferenças obtidas com a variação da concentração inicial de DNA na reação de ampliação; da direita para a esquerda, 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 µl, respectivamente. Com

isso, optou-se por trabalhar com 0,5 ml de amostra e 60 s de agitação já que nessa condição as quantidades de DNA extraído e posteriormente amplificado foram satisfatórias.

A Figura 5.28a,b resume o padrão de bandas obtido a partir dos *primers* universais para o Domínio *Bacteria* utilizados, antes da adição de efluente contaminado com gasolina (5.28a) e depois (5.28b). As colunas visualizadas no gel representam os pontos de amostragem 0, 1, 2, 3, 4 e 5 do reator da esquerda para direita (Figura 5.28a) e da direita para esquerda (Figura 5.28b), respectivamente. É possível observar que antes da adição de BTX a comunidade microbiana foi semelhante em todos os pontos de amostragem (Figura 5.28a). Houve pequena variação no ponto zero, referente à parte inicial do reator horizontal, onde provavelmente duas populações de bactérias estariam em maior número. Depois da introdução dos BTX houve a reestruturação da população de bactérias (Figura 5.28b) evidenciando que os pontos 0 (zero) e o ponto 1 (um) exibiam diversidade genética única. Esses foram os pontos onde o desaparecimento dos BTX foi mais expressivo. A partir do ponto 3, a diversidade genética de bactérias se tornou uniforme, não variando no resto da extensão do reator.

As Figuras 5.29a,b mostram a separação de ampliações de fragmentos de DNA específico para o Domínio *Archaea* antes da adição de efluente contaminado com gasolina (Figura 5.29a) e depois (Figura 5.29b). As colunas visualizadas no gel representam os pontos de amostragem 0, 1, 2, 3, 4 e 5 do reator da esquerda para direita (Figura 5.29a,b). O padrão de bandas da Figura 5.29 sugere que um fenômeno semelhante ocorreu com a diversidade das bactérias presentes no reator. Utilizando-se *primers* universais para o Domínio *Archaea*, verificou-se que o padrão de distribuição de bandas mostrou-se uniforme em todo o reator antes da adição de BTX. Depois da adição de BTX (Figura 5.29b) houve a reestruturação genética das populações, com o ponto inicial do reator apresentando diversidade diferenciada, particularmente com relação à densidade populacional. Isto quer dizer que, devido ao caráter semiquantitativo da reação de PCR (MUYZER *et al.*, 1993) é possível associar a intensidade das bandas a diferenças na concentração de DNA, que se mostra diretamente proporcional à densidade populacional microbiana presente na amostra.

Figura 5.27: Extração de DNA microbiano das amostras do RAHLF sob condições desnitrificantes (a,b). Ampliação por reações de PCR das regiões específicas para o Domínio *Bacteria* (c) e *Archaea* (d).

Figura 5.28: Produto do PCR das amostras de DNA extraído de diferentes pontos do RAHLF sob condições desnitrificantes separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)- Fragmentos de DNA específico para o Domínio *Bacteria* - a: amostras retiradas ao final da Fase 1 - efluente simulando esgoto sanitário; - b: amostras retiradas ao final da Fase 3 - efluente simulando aquífero contaminado com gasolina.

41,8% (a) (b) 42,2%

Figura 5.29 : Produto do PCR das amostras de DNA extraído de diferentes pontos do RAHLF sob condições desnitrificantes separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)- Fragmentos de DNA específico para o Domínio *Archaea* - a: amostras retiradas ao final da Fase 1 – efluente simulando esgoto sanitário; - b: amostras retiradas ao final da Fase 3 – efluente simulando aquífero contaminado com gasolina.

A diferença na diversidade genética entre as populações de arqueas estaria envolvida mais com a mudança na densidade populacional nos diferentes pontos de amostragem do que com a presença ou ausência de uma dada espécie. Por esse motivo é possível sugerir que neste caso a degradação de BTX no reator anaeróbico sob condições desnitrificantes ocorreu provavelmente pela atuação das bactérias, provavelmente bacilos, pois estas variaram conjuntamente com o desaparecimento do substrato em questão (BTX).

Apesar das limitações ao método de DGGE na avaliação da diversidade genética das amostras, as bandas visualizadas nas Figuras 5.28 e 5.29 foram consideradas unidades taxonômicas distintas e servem de conteúdo cognitivo prático para comparar a diversidade microbiana ao longo do reator. Com isso, as mudanças nos padrões de bandas foram associadas a mudanças na diversidade genética das populações, como o relatado em vários outros trabalhos (ENGELIN *et al.*, 1998, SANDAA *et al.*, 1999).

5.3.2. Reator metanogênico

Foi verificada grande diversidade de morfologias ao longo do RAHLF ao final da Fase 1 (reator alimentado com efluente simulando esgoto sanitário), indicando a adequada formação de um biofilme anaeróbio complexo (Figura 5.30, Tabela 5.27). Em relação às morfologias encontradas observou-se a presença de bacilos e cocos ao longo de todo reator, sendo, provavelmente, estes os microrganismos responsáveis pela fase de hidrólise e fermentação do substrato. Microrganismos com morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp foram encontrados nos primeiros trechos do reator, possivelmente devido à presença de maiores concentrações de acetato. No segmento final do RAHLF, as análises de microscopia de epifluorescência mostraram a predominância de microrganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp.

Ao final da operação com efluente simulando aquífero contaminado com gasolina, de acordo com a Figura 5.31 e Tabela 5.28, verificou-se ao longo reator o predomínio de arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosaeta* sp. e bacilos delgados fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. e *Methanospirillum* sp.. Neste caso, entre os organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* observou-se o predomínio de vários tipos morfológicos como filamentos, bacilos com extremidades arredondadas e bacilos com extremidades afiladas. Muitos dos bacilos com extremidades arredondadas apresentavam grânulos em seu interior. Neste reator também foi verificada a presença de bacilos curvos. Bacilos com extremidades arredondadas e microrganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. também foram observados por EDWARDS e GIRBC-GIRBIC (1994), trabalhando com sedimento contaminado com creosoto, onde foi verificada a presença de tolueno e o-xileno. NARDI (2001) observou a presença de bacilos curvos em RAHLF tratando efluente contendo BTEX sob condições fermentativas/metanogênicas.

Tabela 5.27: Ocorrência das morfologias observadas no reator metanogênico ao final da operação com substrato sintético simulando esgoto sanitário (Fase 1).

Morfologia	Pontos					
Arqueas metanogênicas	0	1	2	3	4	5
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	++++	+++	+++	++	++
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	+++	++++	++++	++++	++++
Bacilos fluorescentes	++	+++	++++	+++	+++	+++
Bactérias						
Bacilos	++++	+++	++	+++	++	++
Bacilos curvos	-	-	-	-	-	-
Cocos	++	+++	+++	++	+++	+
Esporos	-	-	-	-	-	-
Filamentos	+	-	++	+++	++	++

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

Tabela 5.28: Ocorrência das morfologias observadas no reator metanogênico ao final da operação com substrato sintético simulando aquífero contaminado com gasolina (Fase 3).

Morfologia	Pontos					
Arqueas metanogênicas	0	1	2	3	4	5
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	++	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++	++++	++	+	-	-
Bacilos fluorescentes	++++	++++	+++	+++	+++	++
Bactérias						
Bacilos	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Bacilos curvos	-	++	+++	+++	+++	+
Cocos	+++	+	+	-	-	-
Esporos	++	++	++	+	+	+
Filamentos	+	++++	++++	++++	++++	++++

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

Figura 5.30 : Observações morfológicas sob microscopia ótica e eletrônica de varredura, referentes às amostras do RAHLF sob condições fermentativas/metanogênicas alimentado com efluente simulando esgoto sanitário: (a) e (f) microrganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp; (b) microrganismos semelhantes a *Methanosarcina* sp; (c) e (e) cocos; (d) bacilos fluorescentes.

Figura 5.31 : Observações morfológicas sob microscopia ótica e eletrônica de varredura, referentes às amostras do RAHLF sob condições fermentativas/metanogênicas alimentado com efluente simulando aquífero contaminado com gasolina: . (a) bacilos fluorescentes; (b), (c) e (e) bacilos; (d) filamentos; (f) microrganismos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

5.3.2.1. Caracterização molecular da diversidade microbiana no reator

Neste reator, a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi aplicada nas amostras coletadas nos pontos zero (entrada do reator), 1, 2, 3, 4 e 5 (Figura 4.3) com as sondas específicas para os Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338). Diferindo dos demais reatores, neste caso foi possível quantificar os organismos metanogênicos e bacterianos nos pontos zero, 1 e 2. Porém, nos demais pontos amostrados as células formavam grumos, devido a polímeros extracelulares, dificultando a contagem das mesmas.

Pelas análises de FISH, verificou-se que a composição microbiana relacionada ao Domínio *Bacteria* apresentou valores de $25,4 \pm 1,6\%$, $27,3 \pm 0,8\%$ e $34,7 \pm 1,8\%$ nos pontos zero, 1 e 2, respectivamente. Para os mesmos pontos, os valores das porcentagens das células hibridadas com a sonda ARC915, relacionada ao Domínio *Archaea*, foram iguais a $74,5 \pm 2,9\%$, $71,2 \pm 1,2\%$ e $73,4 \pm 1,5\%$, respectivamente. Os valores e as morfologias observadas na hibridação *in situ* estão apresentados nas Figuras 5.32 e 5.33, respectivamente.

Figura 5.32 : Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338).

O predomínio do Domínio *Archaea*, provavelmente, se deu principalmente devido a presença de ácido acético proveniente da degradação do etanol, o qual é o maior constituinte da gasolina vendida no Brasil. Esses resultados corroboram os exames realizados empregando técnicas de microscopia ótica e de epifluorescência os quais revelaram o

predomínio de arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosaeta* sp., *Methanosaeta* sp e bacilos delgados fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. e *Methanospirillum* sp.

HIRASAWA *et al.* (2003) avaliou a comunidade microbiana anaeróbia usando a hibridação in situ fluorescente do mesmo lodo utilizado como inóculo dos RAHLF para o tratamento de efluente contaminada com gasolina. As porcentagens médias de microrganismos detectadas pelas sondas EUB338 e ARC915 foram iguais a 44,8% e 59,5%, respectivamente. Estes resultados indicaram um lodo predominantemente metanogênico. Em virtude dessas características do lodo, pode-se concluir que a natureza do lodo propiciou adequada formação do biofilme anaeróbio adaptado à degradação de elevadas concentrações de ácidos voláteis, desde que o mesmo possuía grande concentração de microrganismos metanogênicos.

Figura 5.33 : Hibridação *in situ* das amostras do ponto zero do reator metanogênico com tempo de detenção hidráulica igual a 8. (a), (c), (e) e (g) coloração com DAPI. (b) e (d) células hibridadas com a sonda EUB338. (f) e (h) células hibridadas com a sonda ARC915. Aumento de 1250 vezes.

70,0%

Figura 5.34 : Produto do PCR das amostras de DNA extraído de diferentes pontos do RAHLF sob condições fermentativas/metanogênicas separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)- Fragmentos de DNA específico para o Domínio *Bacteria* referentes a amostras retiradas ao final da Fase 1 – efluente simulando esgoto sanitário e ao final da Fase 3 – efluente simulando aquífero contaminado com gasolina.

32,2%

46,4%

(a)

36,4%

50,0%

(b)

Figura 5.35 : Produto do PCR das amostras de DNA extraído de diferentes pontos do RAHLF sob condições fermentativas/metanogênicas separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)- Fragmentos de DNA específico para o Domínio *Archaea* – a: amostras retiradas ao final da Fase 1 – efluente simulando esgoto sanitário; - b: amostras retiradas ao final da Fase 3 – efluente simulando aquífero contaminado com gasolina.

O padrão de bandas obtido a partir dos *primers* universais para o Domínio *Bacteria* utilizados, antes da adição de efluente contaminado com gasolina e depois, é apresentado na Figura 5.34. As colunas visualizadas no gel representam os pontos de amostragem 0, 1, 2, 3, 4 e 5 do RAHLF antes da adição de gasolina (Fase 1), da esquerda para direita, e os pontos de amostragem 0, 1, 2, 3, 4 e 5 do RAHLF depois da adição de gasolina (Fase 3), do centro para a direita, respectivamente. Verifica-se que antes da adição de BTX a comunidade microbiana foi semelhante para as amostras correspondentes aos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4 e 5 (Figura 5.34). Como no reator operado sob condições desnitrificantes, verificou-se certa diferença na diversidade genética entre o ponto zero e o resto do reator. Provavelmente essas populações de bactérias localizadas na entrada do reator seriam responsáveis pela etapa de hidrólise e fermentação do substrato. Constatou-se, após a introdução do efluente contaminado com gasolina, a reestruturação da população de bactérias a partir do ponto um do reator, em que a diversidade genética de bactérias apresentou-se uniforme, não variando geneticamente no resto da extensão do reator. (Figura 5.34). No entanto, verificou-se que o ponto 0 apresentou perfil de diversidade semelhante ao de antes da adição de gasolina. Na alimentação.

As Figuras 5.35a,b mostram a separação de ampliações de fragmentos de DNA específico para o Domínio *Archaea* antes da adição de efluente contaminado com gasolina (Figura 5.35a) e depois (Figura 5.35b). As colunas visualizadas no gel representam os pontos de amostragem 0, 1, 2, 3, 4 e 5 do reator da esquerda para direita (Figura 5.35a,b). O padrão de bandas da Figura 5.35a mostra que a diversidade genética das arqueas presentes no reator quando da operação com efluente simulando esgoto sanitário permaneceu constante ao longo de todo reator. Após a alimentação com efluente contaminado com gasolina, de maneira análoga ao comportamento observado para o Domínio *Bacteria*, foi verificada a reestruturação da população de arqueas no reator (Figura 5.35b). O perfil de diversidade genética mostrou-se praticamente homogêneo a partir do primeiro ponto do reator, diferindo apenas no ponto zero correspondente a entrada do reator, isto provavelmente ocorreu devido às maiores concentrações de ácidos voláteis presentes nesse trecho do reator e à possível adaptação desse segmento do reator à degradação dos BTX.

5.4. AVALIAÇÃO DO REATOR ANAERÓBIO COM BIOMASSA IMOBILIZADA OPERADO EM BATELADAS SEQUÊNCIAIS

O reator contendo biomassa imobilizada em espuma de poliuretano operado em bateladas sequenciais foi empregado para determinação dos coeficientes cinéticos de degradação dos BTX, matéria orgânica (DQO) e etanol, utilizando-se o tempo de ciclo de 24 horas.

As concentrações de composto aromáticos (10 mg.l^{-1}) utilizadas na alimentação do reator anaeróbio em batelada foram inferiores às verificadas na operação do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (40 mg.l^{-1}). Esta condição se deu ao fato das diferenças encontradas em relação entre a concentração de biomassa no reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais ($4,4 \text{ gSVT.l}^{-1}$) e no RAHLF ($31,2 \text{ gSVT.l}^{-1}$) e com isso pretendeu-se aplicar uma carga orgânica volumétrica de composto aromático por grama de biomassa ao reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais ($2,3 \text{ mgComposto aromático.gSVT}^{-1}.\text{d}^{-1}$) dentro da faixa aplicada ao RAHLF ($1,6$ a $4,8 \text{ mgComposto aromático.gSVT}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

5.4.1. Reator alimentado com benzeno

O primeiro reator foi alimentado com solução contendo etanol (500 mg.l^{-1}) e benzeno (10 mg.l^{-1}), perfazendo concentração de matéria orgânica ($C_{S \text{ FILTRADA}}$) medida como DQO de, aproximadamente, 1000 mg.l^{-1} . Após o período de adaptação da biomassa, o qual durou aproximadamente 40 dias, foi observada a efetiva remoção de matéria orgânica e benzeno, além da adequada estabilidade do sistema evidenciada pelos valores de alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis, conforme mostrado na Tabela 5.29 e nas Figuras 5.36a,b,c,d.

A remoção de benzeno ($67,3 \pm 12,4\%$) foi mais baixa que a verificada para o RAHLF (aproximadamente 95%). Este resultado pode estar vinculado ao menor tempo de operação e conseqüentemente a menor concentração de biomassa adaptada à degradação de benzeno ou então a diferença no modo de operação, já que sistemas que operam em regime contínuo geralmente obtêm melhores resultados na remoção de xenobióticos (HOLLADAY *et al.*, 1978; RITTMANN, 1982; COHEN, 2001). Outra hipótese para o melhor desempenho do RAHLF pode estar vinculado à disposição da biomassa ao longo do comprimento, permitindo diferentes níveis de exposição ao composto aromático.

Tabela 5.29: Valores dos parâmetros de monitoramento para o reator anaeróbio com biomassa imobilizada, operado em batelada seqüencial e alimentado com benzeno.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	991 ± 144 ⁽ⁿ⁾	53 ± 11 ⁽ⁿ⁾	94,8 ± 1,9
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	934 ± 160 ⁽ⁿ⁾	31 ± 19 ⁽ⁿ⁾	96,6 ± 2,5
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	369 ± 61 ⁽ⁿ⁾	452 ± 142 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	30 ± 7 ⁽ⁿ⁾	39 ± 11 ⁽ⁿ⁾	-
pH	7,7 – 8,4	6,7 – 8,6	-
Benzeno (mg.l ⁻¹)	10,98 ± 2,34 ⁽ⁿ⁾	3,85 ± 1,74 ⁽ⁿ⁾	67,3 ± 12,4

⁽ⁿ⁾ 4 observações (Após o 43º dia de operação).

Figura 5.36 : Parâmetros de monitoramento do reator anaeróbio com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com solução etanólica e benzeno: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais; (d) benzeno.

Figura 5.37 : Valores experimentais e preditos pelo modelo referentes às concentrações de substratos e produtos intermediários do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas sequenciais e alimentado com solução etanólica e benzeno para concentração de etanol na alimentação de 500mg.l⁻¹: (a) ácido propiônico, ácido acético e etanol; (b) C_{s FILTRADA} e benzeno.

Ao final da operação do reator foram realizados perfis temporais de concentração de matéria orgânica (C_{s FILTRADA}), etanol, benzeno e ácidos voláteis por cromatografia. De acordo com a Figura 5.37a, pode-se verificar o bom ajuste do modelo aos dados experimentais referentes às concentrações de etanol (eq. 4.6), ácido propiônico (eq. 4.7), ácido acético (eq. 4.8), mostrando que este foi adequado na predição dos dados experimentais. Os modelos referentes à remoção de benzeno (eq. 4.9) e matéria orgânica (C_{s FILTRADA} - eq. 4.10) também se mostraram adequados para predição dos dados experimentais (Figura 5.37b).

Para a análise estatística do modelo foi aplicado o Teste F. Calculou-se a estimativa da variância do erro do modelo de remoção (s_c^2) comparando-se os valores das variáveis obtidas pelo modelo ajustado em relação aos dados experimentais por meio da expressão 4.11.

$$s_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^v \sum_{j=1}^n \left(\tilde{y}_{ij} - y_{ij} \right)^2}{(nv)_c - p} \quad (4.11)$$

Sendo: $(nv)_c = 17$ (número de pontos ajustados)

$p = 1$ (número parâmetros do modelo)

$$s_c^2 = \frac{28318}{51-10} = 690,7$$

Como não se dispunha de medidas precisas da estimativa do erro experimental, já que não foram realizadas repetições do mesmo ensaio, optou-se pela aplicação de uma adaptação do Teste F proposta por BONOMI e SCHMIDELL (2001). Nessa proposta, calcula-se o erro experimental que, se existente, garante que o modelo ajustado representa adequadamente os dados experimentais. Para isso calcula-se, a partir dos valores das variáveis de estado medidas experimentalmente, a somatória do quadrado de todas as variáveis.

$$\sum_{i=1}^n (C_{\text{etanol}})^2 + \sum_{i=1}^n (C_{\text{acético}})^2 + \sum_{i=1}^n (C_{\text{propiónico}})^2 = 1058778$$

Sendo: $(nv)_e = 51$ (número de valores experimentais)

$v = 3$ (número de variáveis de estado)

Então a estimativa da variância do erro experimental é dada por:

$$s_e^2 = \frac{1058778 \cdot \varepsilon^2}{51-3}$$

em que ε é a estimativa do erro experimental.

Para que o modelo seja válido é necessário que $s_c^2 < s_e^2$. Sendo assim temos que para o modelo de degradação de etanol a estimativa do erro experimental (ε) deve ser maior que:

$$\varepsilon > \sqrt{\frac{690,7(51-3)}{1058778}} > 0,177$$

Ou seja, o erro experimental deve ser maior que 17,7% para que o modelo seja válido. Assim, o modelo é válido desde que o erro experimental seja maior que o erro associado ao ajuste do modelo

De maneira análoga temos que para o modelo de remoção de benzeno a estimativa do erro experimental é calculada da seguinte maneira:

Estimativa da variância devido ao erro do modelo:

$$s_e^2 = \frac{17,3}{17-7} = 1,7$$

Sendo: $(nv)_e = 17$ (número de pontos ajustados)

$p = 1$ (número parâmetros do modelo)

Somatória do quadrado de todas as variáveis:

$$\sum_{i=1}^n (C_{\text{benzeno}})^2 = 1060$$

Sendo: $(nv)_e = 17$ (número de valores experimentais)

$v = 1$ (número de variáveis de estado)

Estimativa da variância do erro experimental.

$$s_e^2 = \frac{1060 \cdot \varepsilon^2}{17-1}$$

$$\varepsilon > \sqrt{\frac{1,7 \cdot (17-1)}{1060}} > 0,162$$

Assim, o erro experimental deve ser maior que 0,162 ou 16,2%. Os valores das constantes cinéticas são apresentados na Tabela 5.30.

Tabela 5.30: Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o reator alimentado com solução etanólica e benzeno para concentração de etanol na alimentação de 500 mg.l⁻¹.

Remoção de Matéria Orgânica		Remoção de Benzeno	
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
U_{MAX1} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	70,5	$U_{\text{MAX-BZ}}$ (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	98,1
U_{MAX2} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	21,6	k_{BZ} (mg.l ⁻¹)	39,2
U_{MAX3} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	0,3	$k_{\text{I-PROPIÔNICO}}$ (mg.l ⁻¹)	64,1
U_{MAX4} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	34,0	$k_{\text{I-ACÉTICO}}$ (mg.l ⁻¹)	10,6
U_{MAX5} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	5,1	$k_{\text{I-AD}}$	0,01
k_1 (mg.l ⁻¹)	33,6	$k_{\text{2-AD}}$	12,7
k_2 (mg.l ⁻¹)	0,5	$C_{\text{BZ-R}}$ (mg.l ⁻¹)	5,0
k_3 (mg.l ⁻¹)	10,7		
k_4 (mg.l ⁻¹)	23,1		
k_5 (mg.l ⁻¹)	0,5		

Verificou-se que não ocorreu a remoção efetiva de benzeno, o que provavelmente estava associado às concentrações mais elevadas de ácidos voláteis verificadas durante todo ciclo. Então, optou-se por utilizar a metade da concentração de etanol (250 mg.l⁻¹) na alimentação do reator quando da realização do perfil temporal.

No perfil temporal realizado quando foi empregada a metade da concentração de etanol na alimentação foi observada a efetiva remoção de benzeno devido a menor inibição devido à presença de ácidos voláteis (Figura 5.38). Os valores das estimativas dos erros experimentais foram 0,13 (13%) e 0,111 (11,1%) para o modelo de remoção de etanol e benzeno, respectivamente. Os valores das constantes cinéticas são apresentados na Tabela 5.31. Nota-se que os parâmetros referentes ao modelo de remoção de etanol não sofreram sensíveis modificações.

Figura 5.38 : Valores experimentais e preditos pelo modelo referentes às concentrações de substratos e produtos intermediários do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas sequenciais e alimentado com solução etanólica e benzeno para concentração de etanol na alimentação de 250mg.l⁻¹: (a) ácido propiônico, ácido acético e etanol; (b) C_{s FILTRADA} e benzeno.

Tabela 5.31: Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o reator alimentado com benzeno para concentração de etanol na alimentação de 250 mg.l⁻¹.

Remoção de Matéria Orgânica		Remoção de Benzeno	
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
U _{MAX1} (h ⁻¹)	97,1	U _{MAX-BZ} (h ⁻¹)	103,0
U _{MAX2} (h ⁻¹)	46,8	k _{BZ} (mg.l ⁻¹)	33,7
U _{MAX3} (h ⁻¹)	1,4	k _{I-PROPIONIC} (mg.l ⁻¹)	1,3
U _{MAX4} (h ⁻¹)	29,2	k _{I-ACETIC} (mg.l ⁻¹)	22,0
U _{MAX5} (h ⁻¹)	6,3	k _{1-AD}	0,01
k ₁ (mg.l ⁻¹)	24,9	k _{2-AD}	29,0
k ₂ (mg.l ⁻¹)	1,4	C _{BZ-R} (mg.l ⁻¹)	1,621
k ₃ (mg.l ⁻¹)	10,3		
k ₄ (mg.l ⁻¹)	24,5		
k ₅ (mg.l ⁻¹)	0,9		

5.4.2. Reator alimentado com tolueno

Após a operação em que foi utilizado solução etanólica e benzeno como substrato, o reator foi reinoculado e então procedeu-se a alimentação com solução contendo etanol (250 mg. l^{-1}) e tolueno (10 mg. l^{-1}). Esta etapa da pesquisa apresentou comportamento análogo ao da etapa em que o reator operado em batelada seqüencial foi alimentado com benzeno. Verificou-se elevada remoção de matéria orgânica (95%) e tolueno (82%), o que corrobora com os valores de alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis, conforme mostrado na Tabela 5.32 e nas Figuras 5.39a, b,c,d) evidenciando a estabilidade do sistema.

Os perfis temporais de concentração de matéria orgânica ($C_{S\text{ BRUTA}}$ e $C_{S\text{ FILTRADA}}$), benzeno e ácidos voláteis por cromatografia apresentaram comportamento semelhante ao observado no reator alimentado com benzeno, sendo descritos provavelmente pelo mesmo modelo cinético (Figuras 5.40a, b). Os valores das estimativas dos erros experimentais foram 0,189 (18,9%) e 0,109 (11,6%) para o modelo de remoção de etanol e tolueno, respectivamente.

Tabela 5.32: Valores dos parâmetros de monitoramento para o reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com solução etanólica e tolueno.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} . l^{-1})	$1113 \pm 250^{(n)}$	$48 \pm 37^{(n)}$	$95,5 \pm 3,2$
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} . l^{-1})	$990 \pm 198^{(n)}$	$41 \pm 40^{(n)}$	$95,7 \pm 4,0$
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ . l^{-1})	$332 \pm 26^{(n)}$	$361 \pm 43^{(n)}$	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH. l^{-1})	$43 \pm 23^{(n)}$	$89 \pm 41^{(n)}$	-
pH	7,6 - 8,1	6,9 - 8,6	-
Tolueno (mg. l^{-1})	$14,54 \pm 4,39^{(n)}$	$2,07 \pm 1,12^{(n)}$	$82,9 \pm 12,9$

⁽ⁿ⁾ 15 observações

Em relação aos parâmetros ajustados pelo modelo (Tabela 5.33) pode-se constatar que os valores referentes à degradação de etanol, ácido acético e ácido propiônico, de uma maneira geral, foram bem superiores aos ajustados na operação com benzeno. Este comportamento indica que sistemas alimentados com tolueno apresentariam maiores eficiências em relação à remoção de matéria orgânica quando comparado a reatores alimentados com benzeno operados nas mesmas condições.

Figura 5.39 : Parâmetros de monitoramento do reator anaeróbio com biomassa imobilizada, operado em bateladas sequenciais e alimentado com solução etanólica e tolueno: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais; (d) tolueno.

Tabela 5.33: Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o reator alimentado com solução etanólica e tolueno para concentração de etanol na alimentação de 250 mg.l⁻¹.

Remoção de Matéria Orgânica		Remoção de Benzeno	
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
U_{MAX1} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	300,0	$U_{\text{MAX-TO}}$ (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	100,2
U_{MAX2} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	161,4	k_{TO} (mg.l ⁻¹)	30,1
U_{MAX3} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	16,9	$k_{\text{L-PROPIÔNICO}}$ (mg.l ⁻¹)	59,6
U_{MAX4} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	31,3	$k_{\text{L-ACÉTICO}}$ (mg.l ⁻¹)	1,5
U_{MAX5} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	0,1	$k_{\text{1-AD}}$	0,123
k_1 (mg.l ⁻¹)	419,6	$k_{\text{2-AD}}$	9,1
k_2 (mg.l ⁻¹)	56,0	$C_{\text{TO-R}}$ (mg.l ⁻¹)	3,650
k_3 (mg.l ⁻¹)	0,3		
k_4 (mg.l ⁻¹)	2,4		
k_5 (mg.l ⁻¹)	4,2

Figura 5.40 : Valores experimentais e preditos pelo modelo referentes às concentrações de substratos e produtos intermediários do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas seqüenciais e alimentado com solução etanólica e tolueno: (a) ácido propiônico, ácido acético e etanol ; (b) $C_{S \text{ FILTRADA}}$ e tolueno.

5.4.3. Reator alimentado com meta-xileno

O reator foi então novamente reinoculado e alimentado com solução contendo etanol (250 mg.l⁻¹) e m-xileno (10 mg.l⁻¹). Apesar das condições operacionais serem semelhantes aos outros dois experimentos, a operação do reator alimentado com solução etanólica e meta-xileno apresentou comportamento diferenciado, a despeito da elevada remoção de matéria orgânica (aproximadamente 95%), a remoção de m-xileno (55%) foi inferior às verificadas para tolueno (82%) e benzeno (67%). Os valores de alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis, conforme mostrado na Tabela 5.34 e nas Figuras 5.41a,b,c,d, mostram a estabilidade do sistema quanto ao acúmulo de ácidos que poderiam levar a falência do sistema.

Os perfis temporais de concentração de matéria orgânica ($C_{S \text{ BRUTA}}$ e $C_{S \text{ FILTRADA}}$) e ácidos voláteis por cromatografia apresentaram comportamento semelhante aos observados nos reatores alimentados com benzeno e tolueno. No entanto, a concentração de m-xileno praticamente não variou durante todo o ciclo, sofrendo apenas uma queda nas primeiras horas. Esta queda na concentração provavelmente se deu devido à adsorção do m-xileno à biomassa anaeróbia Figuras 5.42a, b. Os valores das estimativas dos erros experimentais foram 0,199 (19,9%) e 0,061 (6,1%) para o modelo de remoção de etanol e meta-xileno, respectivamente. Em relação aos parâmetros cinéticos ajustados, estes indicam que o m-

xileno foi removido praticamente devido ao processo de adsorção, segundo o modelo (Tabela 5.35).

Figura 5.41: Parâmetros de monitoramento do reator anaeróbio com biomassa imobilizada, operado em batelada seqüencial e alimentado com solução etanólica e m-xileno: (a) - $C_{S\text{ BRUTA}}$; (b) - $C_{S\text{ FILTRADA}}$; (c) - alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis totais; (d) m-xileno.

Tabela 5.34: Valores dos parâmetros de monitoramento para o reator anaeróbio com biomassa imobilizada, operado em batelada seqüencial e alimentado com solução etanólica e meta-xileno.

Parâmetro	Valor médio		Eficiência média %
	Afluente	Efluente	
$C_{S\text{ BRUTA}}$ (mg DQO _{BRUTA} .l ⁻¹)	912 ± 38 ⁽ⁿ⁾	47 ± 32 ⁽ⁿ⁾	94,8 ± 3,5
$C_{S\text{ FILTRADA}}$ (mg DQO _{FILTRADA} .l ⁻¹)	885 ± 36 ⁽ⁿ⁾	42 ± 34 ⁽ⁿ⁾	95,8 ± 3,8
Alcalinidade a bicarbonato (mg CaCO ₃ .l ⁻¹)	189 ± 10 ⁽ⁿ⁾	222 ± 13 ⁽ⁿ⁾	-
Ácidos voláteis totais (mg CH ₃ COOH.l ⁻¹)	19 ± 5 ⁽ⁿ⁾	25 ± 12 ⁽ⁿ⁾	-
pH	6,9 - 7,9	7,0 - 8,5	-
m-Xileno (mg.l ⁻¹)	6,11 ± 1,44 ⁽ⁿ⁾	2,39 ± 0,76 ⁽ⁿ⁾	55,6 ± 16,9

⁽ⁿ⁾ 14 observações

Figura 5.42: Valores experimentais e preditos pelo modelo referentes às concentrações de substratos e produtos intermediários do reator anaeróbico com biomassa imobilizada, operado em bateladas sequenciais e alimentado com solução etanólica e m-xileno: (a) ácido propiônico, ácido acético e etanol; (b) $C_{S \text{ FILTRADA}}$ e m-xileno.

Tabela 5.35: Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o reator alimentado com solução etanólica e meta-xileno para concentração de etanol na alimentação de 250mg.l⁻¹.

Remoção de Matéria Orgânica		Remoção de Benzeno	
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
U_{MAX1} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	302,8	U_{MAX-MX} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	2,2
U_{MAX2} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	157,0	k_{MX} (mg.l ⁻¹)	0,0
U_{MAX3} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	17,4	$k_{I-PROPIÔNICO}$ (mg.l ⁻¹)	1,3
U_{MAX4} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	33,3	$k_{I-ACÉTICO}$ (mg.l ⁻¹)	1,5
U_{MAX5} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	2,6	k_{1-AD}	0,869
k_1 (mg.l ⁻¹)	418,1	k_{2-AD}	2,2
k_2 (mg.l ⁻¹)	59,0	C_{MX-R} (mg.l ⁻¹)	5,300
k_3 (mg.l ⁻¹)	0,8		
k_4 (mg.l ⁻¹)	0,4		
k_5 (mg.l ⁻¹)	4,1		

De maneira geral a aplicabilidade do modelo proposto com tantos parâmetros se dá com o objetivo de auxiliar no entendimento dos processos metabólicos envolvidos, possibilitando a predição das concentrações dos compostos intermediários formados e suas velocidades de produção e consumo, estabelecendo parâmetros cinéticos que possibilitem o dimensionamento de reatores visando o tratamento de efluentes contaminados com etanol e BTX.

6. CONCLUSÕES

O principal resultado deste trabalho foi a constatação da viabilidade técnica da aplicação do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), sob condições metanogênicas, no tratamento de efluentes contaminados com gasolina. A aplicação do RAHLF na remediação de aquíferos contaminados com gasolina se apresenta como potencial, desde que as condições encontradas em campo sejam muito próximas daquelas empregadas em laboratório (elevadas concentrações de etanol, baixas vazões, elevadas concentrações de BTEX), sendo necessário apenas um pré-tratamento para que a fase aquosa seja separada e que se faça a adição de macro e micro-nutrientes para viabilizar o processo.

Do ponto de vista econômico, as vantagens do emprego do RAHLF na remediação de aquíferos são ainda mais pronunciadas, já que as tecnologias hoje utilizadas (carvão ativado e oxidação química) são muito dispendiosas. Nesse sentido, o emprego do RAHLF possibilita a minimização dos custos operacionais, pois a partir da retirada da fonte de contaminação por meio do bombeamento da fase livre até a superfície, os custos associados à descontaminação da fase aquosa seriam de adição de macro e micro-nutrientes, e no caso de reinjeção no aquífero, apenas uma quantidade muito menor de carvão ativado seria necessário para se atingir os padrões exigidos, já que 95% dos BTEX e 99% da matéria orgânica seriam removidos por meio do processo biológico.

A utilização de efluente simulando esgoto sanitário visando a colonização das espumas de poliuretano, tanto para o reator desnitrificante quanto para o reator metanogênico, se mostrou adequada para o desenvolvimento do biofilme em ambos sistemas.

Os reatores desnitrificante e metanogênico apresentaram elevada retenção de biomassa na entrada dos dois reatores. Em virtude desse comportamento, o dimensionamento de sistemas de leito fixo visando o tratando efluentes contaminados com gasolina deve levar em conta a heterogeneidade da distribuição de biomassa ao longo dos reatores a fim de otimizar o volume reacional, atentando para possíveis problemas de entupimento.

Em relação à operação do RAHLF sob condições desnitrificantes foi possível tirar as seguintes conclusões:

- As concentrações dos BTX no efluente do reator atendem os padrões de qualidade exigidos pela CETESB apenas quanto à emissão de meta-xileno, havendo, então, a necessidade do efluente passar por um processo de pós-tratamento, possivelmente físico (adsorção com carvão ativado, stripping) ou químico (ozônio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio) para a remoção adequada de benzeno e tolueno.
- A remoção de N-NO_3^- , N-NO_2^- e BTX ocorreu praticamente no primeiro trecho do reator. A DQO residual ao longo do reator era praticamente constituída de ácido acético, não sendo este efetivamente consumido até a saída do reator. O processo de desbalanceamento do sistema verificado nos primeiros 140 dias de operação pode estar ligado ao esgotamento do íon nitrato já no primeiro trecho do reator e a ausência de biomassa adaptada ao processo de metanogênese acetoclástica.
- O padrão de bandas obtido a partir dos *primers* universais para o Domínio *Bacteria* utilizados mostrou que houve a reestruturação da população de bactérias depois da introdução dos BTX. Nos dois primeiros pontos de amostragem (na entrada e a 20cm da entrada) foi observada diversidade genética única, sendo esses os pontos onde o desaparecimento dos BTX foi mais expressivo. A partir do ponto 3 (40cm da entrada), a diversidade genética de bactérias se tornou uniforme, não variando geneticamente no resto da extensão do reator. Os exames de microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura indicaram a predominância de bacilos ao longo de todo reator e presença de cocos principalmente na primeira metade do reator, os quais podem estar associados às etapas de hidrólise e de desnitrificação.
- Em relação às ampliações de fragmentos de DNA específico para o Domínio *Archaea*, observou-se que o padrão de distribuição de bandas foi uniforme em todo o reator antes da adição de BTX. Depois da adição de BTX houve a reestruturação genética das populações, com o ponto inicial do reator apresentando diversidade diferenciada em relação dos demais pontos. No segmento final do RAHLF, a partir do terceiro ponto de amostragem, as análises de microscopia de epifluorescência mostraram a predominância de microrganismos de morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. e presença de morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp.. Essas morfologias estão, provavelmente, associadas à presença de acetato proveniente das etapas anteriores de degradação da matéria orgânica.

Em relação à operação do RAHLF sob condições metanogênicas foi possível tirar as seguintes conclusões:

- As eficiências em relação à remoção de matéria orgânica diminuíram à medida que o TDH foi reduzido. Contudo, mesmo na condição mais desfavorável (TDH = 8 h), o reator metanogênico apresentou alta eficiência de remoção (~90%).
- Quanto à remoção de benzeno, tolueno, m-xileno, verificou-se que o reator metanogênico apresentou elevada eficiência (acima de 90%) para as condições em que o TDH foi superior a 12 horas. Para a operação em que foi empregado o TDH de 12 horas, ocorreu a diminuição drástica da eficiência de remoção dos BTX (em torno de 70%). Nesse sentido, em caso de aumento de escala, o TDH a ser empregado seria em torno de 16 horas o que conferiria ao efluente qualidade maior em relação às concentrações dos BTX no efluente (benzeno - $0,62 \pm 0,41 \text{ mg.l}^{-1}$; tolueno - $0,71 \pm 0,46 \text{ mg.l}^{-1}$; meta-xileno - $0,28 \pm 0,19 \text{ mg.l}^{-1}$). Apesar da elevada eficiência apresentada pelo sistema, as concentrações do efluente, quanto à concentração dos BTX, não atendem os padrões de qualidade exigidos pela CETESB, sendo necessário o efluente do sistema passar por pós-tratamento.
- Os valores encontrados para as constantes cinéticas aparentes de primeira ordem foram aproximadamente superiores em 50% em relação ao trabalho realizado por NARDI (2002). Este fato deve ser devido às maiores concentrações de biomassa verificadas ao longo do reator. Quanto aos experimentos realizados em microcosmos contendo água de aquíferos, os valores dos coeficientes cinéticos obtidos foram muitos superiores, cerca de cem vezes maiores do que os encontrados na literatura.
- Pelas análises de FISH, verificou-se que a composição microbiana relacionada ao Domínio *Bacteria* apresentou valores de $25,4 \pm 1,6\%$, $27,3 \pm 0,8\%$ e $34,7 \pm 1,8\%$ nos pontos zero (entrada do reator), 1 (20cm da entrada) e 2 (40cm da entrada), respectivamente. Para os mesmos pontos, os valores das porcentagens das células hibridadas com a sonda ARC915, relacionada ao Domínio *Archaea*, foram iguais a $74,5 \pm 2,9\%$, $71,2 \pm 1,2\%$ e $73,4 \pm 1,5\%$, respectivamente. O predomínio do Domínios *Archaea* se deu, provavelmente, devido a presença de ácido acético proveniente da degradação do etanol, constituinte principal da gasolina vendida no Brasil. Esses resultados corroboram os exames realizados empregando técnicas de microscopia ótica e de epifluorescência os quais revelaram o predomínio de arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosaeta* sp. e bacilos delgados fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. e *Methanospirillum* sp.

- O padrão de bandas obtido a partir dos *primers* universais para o Domínio *Bacteria* permite concluir que, de maneira análoga ao reator desnitrificante, verificou-se certa diferença na diversidade genética entre o ponto zero e o resto do reator. Provavelmente essas populações de bactérias localizadas na entrada do reator seriam responsáveis pela etapa de hidrólise e fermentação do substrato. Os resultados verificados para o Domínio *Archaea* foram análogos aos do Domínio *Bacteria*, em que foi verificada a reestruturação da população de arqueas no reator, sendo que o perfil de diversidade genética mostrou-se praticamente homogêneo a partir do primeiro ponto do reator, diferindo apenas no ponto zero correspondente a entrada do reator.

Em relação à operação do reator anaeróbio com biomassa imobilizada operado em bateladas sequenciais foi possível tirar as seguintes conclusões:

- Os reatores alimentados com solução contendo etanol (500 mg.l^{-1}) e seu relativo BTX (10 mg.l^{-1}) apresentaram remoção de benzeno de $67,3 \pm 12,4\%$, tolueno de $82,9 \pm 12,9\%$ e meta-xileno de $55,6 \pm 16,9\%$, respectivamente. As eficiências foram mais baixas que as verificadas para o RAHLF (95%).
- Em relação à remoção de matéria orgânica em todos os três experimentos a eficiência foi por volta de 95%.
- O modelo cinético proposto para remoção de substrato (etanol, ácidos propiônico e acético, BTX) mostrou-se adequado para prever os perfis temporais e mecanismos cinéticos envolvidos, propiciando informações necessárias para o dimensionamento de sistemas de maior escala. Em relação aos parâmetros ajustados para o reator alimentado com meta-xileno o modelo indica que o m-xileno foi removido praticamente devido ao processo de adsorção.

7. SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, as sugestões visando o aprimoramento de reatores anaeróbios tratando águas residuárias contaminadas por gasolina são as seguintes:

- Aplicar o reator anaeróbio horizontal de leito fixo sob condições metanogênicas em escala real tratando efluente proveniente de aquífero contaminado com gasolina;
- Estudar a adição de diferentes fontes de macro e micronutrientes visando acelerar a degradação anaeróbia dos BTX;
- Utilizar diferentes processos de pós-tratamento do efluente do RAHLF tratando efluente contaminado com gasolina objetivando atender os padrões de emissão estabelecidos pelos órgãos ambientais;
- Investigar a cinética de degradação dos BTX em reator anaeróbio com biomassa imobilizada operado em bateladas sequenciais verificando cada composto aromático interfere na remoção do outro;
- Testar diferentes suportes de imobilização visando eliminar problemas operacionais com entupimento do leito;
- Utilizar benzeno, tolueno e m-xileno marcados com o objetivo de provar a remoção dos BTX por meio da degradação biológica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, D. S. (1998). *Desnitrificação e caracterização filogenética das bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas no hipolímio do lago Kizaki, Japão*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ACTON, D.W.; BARCKER, J.F.(1992). In situ biodegradation potencial of aromatics hydrocarbons in anaerobic groundwaters *Journal of Contamination Hydrology*, 9: 325-352.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP, Despacho nº 536, 15/09/2000.

AMANN, R. I.; BINDER, B.G.; OLSON, R.J.; CHRISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-target oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 1919 – 1925.

AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143-169.

ARAÚJO, J.C. (1994). *Acompanhamento da evolução do biofilme e caracterização química e biológica em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário sintético*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- BARBARO, J.R.; BARKER, J.F.; LEMON, L.A.; MAYFIELD, C.I. (1992). Biotransformation of BTEX under anaerobic, denitrifying conditions. Field and laboratory observations. *Journal of Contamination Hydrology*, 11: 245-272.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2ª ed.: McGraw Hill, Nova York, 1996.
- BIEGERT, T.; FUCHS, G. (1995). Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thaurea* sp.. *Archives of Microbiology*, 163: 407-417.
- BIELEFELDT A.R.; STENSEL H.D. (1999). Modeling competitive inhibition effects during biodegradation of BTEX mixtures. *Water Research*, 33: 707-714.
- BOLAÑOS, M.L.R.(2001). *Tratamento de fenol em reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) em condições mesofílicas*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- BOWLEN, G.F.; KOSSON, D.S. (1995). *In situ* processes for bioremediation of BTEX and petroleum fuel products. In: YOUNG, L.Y.; CENIGLIA, C.E.(eds). *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Wiley-Liss, Inc., Nova York.
- CASARINI, D.C.P.; DIAS, C.L; LEMOS, M.M.G. (2001). Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. São Paulo. /Relatório Técnico CETESB/.
- CETESB. Uso das águas subterrâneas para abastecimento público no Estado de São Paulo : 1997. São Paulo: CETESB, 1997. 48 p.

- CETESB. Relação de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo, 2002. São Paulo.
- CETESB, Relação de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo, 2003. São Paulo.
- CHAUDHURI, B.K; WIESMANN, U. (1996). Kinetic study of the anaerobic degradation of toluene by a mixed culture. *Acta Biotechnology*, 16: 31-41.
- COATES, J.D.; ANDERSON, R.T. (2000). Emerging technologies for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends in Biotechnology*, 18: 408-412.
- COATES, J.D.; CHAKRABORTY, R.; LACK, J.G.; O'CONNOR, S.M.; COLE, K.A.; BENDER, K.S.; ACHENBACH, L.A. (2001). Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature*, 411: 1039-1043.
- COHEN Y. (2001). Biofiltration—the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresearch Technology*, 77:257–74.
- COLE, S.T.; SAINT, L.; GIRONS, I. (1994). Bacterial genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 14: 139-160.
- COLEMAN, W. E.; MUNCH, J. W.; STREICHER, R. P.; RINGHAND, H. P.; KOPFLER, F. C. (1984). The identification and measurement of components of gasoline, kerosene, and no. 2 fuel oil that partition into the aqueous phase after mixing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 13: 171-178.
- CORSEUIL H. X.; ALVAREZ, P. J. J. (1996). Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: Effect of ethanol. *Wat. Sci. Tech.*, 35: 9-16.

- CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S.; SANTOS, R. C. F.; ALVAREZ, P. J. J. (1998). The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Water Research*, 32: 2065-2072.
- CORSEUIL, H.X.; MARINS, D.M. (1997). Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: o problema é grave? *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2: 50-54.
- CORSEUIL, H.X.; FERNANDES, M. (1999). Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 4: 71-83.
- CUBAS, S.A.; FORESTI, E.; RODRIGUES, J.A.D.; RATUSZNEI, S.M.; ZAIAT, M. (2004). Influence of liquid-phase mass transfer on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 17: 99-105.
- DAMIANOVIC, M.H.R.Z. (1997). *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DEL NERY, V. (1993). *Digestão anaeróbia em duas fases com culturas mistas acidogênicas e metanogênicas imobilizadas separadamente em gel agar*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DILLALO, R.; ALBERTSON O.E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal Water Pollution Control Federation*, 33(4): 356-365.

- DOLFING, J.; ZEYER, J.; BINDER-EICHER, P.; SCWARZENBACH, R.P. (1990). Isolation and characterization of bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Archives of Microbiology*, 154: 336-341.
- DOMINGUES, M. R. (2001). *Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e de leito fixo, sob condições termofílicas*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DOMINGUES, M. R.; ARAÚJO, J. C.; VARESCHE, M.B.; VAZOLLER, R.F. Evaluation of thermophilic anaerobic microbial consortia using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Water Science and Technology*, 45: 22 – 33.
- EDWARDS, E.A.; GIRBC-GALIC, D. (1994). Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 313-327.
- ENGELN, B.; MEIKEN, K.; VON WINTZINGERODE, F.; HEUER, H.; MALKOMES, H.P.; BACKHAUS, H. (1998). Monitoring impact of pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, (64): 2814-2821.
- FAN, L. S.(1989). *Gas-liquid-solid Fluidization Engineering*. Butterworths Publishers, New York.
- FIELD, J.A.; STAMS, A.J.M.; KATO, M.; SCHRAA, G. (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77: 47-77.
- FLOWERS, L. (2003). Chemicals in the environment: toluene. Office Of Pollution Prevention And Toxics. U.S. EPA (CAS NO. 108-88-3).

- FLOWERS, L., BRODER, M.W., MCCLURE, P., OSIER, M. (2003). Toxicological review of xylenes. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). U.S. EPA (CAS No. 1330-20-7).
- FRIES, M.R.; ZHOU, J.; CHEE-SANFORD, J.; TIEDJE, J.M. (1994). Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2802-2810.
- GOBATO, E.A.A.F. (1995). *Análise de benceno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água e ar utilizando o acoplamento "headspace" dinâmico-cromatografia gasosa (DHS-HRGC)*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- GOLDSTEIN, B.D. (2000). Benzene White Paper. Environmental and Occupational Health Sciences Institute. Piscataway, NJ.
- GRBIC-GALIC, D. (1990). Anaerobic microbial transformation of monooxygenated aromatic and acyclic compounds in soil, subsurface and freshwater sediments. In: BOLLAG, J.M.; STOTSKY, G. (eds). *Soil Biochemistry*, Marcel Dekker, Inc, Nova York, 6: 117-189.
- GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. (2000). Rapid method for correction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5488-5491.
- GUERIN, T.F., HORNER, S., MCGOVERN, T. (2002). An application of permeable reactive barrier technology to petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Water Research*. 36(1): 15-24.

- HARPER, S.R. e POHLAND, F.G. (1987). Enhancement of anaerobic treatment efficiency through process modification. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 59(5): 152-161.
- HESS, A.; ZARDA, B.; HAHN, D.; HÄNER, A.; STAX, D. (1997). In situ analysis of denitrifying toluene and m-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2136-2141.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BARKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, M.H.E. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3233-3241.
- HIRASAWA, J.S.; SILVA, A.J.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; VARESCHE, M.B.A. (2003). Avaliação da Comunidade Microbiana Anacróbia usando a Híbridação in situ Fluorescente em Reator Sulfetogênico operado com Diferentes Materiais Suportes. In: *Anais do XIV Sinaferm – Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis, SC (em CD).
- van der HOEK, J.P., URLINGS L.G.D.M., GROBBEN, C.M. (1989). Biological removal of polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene, toluene, ethylbenzene, xylene and phenolic compounds from heavily contaminated ground water and soil. *Environmental Technology Letters*, 10:185-194.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 703-711.
- HOLLADAY, D.W., HANCHER, C.W., SCOTT, C.D. (1978). Biodegradation of phenolic waste liquors in stirred-tank, packed-bed, and fluidized-bed bioreactors. *Journal Water Pollution Control Federation*, 50(11): 2573-2589.

- HU, Z.C., KORUS, R.A., LEVINSON, W.E. (1994). Adsorption and biodegradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized flavobacterium. *Environmental Science & Technology*, 28(3): 491-496.
- HUTCHINS, S. R.; DOWS, W. C.; WILSON, J. T.; SMITH, G. B.; KOVACS, D. A.; FINE, D. D.; DOUGLASS, R. H.; HENDRIX, D. J. (1991). Effect of nitrate addition on bioremediation of fuel-contaminated aquifer: Field demonstrations. *Ground Water*, 29:571-580.
- JACOBSEN, C.S.; RASMUNEN, D.F.(1992). Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacterial from soil with cation exchange resin. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2458-2462.
- JENSEN, S.; OVREAS, L.; DAAE, F.L; TORSVIK, V.(1998). Diversity in methane enrichments from agricultural soil revealed by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. *FEMS Microbiology-Ecology*, 26: 17-26.
- KLEEREBEZEM, R., MORTIER, J., POL, L.W.H. (1997). Anaerobic pre-treatment of petrochemical effluents: Terephthalic acid wastewater. *Water Science And Technology*, 36(2-3): 237-248.
- KRAWIEC, S.; RILEY, M. (1990). Organization of the bacterial chromosome. *Microbial Reviews*, 54: 502-539.
- KREMER, F. (1998). *Trends in the Use of Monitored Natural Attenuation*. In: Seminars on Monitored Natural Attenuation for Ground water. USEPA's Office of Research and Development, EPA/625/K-98/001. Washington, DC.

- KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 22: 39-48.
- LANGWALDT, J.H., PUHAKKA, J.A. (2000). On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environmental Pollution*, 107 (2): 187-197
- van LANGENHOVE, H.; ROELSTRAETE, K.; SCHAMP, N.; HOUTMEYERS, J. (1985). GC-MS identification of odorous volatiles in wastewater. *Water Research*, 19: 597-603.
- LEFF, L.G.; DANA, J.R.; McARTHUR, J.V.; SCHMKETS, L.J. (1995). Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1141-1143.
- LEAHY, M.C., AHRENS, B.W., BLAZICEK, T.L., MAYBACH, G.B., in "In Situ an On-Site Bioremediation, Fourth Symposium," Vol.3, 463-468. Battelle Press, Columbus, OH, 1997.
- MA, G.H., LOVE, N.G. (2001). BTX biodegradation in activated sludge under multiple redox conditions. *Journal Of Environmental Engineering-Asce*, 127(6): 509-516.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (2000). Brock biology of microorganisms. 9^a ed.: Prentice Hall, Nova York, 2000.
- MANFIO, G.P.; DESTEFANO, S.L.; FANTINATTI, F.; OLIVEIRA, V. (1999). *Métodos moleculares para a caracterização de diversidade microbiana*. Curso de treinamento. Fundação André Tosello (Campinas).

- MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probe for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic Applied Microbiology*, 15: 593 – 600.
- MASON, C.A., WARD, G., ABU-SALAH, K. (2000). Biodegradation of BTEX by bacteria on powdered activated carbon. *Bioprocess Engineering*, 23 (4): 331-336.
- METCALF & EDDY, INC (1991). *Wastewater Engineering – Treatment, Disposal and Reuse*. 3^a ed., New York, McGraw Hill.
- MONOD J. (1950). La technique de culture continue: theorie et applications. *Annales del Institut Pasteur*, 79 (4), 390-410.
- MORGAN, P.; LEWIS, S.T.; WATKINSON, R.J. (1993). Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in gas-condensate-contaminated groundwater. *Environmental Pollution*, 82: 181-190.
- MORAES, E.M.; ADORNO, M.A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2000). Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anacróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: VI Oficina e Seminário Latinoamericano de Digestão Anaeróbia, Recife, PE. Anais, 2: 235-238.
- MUYSER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR - amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Methods Ecology Manual*. 1 – 23.
- MUYZER, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L.S. (1994). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 155: 501-527.

- MUYSER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. (1993). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR - amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(03): 695 - 700.
- NARDI, I.R., Zaiat, M., Foresti, E. (1999). Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors. *Bioprocess Engineering*, 21: 469-476.
- NARDI, I. R. (2002). Degradação do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). São Carlos 2002. 165p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- NARDI, I.R., VARESCHE, M.B.A., ZAIAT, M. FORESTI, E. (2002). Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. *Water Science and Technology*, 45(10): 175-180.
- NATION, J. L. (1983). A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Staining Technol.* 58: 347-351.
- NIELSEN, T.A.; LIU, W-T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D.A. (1999). Identification of a Novel Group of Bacteria in Sludge from a Deteriorated Biological Phosphorus Removal Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1251-1258.
- NOYOLA, A., MACARIE, H., VARELA, F. (2000). Upgrade of a petrochemical wastewater treatment plant by an upflow anaerobic pond. *Water Science And Technology*. 42(5-6): 269-276.

NÜBEL, V.; ENGELER, B.; FELSKE, A.; SNAIR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.C.; LUWIG, W.; BACKHAUS, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178: 5636-5643.

OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T.J. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7: 57-66.

OLIVEIRA, E.; CLEARY, R. W.; CUNHA, R. C.; PACHECO, A.(1991). Gasoline Hydrocarbons: Groundwater Pollution Potencial in Metropolitan São Paulo. *Water Science and Technology*, 11: 189-200.

OLIVEIRA, E. de, CLEARY, R. W., CUNHA, R. C., PACHECO, A.(1991). Gasoline Hydrocarbons: Groundwater Pollution Potencial in Metropolitan São Paulo. *Wat. Sci. Technol.*, 11: 189-200.

OLIVEIRA, S.V.W.B. (2001). Avaliação da degradação e toxicidade de formaldeído em reator anaeróbio de leito fixo (RAHLF). *Dissertação de Mestrado* – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

PINHO, S.C.; RATUSZNEI, S.M.; RODRIGUES, J.A.R.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. (2004). Influence of the agitation rate on the treatment of partially soluble wastewater in anaerobic sequencing batch biofilm reactor. *Water Research*, 38: 4117-4124.

du PLESSIS, C. A.; STRAUSS, J. M.; RIEDEL, K. H. J. (2001). Catabolism interations in a toluene-acclimatized biofilter. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55(1): 1222-128.

PORTARIA nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. 15p.

- POWERS, S. E.; HUNT, C. S.; HEERMANN, S. E.; CORSEUIL, H. X.; RICE, D.; ALVAREZ, P. J. J. (2001). The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31: 79-123.
- PRUDEN, A., SEDRAN, M., SUIDAN, M. (2003). Biodegradation of MTBE and BTEX in an aerobic fluidized bed reactor. *Water Science And Technology*, 47 (9): 123-128.
- RASKIN, L.; STROMLEY, J. M.; RITTMAN, B. E.; STAHL, D. A. (1994). Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 1232 – 1240.
- RIBEIRO, R (2001). Influência da composição do substrato na formação do biofilme anaeróbio em matrizes de espuma de poliuretano. Dissertação de mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.
- RIPLEY, L.F.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 58(5): 406-411.
- RITTMANN, B.E. (1982). Comparative performance of biofilm reactor types. *Biotechnology Bioengineering*, 24, 1341-1370.
- RYU, D. D. Y.; KIM H. S.; TAGUCHI, H. (1984). Intrinsic Fermentation kinetic parameters of immobilized yeast cells. *Journal of Fermentation Technology*, 62: 255-261.
- SANTOS, S. G.; ZAIAT, M.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E. (2002). Comparative research on the use of methanol, ethanol and methane as electron donors for denitrification. Proceedings. *VII Taller y Simposio Latino americano sobre digestión anaerobia*. Mérida, Yucatán, México.

- SARTI, A.; VIEIRA, L. G. T.; ZAIAT, M.; FORESTI E. (2001). Influence of liquid phase mass transfer on performance of a packed-bed bioreactor for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 78: 231-238.
- SALANITRO, J.P.; WISNIESWESKI, H.L.; BYERS, D.L.; NEAVILLE, C.C.; SCHRODER, R.A. (1997). Use of aerobic and anaerobic microcosms to assess BTEX biodegradation in aquifers. *Ground Water Monitoring and remediation*, 17(3): 210-221.
- SAMBROOK, F.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2^a ed., New York: Cold Spring Harbor Press.
- SANDAA, R.A.; TORSVIK, V.; ENGER, O.; DANE, F.L.; CASTBERG, T.; HAHN, D. (1999). Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology-Ecology*, 30: 237-251.
- SEABRA, P.N. (2001). Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria do petróleo. In: *II Workshop sobre Biodegradação*, Campinas, SP, Brasil, pp. 41-60.
- SELENSKA-POBELL, S. (1995). Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. In: Akkermans, A.D.L. (ed). *Molecular Microbial Ecology Manual*, 1.5.1., pp. 1-17.
- SHIM, H.; YANG, S.T. (1999). Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 67: 99-112.
- SHIRMER, M.; MOLSON, J.W.; FRIND, E.O.; BRAKER, J. F. (2000). Biodegradation modeling of a dissolved plume applying laboratory and field parameters. *Journal of Contaminant Hydrology*, 46(3-4): 339-374.

- SHOCHER, R.J.; SEYFRIED, B.; VAZQUEZ, F.; ZEYER, J. (1991). Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, 157: 7-12.
- SMALLA, K., CRESSWELL, N., MENDONÇA-HAGLER, L.C., WOLTERS, A., Van ELSAS, J.D. (1993). Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *Journal Applied Bacteriology*, 74: 78-85.
- SPECCE, RE, Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville: Archae Press, 1996.
- SPILBORHGS, M. (1997). *Biorremediação de aquífero contaminado por hidrocarbonetos*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo.
- STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998). *APHA*. Washington D. C., American Publications Health Association. 20ª edição.
- TSAI, Y.L.; OLSON, B.H. (1992). Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polimerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 754-757.
- TSHECH, A.; FUCHS, G. (1987). Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying *Pseudomonas*. *Archives of Microbiology*, 148: 213-217.
- U.S. EPA (1994) How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (*EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007*). Cap. 8, p. 2.

- U.S. EPA (1995) How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007). Cap. 10, p. 3.
- U.S. EPA (1999) Monitored Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons. U.S. EPA REMEDIAL TECHNOLOGY FACT SHEET (EPA/600/F-98/021). May, p. 2
- VAIL, RL. (1991). Refiner Biodegrades Separator-Type Sludge To Bdat Standards. *Oil & Gas Journal*, 89(45): 53-57.
- VILLATORO-MONZON, W.R., MESTA-HOWARD, A.M., RAZO-FLORES, E. (2003). Anaerobic biodegradation of BTEX using Mn(IV) and Fe(III) as alternative electron acceptors. *Water Science And Technology*, 48(6): 125-131.
- WILSON, S. B.; BROWN, R. A. (1989). In situ bioreclamation a cost-effective technology to remediate subsurface organic contamination. *Groundwater Monitoring Remediation.*, 173-179.
- WRIGHT, W.F., SCHROEDER, E.D., CHANG, D.P.Y. (1997). Performance of a pilot-scale compost biofilter treating gasoline vapor. *Journal Of Environmental Engineering-Asce*, 123(6): 547-555.
- YEOM, S.H., YOO, Y.J. (1999). Removal of benzene in a hybrid bioreactor. *Process Biochemistry*, 34(3): 281-288.
- YOCUM, P.S., IRVINE, R.L., BUMPUS, J.A.. (1995). Bioremediation of water contaminated with jet fuel-4 in a modified sequencing batch reactor. *Water Environment Research*, 67(2): 174-180.

- ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. (1994). Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Química*, 11(02), 33 - 42.
- ZAIAT, M. (1996). Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias. *Tese de Doutorado*. EESC, USP, São Carlos.
- ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; FORESTI, E. (1997a). Spatial and temporal variations in monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Water Research*, 31: 1760-1766.
- ZAIAT, M.; FORESTI, E. (1997b). Method for estimating the kinetics of substrate degradation in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge reactors. *Biotechnology Techniques*, 11: 315-318.
- ZAIAT, M.; RODRIGUES, J.A.D.; RATUZNIEI, S.M.; CAMARGO, E.F.M.; BORZANI, W. (2001). Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater treatment: a developing technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 29-35.
- ZILVERENTANT AG. (1997). Pilot-testing, design and full-scale experience of a sequencing batch reactor system for the treatment of the potentially toxic waste water from a road and rail car cleaning site. *Water Science And Technology*, 35(1): 259-267.