Sidnei Pereira da Silva

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIA
REDUTORA DE SULFATO: ÊNFASE NA UTILIZAÇÃO DE
BENZOATO**

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço...18.../10.../04...

Ass.: *Sidnei Pereira da Silva*

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

Orientadora: Prof. Dra. Maria Bernadete A. Varesche

**São Carlos
2004**

DEDALUS - Acervo - EESC

31100047360

Class.	TESE EESC
Curr.	5537
Tempo	T 254/04
Syano	1400131

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

S586i Silva, Sidnei Pereira
Isolamento e caracterização de bactéria redutora de sulfato : ênfase na utilização de benzoato / Sidnei Pereira da Silva. -- São Carlos, 2004.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2004.

Área : Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche.

1. Benzoato. 2. Bactérias redutoras de sulfato (BRS). 3. *Desulfococcus multivorans*. 4. Sequenciamento de DNA. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **SIDNEI PEREIRA DA SILVA**

Dissertação defendida e julgada em 16-09-2004 perante a Comissão Julgadora:

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

Dra. **ISABEL KIMIKO SAKAMOTO**
(Pesquisadora da FAPESP)

Profa. Dra. **NELMA REGINA SEGNINI BOSSOLAN**
(Instituto de Física de São Carlos/USP)

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

**Dedico este trabalho à minha
esposa Thaís e a minha filha
Laura.**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus e à minha avó Francisca que estão olhando e orando por nós lá do céu.

Agradeço a meus pais José e Tereza, pois, sem eles eu não teria chegado aonde cheguei.

À Berna, pela paciência, perseverança, apoio e orientação.

À Janja e à Profa. Beth pelo apoio técnico e, ainda mais, pela amizade.

Ao seu Antonio e à dona Terezinha pela amizade e apoio.

À Sandra pela amizade especial.

Ao Dr. Fábio Chinalia pelo seqüenciamento.

Ao Prof. Foresti, Prof. Zaiat e à Profa. Ana Paula pelas dicas e orientações.

Aos meus amigos da turma da Bio/97, em especial para: Patrícia (Nana), Taís, Maria Angélica (Géli), Débora (Béba), Júlia, Luciana, Wilson Jr. (Will), Heitor (Veio), Davi, André, Pluck e Thomaz.

Aos amigos da Biologia: Andressa, Cris, Paula, Camila, Graziela, Carol, Gunther, Guilherme, Bispo, Fernando (Filé), Miguel, Elliot, Marquinhos, Mário, Sono, Paulão, Renato Russo, Danilo, Douglas, Quique e Alexandre.

Aos professores do Curso de Biologia da UFSCar, pelos ensinamentos.

Aos amigos do Futebol.

Ao Ramalhão (E. C. Santo André) pelas alegrias.

Aos amigos do Laboratório: Iolanda (Tininha), Isabel, Dalva, Tati, Eloisa, Dirlane, Luciana, Flavinha, Júlia, Renata, Karina, Monique, Bruna, Luana, Estela, Andréa, Márcia, Paula Miqueleto, Katt, Daniela, Larissa, Lara, Mércia, Kátia, Tiago, Eduardo (Chuchu), Ari, Tiago Momenti, Marcelinho, Alexandre, André Coelho, André Braga, Douglas, Luiz Hamilton, Luiz Ricardo, Fernandão e Betão.

Aos amigos da turma de mestrado: Leonardo, Quaresma, Edson, Murilo, Paulão e Hugo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

SILVA, S. P. (2004). *Isolamento e caracterização de bactérias redutora de sulfato: ênfase na utilização de benzoato* – Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos, São Paulo, 97p.

Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar a degradação anaeróbia de benzoato por bactérias redutoras de sulfato (BRS). A primeira fase experimental avaliou essa degradação utilizando como inóculo biomassa de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) utilizado no tratamento de água residuária de indústria de peróxidos orgânicos. Os ensaios foram realizados em reatores em batelada mantidos em temperatura de $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ e agitação de 150rpm. Os reatores foram alimentados com meio para BRS e diferentes concentrações de benzoato e sulfato, estabelecendo as seguintes relações: 0,9 (890mg/L e 970mg/L), 0,8 (660mg/L e 870mg/L) e 0,6 (242mg/L e 400mg/L). Após 13 dias verificou-se valores de remoção do benzoato e utilização do sulfato iguais a: (0,9) 71,2% e 98%, (0,7) 97% e 99,9% e (0,6) 91,3% e 15%, respectivamente. Os exames microscópicos revelaram o predomínio de BRS. Na segunda fase experimental foi realizada a purificação celular, utilizando-se técnica de diluição seriada em meio líquido, obtendo-se cultura com predomínio de cocos, gram-negativos, diâmetro médio de $1,8\mu\text{m}$, não formadores de esporos e desulfoviridina positiva. Sendo identificadas como *Desulfococcus multivorans* através de seqüenciamento do DNAr 16S. As células foram submetidas a testes fisiológicos visando caracterizar o crescimento com diferentes aceptores de elétrons e substratos orgânicos. Nas condições em que predominaram cocos o consumo das fontes de carbono foram melhores quando as fontes aceptoras de elétron eram possuidoras de enxofre. Na terceira fase experimental foram realizados ensaios com a cultura purificada em reatores anaeróbios em batelada submetidos as seguintes concentrações de benzoato e sulfato estabelecendo relações de: (0,3) 600mg/L e 2000mg/L; (0,6) 606mg/L e 1000mg/L; (1,2) 600mg/L e 500mg/L; (1,8) 910mg/L e 500mg/L, respectivamente. Após, 13 dias de operação, verificou-se valores de remoção do benzoato e utilização do sulfato, iguais a: 99% e 61,2% (0,3), 99% e 100% (0,6), 99% e 100% (1,2) e 50% e 100% (1,8), respectivamente. A velocidade de crescimento (μ) e o tempo de geração (Tg) foram respectivamente: $0,010\text{h}^{-1}$ e 66,4 horas, para relação 0,6 e $0,011\text{h}^{-1}$ e 66,1 horas, para a relação 0,3.

Palavras-chave: Benzoato; Bactérias redutoras de sulfato (BRS); *Desulfococcus multivorans*; Seqüenciamento de DNA.

72000 — 1000ml

x — x_m

x =

ABSTRACT

SILVA, S. P. (2004). *Isolation and Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria: Emphasis in the Benzoate Use* – Master's degree Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos, São Paulo, 97p.

This work was carried out aiming to assess benzoate anaerobic degradation by sulfate-reducing bacteria (SRB). The first experimental phase consisted of assessing this degradation using biomass provided from a horizontal anaerobic immobilized bed reactor (HAIB) applied in the treatment of wastewater from an organic peroxide industry. The essays were carried out in batch reactors kept under $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ of temperature and 150rpm of agitation. The reactors were fed with a specific culture medium for SRB and also with different concentrations of benzoate and sulfate, establishing the following relations: 0.9 (890mg/L and 970mg/L), 0.8 (680mg/L and 870mg/L) and 0.6 (242mg/L and 400mg/L), respectively. After 13 days of operation, benzoate removal and sulfate utilization efficiency values equal to: (0.9) 71.2% and 98%, (0.8) 97% and 99.9% and (0.6) 91.3% and 15%, respectively, were verified. The microscopic exams revealed the domain of SRB. In the second experimental phase cellular purification was carried out using the serial dilution technique in liquid medium, obtaining a culture with the domain of gram-negatives *cocci*, average diameter of $1,8\mu\text{m}$, nonspore-forming and desulfovibrin positive. These cells were identified as *Desulfococcus multivorans* through the use of ribosomal 16S DNA sequencing technique. This biomass was submitted to physiological tests aiming to characterize the growth with different electron acceptors and organic substrates. It was possible to verify that in the conditions where *cocci* took place, the consumption of carbon sources were better when the electron accepting sources possessed sulfur. In the third experimental phase essays with culture purified, the reactors were submitted to the following concentrations of benzoate and sulfate: relation (0.3), with 600.0mg/L and 2000.0mg/L; relation (0.6) with 606mg/L and 1000mg/L; relation (1.2), with 600mg/L and 500mg/L; relation (1.8), with 910mg/L and 500mg/L, respectively. After 13 days of operation, benzoate removal and sulfate utilization values were equal to: 99% and 61.2% (0.3), 99% and 100% (0.6), 99% and 100% (1.2) and 50% and 100% (1.8), respectively. The specific growth rate (μ) and the generation time (T_g) of culture, were equal to: 0.010h^{-1} and 66.4 hours for relation 0.6 and 0.011h^{-1} and 66.1 hours for relation 0.3, respectively.

Keywords: Benzoate; Sulfur Reducing Bacteria (SRB); *Desulfococcus multivorans*; DNA Sequencing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	4
3.1.1. METABOLISMO DOS COMPOSTOS DE ENXOFRE	5
3.1.2. DIVERSIDADE NUTRICIONAL DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	7
3.2. DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO BENZOATO.....	11
3.3. VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E TEMPO DE GERAÇÃO.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. ATIVIDADES EXPERIMENTAIS	30
4.2. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO	34
4.3. MEIOS DE CULTIVO	34
4.3.1. MEIO BASAL ZINDER	34
4.3.2. MEIO DE CULTURA PARA BRS	35
4.3.2.1. SOLUÇÃO DE METAIS TRAÇO	36
4.3.2.2. SOLUÇÃO DE VITAMINA BRS.....	36
4.3.2.3. SOLUÇÕES ESTOQUE ESTERILIZADAS POR FILTRAÇÃO EM MEMBRANA.....	37
4.3.2.4. SOLUÇÕES ESTOQUE DE FONTES ACEPTORAS DE ELÉTRONS.....	37
4.3.2.5. SOLUÇÃO ESTOQUE DE BENZOATO DE SÓDIO	38
4.3.2.6. SOLUÇÕES ESTOQUE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	38
4.3.2.7. SOLUÇÃO ESTOQUE DE LACTATO DE SÓDIO, FUMARATO DE SÓDIO E MALATO DE SÓDIO	38
4.3.2.8. SOLUÇÃO ESTOQUE EXTRATO DE LEVEDURA	38
4.4. DETERMINAÇÃO DE SULFATO.....	39
4.5. DETERMINAÇÃO DE SULFETO TOTAL DISSOLVIDO	39
4.6. MÉTODOS CROMATOGRAFICOS	40
4.6.1. DETERMINAÇÃO DO METANO	40

4.6.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO E DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS	41
4.7. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	41
4.8. INÓCULO	42
4.9 . REATORES ANAERÓBIOS.....	43
4.10. ENRIQUECIMENTO DO LODO EM DIFERENTES MEIOS E COMPOSTOS.....	43
4.11. ENSAIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BENZOATO DE SÓDIO E SULFATO DE SÓDIO	45
4.12. PURIFICAÇÃO	46
4.13. ENSAIO COM CULTURA PURIFICADA PARA DIFERENTES RELAÇÕES DE SULFATO/BENZOATO.....	48
4.14. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DA CULTURA PURIFICADA.....	49
4.15. VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E DO TEMPO DE GERAÇÃO.....	50
4.16. CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DA CULTURA PURIFICADA....	50
4.17. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE.....	51
4.18. SEQÜENCIAMENTO DA CULTURA PURIFICADA	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1. ENRIQUECIMENTO SOB VARIAÇÕES DE CULTIVO.....	54
5.2. ENSAIOS UTILIZANDO CULTURA ENRIQUECIDA	61
5.3. PURIFICAÇÃO	69
5.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DA CULTURA PURIFICADA.....	70
5.5. CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DA CULTURA PURIFICADA.....	72
5.6. ENSAIOS COM DIFERENTES RELAÇÕES SULFATO/BENZOATO PARA CULTURA PURIFICADA.....	79
5.7. VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E TEMPO DE GERAÇÃO.....	85
6. CONCLUSÕES.....	88
7. RECOMENDAÇÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética baseada no RNAr 16S de algumas espécies de BRS.....	5
Figura 2. Caminhos propostos da redução da adenosina fosfosulfato (APS) e do bissulfito (HSO_3^-) em escala de oxi-redução.....	6
Figura 3. Fórmula estrutural da molécula de benzoato	11
Figura 4. Mecanismos de degradação de benzoato para diferentes relações DQO/sulfato.....	17
Figura 5. Condições redox impostas durante as várias etapas experimentais.....	21
Figura 6. Rota metabólica proposta para <i>S. aciditrophicus</i> no consumo de benzoato.	24
Figura 7. Rota metabólica proposta na biodegradação de benzoato por <i>Pseudomonas putida</i> . Incluindo indução de meta clivagem via DHB (Dihidroxibenzoato).	26
Figura 8. Organograma das atividades experimentais utilizando cultura enriquecida.	32
Figura 9. Organograma das atividades experimentais realizadas com cultura purificada.	33
Figura 10. Reator em batelada: (a) <i>headspace</i> (b) meio de cultura com células planctônicas.....	39
Figura 11. Fluxograma das condições experimentais utilizadas para enriquecimento do lodo anaeróbio mesofílico.....	44
Figura 12. Esquema de preparação e realização de diluições seriadas. Os frascos circundados em azul são os frascos utilizados como inóculo na etapa seguinte.....	47
Figura 13. Esquema de suspensão das células para obtenção de volume celular	48
Figura 14. Produção de metano em função do tempo, em diferentes condições nutricionais:.....	54
Figura 15. Células observadas em microscopia de contraste de fase da biomassa proveniente do RAHLF de indústria de peróxidos orgânicos: (a) cocos e bacilos retos; (b) sarcinas; (c) sarcinas e (d) cocos e cisto de sarcina.....	56
Figura 16. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência nas amostras dos reatores alimentados com meio BRS e benzoato de sódio: (a) sarcinas não fluorescentes; (b) cocos não fluorescentes; (c) cistos de <i>Methanosarcina</i> e (d) cistos de <i>Methanosarcina</i> com fluorescência.....	58
Figura 17. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência nas amostras dos reatores alimentados com meio BRS e compostos orgânicos não aromáticos: (a) e (b) cistos de sarcinas; (c) e (d) sarcinas não fluorescentes e sarcinas fluorescentes semelhantes a <i>Methanosarcina</i>	59

Figura 18. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência nas amostras dos reatores alimentados com meio ZINDER e composto orgânico não aromáticos: (a) e (b) cistos de <i>Methanosarcina</i> ; (c) cocos e (d) cocos fluorescentes.	60
Figura 19. Variações temporais de benzoato, sulfato e sulfeto em reator anaeróbio em batelada alimentado com relação benzoato/sulfato de 0,9.....	62
Figura 20. Variações temporais de benzoato, sulfato e sulfeto em reator anaeróbio em batelada alimentado com relação benzoato/sulfato de 0,8.....	62
Figura 21. Variações temporais de benzoato, sulfato e sulfeto em reator anaeróbio em batelada alimentado com relação benzoato/sulfato de 0,6.....	63
Figura 22. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência em amostras dos reatores alimentados com benzoato e sulfato, na relação de 0,9: (a) e (b) sarcinas não fluorescentes e <i>Methanosarcina</i> sp.; (c) sarcinas não fluorescentes e (d) <i>Methanosarcina</i> sp.	66
Figura 23. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência em amostras dos reatores alimentados com benzoato e sulfato, na relação de 0,8: (a) cocos não fluorescente; (b) cocos fluorescentes; (c) e (d) sarcinas não fluorescentes e cisto de <i>Methanosarcina</i> sp.	67
Figura 24. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência em amostras dos reatores alimentados com benzoato e sulfato, na relação de 0,6: (a) e (b) cocos, bacilos com extremidade arredondada, bacilos curvos e filamentos; cocos fluorescentes; (c) e (d) cisto de <i>Methanosarcina</i> sp. e sarcina não fluorescente	68
Figura 25. Esquema de diluições decimais seriadas utilizadas.....	69
Figura 26. Microscopias da cultura purificada em contraste de fase: (a) cocos e bacilos (b) cocos fluorescentes, (c) cocos gram-negativos; em microscopia eletrônica de varredura: (d) cocos e bacilos com extremidades arredondadas.....	71
Figura 27. Morfologias observadas em microscopia de contraste de fase, de amostras obtidas do ensaio de caracterização nutricional.....	75
Figura 28. Valores de biomassa, expressos em absorbância, obtidos do ensaio de caracterização nutricional.	76
Figura 29. Variações temporais das concentrações de benzoato em reator em batelada com cultura purificada para diferentes relações estudadas.....	80
Figura 30. Variações temporais das concentrações de sulfato em reator em batelada com cultura purificada para diferentes relações estudadas.....	81

Figura 31. Variações temporais das concentrações de sulfeto total dissolvido em reator em batelada com cultura purificada para diferentes relações estudadas.	81
Figura 32. Variações temporais das concentrações de benzoato e acetato para relação 0,3.	82
Figura 33. Variações temporais das concentrações de benzoato e acetato para relação 0,6.	82
Figura 34. Variações temporais das concentrações de benzoato e acetato para relação 1,2.	83
Figura 35. Variações temporais das concentrações de benzoato e acetato para relação 1,8.	83
Figura 36. Crescimento celular expresso em absorbância em relação ao tempo.	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo de algumas características importantes de bactérias redutoras de sulfato.	10
Tabela 2. Reações na degradação anaeróbia de benzoato.	18
Tabela 3. Dados obtidos por RMN, na degradação de benzoato por cocultura de <i>Syntrophus aciditrophicus</i> e <i>Methanospirillum hungatei</i> utilizando [¹³ C ₆].	22
Tabela 4. Parâmetros cinéticos de μ e T _g para algumas espécies de BRS	29
Tabela 5. Composição do meio de cultivo ZINDER.	35
Tabela 6. Meio de cultura para <i>Desulfosarcina</i> modificado.	35
Tabela 7. Solução de metais traço SL-10.	36
Tabela 8. Solução de vitaminas para BRS.	37
Tabela 9. Condições nutricionais para enriquecimento do lodo anaeróbio.	45
Tabela 10. Ensaio com diferentes concentrações de benzoato e sulfato.	46
Tabela 11. Composição nutricional utilizado na condição de purificação.	47
Tabela 12. Composição dos meios em ensaios com diferentes relações benzoato e sulfato.	49
Tabela 13. Sondas de oligonucleotídeos para hibridação <i>in situ</i> fluorescente.	52
Tabela 14. Frequência das morfologias das células presentes nos reatores em batelada com diferentes condições nutricionais.	57
Tabela 15. Concentrações iniciais de sulfato e de benzoato e suas porcentagens de remoção nos ensaios em batelada com cultura enriquecida.	63
Tabela 16. Frequência das morfologias das células presentes nos reatores em batelada com diferentes concentrações de sulfato e benzoato.	65
Tabela 17. Valores de absorvância e culturas predominantes obtidos em crescimento com sulfato.	75
Tabela 18. Valores de absorvância e culturas predominantes obtidos em crescimento com sulfato.	75
Tabela 19. Valores de absorvância e culturas predominantes obtidos em crescimento com tiosulfato.	76
Tabela 21. Valores de absorvância e culturas predominantes obtidos em crescimento apenas com compostos orgânicos.	77
Tabela 22. Concentrações iniciais de sulfato e de benzoato e suas porcentagens de remoção nos ensaios em batelada com cultura purificada.	84

Tabela 23. Velocidades específicas de crescimento e tempos de geração da cultura purificada.....	86
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

μ -	Velocidade específica de crescimento
Acetil-CoA-	Acetil coenzima A
AM-	Arquea metanogênica
APS-	Adenosina fosfosulfato
ATP-	Adenosina trifosfato
BAS-	Bactéria acetogênica sintrófica
BRS -	Bactéria redutora de sulfato
CO-	Monóxido de carbono
DNA-	Acido desoxirribonucléico
DNAr -	DNA ribossômico
DMPD-	Dimetil- <i>p</i> -fenilenodiamina
DQO-	Demanda química de oxigênio
E^0 -	Potencial redox
FISH-	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente
GTA-	Glutaraldeído
HSO^3 -	Bissulfito
H_2S -	Sulfeto de hidrogênio
PCR-	Reação de polimerização em cadeia
MEV-	Microscopia eletrônica de varredura
NADP(H)-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
R^2 -	Coefficiente de correlação
RAHLF-	Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
SO_4^{2-} -	Sulfato
$\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ -	Tritionato
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	Tiossulfato
Tg-	Tempo de geração
Uv-	Luz ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional em todo o mundo levou à necessidade de rápido crescimento industrial, o que resultou no aumento da poluição dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos por ampla variedade de efluentes industriais e sanitários. Estas interferências são de difícil controle, devido à quantidade e diversidade das fontes de emissão.

Algumas das soluções para os problemas ambientais podem ser encontradas através do uso de biorreatores, utilizando microrganismos especializados na degradação e/ou transformação de substâncias tóxicas. Os processos biológicos de tratamento de águas residuárias são utilizados na tentativa de se aproveitar ao máximo a capacidade microbiana de catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraindo desses compostos alimentos e energia como solução dos problemas gerados pelos rejeitos lançados no meio ambiente (Vazoller, 1995).

Uma ampla variedade de compostos aromáticos são produzidos pelas indústrias químicas, para utilização em pesticidas, inseticidas, herbicidas, detergentes, solventes, etc. e poluem o ar, a água e o solo. O acúmulo desses compostos tóxicos pode causar danos sérios aos ecossistemas. A prevenção, através de transformação abiótica ou bioconversão a produtos não tóxicos ou, ainda, a biodegradação por microrganismos é possível (Çinar & Gradys Jr., 2000).

Estudos recentes mostraram que compostos aromáticos, presentes em águas residuárias industriais, tais como fenol, cresol, tolueno e benzoato foram degradados eficientemente através de processos anaeróbios (Li *et al.*, 1996; Fang & Zhou, 1997). Entretanto, muitas águas residuárias não contêm apenas compostos aromáticos, mas também sulfato em altas concentrações. Especificamente, nesse caso, tem-se a competição entre as bactérias redutoras de íon sulfato (BRS), as acetogênicas e as arqueas metanogênicas pelos intermediários da digestão anaeróbia.

Sulfato é comumente encontrado em águas residuárias de indústrias farmacêuticas, de celulose e papel, de mineração, de fermentação de melaço, de óleos comestíveis, de curtumes e de petroquímica (Fang & Zhou, 1997; Lettinga *et al.*, 1998).

A presença de sulfato pode causar muitos problemas nos processos anaeróbios de tratamento, por várias razões: (a) o sulfato reduzido a gás sulfídrico, é inibidor da metanogênese; (b) o gás sulfídrico tem odor desagradável e causa alta demanda de oxigênio no efluente; e (c) o gás sulfídrico gerado causa corrosão em tubulações de esgoto (Speece, 1996).

A competição entre as bactérias redutoras do íon sulfato e as arqueas metanogênicas depende de uma série de variáveis, como da relação DQO (demanda química de oxigênio)/sulfato, da concentração de substrato, da carga orgânica e da configuração do reator. Entretanto, não há consenso sobre quais os efeitos diretos dessas variáveis em determinados grupos tróficos (Fang & Zhou, 1997).

O benzoato é poluente comum em águas residuárias oriundas de indústrias químicas. Também é intermediário fundamental na degradação anaeróbia de muitos compostos aromáticos complexos. Benzoato foi detectado como intermediário na degradação de fenol e clorofenol por consórcio microbiano anaeróbio (Knoll & Winter, 1989), na degradação de 3-hidroxibenzoato por co-cultura sintrófica (Tschech & Schink, 1986) e na degradação de tolueno por bactérias redutoras de sulfato (Beller *et al.*, 1996).

Com as considerações apresentadas anteriormente, este trabalho foi realizado com objetivo de estudar degradação de benzoato em condições sulfetogênicas, utilizando culturas bacterianas enriquecidas e cultura purificada na tentativa de otimizar os processos de remoção de compostos recalcitrantes de águas residuárias.

Para a pesquisa em questão, foi utilizado como inóculo biomassa de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) utilizado no tratamento de água residuária de indústria de peróxidos orgânicos. A principal característica da água residuária tratada pelo RAHLF, era a presença de compostos aromáticos como: Benzil butil ftalato, cloreto de benzoila, etilbenzeno, entre outros e sulfato em altas concentrações, que variavam entre 20g/L a 50g/L (Silva(a), 1999).

2.OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a capacidade das culturas bacterianas enriquecidas e linhagem de cultura purificada na degradação de benzoato e na utilização de sulfato em reatores em batelada.

Objetivos específicos

- Avaliar os produtos do metabolismo microbiano durante a digestão anaeróbia dos reatores em batelada com relação aos compostos benzoato e sulfato;
- Caracterizar morfológicamente as bactérias e arqueas metanogênicas presentes nas culturas enriquecidas;
- Purificar cultura sulfetogênica degradadora de benzoato;
- Avaliar a eficiência de crescimento da cultura purificada nas condições determinadas através da velocidade de crescimento e do tempo de geração;
- Caracterizar nutricionalmente a linhagem purificada;
- Identificação da linhagem bacteriana isolada através da técnica de sequenciamento de DNAr.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

Os microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* encontram-se presentes nos mais diversos habitats. Apresentam diversidade metabólica, com representantes autotróficos, heterotróficos e fototróficos (Canhos & Vazoller, 1999). As bactérias redutoras do íon sulfato (BRS), encontram-se neste Domínio, de acordo com a filogenética construída com base na comparação de seqüências do RNAr 16S (Madigan *et al.*, 1997; Canhos & Vazoller, 1999).

As BRS são capazes de utilizar o íon sulfato como acceptor final de elétrons, na oxidação da matéria orgânica, reduzindo-o a sulfeto de hidrogênio através do processo desassimilatório da fonte de enxofre (Castro *et al.*, 2000), são organismos anaeróbios estritos, capazes de sobreviverem em ambientes isentos de oxigênio. A maioria das BRS são quimiorganotróficas e utilizam como doadores de elétrons compostos de baixo peso molecular como ácidos orgânicos, ácidos graxos, álcoois e hidrogênio (Widdel & Pfennig, 1984).

Além das características fisiológicas, o seqüenciamento do RNAr 16S é geralmente decisivo como critério para definição das divisões da árvore filogenética dos microrganismos (Woese, 1987). Este método é aplicado também para bactérias redutoras de sulfato mesofílicas não formadoras de esporos. A Figura 1 apresenta a árvore filogenética das Proteobacterias, subdivisão delta.

Comparações entre seqüências de RNAr 16S tem revelado a presença de dois ramos dentro da divisão delta das Proteobacterias, os quais formam duas famílias Desulfovibrionaceae onde estão os gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomicrobium* e Desulfotomicrobiaceae constituída pelos gêneros *Desulfococcus*, *Desulfomonile*, *Desulfobotulus*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfoarculus* e *Desulfobacterium* (Devereux, 1989; Widdel & Hansen, 1992; Oude Elferink *et al.*, 1999).

Figura 1. Árvore filogenética baseada no RNAr 16S de algumas espécies de BRS.

Fonte: Devereux, 1989.

3.1.1. METABOLISMO DOS COMPOSTOS DE ENXOFRE

Em culturas de bactérias redutoras de sulfato, o sulfeto aparece frequentemente como único produto final da redução. Todos os passos da redução de sulfato a sulfeto ocorrem no citoplasma, uma vez que o sulfato é capaz de passar através da membrana citoplasmática. O transporte de sulfato foi estudado em *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfohalobus propionicus* e *Desulfococcus multivorans* com crescimento em concentrações limitantes de sulfato. O sulfato é transportado através do gradiente iônico (Warthmann & Cypionka, 1990; Cypionka, 1995). Em espécies de água doce (*Desulfovibrio propionicus*, *Desulfohalobus propionicus*), o sulfato é transportado simultaneamente aos prótons (H^+), enquanto em espécies moderadamente dependente de sais (*Desulfovibrio salexigens*, *Desulfococcus multivorans*) o transporte é feito pelo íon sódio (Na) (Stahlmann *et al*, 1991; Kreke & Cypionka, 1992).

Antes de ser reduzido, o sulfato é ativado por uma ATP-sulfurilase que catalisa a ligação do íon ao fosfato da molécula de ATP. O produto dessa reação é a adenosina fosfosulfato (APS) (Hansen, 1994; Brock *et al*, 1997). O sulfato é o único aceptor final de elétrons que deve ser ativado e essa ativação é necessária devido ao potencial redox do par sulfato/bissulfeto ser desfavorável ($E_0' = -0,516 V$) (Hansen, 1994). Apesar da reação ser

termodinamicamente desfavorável, a hidrólise do pirofosfato favorece a reação no sentido da formação do APS. (Fauque *et al.*, 1991; Widdel & Hansen, 1992)

O bissulfito formado é então reduzido a sulfeto, mas o doador natural de elétrons para sulfito-redutase é desconhecido. Sugere-se que a redução do bissulfito ocorra indiretamente através do tritionato (Figura 2a), envolvendo a formação em estágios intermediários de tritionato (bissulfito-redutase), tiosulfato (tritionato-redutase) e sulfeto (tiosulfato-redutase) (Widdel & Hansen, 1992). A proposta de redução direta pela bissulfito-redutase utiliza seis elétrons sem a formação de intermediários livres. (Figura 2b)

Figura 2. Caminhos propostos da redução da adenosina fosfosulfato (APS) e do bissulfito (HSO₃⁻) em escala de oxi-redução: (a) redução seqüencial do bissulfito via tritionato (S₃O₆²⁻) e tiosulfato (S₂O₃²⁻) e (b) redução direta de bissulfito a sulfeto.

Fonte: Hansen (1994)

Há quatro tipos mais conhecidos de sulfito-redutases presentes em bactérias redutoras de sulfato: desulfoviridina, desulforubidina, desulfofuccidina e P-582 (Fauque, *et al.*, 1991). Todas contêm cromóforo *siroheme* e [4Fe-4S], mas são diferenciadas pela

espectroscopia e por outras características moleculares. Desulfoviridina é a única que não reage com monóxido de carbono (CO) e libera facilmente o grupo prostético siroporfirina (sirohidroclorina). Este é responsável pela cor vermelha em luz Uv, após tratamento das células com solução alcalina (Postgate, 1984).

3.1.2. DIVERSIDADE NUTRICIONAL DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO Novo

Dois grupos metabólicos podem ser distinguidos: (1) as oxidadoras incompletas, oxidando compostos como lactato a acetato e dióxido de carbono e (2) as oxidadoras completas (acetoclásticas), oxidando completamente os substratos orgânicos, incluindo o acetato, até dióxido de carbono (Widdel, 1988). São exemplos de oxidadoras incompletas, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas pigra*, *Desulfovibrio thermophilus*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Thermodesulfobacterium commune*, *Desulfobulbus*. (Madigan *et al.*, 1997).
Aparentemente, todas estas redutoras não possuem mecanismo enzimático, semelhante ao ciclo do ácido cítrico, que permite a oxidação do acetato (acetil-CoA) originário dos substratos (Pfennig & Widdel, 1982). Somente compostos com até dois carbonos, podem ser oxidados completamente, tais como oxalato, glicina, formiato e metanol (Madigan *et al.*, 1997). Contudo, o acetato poderá ser assimilado como fonte de carbono orgânico no material celular, em crescimento na presença de hidrogênio ou formiato como doadores de elétrons (Widdel, 1988).

As redutoras incompletas são nutricionalmente menos versáteis do que as completas. Provavelmente, entre as primeiras, a mais versátil seja *Desulfovibrio*, utilizando hidrogênio, lactato, piruvato, malato, fumarato, etanol, glicerol e aminoácidos/ Sob condições ótimas, espécies de *Desulfovibrio* podem atingir tempo de geração de 3 a 4 horas usando hidrogênio, lactato ou piruvato (Oude Elferink *et al.*, 1994).

Entre as oxidadoras completas, são conhecidos os gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* e *Desulfobacterium*. Outros exemplos são *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfotomaculum sapomadens* e *Desulfovibrio barsii* que diferem dos outros representantes do mesmo gênero e classificados no primeiro grupo metabólico (Widdel, 1988; Madigan *et al.*, 1997).

(A eficiência na utilização do acetato não é a mesma para todas oxidadoras completas. Tipos especializados, como *Desulfobacter* usam acetato como único substrato orgânico e crescem vigorosamente com tempo de geração de 20 horas (Widdel & Pfennig, 1981). As

outras oxidadoras completas preferem outros ácidos orgânicos ou álcool e usam acetato muito lentamente com baixa produção celular (Widdel, 1988).

Novo A utilização do produto de fermentação, outros que não acetato e hidrogênio, pelas BRS inclui duas possibilidades: Na primeira, os produtos tais como propionato, ácidos graxos maiores, lactato ou álcool podem ser degradados pelas oxidadoras incompletas, com produção de acetato, sendo posteriormente consumido pelas BRS que oxidam acetato. Na segunda, as oxidadoras completas podem degradar os produtos da fermentação a dióxido de carbono como único produto final (Widdel, 1988).

Novo O lactato e piruvato podem ser usados como excelentes substratos orgânicos para enriquecimento, isolamento, cultivo ou determinação do número celular de espécies de *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*. Entre as oxidadoras incompletas, as que apresentam morfologia semelhantes a células ovais ou vibrio, são incapazes de usar lactato, com exceção de *Desulfovibrio sapovorans*. Entre as oxidadoras completas, a maioria das espécies de *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfovibrio baarsii*, *Desulfococcus niacini*, *Desulfonema magnum* não crescem com lactato (Pfennig *et al.*, 1981; Postgate, 1984).

As BRS com oxidação incompleta que usam lactato são capazes de crescer com hidrogênio como doador de elétrons, como demonstrado para diferentes espécies de *Desulfovibrio* (Laanbroek & Pfennig, 1981), *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* (Widdel & Pfennig, 1982) e *Thermodesulfobacterium commune*.

Estereato, que possui 16 carbonos, é substrato seletivo para enriquecimento de *Desulfovibrio baarsii*. [Outras oxidadoras completas, nutricionalmente mais versáteis, tais como *Desulfosarcina variabilis*, *Desulfococcus*, *Desulfonema* e *Desulfobacterium*, crescem com ácidos graxos com 10 a 16 átomos de carbono. Compostos aromáticos são usados pelas BRS oxidadoras completas.] *3c*

3c Segundo Oude Elferink *et al.* (1994), muitas BRS são encontradas em associação com as metanogênicas em ambientes anaeróbios. Na ausência de sulfato comportam-se como microrganismos acetogênicos, utilizando lactato e etanol para produzir substratos, como acetato, gás carbônico e hidrogênio para as metanogênicas. [Essa associação foi observada, por exemplo, entre *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfovibrio vulgaris* com arqueas metanogênicas.] Essas interações são importantes na manutenção do equilíbrio de hidrogênio nos ambientes anaeróbios. A pressão parcial elevada de hidrogênio impede a degradação dos compostos em produtos mais reduzidos, prejudicando o metabolismo fermentativo a metano (McInerney & Bryant, 1981).]

Entretanto, na presença de elevadas concentrações do íon sulfato em ambientes anaeróbios, as BRS levam vantagem em relação às metanogênicas pela competição pelos mesmos substratos, ou seja, acetato e hidrogênio. A redução do sulfato para sulfeto, com acetato ou hidrogênio é termodinamicamente mais favorável do que a produção de metano pelos mesmos substratos (Widdel, 1982).

Várias BRS são capazes de crescer através da fermentação de substratos orgânicos na ausência de sulfato. *Desulfosarcina* é capaz de fermentar apenas malato. Os produtos da fermentação são succinato, acetato, dióxido de carbono e às vezes propionato (Widdel & Pfennig, 1988).

Bactérias redutoras de sulfato em associação sintrófica com metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas degradam álcoois, formiato e propionato, na ausência de sulfato. Sendo os primeiros responsáveis pela conversão a acetato, dióxido de carbono, hidrogênio e/ou formiato, posteriormente utilizados pelas metanogênicas (Stams, 1994).

Os organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* são considerados únicos, possuindo filogenia particular e propriedades metabólicas extraordinárias. Apesar de também serem procarióticos, estes organismos são distintos dos pertencentes ao Domínio *Bacteria*, pois apresentam organização do genoma, composição celular e filogenia distinta (Canhos & Vazoller, 1999).

As arqueas se encontram distribuídas nos mais diversos habitats, sedimentos aquáticos, pântanos, sistemas de tratamento de resíduos, digestores anaeróbios e aterros sanitários. O metabolismo das arqueas é dependente de outros microrganismos geradores de precursores para a metanogênese, atuando na etapa final da decomposição de compostos orgânicos complexos (Vazoller, 1995).

O acetato é o principal precursor de metano na natureza, muito embora poucas espécies sejam capazes de utilizar esse substrato para metanogênese. *Methanosaeta sp.* utiliza exclusivamente acetato, enquanto que *Methanosarcina* utiliza também hidrogênio, dióxido de carbono e metanol. A Tabela 1 apresenta algumas características importantes das bactérias redutoras de sulfato

Tabela 1. Resumo de algumas características importantes de bactérias redutoras de sulfato.

Tabela 1. Resumo de algumas características importantes de bactérias redutoras de sulfato.															
Gênero	Morfologia	Temp. ótima (°C)	Desulfovi-ridina	Oxid. de doad. org. de elétrons	Doadores de elétrons										
					H ₂	acetato	propionato	ácidos graxos	etanol	lactato	succinato, fumarato, e/ou malato	glicose	fenil-substituto de ácidos orgânicos	Outros compostos utilizados	
Bacteria															
<i>Desulfovibrio</i>	Vibrio	30–38	+	i	+	-	-	-	+	+	±	±	-	metanol, glicerol, glicina, alanina, colina, furfural	
<i>Desulfomicrobium</i>	Oval ou bacilo	28–37	-	i	+	-	-	-	±	+	+	-	-	-	
<i>Desulfobulbus</i>	Oval	28–39	-	i	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
<i>Desulfobacter</i>	Oval ou vibrio	28–32	-	CAC	±	+	-	-	±	-	-	-	-	-	
<i>Desulfobacterium</i>	Oval	20–35	-	CO	±	(+)	(±)	±	±	±	±	-	±	metanol, glutarato, glutamato, fenol, anilina, nicotinato, indol	
<i>Desulfococcus</i>	Esfera	28–35	(+)	CO	-	(+)	+	+	+	+	-	-	+	acetona	
<i>Desulfosarcina</i>	Oval (formas agregadas)	33	-	CO	+	(+)	+	+	+	+	±	-	+	-	
<i>Desulfomonila</i>	Bacilo	37	+	c	+	-	ND	ND	-	-	-	-	+	3- or 4-anisato	
<i>Desulfonema</i>	Filamento multicelular	30–32	±	c	±	(+)	+	+	-	±	+	-	±	-	
<i>Desulfobotulus</i>	Vibrio	34	-	i	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
<i>Desulfoarculus</i>	Vibrio	35–39	-	CO	-	(+)	(+)	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Desulfotomaculum</i>	Bacilo delgado ou curvo; forma esporo	30–38; 50–65	-	i ou CO	±	±	±	±	+	±	±	±	±	metanol, alanina	
<i>Thermodesulfo bacterium</i>	Bacilo	65–70	-	i	+	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	
Archaea															
<i>Archaeoglobus</i>	Coco	82–83	-	CO	+	-	ND	ND	ND	+	ND	+	ND	amido peptídeos	

Legenda: i = degradação incompleta; c = completa; CO = completa via monóxido de carbono dehidrogenase; CAC = completa via ciclo do ácido cítrico
 + utilizado; (+) pouco utilizado; ± utilizado ou não; (±) pouco utilizado ou não; - não utilizado; ND não determinado.

Fonte: Widdel & Hansen, 1994.

3.2. DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO BENZOATO *N.V.O*

16 [Sob condições anaeróbias, os compostos orgânicos são oxidados em etapas sucessivas. Os produtos finais de cada etapa de oxidação atuam como substrato para membros da cadeia alimentar subsequente, até que a matéria seja integralmente degradada a biogás (Vazoller, 1995). A Figura 3 mostra a fórmula estrutural da molécula de benzoato. O quadro 1, apresenta as características físico-químicas e informações toxicológicas do benzoato.]

Figura 3. Fórmula estrutural da molécula de benzoato

16 [Muitos compostos aromáticos são usados pelas BRS oxidadoras completas. O enriquecimento com benzoato favorece o crescimento de *Desulfococcus multivorans*, *Desulfosarcina variabilis* e *Desulfonema magnum* (Widdel, 1988).]

16 [A estequiometria da degradação completa de benzoato na presença de sulfato é apresentada a seguir:

16 [As espécies que degradam benzoato freqüentemente utilizam fenol e lactato, fenol e propionato, ou mono, di ou trihidroxibenzoato. *Desulfococcus multivorans* e *D. niacini* necessitam da adição de selenito ao meio para crescimento em fenol (Widdel & Pfennig, 1988).]

Revisão Bibliográfica

Quadro 1. Caracterização físico-química e ambiental e informações sobre a ecotoxicologia de benzoato.

Propriedades Físico-Químicas e Ambientais			
Peso molecular 122,12	Ponto de ebulição (°C) 249,2	Ponto de fusão (°C) 122,3	
Temperatura crítica (°C) 479	Pressão crítica (atm) 45	pH 2,8(0,03M)	Solubilidade na água 0,20 g/100 ml de água a 17°C
Densidade relativa do líquido (ou sólido) 1,316 A 28°C (sólido)	Pressão de vapor 1 mm Hg A 96,0°C	Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) 165% em 5 dias.	

Informações Ecotoxicológicas

Toxicidade - limites e padrões

L.P.O.: 1,96 ppm

Toxicidade ao homem e animais superiores (vertebrados)

M.D.T.: LDLo: 500 mg/kg (oral)

M.C.T.: dado não disponível

Toxicidade à pele humana: LDLo = 6 mg/kg- irritação moderada a pele humana: 22 mg/3 dias (exposição intermitente) potencial de ionização (pi) = dado não disponível

Toxicidade: Espécie: rato

Via Oral (DL 50): 1.700 mg/kg ; 2.530 mg/kg

Toxicidade: Espécie: camundongo

Via Oral (DL 50): 2.370 mg/kg

Toxicidade: Espécie: outros

Via Oral (DL 50): cão: 2.000 mg/kg ; gato: 2.000 mg/kg

Toxicidade aos organismos aquáticos: peixes : espécie

Gambusia affinis : TLm (24 h) = 240 mg/L e TLm (96 h) = 180 mg/L; *Carassius auratus* : letal de 7h a 96 h = 200 mg/L; *Lepomis humilis*: letal a 500 ppm em 1h - água continental.

Toxicidade aos organismos aquáticos: crustáceos : espécie

Daphnia magna : imobilização a 146 mg/L, em exposição prolongada

Toxicidade aos organismos aquáticos: algas : espécie

L.tox T.I.M.C. *Microcystis aeruginosa* = 55 mg/L; *Scenedesmus quadricauda* = 1.630 mg/L

Toxicidade a outros organismos: bactérias

L.tox T.I.M.C. *Pseudomonas putida* = 480 mg/L

Toxicidade a outros organismos: mutagenicidade

Toxicidade a outros organismos: outros

protozoários : l.tox T.I.M.C. *Entosiphon sulcatum* = 218 mg/l; l.tox T.I.M.C. *Uronema parduczi* (chatton-lwoff)= 31 mg/l.

L.P.O.: limite de percepção olfativa; M.D.T.:menor dose tóxica publicada; M.C.T.: menor concentração tóxica; LDLo: dose letal mínima; DL: dose letal; TLm: tolerância média; LT: limite de tolerância; L tox T.I.M.C.: limite de toxicidade (teste de inibição da multiplicação das células)

Fonte: CETESB.

Várias bactérias sintróficas são conhecidas como degradadoras de benzoato. *Syntrophus buswellii* foi a primeira bactéria isolada utilizando benzoato em co-cultura com metanogênicas hidrogenotróficas ou bactérias redutoras de sulfato (Mountfort & Bryant, 1984).

É provável que exista competição, assim como, relação sintrófica entre BAS (bactéria acetogênica sintrófica), BRS (bactéria redutora de sulfato) e AM (arqueas metanogênicas) na degradação anaeróbia de benzoato na presença de sulfato (Li *et al.*, 1996).

A necessidade de culturas, contendo pelo menos dois grupos para degradação de benzoato, pode ser explicado pelas equações estequiométricas a seguir:

Kamagata *et al.* (1992), constataram que a conversão de benzoato a acetato não é energeticamente favorável (Eq. 2), sem o consumo de hidrogênio, por bactérias que mantenham a pressão parcial de hidrogênio extremamente baixa. Entretanto, quando o consumo do hidrogênio (Eq. 3) é acoplado à degradação, a reação se torna energeticamente favorável (Eq. 4).

Tschech & Schink (1986), pesquisaram a degradação fermentativa de monohidroxibenzoato através de cocultura sintrófica. Os autores utilizaram lodo proveniente de estação de tratamento de esgoto de Göttingen e Konstanz (Alemanha) e lodo anaeróbio de córregos poluídos de Hannover e Konstanz (Alemanha). Os autores utilizaram também *Desulfovibrio vulgaris* Marburg e *Methanospirillum hungatei* Mlh como consumidores de hidrogênio. Foram utilizados dois meios de cultura: (1) contendo 1,0g/L de NaCl e 0,4g/L de MgCl₂.6H₂O e (2) contendo 20,0g/L de NaCl e 3,0g/L de MgCl₂.6H₂O. Na fase de enriquecimento foram utilizados os seguintes substratos: 3-hidroxibenzoato (3-HB), 2-hidroxibenzoato (2-HB) e 4-hidroxibenzoato (4-HB). Todos os ensaios de crescimento foram realizados sob condições anaeróbias, em triplicata, em tubos de ensaio a 28°C e pH entre 7,2 a 7,4.

No enriquecimento, com 750 mg/L de 3-HB, no meio (1), a produção de metano teve início após 10 a 14 dias. No enriquecimento com meio (2), a produção foi observada após 25 dias. Devido ao crescimento muito lento no meio (2), este não foi caracterizado. As culturas no meio (1), foram purificadas entre 10 e 15 dias e após cinco transferências, 3-HB foi quantitativamente degradado com formação de acetato e metano. Entre 4 e 5 semanas de incubação surgiram colônias amarelas, identificadas como KN032 e KN033. As culturas eram fisiologicamente idênticas. As células de KN032 apareceram sob duas formas, bacilos retos e bacilos ligeiramente curvos, ambas com 0,8 μm largura e 1,5 a 3,0 μm de comprimento. As células eram Gram-negativas, sem mobilidade e não formadora de esporos.

No enriquecimento com 375 mg/L de 2-HB em meio (2), não houve degradação do substrato após quatro meses de incubação. No meio (1), 2-HB foi completamente mineralizado a metano e CO_2 , no período entre 5 a 6 semanas. Durante o período de incubação, surgiram células cocóides capazes de degradar 2-HB. Estas foram denominadas Wo021, com 0,8 a 1,7 μm de comprimento e 0,8 a 0,9 μm de largura. As células eram Gram-negativas, sem mobilidade e não formadora de esporos.

No enriquecimento, com 4-HB, em meio (1), a produção de metano teve início após 7 semanas. Após 10 transferências, a cultura mista foi representada por três microrganismos. Um Gram-negativo, sem mobilidade, sem formação de esporos, com 0,75 a 1,0 μm de largura e entre 1,0 a 2,0 μm de comprimento. Juntamente com esta cultura, surgiram arqueas hidrogenotróficas semelhantes a *Methanospirillum* sp. e acetoclásticas semelhantes a *Methanosaeta soehngenii*. A degradação de 4-HB a metano e CO_2 foi completa.

Kobayashi *et al.* (1989), estudaram a degradação de benzoato em condições metanogênicas. O consórcio metanogênico foi retirado de lodo anaeróbio proveniente de (1) estação de tratamento de esgoto, (2) de tratamento de celulose e (3) reator metanogênico alimentado com glicose e solução de extrato de milho. O lodo foi transferido para meio contendo inicialmente 600 mg/L de benzoato de sódio, elevando-se, posteriormente, a concentração para 3000 mg/L. Esta adaptação foi realizada no período entre 6 meses a 2 anos.

Os autores utilizaram 10% do lodo adaptado como inóculo, adicionando-se 50 mL de meio em frascos de soro com volume de 125 mL. Os frascos foram incubados a 37°C sob agitação. A degradação total de 3000 mg/L de benzoato ocorreu após 5 a 7 dias.

Os autores verificaram também que na presença de H_2/CO_2 (80%/20%) o benzoato não foi degradado e, conseqüentemente, a produção de metano foi reduzida. Quando a atmosfera foi alterada para N_2/CO_2 (80%/20%), houve degradação de benzoato e o rendimento na produção de metano foi melhor.

Sembiring & Winter (1990), estudaram a degradação completa de 3-metoxibenzoato, utilizando cocultura de *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060 ou *Desulfosarcina* DSU3 e microrganismo B10. Para inoculação foi utilizado meio de cultura descrito por BALCH *et al.* (1979), modificado para o crescimento em co-cultura, com NaCl (15 g/L) e $(NH_4)_2SO_4$ (5 g/L). As células do microrganismo B10, provavelmente *Acetobacterium* sp., foram responsáveis pela desmetilação do benzoato. Para se obter elevada densidade celular de *Desulfosarcina* foi adicionada ao meio mineral 576 mg/L de benzoato de sódio, como substrato. O enriquecimento foi realizado utilizando 3-metoxibenzoato e 3-hidroxibenzoato como substratos. A co-cultura foi incubada a 37°C. Devido à sensibilidade da *Desulfosarcina variabilis* à luz e agitação, todas as culturas foram incubadas no escuro e sem agitação.

Na co-cultura, a desmetilação de 3-metoxibenzoato pelo grupo B10 ocorreu entre 8 a 10 dias e, subseqüentemente, 3-hidroxibenzoato foi completamente degradado pela *Desulfosarcina variabilis*. Devido ao crescimento lento dessa BRS e sua sensibilidade à agitação, concentrações de 3-hidroxibenzoato iguais a 600 mg/L não foram totalmente mineralizadas.

Comparando com a outra co-cultura representada por *Desulfosarcina* DSU3 e microrganismo B10, com ensaios realizados sob agitação, não houve acúmulo de 3-hidroxibenzoato. Provavelmente, a diferença entre as duas co-culturas foi devido à agitação, ou seja, quando esta não ocorreu, houve rápida deposição do substrato no fundo do frasco de incubação.

Kamagata *et al.* (1992), observaram a degradação de benzoato por consórcio anaeróbio metanogênico e sulfetogênico. Os autores utilizaram meio DSM 334, alterando acetato por benzoato (720 mg/L) na ausência de cisteína. As incubações foram realizadas em batelada a 36°C. Através de observação microscópica foi possível constatar a presença de *Methanosaeta* e cocos irregulares com autofluorescência. O tempo de degradação de 720 mg/L de benzoato por esse consórcio foi de 2 semanas, formando metano e acetato.

Os autores realizaram isolamento das bactérias desse consórcio. Para as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, a técnica utilizada foi de diluição seriada usando meio líquido descrito por Zehnder (1980), utilizando como fonte de carbono 5mM de acetato. As BRS foram isoladas através do método de *roll tube* (Hungate, 1969), no mesmo meio utilizado para as arqueas, com adição de 20mM de sulfato. Quando acetato foi necessário como fonte de carbono as células isoladas foram cocos irregulares denominados BZM, gram-negativos e sem mobilidade, com autofluorescência, G+C de 62,0mol%. A cultura utilizou formiato e H_2/CO_2 para crescimento e produção de metano. O NaCl não foi necessário para o crescimento. Estas propriedades permitiram classificar o grupo BZM como *Methanogenium sp.*

Os autores estudaram também o efeito de sulfato no consórcio anaeróbio. Para tanto, foi adicionado ao meio 1920 mg/L de sulfato. Sob tais condições houve grande alteração da composição do consórcio, com o surgimento de vibrios e o desaparecimento de *Methanosaeta* e *Methanogenium*. Entretanto, a presença de sulfato não afetou a degradação de benzoato, mas, a produção de metano diminuiu. Essas observações indicaram que *Desulfovibrio* estavam presentes em pequeno número mesmo na ausência de sulfato. A bactéria denominada de BZS foi isolada. Nos ensaios de caracterização, observou-se mobilidade, não formação de esporos, formato de bacilos curvos e coloração gram-negativa. BZS não foi capaz de degradar benzoato. Estas características levaram a identificar o microrganismo como sendo *Desulfovibrio desulfuricans*. A determinação do K_s para hidrogênio dos grupos BZM e BZS foi determinado como sendo iguais a 10 μM e 4 μM , respectivamente.

Novo Li *et al.* (1996), estudaram as interações entre arqueas metanogênicas, bactérias redutoras de sulfato e bactérias acetogênicas sintróficas (BAS) na degradação anaeróbia do benzoato, utilizando reatores anaeróbios de bancada de fluxo contínuo com controle de temperatura, a 35°C. Em tais ensaios foi utilizado lodo granulado proveniente de digestor anaeróbio de estação de tratamento de esgoto de Hong Kong (China). Os reatores foram alimentados com água residuária sintética durante 90 dias de operação, com tempo de retenção hidráulica de 16 dias. Para DQO de 10000 mg/L, houve decréscimo na taxa de produção de metano, aumento na produção de sulfeto e diminuição da concentração de sulfato no efluente. Com o aumento da concentração de sulfato de 500 para 5000 mg/L, a taxa de produção de metano decresceu de 194 mg/L/d para 150 mg/L/d, enquanto a concentração de gás sulfídrico aumentou de 2,0 mg/L para 50 mg/L. A remoção de DQO decresceu de 94%

para 88,5% e 53,1%, quando a relação DQO/sulfato variou de 60 para 6,0 e 0,75, respectivamente. Com relação DQO/sulfato de 6,0, houve diminuição parcial na degradação do benzoato. Nessa mesma condição, a produção de gás sulfídrico no reator foi de 50 mg/L.

✓✓✓ Durante a degradação de benzoato na presença de sulfato, BRS (bactérias redutoras de sulfato) e AM (arqueas metanogênicas) competiram por elétrons. Esta competição foi fortemente dependente da relação DQO/sulfato, que por sua vez influenciou na composição microbiana e na via de degradação dos compostos. Quando o sulfato esteve disponível em pouca quantidade, o benzoato foi consumido pelas BAS a acetato e hidrogênio, e esses intermediários foram consumidos pelas arqueas metanogênicas produzindo metano (Figura 4a). Para águas residuárias com relação DQO/sulfato intermediária a degradação do benzoato seguiu rotas complexas, havendo a competição pelo substrato entra as BAS e BRS e pelos intermediários, entre BRS e AM, (Figura 4b). Para relação DQO/sulfato de 0,75, o benzoato foi degradado pelas BRS e pequena fração convertida a metano (Figura 4c).

Figura 4. Mecanismos de degradação de benzoato para diferentes relações DQO/sulfato.

AM: Arqueas metanogênicas;

BRS: Bactérias redutoras do íon sulfato;

BAS: Bactérias acetogênicas sintróficas.

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

16/0 A Tabela 2 mostra as possíveis vias de degradação anaeróbia do benzoato por bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas. [A degradação anaeróbia de benzoato na presença de sulfato pode ocorrer através de várias reações envolvendo diversos grupos de bactérias. Benzoato pode primeiramente, ser convertido por bactérias acetogênicas sintróficas a acetato e hidrogênio (reação 5), ou convertido, por sulfetogênese incompleta, a acetato (reação 6) ou completamente a bicarbonato (reação 7). Em processo de degradação subsequente, acetato e hidrogênio podem ser consumidos na metanogênese e pela sulfetogênese, produzindo metano (reações 8 e 10) e sulfeto (reações 9 e 11), respectivamente.]

Tabela 2. Reações na degradação anaeróbia de benzoato.

Substrato	Organismos	Reações	Nº Reações
Benzoato	BAS	$Be^- + 7H_2O \rightarrow 3Ac^- + 3H^+ + HCO_3^- + 3H_2$	(5)
	BRSi	$4Be^- + 3SO_4^{2-} + 16 H_2O \rightarrow 12Ac^- + 3HS^- + 4HCO_3^- + 9H^+$	(6)
	BRSc	$Be^- + 3.75SO_4^{2-} + 4 H_2O \rightarrow 3.75H_2S^- + 7HCO_3^- + 2.25 H^+$	(7)
Acetato	AM	$Ac^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	(8)
	BRS	$Ac^- + SO_4^{2-} \rightarrow HS^- + 2HCO_3^-$	(9)
Hidrogênio	AM	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	(10)
	BRS	$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$	(11)

BRSi = degradação incompleta pelas BRS

BRSc = degradação completa pelas BRS

BAS: bactéria acetogênica sintrófica; BRS: bactéria redutora do íon sulfato;

AM: arquea metanogênica; Be: benzoato; Ac: acetato.

Fonte: Li (1996); Zhou (1997).

16 Fang *et al.* (1997) estudaram a degradação de benzoato na presença de sulfato, em biodigestor UASB, operado durante 391 dias, em temperatura de 37°C, utilizando água residuária sintética. Os estudos foram divididos em duas fases. Na primeira, com duração de 70 dias, o reator foi alimentado com 730 mg/L de benzoato de sódio e 1800 mg/L de sulfato de sódio, atingindo remoção de 99,5% e redução de 39,6%, respectivamente. Na segunda fase, com duração de 148 dias e adição de 1000 mg/L de benzoato e 1880 mg/L de sulfato, a redução da fonte de enxofre atingiu 48% e a degradação do substrato orgânico se manteve constante em 99,5%. Em testes em batelada foi possível constatar que a redução do sulfato dependeu da qualidade do substrato. Usando somente benzoato como substrato, a redução foi

de 25,6%, abaixo dos valores observados nos testes contínuos. Redução de sulfato na presença de outros substratos como butirato, propionato e acetato, foi igual a 33,3%, 50,4% e 12,4%, respectivamente. }

Em outro trabalho, Fang *et al.* (1997) usaram biodigestor UASB, em experimento conduzido durante 320 dias, com temperatura controlada entre 34°C-37°C, e água residuária sintética contendo concentração de benzoato de 2520 mg/L, equivalente a 5000 mg/L de DQO. Os autores realizaram dois experimentos: (1) concentração de sulfato constante, de 3000 mg/L; (2) aumento gradual na concentração de sulfato de 100 mg/L para 7500 mg/L. No experimento (1) foi observado a eficiência na remoção da matéria orgânica de 99,3%, com quantidade de benzoato residual inferior a 13 mg/L. A eficiência na redução de sulfato decresceu para 56% quando a concentração de sulfato na água residuária aumentou de 1000 mg/L para 2000 mg/L. Com relação à produção de CH₄, 93,4% da DQO removida foi convertida nesse gás. No experimento (2) a eficiência na remoção da matéria orgânica foi de 98% a 100% para valores inferiores a 6000 mg/L, correspondendo a relação DQO/SO₄²⁻ de 2,5. Quando a concentração do sulfato foi elevada para 7500 mg/L a relação DQO/SO₄²⁻ decresceu para 2,0, com eficiência na remoção da matéria orgânica de 32%. A redução de sulfato foi constante e igual a 89%. }

Zhou (1998) conduziu experimento utilizando reator UASB a 37°C, durante 251 dias. O autor usou água residuária sintética com concentração de benzoato de 440 mg/L e sulfato de 1080 mg/L, com sacarose como co-substrato. A remoção de benzoato, na presença do co-substrato (1000 mg/L) iniciada em 42%, atingiu 75% no final do experimento. Com a concentração de sacarose reduzida para 500 mg/L, a eficiência de remoção do benzoato foi maior, atingindo valor de 99,5%. Sob tais condições houve acréscimo na redução de sulfato de 48% para 99% e diminuição na produção de metano, inicialmente de 1,02 L/d, para 0,39 L/d, respectivamente. Na ausência de sacarose, a eficiência na remoção de benzoato foi mantida. A remoção de sulfato sofreu diminuição de 99% para 72% e a produção de metano também decresceu para 0,6 L/d.

Çinar & Gradys Jr. (2000), estudaram a estabilidade da capacidade biodegradativa de benzoato em ambiente anóxico e aeróbio. Os experimentos foram realizados utilizando como biomassa, duas culturas mistas mantidas em cultivo contínuo. As células iniciais para cultivo foram provenientes de estação municipal de tratamento de esgoto – Clemson-USA. A primeira

cultura foi desenvolvida e mantida sob condições anóxicas, com nitrato como aceptor final de elétrons. A Segunda foi mantida sob condições aeróbias. Ambas foram operadas com tempo de detenção hidráulica de 48 horas em meio mineral contendo benzoato como fonte de carbono e energia.

A concentração inicial de benzoato foi de 2000 mg/L, na condição anóxica a concentração de nitrato foi de 2670 mg/L. Na condição aeróbia não houve adição de NaNO_3 . Nas duas condições houve o bombeamento de gás no sistema, nitrogênio na condição anóxica e oxigênio na condição aeróbia. O cultivo contínuo foi realizado em temperatura de 25°C. Às duas condições foram adicionadas 0,026M de tampão fosfato para manter o pH em 7,3. Entretanto, devido à produção de alcalinidade associada à desnitrificação, foi necessária a adição de 2M de HCl na condição anóxica para manter o pH desejado.

Posteriormente, os autores Çinar & Gradys Jr., testaram a estabilidade do sistema enzimático na degradação de benzoato, que é ilustrado na Figura 5. Aliquotas de biomassa do ensaio de crescimento foram retiradas e inoculadas em reatores em batelada com substrato endógeno. Células em crescimento anóxico foram expostas às condições anaeróbia e aeróbia, da mesma maneira as células cultivadas aerobiamente, foram expostas a mudanças na condição redox. Amostras de biomassa foram retiradas nos tempos 0, 2, 4 e 8 horas. A condição redox nos ensaios de degradação foram os mesmos do ensaio de crescimento.

Em seguida, a biomassa retirada nos tempos descritos, anteriormente, e transferida para reatores pequenos, para se analisar o potencial de assimilação de benzoato. A concentração de biomassa nesses ensaios foi de 500mg/L. Para inibir a síntese protéica foi adicionado 100mg/L de canamicina. Nos ensaios aeróbios a taxa de aeração foi mantida próxima ao nível de saturação. Em ambiente anóxico foi adicionado 55mg/L de nitrato de sódio. O substrato foi adicionado na concentração de 100mg/L. Amostras foram retiradas a cada 5 minutos durante 25 minutos, sendo a atividade microbiana eliminada, imediatamente, através da adição 30μL de ácido fosfórico concentrado. Cada amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 4°C para remover a biomassa e analisar o substrato.

Figura 5. Condições redox impostas durante as várias etapas experimentais na degradação de benzoato

Fonte: Çinar e Grady Jr. (2000)

A taxa de assimilação de benzoato foi constante sob condições aeróbias, indicando independência em relação à concentração. Sob condições anóxicas, somente a fase inicial foi linear, durante o restante do tempo houve o surgimento de fase exponencial. Canamicina incluída durante o ensaio demonstrou que a assimilação de benzoato não estava associada à síntese protéica. Para estudos da atividade enzimática, células anaeróbias foram mantidas sem alimentação e sob aerobiose. Durante o período de ensaio houve perda de 20% da atividade enzimática, provavelmente, essa perda da atividade foi devido à exposição aeróbia. Na exposição anaeróbia de células aeróbias houve a perda de 80% da capacidade de catabolizar benzoato, provavelmente, devido a perda da atividade de citocromo oxidase.

Elshahed *et al.* (2001) estudaram o metabolismo de *Syntrophus aciditrophicus* em associação sintrófica com microrganismos hidrogenotróficos no consumo de benzoato. *Syntrophus aciditrophicus* foi isolada de lodo de estação de tratamento de esgoto, Norman – Oklahoma (USA). As células hidrogenotróficas, tais como, *Methanospirillum hungatei* e *Desulfovibrio* sp. foram obtidas de coleção particular de M. P. Bryant. Todos os meios e soluções estoque foram preparada anaerobiamente. Sulfato de sódio (2000mg/L) foi adicionado ao meio quando *Desulfovibrio* sp. esteve presente. Cultura de *Methanospirillum hungatei* e *Desulfovibrio* sp. foram incubadas sob agitação de 100 rpm. Crotonato (85mg/L) foi adicionado ao meio basal para estimular o crescimento de *Syntrophus aciditrophicus*. Coculturas de *Syntrophus aciditrophicus* e *Methanospirillum hungatei* ou *Desulfovibrio* sp. foram estabelecidas adicionando 15% a 20% (v/v) de inóculo de cada microrganismo em meio basal contendo 173mg/L a 216mg/L de benzoato de sódio. Todas as culturas foram incubadas a 37°C. A detecção e quantificação de metabólitos provenientes da degradação do benzoato

foram determinadas por cromatografia gasosa. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear, foi realizada utilizando 216mg/L benzoato [anel $^{13}\text{C}_6$], a frequência utilizada foi de 100.573 MHz e temperatura de 30°C. Atividade enzimática por turbidimetria, foi determinada em comprimento de onda de 300nm, NADH foi monitorado a 340nm. O ensaio enzimático foi realizado aerobiamente em temperatura ambiente. A Tabela 3 apresenta os dados obtidos pela ressonância magnética nuclear (RMN).

Tabela 3. Dados obtidos por RMN, na degradação de benzoato por cocultura de *Syntrophus aciditrophicus* e *Methanospirillum hungatei* utilizando [$^{13}\text{C}_6$].

Composto	Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	J_{cc} (Hz)
Ácido acético	Carboxil	177,0	55,7
	Metil	20,7	56,9
Ácido benzóico	C-1	133,5	53,6; 10,5
	C-2 – C-6	127,7 – 130,7	
Ácido ciclohexano	C-1	42,8	32,0
carboxílico	C-2, C-6	28,7	31,9
	C-3, C-5	25,7	
	C-4	25,4	
Ácido ciclohex-1-eno	C-1	142,6	70,3; 41,0
carboxílico	C-2	147,5	69,8; 41,1
	C-3 – C-6	18,0 – 25,9	

J_{cc} = frequência de ligação carbono-carbono.

Fonte: Elshahed *et al.* (2001).

Em cocultura de *Syntrophus aciditrophicus* e *Methanospirillum hungatei*, ciclohexano carboxilato (260µm) foi produzido, temporalmente, durante a degradação de benzoato, e a concentração máxima ocorreu após 97,5% de benzoato ser consumido. Ciclohex-1-eno carboxilato, pimelato e glutarato foram produzidos e consumidos, sendo detectados em concentrações muito baixas e iguais a 12,5µm, 6,4µm e 11,3µm, respectivamente. Ciclohexano carboxilato, ciclohex-1-eno carboxilato, pimelato e glutarato foram detectados em cocultura de *Syntrophus aciditrophicus* e *Desulfovibrio* sp. em concentrações similares a condição metanogênica, ou seja, consumo e produtos foram independentes do microrganismo que utilizou hidrogênio.

Novo A relação de metano produzido e benzoato consumido foi de 0,76. A análise por ressonância de ^{13}C demonstrou que ciclohexano carboxilato, ciclohex-1-eno carboxilato (e outros -CoA derivados) foram intermediários de benzoato metabolizado por *Syntrophus aciditrophicus*. A Figura 6 apresenta possível rota de degradação do benzoato.

A determinação da atividade enzimática foi realizada em cocultura de *Syntrophus aciditrophicus* e *Desulfovibrio* sp.. A formação de benzoil-CoA a partir de benzoato foi confirmando através de ensaio isotópico utilizando [fenil- ^{14}C]benzoato. Os resultados mostraram que 84% de [^{14}C]benzoato adicionado foi transformado em benzoil-CoA após 2 minutos. Atividade de Acil-CoA não foi detectada em culturas puras de *Desulfovibrio* sp., porém níveis de atividade de Acil-CoA foram observados em culturas puras de *Syntrophus aciditrophicus* no metabolismo de crotonato.

Figura 6. Rota metabólica proposta para *S. aciditrophicus* no consumo de benzoato: 1, benzoato; 2, benzoyl-CoA; 3, ciclohexano carboxil-CoA; 4, ciclohex-1-eno carboxil-CoA; 5, 2-hidroxiciclohexano carboxil-CoA; 6, 2-cetociclohexano carboxil-CoA; 7, pimelil-CoA; 8, ácido heptenodióico-1-CoA; 9, 3-hidroxipimelil-CoA; 10, 3-cetopimelil-CoA; 11, glutaril-CoA; 12, glutaconil-CoA; 13, crotonil-CoA; 14, 3-hidroxibutiril-CoA; 15, acetoacetyl-CoA; 16, acetyl-CoA; 17, acetato.

Fonte: Elshahed, 2001

Novo

Novo Loh & Chua (2001), estudaram as rotas de degradação de benzoato por *Pseudomonas putida*. Todas as culturas foram mantidas em batelada, em Erlenmeyer de 500mL, com 50% de volume de meio. As concentrações iniciais de benzoato utilizadas foram variáveis. Para realização dos experimentos foi utilizado inóculo previamente cultivado em 200mg/L de benzoato de sódio como única fonte de carbono. Quando as células estavam em fase exponencial foram transferidas para os frascos experimentais. Os frascos foram mantidos sob agitação de 165rpm, temperatura de 30°C e pH entre 6,9 a 7,4. A densidade celular foi determinada por turbidimetria (600nm). Incubação em placas foram realizadas utilizando ágar nutriente contendo 100mg/L de benzoato. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas, e então determinado o número de UFC (unidades formadoras de colônias). As concentrações de benzoato e catecol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Metabólito de orto-clivagem de benzoato foram determinados por cromatografia gasosa (GC). O crescimento específico (μ), utilizando gráfico da biomassa pelo tempo. A velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e a constante de saturação (K_s) foram determinadas utilizando equação de Monod, através de gráfico Hanes-Woolf.

Revisão O crescimento e a rota metabólica de *Pseudomonas putida* em várias concentrações de benzoato de sódio, foi observado, acima de 100mg/L, e a velocidade de crescimento ($\mu_{\max}$) foi limitada alcançando 0,66h⁻¹ e K_s de 10mg/L. Para as concentrações acima de 500mg/L houve inibição do crescimento.

Novo Os resultados demonstraram ainda, que a regulação das rotas utilizadas foram dependentes da concentração de benzoato, ou seja, para valores abaixo de 200mg/L, a degradação ocorreu via orto clivagem, enquanto para as concentrações acima de 300mg/L, a via preferencial foi a meta clivagem. A taxa de catecol produzido durante o experimento foi de 4,4mg/L. O número de UFC foi de 33×10^{10} . A Figura 7 apresenta as rotas propostas na degradação de benzoato por *Pseudomonas putida*.

Figura 7. Rota metabólica proposta na biodegradação de benzoato por *Pseudomonas putida*. Incluindo indução de meta clivagem via DHB (Dihidroxibenzoato).

Fonte: Loh & Chua, 2001.

NVO

Kim *et al.* (2003), estudaram as rotas de degradação de benzoato por *Acinetobacter* sp., KS-1, utilizando análise de proteoma (análise de proteína em gel bidimensional). As células foram incubadas em tubos de ensaio contendo meio basal, com concentração variada de benzoato como fonte de carbono (5,9mg/L, 11,8mg/L, 118mg/L, 590mg/L e 1180mg/L), a 27°C sob agitação contínua. Proteínas foram determinadas pelo método desenvolvido por Bradford (1976). Atividade da enzima catecol dioxigenase foi analisado por espectrofotômetro.

Acinetobacter sp. KS-1 foi capaz de utilizar completamente benzoato em concentrações de 5,9mg/L e 11,8mg/L, porém a taxa de crescimento em 118mg/L e 590mg/L foi reduzida após 6 horas. Em 1180mg/L não ocorreu crescimento.

Para identificar as proteínas de *Acinetobacter* sp. KS-1 foram utilizadas culturas incubadas em benzoato. Análises comparativas foram realizadas utilizando bactérias com crescimento em benzoato. Aproximadamente, 350 proteínas foram detectadas e 18 apresentaram intensidade significativa se diferenciando das outras em gel 2-D. Essas então foram numeradas de 1 a 18 e analisadas em espectrofotômetro de massa. Entre essas, 10 proteínas foram analisadas com sucesso, enquanto, as 8 restantes foram identificadas por homologia utilizando aminoácidos previamente conhecidos. Sítio 3, foi identificado como catecol 1,2 dioxigenase, sugerindo que *Acinetobacter* sp. KS-1 utilizou β -cetoadipato como rota na degradação de benzoato. Essa sugestão foi confirmada com a identificação dos sítios 9, 10 e 18, os quais foram identificados como sendo β -cetoadipato succinil-CoA transferase (*catI*). Os sítios 4, 5, 6 e 8 foram identificados como trealose fosfatase, envolvida na síntese de trealose, dissacarídeo não reduzível presente em diversos organismos eucariotos e procariotos, sendo utilizados como protetores de membrana em situações de choque e estresse hídrico. Análise do proteoma de *A. hwoffii* K24 e *A. radioresistens* também utilizam β -cetoadipato como rota na degradação do benzoato, porém enzimas relacionadas com síntese de trealose não foram detectadas.

3.3. VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E TEMPO DE GERAÇÃO

Os microrganismos são estudados como população e não como células individuais (Videla, 1996) e quando se fala em crescimento microbiano, a referência é em relação ao aumento do número de células ou massa microbiana de uma população (Brock *et al*, 1998).

O crescimento de uma população microbiana é dividido em três etapas distintas: **fase lag**, corresponde à fase de adaptação da cultura às condições de cultivo; **fase log ou exponencial**, corresponde ao crescimento efetivo, onde a velocidade de crescimento é constante devido à constante divisão celular; **fase estacionária**, ocorre quando os nutrientes foram consumidos e o número de células permanece constante, isto é, o número de células novas é igual ao número de células mortas; **fase de declínio**, onde ocorre o predomínio de

células mortas, as células se auto digerem e a população diminui (Brock *et al*, 1998). A extensão da fase lag está associada as condições de cultivo (Silva (b), 1999).

Novo Se a velocidade específica de crescimento é constante, a equação representa a fase exponencial, onde o crescimento é proporcional à massa celular presente. O tempo necessário para que a célula se divida, ou para que a população se duplique, é conhecido como tempo de geração (T_g), que pode ser calculado conhecendo-se a velocidade de crescimento (μ) (Varesche, 1997).

Szewzyk & Pfennig (1987), realizaram estudos de cinética de crescimento para três culturas, *Desulfovibrio* sp., *Desulfovibrio propionicus* e *Desulfotomaculum orientis*, obtendo velocidade de crescimento entre $0,02$ e $0,03h^{-1}$ para ensaios descontínuos e crescimento específico de $0,05h^{-1}$ para ensaios contínuos realizados em quimiostato, sob condições limitantes de fonte de carbono.

Laanbroek *et al* (1994), utilizando as mesmas condições impostas por Szewzyk e Pfennig (1987), determinaram a velocidade de crescimento específico para *Desulfobacter posgatei*, *Desulfobulbus propionicus* e *Desulfovibrio bacuolatus* em $0,13h^{-1}$, $0,08h^{-1}$ e $0,10h^{-1}$, respectivamente. Em cultivo em batelada das mesmas espécies, as velocidades de crescimento foram 50% a 70% mais baixas.

Novo Silva(b) (1999), avaliou a cinética de crescimento para *Desulfovibrio* sp, em ensaios em batelada utilizando lactato ($4022mg/L$) e sulfato ($2000mg/L$), a $30^{\circ}C$ e sem agitação. A determinação do tempo de geração e da velocidade de crescimento foi feita através da medida dos valores médios das concentrações de proteína total. Sob tais condições, o valor de μ obtido foi de $0,13d^{-1}$, com tempo de geração de 5,33d.

A Tabela 4 apresenta alguns valores de velocidades de crescimento e de tempos de geração para culturas em condições específicas de crescimento.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos de μ e Tg para algumas espécies de BRS

Espécie	μ	Tg	Fontes
<i>Desulfohrabdus amnigenus</i> ¹	0,13 – 0,19d ⁻¹	3,5 – 5,0d	acetato e sulfato
<i>Desulfohrabdus amngemus</i> ¹	0,5d ⁻¹	1,5d	formiato, propionato, etanol e sulfato
<i>Desulfobacca acetoxidans</i> ²	0,32 – 0,41d ⁻¹	1,7 – 2,1d	acetato e sulfato
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> ³	0,15h ⁻¹	4,6h	acetato, hidrogênio e sulfato
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> ³	0,21h ⁻¹	3,3h	acetato, hidrogênio e tiosulfato
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ⁴	0,06h ⁻¹	10,2h	acetato, hidrogênio, sulfato e nitrato
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ⁵	0,35h ⁻¹	1,9h	lactato e sulfato
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ⁶	0,38 – 0,55h ⁻¹	1,2 – 1,8h	lactato e sulfato
<i>Desulfovibrio</i> sp. ⁷	0,33h ⁻¹	2h	lactato e sulfato
<i>Desulfobacter</i> sp. ⁸	0,8 – 1,1d ⁻¹	0,6 – 0,9d	acetato e sulfato
<i>Desulbacter postagateri</i> ⁹	0,13h ⁻¹	5,3h	etanol e sulfato
<i>Desulfobulbus Propionicus</i> ⁹	0,08h ⁻¹	8,6h	etanol e sulfato
<i>Desulfovibrio bacuolatus</i> ⁹	0,10h ⁻¹	6,9h	etanol e sulfato
<i>Desulfotomaculum thermoacetoxidans</i> ¹⁰	0,06h ⁻¹	11h	lactato e sulfato

¹Oude Elferink *et al.* (1995); ²Oude Elferink *et al.* (1998); ³Badziong & Thauer (1978); ⁴Dalsgaard & Bak (1994); ⁵Okabe *et al* (1992); ⁶Okabe & Characklis *et al* (1992); ⁷Reis *et al* (1992); ⁸Smith & Mah (1966); ⁹Laanboek *et al* (1984); ¹⁰Min & Zinder (1990).

Fonte: Silva (b), 1999

novo

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ATIVIDADES EXPERIMENTAIS

O trabalho foi realizado em duas etapas: a primeira, com células provenientes de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) e a segunda, após processo de purificação da cultura. Nas duas etapas foi avaliada a capacidade dos microrganismos em metabolizar o composto aromático. O material utilizado como inóculo no experimento inicial (primeira etapa) deste trabalho foram as células desprendidas das matrizes de poliuretano provenientes do RAHLF, usado no tratamento de água residuária de indústria química de peróxidos orgânicos de Rio Claro (SP).

Amostras de espumas de poliuretano do reator foram colocadas em frasco contendo pérolas de vidro e solução de cloreto de sódio (0,9%), previamente esterilizada. Para manter-se o sistema em anaerobiose, o frasco foi submetido à atmosfera de nitrogênio (100%), durante 20 minutos e lacrado com tampa de butila e rosca de alumínio. Procedeu-se agitação manual em ângulo de 45°, durante 20 minutos, para desprender as células presentes no material suporte. Como inóculo nos reatores sulfetogênicos, foram utilizados 10% (v/v) desse material desprendido. Os ensaios em reator em batelada foram feitos em duplicata e mantidos à temperatura de $33,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Todos os testes experimentais realizados nessa fase do trabalho estão descritos na Figura 8.

Inicialmente, foram utilizados dois meios de cultura contendo vários compostos orgânicos não aromáticos ou benzoato como fontes de carbono, sempre na presença de sulfato. Todos os experimentos foram realizados com reatores em batelada, em cultura planctônica, isto é, não aderida a material suporte.

Primeiramente, para reativação do lodo, foram utilizadas as seguintes condições: (1) meio BRS (Widdel & Pfennig, 1984) com benzoato de sódio, (2) meio BRS (Widdel & Pfennig, 1984) com compostos orgânicos não aromáticos e (3) meio Zinder (Zinder & Koch, 1994) com compostos orgânicos não aromáticos. Os compostos orgânicos não aromáticos utilizados como fontes de carbono foram: soluções de acetato (2041,6mg/L), lactato (2011,6mg/L), propionato (1691,2mg/L), butirato (1971,8mg/L), formiato (2491,6mg/L), glicose (1801,6mg/L), etanol (920,0mg/L). Foi usado também extrato de levedura 0,01%. Como fonte de enxofre foi utilizado sulfato (1000 mg/L).

Posteriormente, foi realizado outro experimento utilizando inóculo biomassa proveniente do frasco com benzoato/sulfato do ensaio de enriquecimento descrito anteriormente, e meio de cultivo BRS (Widdel & Pfennig, 1984). Com o objetivo de avaliar a utilização de diferentes concentrações de sulfato e benzoato, foram realizados três testes nutricionais com meio de cultura BRS (Widdel & Pfennig, 1984): (1) com 870,0 mg/L de sulfato e 680,0 mg/L benzoato, (2) com 400 mg/L de sulfato e 242,0mg/L de benzoato (3) com 975,0 mg/L de sulfato e 890,0 mg/L de benzoato. Foram monitorados os consumos de benzoato, a utilização de sulfato e a produção de sulfeto e metano.

Nos ensaios de purificação foram utilizadas, como inóculo, células enriquecidas em benzoato (600mg/L) e sulfato (1000mg/L) utilizadas em experimentos anteriores. Foi utilizado meio de cultura BRS (Widdel & Pfennig, 1984), em diluições decimais seriadas, em frascos de antibiótico (30 mL), sob condições anaeróbias, utilizando 1000mg/L de sulfato e 600mg/L de benzoato (Figura 9).

Após purificação da cultura, foram realizados ensaios de degradação de benzoato, sob condições sulfetogênicas, utilizando diferentes relações de benzoato/sulfato, apresentadas posteriormente. Foram determinados o tempo de geração (T_g) e a velocidade de crescimento (μ) nas condições de purificação. Foram determinadas as dimensões celulares, foi realizada coloração de Gram e presença de desulfoviridina na fase exponencial de crescimento. As morfologias foram constatadas através de microscopias de contraste de fase e eletrônica de varredura (MEV), além da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), utilizando sonda para bactérias redutoras de sulfato (BRS) da subdivisão delta, de Proteobacteria (SRB385), através de metodologia descrita por Hirasawa (2003). Ainda, com a finalidade de se identificar a bactéria responsável pela utilização do benzoato realizou-se o seqüenciamento do DNAr da bactéria utilizando-se metodologia descrita por Chinalia *et al.* (2004).

Posteriormente, foi realizada a caracterização nutricional da cultura purificada. Para tanto, foram realizados ensaios com diferentes compostos orgânicos (acetato, benzoato, butanol, butirato, etanol, formiato, fumarato, glicose, lactato, malato, metanol, piruvato, propanol, propionato), em condições de fermentação e respiração, na presença de sulfato, tiosulfato, sulfito e nitrato. Esses testes foram realizados em triplicata, em frascos de antibiótico de 30 mL. As etapas experimentais, realizadas nessa fase, estão descritas na Figura 9.

Figura 8. Organograma das atividades experimentais utilizando cultura enriquecida.

Figura 9. Organograma das atividades experimentais realizadas com cultura purificada.

4.2. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Todo material utilizado na preparação de soluções, meios de cultura e as próprias soluções foram submetidos à esterilização, para se manter as condições de assepsia e evitar contaminações durante os processos de manipulação dos experimentos.

As esterilizações foram realizadas por autoclave ou por filtração. A esterilização em autoclave foi realizada a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos.

A esterilização por filtração foi realizada da seguinte maneira: a água foi previamente fervida e resfriada sob atmosfera de N₂ (100%) até atingir 45°C. Foi realizada filtração rápida da solução em filtro de membrana com 0,22µm de diâmetro de poro, utilizando sistema Millipore. As soluções foram distribuídas em frascos de antibióticos previamente lavados com N₂ (100%) através de sistema de gases purificado em coluna catalítica e Acrodisc®, durante 5 minutos. O nitrogênio (100%) foi utilizado para reduzir a presença de oxigênio molecular no sistema.

4.3. MEIOS DE CULTIVO

4.3.1. MEIO BASAL ZINDER

O meio de cultura basal Zinder (Zinder & Koch, 1994) foi utilizado no enriquecimento do lodo anaeróbico nos reatores em batelada. Na preparação do meio foram utilizados os reagentes descritos na Tabela 5, dissolvidos em água ultrapurificada, na ordem apresentada nessa Tabela. Após a dissolução, o meio foi acondicionado em frascos de Duran (2000 mL), fechados com papel alumínio e submetidos à esterilização em autoclave. No momento da inoculação, os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂/CO₂ (70%/30%). Posteriormente, os frascos foram fechados com tampas de butila e roscas plásticas, para manter as condições anaeróbicas. Para preparação e distribuição do meio de cultura, foram utilizadas técnicas de manipulação para organismos anaeróbios estritos, descritas detalhadamente por Vazoller (1995).

Tabela 5.. Composição do meio de cultivo ZINDER.

Componentes	Quantidades para 1000mL
NH ₄ Cl	0,50 g
KH ₂ PO ₄	0,40 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g
Solução de resazurina (0,1%)	1,0 mL
Solução de metais traço (SL-10)	10,0 mL

Fonte: Zinder & Koch (1994).

4.3.2. MEIO DE CULTURA PARA BRS

O meio de cultura utilizado foi adaptado de meio DSM198 específico para *Desulfosarcina*, preparado seguindo os mesmos procedimentos mencionados na descrição do meio Zinder, utilizando-se os componentes apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Meio de cultura para *Desulfosarcina* modificado.

Componentes	Quantidades para 1000mL
KH ₂ PO ₄	0,20g
NH ₄ Cl	0,30g
NaCl	13,50g
MgCl.6H ₂ O	2,00g
KCl	0,50g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15g
Resazurina (0,1%)	1,00 mL
Solução metais traço (SL-10)	1,00 mL

Fonte: Widdel & Pfennig (1984).

4.3.2.1. SOLUÇÃO DE METAIS TRAÇO

A solução de metais traço SL-10, específica para BRS, descrita por Widdel & Pfennig (1984), foi preparada a partir da dissolução do $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em HCl (25%). Posteriormente, foram adicionados os demais sais, conforme a ordem apresentada na Tabela 7. O volume foi completado para 1000mL com água ultrapurificada. A esterilização foi realizada por filtração. Os frascos foram mantidos na ausência de luz, a 4°C.

ac 10/08/20

Tabela 7. Solução de metais traço SL-10.

Componentes	Quantidades para 1000mL
HCl (25%; 7.7M)	10,0 mL
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,50 g
ZnCl_2	70,0 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100,0 mg
H_3BO_3	6,0 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	190,0 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24,0 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,0 mg

Fonte: Widdel & Pfennig (1984).

4.3.2.2 SOLUÇÃO DE VITAMINA BRS

Um litro da solução de vitaminas específica para BRS, com ácido *p*-aminobenzóico, descrita por Widdel & Pfennig (1984), foi preparada através da dissolução dos componentes descritos na Tabela 8, em água ultrapurificada, na mesma sequência em que são apresentados. A solução foi esterilizada através de filtração. A solução foi distribuída em frasco de Duran, fechados com tampa de butila e rosca plástica, envolvidos em papel alumínio e armazenados sob refrigeração a 4°C, no escuro.

Tabela 8.. Solução de vitaminas para BRS.

Componentes	Quantidades para 1000mL
Biotina	2,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Piridoxina-HCl	10,0 mg
Tiamina-HCl.2H ₂ O	5,0 mg
Riboflavina	5,0 mg
Ácido nicotínico	5,0 mg
D-pantotenato de cálcio	5,0 mg
Vitamina B ₁₂	0,1 mg
Ácido p-aminobenzóico	5,0 mg
Ácido lipóico	5,0 mg

Fonte: Widdel & Pfennig (1984)

4.3.2.3. SOLUÇÕES ESTOQUE ESTERILIZADAS POR FILTRAÇÃO EM MEMBRANA

Para a esterilização das soluções estoque de bicarbonato de sódio (5% e 10%), de sulfeto de sódio (5% e 4%), de ditionito de sódio e de selenito de sódio, foi utilizado o método de filtração através de membrana. Após a distribuição os frascos foram fechados com tampas de butila e lacrados com selo de alumínio.

4.3.2.4. SOLUÇÕES ESTOQUE DE FONTES ACEPTORAS DE ELÉTRONS.

Sulfato de sódio (123g/L), tiosulfato de sódio (158g/L) e sulfeto de sódio (126g/L) foram utilizados como fontes de enxofre para o crescimento das bactérias redutoras do íon sulfato. Nitrato de sódio (85g/L) também foi utilizado na caracterização nutricional. Todas as soluções foram preparadas através da dissolução do sal em água ^{destilada} ultrapurificada. A esterilização foi feita em autoclave. A armazenagem foi feita em frascos de antibiótico,

Sulfeto (elementar)

fechados com tampa de butil e lacrados com selos de alumínio e mantidos sob temperatura ambiente, em ausência de luz.) *Sulfato (embalado no alumínio)*

4.3.2.5. SOLUÇÃO ESTOQUE DE BENZOATO DE SÓDIO

A solução foi preparada com concentração de ¹²60g/L, através do processo de esterilização por membrana, como descrito no item 4.2. Esse sal foi utilizado como fonte de carbono e doador de elétrons para as bactérias redutoras do íon sulfato. *+ flocculantes*

4.3.2.6. SOLUÇÕES ESTOQUE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

Foram preparadas soluções estoque dos seguintes compostos orgânicos: formiato de sódio (273,2g/L), fumarato de sódio (223,0g/L), piruvato de sódio (200,1g/L), propionato de sódio (192,1g/L), butirato de sódio (110,1g/L), lactato de sódio (224,2g/L), acetato de sódio (272,2g/L), malato de sódio (204,0g/L), glicose (180,2g/L), propanol (66,1g/L), metanol (32,0g/L), butanol (74,1g/L) e etanol (92,0g/L).

A preparação das soluções foi feita através da dissolução dos reagentes em água ultrapurificada e distribuídos em frascos de antibiótico, sob atmosfera de N₂ (100%) e autoclavadas. As soluções foram armazenadas em temperatura ambiente e ausência de luz.

4.3.2.7. SOLUÇÃO ESTOQUE DE LACTATO DE SÓDIO, FUMARATO DE SÓDIO E MALATO DE SÓDIO

Soluções de lactato de sódio e fumarato de sódio foram preparadas através da reação de neutralização das soluções 4M de ácido láctico e 4M de ácido fumárico e com solução 4M de hidróxido de sódio. A solução de malato de sódio foi preparada através da neutralização do ácido málico 4M e hidróxido de sódio 8M. O pH das soluções foi ajustado em 7,4. As soluções foram armazenadas em frascos de antibiótico, sob atmosfera de N₂ (100%).

4.3.2.8. SOLUÇÃO ESTOQUE EXTRATO DE LEVEDURA

A solução foi preparada através da dissolução de extrato de levedura em água ultrapura, e submetida à atmosfera de nitrogênio (100%) durante 20 minutos. As soluções foram distribuídas em frascos de antibióticos, sob fluxo de N₂, fechados com tampas de butila e lacrados com selo de alumínio. Os frascos foram autoclavados e armazenados em temperatura ambiente na ausência de luz.

4.4. DETERMINAÇÃO DE SULFATO

Novo A determinação de sulfato foi realizada através de método espectrofotométrico, em amostras diluídas utilizando *kit* Hach SULFAVER® ACCUVAC (APHA, 1998). Em meio ácido, sulfato de bário finamente dividido permanece em suspensão. A leitura da turbidez foi feita a 450nm, após cinco minutos. Foram utilizadas como branco amostras diluídas, sem cloreto de bário, para zerar o equipamento.

As amostras foram coletadas através de seringas hipodérmicas esterilizadas, filtradas pelo sistema Millipore, utilizando filtros de celulose de 1,2μm de diâmetro de poro; 2,0mL do filtrado foi diluído em balões volumétricos de 50mL com água ultrapurificada

4.5. DETERMINAÇÃO DE SULFETO TOTAL DISSOLVIDO

O método descrito por Quentin & Pachmeyer, modificado por Plas *et al.* (1992), foi utilizado para determinação do sulfeto total dissolvido dos reatores em batelada. A concentração de sulfeto total dissolvido foi determinada através de curva padrão previamente elaborada (anexo 1). Esse método foi escolhido por ser extremamente sensível e por requerer pequena quantidade de amostras, evitando assim, a retirada excessiva durante ensaios (Varesche, 1997).

As amostras foram coletadas por seringas hipodérmicas estéreis e filtradas em sistema Millipore, com filtro de celulose com 1.2μm de diâmetro de poro. Imediatamente, 200μL do filtrado foram transferidos a tubos contendo 10mL de solução de acetato de zinco 0,01M. Em seguida foi adicionado 1mL de solução de dimetil-*p*-fenilenodiamina (DMPD) e 70μL de solução de sulfato férrico amoniacal. Após a adição de cada solução os

tubos foram agitados vigorosamente. Os frascos foram mantidos na ausência de luz durante 20 minutos. A leitura de absorbância foi feita em comprimento de onda de 663nm. As soluções utilizadas nesse método estão descritas no quadro 2.

Quadro 2. Soluções para determinação do sulfeto total dissolvido.

Solução de acetato de zinco

- 20 g de acetato de zinco dihidratado P. A.;
- 0,2mL de ácido acético glacial P. A.;

Completar o volume para 1000 mL com água ultrapurificada.

Armazenar no escuro, sob refrigeração (4°C), por 30 dias.

Solução de sulfato férrico amoniacal

- 2mL de ácido sulfúrico 96%;
- 50 mL de água Milli-Q;
- 10 g de sulfato férrico amoniacal 99%.

Completar o volume para 1000 mL com água ultrapurificada.

Armazenar no escuro sob refrigeração (4°C), por 30 dias.

Solução de dimetil-*p*-fenilenodiamida (DMPD)

- 2,0g de DMPD dissolvido em 200 ml de água ultrapurificada sob banho de gelo;
- 200 mL de ácido sulfúrico (96%) adicionado lentamente;

Completar o volume com água ultrapurificada para 1000 mL.

Armazenar no escuro sob refrigeração (4°C) por 30 dias.

Fonte: Plas *et al.* (1992)

4.6. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.6.1. DETERMINAÇÃO DO METANO

Novo As análises de metano foram feitas através de cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo Gow-Mac, equipado com detector de condutividade térmica e colunas PORAPAK-Q (de análise) e PORAPAK-T (de referência), com partículas entre 80 a 100 mesh, ambas com 2 m de comprimento, 1/4" de diâmetro interno, utilizando hidrogênio

como gás de arraste e forno operando a 50°C. A retirada de amostra da atmosfera do reator, foi feita com seringa *gas tight*, com trava para gases.

4.6.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO E DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (1100 vs. 101)

Novo Ácido benzóico e ácidos orgânicos voláteis foram quantificados através de cromatógrafo a gás HP6890/FID, equipado com coluna HP (I&W) INNOWAX (Cross Linked Polyethylene) com 30m x 0,25mm e 0,25µm de espessura do filme. O injetor operou a 250°C, com razão de split: 20 e o forno a 100°C por 3 minutos até 180°C, a 15°C.min⁻¹ e até 200°C a 10°C.min⁻¹, permanecendo por 15 minutos. O detector de chamas operou a 300°C. Os gases utilizados foram hidrogênio (arraste), nitrogênio (gás auxiliar) e ar sintético com fluxos de 30 mL.min⁻¹, 33,1mL.min⁻¹ e 300 mL.min⁻¹, respectivamente. Utilizando-se de 2-clorofenol como padrão interno.

As amostras foram coletadas e armazenadas em frascos plásticos (1 mL) e mantidas no freezer para posterior extração. A preparação das amostras foi realizada através de metodologia descrita a seguir.

Procedimento:

- adicionar 1g de NaCl (P.A.) aos frascos; 1,5mL de amostra; 100µL de H₂SO₄ 1M; 100µL de 2-clorofenol; 0,5mL de éter purificado (gelado);
- agitar a amostra no agitador de tubos (vórtex) por 30 segundos;
- centrifugar por 1 minuto;
- manter a amostra no *freezer* até o momento da injeção;
- injetar 1,0 µL da fase orgânica no cromatógrafo.

Os resultados das concentrações, em mg/L foram obtidos através de curva de calibração.

4.7. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA

Novo Foram feitos exames microscópicos das amostras dos reatores, através de luz comum, contraste de fase e fluorescência em aparelho Olympus BX60-FLA, com sistema de câmera digital Optronics. As imagens foram captadas através do software *Image Pro-Plus*, versão 3.0.1, sendo possível observar e registrar os tipos morfológicos presentes nos ensaios.

Os exames foram feitos em amostras retiradas dos reatores através de agulhas e seringas hipodérmicas esterilizadas. Todas as amostras foram observadas em lâminas de vidro cobertas com filme de ágar 2% e lamínula. O ágar permite que as células permaneçam imóveis devido à retirada do excesso de água (Vazoller, 1995).

As células foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio eletrônico digital Zeiss DSM-960 (IFSC/USP). A metodologia utilizada para preparação das amostras foi descrita por Araújo (1995). Inicialmente, 10mL de amostras foram colocadas em tubos Falcon e centrifugadas a 6000rpm, durante 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante. A cada etapa que se segue abaixo, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 6000rpm.

O *pellet* restante foi fixado utilizando-se glutaraldeído (GTA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, gelado e deixado em geladeira por 12 horas (4°C). A amostra foi centrifugada e lavada em tampão fosfato 0,1M, pH7,3, por três vezes. Após lavagem, as amostras foram desidratadas usando soluções de etanol a 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, mantendo a amostra submersa em cada uma das soluções durante 10 minutos, sendo o último passo (etanol 100%) repetido por três vezes. A amostra foi imersa em solução de hexametildesilazane (HMDS) por 30 segundos e, em seguida, seca ao ar.

4.8. INÓCULO

Como mencionado anteriormente, em todo os experimentos realizados neste trabalho, o inóculo utilizado foi proveniente de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RHAF), de indústria fabricante de peróxidos orgânicos de Rio Claro-SP.

As espumas de poliuretano vindas do reator foram colocadas em frasco (1000mL) contendo pérolas de vidro (500 g, aproximadamente) e solução de cloreto de sódio (0,9%) previamente estéril. O sistema foi submetido à atmosfera de nitrogênio (100%), durante 20

minutos. Procedeu-se agitação manual em ângulo de 45°, durante 20 minutos para desprender o lodo presente no material suporte e posterior inoculação (Varesche, 1997).

4.9 . REATORES ANAERÓBIOS

Todos os reatores utilizados nos experimentos foram em batelada, com células planctônicas em volumes de 1000mL e 2000 mL, fechados com tampas de butila e rosca plástica. A Figura 10, mostra o tipo de reator anaeróbio utilizado neste trabalho.

Figura 10. Reator em batelada: (a) *headspace* (b) meio de cultura com células planctônicas.

4.10. ENRIQUECIMENTO DO LODO EM DIFERENTES MEIOS E COMPOSTOS

Para que fosse feito o enriquecimento do lodo despreendido do material suporte, primeiramente foram utilizados dois meios diferentes: (1) meio basal Zinder (Zinder & Koch, 1994) e (2) meio BRS (Widdel & Pfennig, 1984), específico para o crescimento de *Desulfosarcina*, destacando-se, principalmente, pela presença de 13,5g/L de cloreto de sódio, 2,0g/L de cloreto de magnésio e 3µg/L de selenito de sódio (Widdel & Pfennig, 1984).

Foram realizados dois testes específicos com meio BRS e um teste em meio basal Zinder. A Figura 11 mostra o fluxograma de ensaios realizados com o lodo anaeróbio. No ensaio com meio de cultura BRS, foi utilizado benzoato de sódio (600 mg/L) e compostos orgânicos não aromáticos, dispostos separadamente. No ensaio com meio Zinder foram utilizados compostos orgânicos não aromáticos como fontes de carbono. Foi determinada a concentração de metano em função do tempo nas três condições especificadas na Figura 11. Foram realizados exames do lodo em microscópio óptico de contraste de fase e fluorescência. Na Tabela 9 é possível observar as condições nutricionais utilizadas para o enriquecimento do lodo anaeróbio mesofílico proveniente do RAHLF. Os reatores foram operados em duplicata.

Figura 11. Fluxograma das condições experimentais utilizadas para enriquecimento do lodo anaeróbio mesofílico.

Sob condições de assepsia, frascos de Duran de 1000 mL, contendo os meios de cultura estéreis (365 mL, 374,6 mL e 400 mL) respectivamente, foram submetidos à atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70:30%), durante 20 minutos. Posteriormente, soluções estoques foram adicionadas ao meio, com auxílio de pipetas automáticas, com ponteiros esterilizados. Os reatores anaeróbios foram mantidos com volume final de reação de 500 mL e *headspace* de 500 mL. A redução do meio foi feita através da adição da solução de sulfeto de sódio.

Após a adição de 10% (v/v) do inóculo, ainda sob atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono, os frascos foram fechados, com tampa de butila e roscas plásticas. Nessa fase de enriquecimento os frascos foram mantidos sem agitação e temperatura de $33,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Foram feitas análises de metano e observações em microscópio óptico de contraste de fase da comunidade microbiana presente nos frascos.

Tabela 9. Condições nutricionais para enriquecimento do lodo anaeróbio.

Condição Nutricional	MEIOS DE CULTURA		
	Meio-BRS –	adaptado	Meio basal
	1	2	ZINDER
Atmosfera gasosa	N ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂
Solução de vitaminas	BRS	BRS	BRS
Bicarbonato de sódio	BRS	BRS	ZINDER
Solução redutora	BRS	BRS	ZINDER
Selenito de sódio	+	+	-
Ditionito de sódio	+	+	+
Sulfato (1000 mg/L)	+	+	+
Benzoato (600 mg/L)	+	-	-
Compostos orgânicos	-	*	*
Extrato de levedura 0,1%	-	+	+

*Acetato (2491,6mg/L) + lactato (2011,6mg/L) + propionato (1691,2mg/L) + butirato (1971,8mg/L) + formiato (2491,6mg/L) + glicose (1801,6mg/L) + etanol (920,0mg/L).

4.11. ENSAIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BENZOATO DE SÓDIO E SULFATO DE SÓDIO

Nesse experimento, as condições de montagem foram semelhantes às descritas no item 4.10. Foi usado meio BRS com diferentes concentrações de benzoato e sulfato no reator em batelada: condição (1) benzoato (890 mg/L) e sulfato (975 mg/L), condição (2) benzoato (680 mg/L) e sulfato (870,0mg/L), condição (3) benzoato (242,0 mg/L) e sulfato (400,0mg/L). A adição dos componentes e seus respectivos volumes estão demonstrados na Tabela 10. Após a adição do inóculo os reatores foram fechados com tampas de butila e

roscas de plástico. Os ensaios feitos em duplicata foram mantidos em agitação de 150 rpm, a temperatura constante de 33°C. Foram analisadas, as concentrações de benzoato, de sulfato, de sulfeto, de ácidos voláteis intermediários e de metano. O inóculo utilizado foi proveniente da condição (1) dos ensaio sob variações de cultivo, o qual obteve melhor comportamento para os estudos posteriores.

Tabela 10. Ensaio com diferentes concentrações de benzoato e sulfato.

Componentes	Volume (mL)		
	Ensaio1	Ensaio 2	Ensaio 3
	Relação 0,9	Relação 0,8	Relação 0,6
Meio BRS	749,3	649,3	659,6
Bicarbonato de sódio	100	100	100
Solução vitaminas	10,6	10	10
Benzoato de sódio	10	10,6	5,3
Sulfato de sódio	10	10	5
Selenito de sódio	0,1	0,1	0,1
Ditionito de sódio	10	10	10
Sulfeto de sódio	10	10	10
Inóculo (20%)	200	200	200
Volume total	1000	1000	1000

4.12. PURIFICAÇÃO

Para essa etapa foi utilizado o meio de cultura BRS. Foram realizadas purificações em meio líquido em frascos de antibiótico de 30 ml, sob condições de assepsia e anaerobiose. A Tabela 11 apresenta as condições utilizadas na diluição seriada e a Figura 12 apresenta, esquematicamente, o procedimento utilizado na diluição seriada.

A solução de diluição utilizada durante o processo de diluição seriada foi preparada utilizando meio para BRS, adicionando-se as mesmas substâncias dos ensaios em batelada, exceto benzoato de sódio e sulfato de sódio.

Tabela 11. Composição nutricional utilizado na condição de purificação.

Componentes	Volume (mL)
Meio BRS	7,49
Bicarbonato de sódio	1,0
Solução de vitaminas	0,1
Benzoato de sódio (600mg/L)	0,1
Sulfato de sódio (1000mg/L)	0,1
Selenito de sódio	0,01
Ditionito de sódio	0,1
Solução redutora	0,1
Inóculo (10%)	1,0
Volume total	10,0

Figura 12. Esquema de preparação e realização de diluições seriadas. Os frascos circundados em azul são os frascos utilizados como inóculo na etapa seguinte.

O inóculo foi transferido para o primeiro frasco de solução de diluição (10^{-1}), esse então foi transferido para o frasco seguinte (10^{-2}), e assim, sucessivamente até 10^{-10} . Esse procedimento foi realizado em todas etapas de diluição. Ao final das diluições, o frasco com melhor crescimento foi suspenso sequencialmente, como apresentado na Figura 13. Cada etapa de suspensão foi realizada durante 13 dias de incubação a 33°C , sendo a última utilizada como inóculo dos ensaios com cultura purificada.

Figura 13. Esquema de suspensão das células para obtenção de volume celular

4.13. ENSAIO COM CULTURA PURIFICADA PARA DIFERENTES RELAÇÕES DE SULFATO/BENZOATO

Após a purificação da cultura realizou-se experimento com diferentes relações benzoato/sulfato. Foi usado meio BRS no reator em batelada. O inóculo, proveniente da última suspensão, foi adicionado a tubos Falcon estéreis e centrifugado a 6000rpm durante 10 minutos, em centrífuga FANEM modelo 215, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em meio estéril, sem fontes de carbono e de enxofre. Aos reatores foram adicionados benzoato de sódio e sulfato de sódio em diversas concentrações, estabelecendo relações de concentrações benzoato/sulfato diferentes. As concentrações e relações foram as seguintes: ensaio (1) 600,0 mg/L de benzoato e 2000,0 mg/L de sulfato; ensaio (2), 606,0 mg/L de benzoato e 1000,0 mg/L de sulfato; ensaio (3), 600,0 mg/L de benzoato e 500,0 mg/L de sulfato; ensaio (4), 910,0 mg/L de benzoato e 500,0 mg/L de sulfato, respectivamente, relações de 0,3, 0,6, 1,2 e 1,8. A relação dos componentes e seus respectivos volumes estão na Tabela 12. Após a adição do inóculo os reatores foram fechados com tampas de butila e roscas de plástico. Os ensaios feitos em duplicata foram mantidos em agitação de 100 rpm, à temperatura de $33 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Foram analisadas,

degradação de benzoato, redução de sulfato, produção de ácidos intermediários e porcentagem de metano.

Tabela 12. Composição dos meios em ensaios com diferentes relações benzoato e sulfato.

Componentes	Volumes (mL)			
	Relações			
	0,3	0,6	1,2	1,8
Meio	739,9	749,9	754,9	749,9
Bicarbonato	100,0	100,0	100,0	100,0
Vitamina	10,0	10,0	10,0	10,0
Sulfato	20,0	10,0	5,0	5,0
Benzoato	10,0	10,0	10,0	15,0
Ditionito	10,0	10,0	10,0	10,0
Selenito	0,1	0,1	0,1	0,1
Redutora	10,0	10,0	10,0	10,0
Inóculo	100,0	100,0	100,0	100,0
Volume total	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
<i>Headsapce</i>	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0

4.14. CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS E FISIOLÓGICAS DA CULTURA PURIFICADA.

A análise de formação de esporos (DSM,1991) foi realizada através do aumento gradual de temperatura em banho-maria, partindo-se de 40°C, até atingir 80°C, permanecendo nessa temperatura por 10 minutos. Em seguida, observou-se as células em microscopia de contraste de fase, a fim de se verificar a presença de esporos. (Videla, 1996).

Para observação da presença da enzima desulfoviridina, sulfito-redutase específica de alguns gêneros de BRS, foram adicionadas gotas de NaOH 2N sobre a amostra disposta

em lâmina. Em seguida, observou-se as células em microscópio em luz ultravioleta à procura de zonas avermelhadas, associadas ao cromóforo sirohidroclorina característicos de desulfoviridina (Postgate, 1984).

Para medida do tamanho celular foram realizadas medidas em 135 células em fase exponencial, através de *software Image Pro Plus* versão 3.05.

4.15. VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E DO TEMPO DE GERAÇÃO

Para a quantificação celular foi adotada leitura de absorbância. Para isso, 3,0 ml de amostra foram colhidas de maneira asséptica e transferidas a tubos Falcon. Essas amostras foram centrifugadas a 6000rpm durante 10 minutos e temperatura de 25°C. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em água destilada e então submetidas à leitura de absorbância em 600nm, em espectrofotômetro.

Após a obtenção da cultura purificada, determinou-se a velocidade de crescimento na fase exponencial (μ), através de método gráfico descrito por Varesche (1997). Para a determinação da velocidade específica projetou-se valores de logaritmos neperianos da absorbância em função do tempo, identificando os pontos que sugerissem uma distribuição retilínea. Essa reta corresponde à fase exponencial de crescimento, quando a velocidade específica (μ) é máxima e constante. Através do cálculo de regressão linear dos pares de pontos, determinou-se a equação da reta, cujo coeficiente angular corresponde ao μ . O tempo de geração (T_g) foi determinado pela equação 12.

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (12)$$

4.16. CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DA CULTURA PURIFICADA.

O ensaio de caracterização nutricional consistiu inicialmente em fornecer diferentes fontes aceptoras de elétrons, tais como: sulfato (1000,0mg/L), sulfito (1030,0mg/L), tiosulfato (1350,0mg/L) e nitrato (620,0mg/L), bem como a não utilização de fontes aceptoras, para que fosse observado consumo das fontes de carbono. Como fontes de carbono foram utilizados os seguintes compostos: acetato (2041,6mg/L), benzoato (600,0

mg/L), butanol (741,0mg/L), butirato (1971,8mg/L), etanol (920,0mg/L), formiato (2491,6mg/L), fumarato (2000,0mg/L), glicose (1801,6mg/L), lactato (2011,6mg/L), malato (2040,0mg/L), metanol (320,0mg/L), piruvato (2001,0mg/L), propanol (661,0 mg/L), propionato (1691,2mg/L). Todos os ânions foram utilizados na forma de sais de sódio.

O inóculo utilizado foi enriquecido com benzoato (600mg/L). Após período de incubação de 15 dias, o material celular foi separado do meio líquido através de centrifugação a 6000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* resultante foi ressuspensão e homogeneizado em meio esterilizado sem sulfato e benzoato e depois transferido para os frascos de antibiótico.

Para esse ensaio foram utilizados triplicatas de frascos de antibiótico de 30ml, utilizando volume total de reação de 10mL. Os frascos foram incubados em estufa a $33 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em ausência de luz, durante quinze dias.

A análise da resposta fisiológica para esses compostos foi feita através de leitura de absorbância a 600nm e através de microscopia óptica.

Para padronizar a análise de crescimento nas diferentes condições foram adotados os seguintes parâmetros: (bom) absorbância acima de 0,500; (médio) absorbância entre 0,300 e 0,500; (baixo) absorbância entre 0,170 e 0,300 e (insignificante) absorbância entre 0,132 e 0,170. Abaixo de 0,132, não houve crescimento.

4.17. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE

Na caracterização microbiana foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos específicas para membros do Domínio Bactéria (EUB338), controle negativo (NON338) e bactéria redutora de sulfato (BRS), subdivisão delta de Proteobactéria (SRB385), com marcação fluorescente de rodamina na extremidade 5', conforme descrita na Tabela 13. A metodologia utilizada foi descrita por Hirasawa (2003); os protocolos utilizados foram descritos por Araújo (2001).

Tabela 13. Sondas de oligonucleotídeos para hibridação *in situ* fluorescente

Sonda	Especificidade	Sequência (5'→3')	Sítio do RNAr 16S*	Referências
NON338	Controle negativo	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	338-355	Manz <i>et al.</i> , 1992
EUB338	Domínio Bacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	338-355	Amann <i>et al.</i> , 1990
SRB385	Bactérias redutoras de Sulfato, mesofílicas, gram-negativas, da subdivisão delta de Proteobacteria e algumas gram-positivas	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	915-934	Stahl & Amann, 1991

*Posição RNAr 16S de acordo com a numeração de *Escherichia Coli*.

Fonte: Hirasawa, 2003

4.18. SEQUENCIAMENTO DA CULTURA PURIFICADA

Para análise de sequenciamento foram utilizadas células coletadas em amostras homogêneas da cultura planctônica purificada.

A extração de DNA foi realizada através de método direto, segundo metodologia desenvolvida por Griffiths *et al.* (2000), utilizando *glass beads* e mistura de fenol:clorofórmio:tampão (1:1:1 v/v). Para ampliação de um segmento de aproximadamente 880 pares de bases (pb) do ribossomo 16S em reações de PCR (*polimerase chain reaction*) foi utilizado eubacterial *primers* 27f (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 907r (5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3') seguindo metodologia descrita por So & Young (1999).

As amostras dos produtos de PCR (DNAr 16S) foram clonadas em plasmídeo pCR 2.1 TOPO-TA *easy vector system-Invitrogen*. Células competentes de *E. coli* DH α 5 foram transformadas com plasmídeo segundo metodologia descrita pelo fabricante. Os clones foram selecionados casualmente, sendo a presença do inserto verificada através de digestão com endonuclease *HhaI*. Foram sequenciados, até o momento, 15 clones. O sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado em sequenciador ABI 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer). Foram utilizados *primers* M13 *forward* e *reverse*. As sequências obtidas foram agregadas e alinhadas utilizando DNASTAR-package Software (Lasergene

Sequence Analysis). Após o alinhamento e averiguação da presença de quimeras, as seqüências de nucleotídeos foram comparadas com seqüências de banco de dados eletrônico NCBI-database, para aproximação da identidade filogenética (Chinalia *et al*, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ENRIQUECIMENTO SOB VARIAÇÕES DE CULTIVO

Nos enriquecimentos feitos com variações no meio de cultivo, sob condições mesofílica ($33\pm0,5^{\circ}\text{C}$), foi possível observar o comportamento do lodo, quanto à produção de metano e quanto ao crescimento das diferentes morfologias presentes. Em 20 dias de operação dos reatores nos três ensaios: (1) meio BRS com benzoato, (2) meio BRS com compostos orgânicos não aromáticos e (3) meio ZINDER com compostos orgânicos não aromáticos.

A Figura 14 mostra a porcentagem de metano produzida em função do tempo para os ensaios em batelada nas seguintes condições: (2) em meio BRS com compostos orgânicos não aromáticos e (3) meio ZINDER com compostos orgânicos não aromáticos. Na condição (3), a porcentagem máxima de metano foi de 35% em 476 horas (aproximadamente 20 dias) de operação. Na condição (2), esse valor foi de 6%, no mesmo período de operação. Na condição (1), em meio BRS com benzoato de sódio, não houve produção de metano, no mesmo período.

Figura 14. Produção de metano em função do tempo, em diferentes condições nutricionais:

- (2) Meio BRS com compostos orgânicos não aromáticos;
- (3) Meio ZINDER com compostos orgânicos não aromáticos.

Portanto, os resultados apresentados na Figura 14 mostram que as três condições nutricionais foram seletivas para o crescimento de microrganismos anaeróbios, e conseqüentemente, influenciaram na produção de metano. Além disso, é importante ressaltar, novamente, as características sulfetogênicas do inóculo proveniente do reator anaeróbio usado no tratamento de água residuária contendo sulfato e peróxidos orgânicos. Desse modo, mesmo na presença de compostos orgânicos não aromáticos que favorecem a fermentação (acetato, propionato, lactato, butirato, formiato, etanol e glicose) e, conseqüentemente, a metanogênese, a porcentagem máxima de metano obtida foi em torno de 35%. FATIBELLO (2000), obteve valor de aproximadamente 70% para sedimento do reservatório de Salto Grande – S. P., utilizando a mesma condição nutricional empregada neste trabalho (condição 3).

Nas condições em que o meio BRS foi utilizado, também houve crescimento preferencial de algumas morfologias distintas na presença de benzoato em relação aos demais compostos orgânicos. Como mencionado anteriormente, em presença de benzoato a produção de metano não foi favorecida.

Nas condições experimentais (2) e (3), com meio BRS e ZINDER, respectivamente, foi observada a predominância de vibrios semelhantes a *Desulfovibrio*, pertencente às bactérias redutoras do íon sulfato, bacilos retos e cocos isolados ou agrupados. Em relação às arqueas metanogênicas, foram observados alguns bacilos, cocos e sarcinas fluorescentes.

Na condição (1), em meio BRS com benzoato de sódio foi observado o predomínio de cocos isolados ou na forma de sarcinas. Pelas características morfológicas associadas à não fluorescência e sem produção de metano, foi possível indicar semelhança ao gênero *Desulfosarcina*. Segundo Widdel & Pfennig (1984), esses microrganismos desenvolvem-se na forma de pacotes semelhantes às sarcinas e repetidas transferências em meio líquido favorecem o desenvolvimento de células isoladas na forma elipsoidal ou na forma de cocos. Segundo esses autores, para favorecer o crescimento de tais células, são necessárias as presenças de pelo menos 1,0% de cloreto de sódio e 0,2% de cloreto de magnésio no meio de cultura. Neste trabalho foram utilizadas concentrações desses sais de 1,35% e 2,0%, respectivamente. Esses microrganismos realizam metabolismo quimiorganotrófico ou quimioautotrófico, usando formiato, acetato, propionato, butirato, álcool e benzoato, ou compostos aromáticos similares, como doadores de elétrons para respiração anaeróbia e

também como fontes de carbono, e são oxidados completamente a dióxido de carbono (Widdel & Pfennig, 1984).

É importante destacar também que no inóculo original proveniente do biofilme do RAHLF foram observados arranjos celulares semelhantes a *Desulfosarcina* sp. Provavelmente, esses organismos cresceram em tais condições pela presença de sulfato e compostos aromáticos.

A Tabela 14 mostra as morfologias observadas no inóculo proveniente do reator anaeróbico e nas condições nutricionais (1), (2) e (3). A Figura 15 apresenta as morfologias observadas em microscopias realizadas com amostras do inóculo utilizadas para os ensaios seletivos em meios de cultura. As Figuras 16, 17 e 18 mostram as diferentes formas celulares encontradas nos reatores em batelada. Mesmo sendo observadas por fluorescência arqueas metanogênicas, no reator da condição (1) não ocorreu produção de metano.

Figura 15. Células observadas em microscopia de contraste de fase da biomassa proveniente do RAHLF de indústria de peróxidos orgânicos: (a) cocos e bacilos retos; (b) sarcinas; (c) sarcinas e (d) cocos e cisto de sarcina.

Aumento: 1500x

Tabela 14. Frequência das morfologias das células presentes nos reatores em batelada com diferentes condições nutricionais.

Condições nutricionais				
Morfologias	Inóculo	Meio	BRS	Meio ZINDER e compostos orgânicos não aromáticos
		Benzoato	Compostos orgânicos não aromáticos	
Arqueas				
metanogênicas				
Methanosarcina sp.	+++	++	++	+++
Cistos de sarcinas	+++	+++	++	+++
Bacilos				
fluorescentes	++++	-	++	+++
Bacilos curvos				
fluorescentes	++++	-	+++	++++
Cocos fluorescentes	++++	++	+++	++++
Bactérias				
Bacilos com extremidades				
afiladas	+++	+	+	+++
Bacilos com extremidades				
arredondadas	++++	++	++	+++
Bacilos curvos	++++	++	+	+++
Bacilos em cadeia	++	-	-	-
Cocos	++++	+++	-	++
Sarcinas	++	++++	++	+
Filamentos	+++	-	-	-

(+++++) predominantes, (++++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (±) raros, (-) não observados

Figura 16. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência nas amostras dos reatores alimentados com meio BRS e benzoato de sódio: (a) sarcinas não fluorescentes; (b) cocos não fluorescentes; (c) cistos de *Methanosarcina* e (d) cistos de *Methanosarcina* com fluorescência.

Aumento: 1500x

Figura 17. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência nas amostras dos reatores alimentados com meio BRS e compostos orgânicos não aromáticos: (a) e (b) cistos de sarcinas; (c) e (d) sarcinas não fluorescentes e sarcinas fluorescentes semelhantes a *Methanosarcina*.

Aumento: 1500x

Figura 18. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência nas amostras dos reatores alimentados com meio ZINDER e composto orgânico não aromáticos: (a) e (b) cistos de *Methanosarcina*; (c) cocos e (d) cocos fluorescentes.

Aumento: 1500x

5.2. ENSAIOS UTILIZANDO CULTURA ENRIQUECIDA

Os ensaios com diferentes concentrações de sulfato e de benzoato foram realizados com a finalidade de se estudar o potencial de utilização desses compostos pela cultura sulfetogênica. Os sistemas foram montados em duplicata, submetidos à agitação de 150rpm e temperatura de 33°C. O inóculo utilizado foi proveniente da condição nutricional (1) do ensaio sob variações de cultivo, por apresentar melhor desempenho quanto à condição sulfetogênica.

Foram monitoradas três condições de alimentação: (1) com 890 mg/L de benzoato e 975 mg/L de sulfato, (2) com 680 mg/L de benzoato e 870 mg/L de sulfato e (3) com 242 mg/L de benzoato e 400 mg/L de sulfato, respectivamente, relações de 0,9, 0,8 e 0,6.

Na condição (1), os reatores anaeróbios em batelada não produziram metano. Os reatores da condição (2) produziram, aproximadamente, 0,32% de metano, após 1145 horas de operação. Na condição (3), o valor obtido também foi baixo e igual a 0,76%, após o mesmo período de operação.

Na condição (1), a remoção de benzoato, redução do sulfato e produção de sulfeto total dissolvido, foram iguais a 71,2%, 98% e 151,7mg/L, respectivamente, após 220 horas de incubação (Figura 19). Nessa condição não houve monitoramento da concentração de acetato.

A remoção do benzoato, na condição (2), atingiu 97% de eficiência com redução do sulfato de 99,9%, após 269 horas de operação (Figura 20). A produção máxima de sulfeto total dissolvido foi de 125,6 mg/L. A produção de acetato a partir da degradação do benzoato atingiu valor de 68,5mg/L, no mesmo período.

Nos reatores da condição (3), com concentrações inferiores de benzoato e sulfato iguais a 242 mg/L e 400mg/L, respectivamente, a sulfetogênese foi reduzida, ou seja, ocorreu redução de apenas 15% da fonte de enxofre, com produção máxima de sulfeto dissolvido de 26,3 mg/L (Figura 21). A produção de acetato a partir do benzoato foi de 44,2 mg/L. Nesse caso, a metanogênese também foi extremamente reduzida. O consumo de benzoato atingiu eficiência de 91,3%.

Nas condições (2) e (3), além de acetato, ocorreram produções de ácidos propiônico, valérico, isovalérico, butírico e isobutírico em concentrações abaixo de 900µg/L.

Na Tabela 15 estão apresentados as porcentagens de remoção de sulfato, produção de sulfeto e utilização do benzoato em todos ensaios.

Figura 19. Variações temporais de benzoato, sulfato e sulfeto em reator anaeróbio em batelada alimentado com relação benzoato/sulfato de 0,9.

Figura 20. Variações temporais de benzoato, sulfato e sulfeto em reator anaeróbio em batelada alimentado com relação benzoato/sulfato de 0,8.

Figura 21. Variações temporais de benzoato, sulfato e sulfeto em reator anaeróbio em batelada alimentado com relação benzoato/sulfato de 0,6.

Tabela 15. Concentrações iniciais de sulfato e de benzoato e suas porcentagens de remoção nos ensaios em batelada com cultura enriquecida.

Condições de operação	Relações		
	0,9	0,8	0,6
Benzoato (mg/L)	890,0	680,0	242,0
Sulfato (mg/L)	975,0	870,0	400,0
Tempo (h)	220	269	269
Resultados finais			
Utilização de benzoato (%)	71,2	97,0	91,3
Remoção de SO ₄ ²⁻ (%)	98,0	99,9	15,0
Produção de sulfeto dissolvido (mg/L)	151,7	125,6	26,3

Nos ensaios realizados por FANG *et al.* (1997), em reatores UASB, com duração de 70 dias, as concentrações iniciais foram de 730 mg/L de benzoato de sódio e 1800 mg/L de sulfato de sódio. Os autores obtiveram 99,5% de remoção do composto orgânico e redução da fonte de enxofre de 39,6%. Portanto, considerando-se os valores de eficiência, verifica-se que a relação obtida pelos autores foi igual a 1, ou seja, em tal sistema de operação contínua foi possível metabolizar 726,3 mg/L de benzoato e reduzir 712,8 mg/L de sulfato, aproximadamente, em consórcios microbianos imobilizados em grânulos anaeróbios.

Neste trabalho, com cultura enriquecida mantida em crescimento planctônico, observou-se remoção elevada, principalmente para relação 0,8. No entanto, aproximadamente 269 horas de operação foram necessárias para que tal fato ocorresse. Os resultados mostraram ainda que a cultura enriquecida apresentou comportamento semelhante para as relações 0,9 e 0,8. As concentrações foram distintas para ambas as relações, no entanto, os valores de remoção obtidos após 220h e 269h, respectivamente, sugeriram comportamento semelhante, com ligeira vantagem na relação 0,9. Em valores práticos, após o período de operação estabeleceu-se relação de 0,6 para as duas condições.

Na relação 0,6, com concentrações menores dos compostos, os resultados sugerem que ocorreu, preferencialmente, a degradação do benzoato por fermentação, inviabilizando quase que por completo a redução de sulfato. Esse fato pode ser comprovado observando a Figura 21, pois, mesmo após a estabilização da concentração de sulfato, o benzoato continuou sendo consumido pelos microrganismos presentes, fato este que somente pode ocorrer via fermentação, já que não havia nenhuma outra fonte para respiração.

Provavelmente, neste trabalho, a alta capacidade de remoção de sulfato para a relação 0,9, deveu-se ao predomínio de bactérias redutoras do íon sulfato, principalmente semelhantes a *Desulfosarcina*. Foram observados também cocos isolados, bacilos retos, bacilos curvos e filamentos não fluorescentes. Foram visualizadas as presenças de arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina*, cocos e cistos fluorescentes. Na Figura 22 estão apresentadas as morfologias presentes nesses ensaios.

Na relação de 0,8 predominou, principalmente, células semelhantes a *Desulfococcus* sp; embora outras semelhantes a *Desulfosarcina* também foram visualizadas (Figura 23). Na relação 0,6 ocorreu o predomínio de bacilos com extremidades arredondadas (Figura 24).

Para todas relações estudadas foram observadas células de arqueas metanogênicas semelhantes a cocos e sarcinas. Provavelmente, a presença de tais microrganismos justifica-se pelo acetato produzido na degradação do benzoato. A Tabela 16, apresenta as frequências morfológicas observadas nesses ensaios.

Os resultados mostraram que a degradação de benzoato e a redução de sulfato foram favorecidas nas relações 0,8 e 0,9. Esse fato deveu-se, principalmente, às etapas de enriquecimento, realizadas anteriormente em condições semelhantes, e associados à presença de BRS no inóculo inicial.

Segundo Widdel (1988), são necessários 2,5mg/L de sulfato para que cada miligrama de benzoato seja consumido, (relação de 0,4) (Equação 1). Em nenhuma das condições

estudadas ocorreu essa relação, pois as quantidades de sulfato estavam abaixo da necessidade teórica. Entretanto, as bactérias presentes foram eficazes na remoção do benzoato. Portanto, para a relação 0,6, provavelmente, a degradação de benzoato via redução de sulfato foi de apenas 15%. Nesse caso, portanto, o metabolismo predominante foi a fermentação do benzoato, atingindo eficiência de 91,3%. No entanto, destaca-se que sob tal condição ocorreu a mudança do metabolismo associado, provavelmente, com alteração do predomínio celular. Embora não obedecendo a proporção estequiométrica sugerida por Widdel (1988), para as outras relações, observou-se favorecimento da redução do sulfato e predomínio de morfologias semelhantes à BRS. Tal fato, justifica-se, principalmente, pelas características do inóculo provenientes do RAHLF de indústria de peróxidos orgânicos, alimentado com aproximadamente 20000mg/L de sulfato.

Tabela 16. Frequência das morfologias das células presentes nos reatores em batelada com diferentes concentrações de sulfato e benzoato.

Condições nutricionais				
Morfologias	Inóculo	Relação 0,9	Relação 0,8	Relação 0,6
Arqueas				
metanogênicas				
<i>Methanosarcina</i> sp.	++	++	++	++
Cistos de sarcinas	+++	+++	+++	+++
Bacilos fluorescentes	-	-	-	-
Bacilos curvos				
fluorescentes	-	-	-	-
Cocos fluorescentes	++	++	+++	+++
Bactérias				
Bacilos com				
extremidades				
arredondadas	++	+++	++	++++
Bacilos curvos	++	+++	++	+++
Bacilos em cadeia	+	+	+	+
Cocos	++++	++++	+++	++
Sarcinas	+++	++++	++++	++

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

Figura 22. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência em amostras dos reatores alimentados com benzoato e sulfato, na relação de 0,9: (a) sarcinas; (b) sarcinas fluorescentes e não fluorescentes e *Methanosarcina* sp.; (c) sarcinas não fluorescentes e (d) *Methanosarcina* sp.

Aumento: 1500x

Figura 23. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência em amostras dos reatores alimentados com benzoato e sulfato, na relação de 0,8: (a) cocos; (b) cocos fluorescentes; (c) e (d) sarcinas não fluorescentes e cisto de *Methanosarcina* sp. Aumento: 1500x

Figura 24. Morfologias observadas por microscopia de contraste de fase e fluorescência em amostras dos reatores alimentados com benzoato e sulfato, na relação de 0,6: (a) e (b) cocos, bacilos com extremidade arredondada, bacilos curvos e filamentos; cocos fluorescentes; (c) e (d) cisto de *Methanosarcina* sp. e sarcina não fluorescente

Aumento: 1500x

5.3. PURIFICAÇÃO

A biomassa crescida em benzoato (600 mg/L) e sulfato (1000 mg/L) foi utilizada como inóculo nas diluições decimais seriadas. Cada diluição teve período de inoculação de 20 dias e intervalos de 5 dias entre cada ensaio, a fim de se obter isolamento da cultura. A Figura 25 apresenta o procedimento e as diluições utilizadas nas etapas seguintes. Todas as diluições foram realizadas de 10^{-1} a 10^{-10} .

Figura 25 Esquema de diluições decimais seriadas utilizadas

Após vinte dias de incubação, o frasco que apresentou melhor crescimento foi a diluição de 10^{-7} ; porém foi possível observar vários contaminantes. Após o período de incubação, os frascos foram levados à geladeira para repouso durante 5 dias. Na segunda série de diluição utilizou-se, como inóculo, o frasco 10^{-7} . Os novos frascos foram incubados durante 20 dias. Posteriormente, exames microscópicos mostraram que no frasco 10^{-6} ocorreu melhor crescimento, sendo então escolhido como inóculo da diluição III. Após 20 dias o frasco 10^{-6} foi escolhido por apresentar melhor crescimento, porém, ainda era possível observar a presença de bacilos e predominância de cocos fluorescentes.

As células contidas no frasco 10^{-6} da etapa anterior foram ressuspensas em volume final de 50mL para aumento da biomassa. Desse reator foram utilizados 15% (v/v) como inóculo para crescimento com volume final de 100mL, e assim, sucessivamente, para volumes finais de 250mL, 500mL e 1000mL. Todos esses processos foram realizados utilizando meio BRS e condição nutricional com benzoato (600mg/L) e sulfato (1000mg/L), em temperatura de $33^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e anaerobiose durante 20 dias. Os frascos de 500mL e de 1000mL foram mantidos sob agitação de 150rpm.

5.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DA CULTURA PURIFICADA

Após ensaio fisiológico de crescimento, durante período de 10 dias em meio BRS modificado, realizou-se medição para se determinar, na fase exponencial, o tamanho celular. Os cocos apresentaram diâmetro médio de $1,8\pm 0,2\mu\text{m}$, no contraste de fase.

Para testes com coloração de Gram as células se mostraram gram-negativas. Nas análises de formação de esporos não houve a formação dos mesmos. No teste realizado para desulfoviridina o exame foi positivo. A Figura 26 apresenta os cocos em microscopia de contraste de fase, fluorescência e eletrônica de varredura, obtidos através de purificação celular. A fluorescência apresentada pelos cocos (Figura 26b) pode ser devido a presença de coenzimas (NAD(P)H, flavinas) envolvidas estritamente no metabolismo energético. As propriedades fluorescentes são fortemente dependentes do seu estado oxidativo de liberação de energia (Brock *et al*, 1997).

A Coenzima F_{420} , flavina derivativa fluorescente, é utilizada como ferramenta preliminar para identificar microrganismos metanogênicos. Embora essa coenzima seja importante na metanogênese, em outros microrganismos existem cofatores similares ao F_{420} , como os detectados em arqueas redutoras de sulfato e em várias bactérias, incluindo *Streptomyces* e algumas cianobactérias (Brock *et al*, 1997).

Figura 26. Microscopias da cultura purificada em contraste de fase: (a) cocos e bacilos (b) cocos fluorescentes, (c) cocos gram-negativos; em microscopia eletrônica de varredura: (d) cocos e bacilos com extremidades arredondadas.

Neste trabalho foi realizada, também, a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), com sonda (SRB385) para bactérias redutoras de sulfato, mesofílicas, gram-negativas, da subdivisão delta de Proteobacteria e algumas gram-positivas. Os resultados obtidos foram positivos, indicando se tratar de células de BRS. Todavia, destaca-se também a redução de sulfato, obtida nos ensaios anteriores confirmando a presença de tais microrganismos.

Para seqüenciamento do DNAr 16S, foram analisados 15 clones das amostras. Foi necessário, antes do seqüenciamento, averiguar se o clone possuía o inserto de DNA de tamanho desejado e se existiam diferenças na seqüência dos nucleotídeos. Após a confirmação, os clones selecionados foram seqüenciados. Cada seqüência possui uma porção de nucleotídeos pertencentes ao plasmídeo e outra correspondente ao inserto desejado. A porção pertencente ao plasmídeo foi utilizada para auxiliar no alinhamento e distinguir as seqüências semelhantes e diferentes.

A análise dos 15 clones obtidos do reator alimentado com benzoato/sulfato revelou 99% de semelhança com a sequência de *Desulfococcus multivorans*. Esta espécie é redutora de sulfato e sua capacidade de degradar poluentes orgânicos já foi descrita (Widdel e Pfennig, 1982; Widdel, 1984). O potencial de metabolização de benzoato por *Desulfococcus* tem importância estratégica, pois essa substância é um dos intermediários na degradação de diversos compostos aromáticos (Knoll & Winter, 1989; Beller, 1996; England *et al.*, 1997).

Os resultados morfológicos e fisiológicos obtidos neste trabalho foram confirmados pela descrição feita por Widdel (1988) no manual de sistemática bacteriológica Bergey's.

5.5. CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DA CULTURA PURIFICADA

Para o ensaio de caracterização nutricional, as células utilizadas como inóculo, foram provenientes da purificação celular com benzoato (600,0mg/L) e sulfato (1000,0mg/L), onde era possível observar o predomínio de cocos fluorescentes e raros bacilos não fluorescentes.

O ensaio de caracterização nutricional consistiu, inicialmente, em avaliar-se o crescimento sob diferentes fontes aceptoras de elétrons: sulfato (1000,0mg/L), sulfito (1030,0mg/L), tiosulfato (1350,0mg/L) e nitrato (620,0mg/L) e condição de fermentação. Como fontes de carbono foram utilizados os seguintes compostos: acetato (2041,6mg/L), benzoato (600,0 mg/L), butanol (741,0mg/L), butirato (1971,8mg/L), etanol (920,0mg/L), formiato (2491,6mg/L), fumarato (2000,0mg/L), glicose (1801,6mg/L), lactato (2011,6mg/L), malato (2040,0mg/L), metanol (320,0mg/L), piruvato (2001,0mg/L), propanol (661,0 mg/L) e propionato (1691,2mg/L). As concentrações utilizadas nesse ensaio as normalmente, utilizadas para crescimento anaeróbio mesofílico (Silva (b), 1999). As respostas de crescimento foram avaliadas através de leitura de absorbância e de exames microscópicos.

Os ensaios fisiológicos foram conduzidos no período de 10 dias. O período foi obtido observando o máximo crescimento (0,515) da cultura em benzoato (606mg/L) e sulfato (1000mg/L) (Figura 36).

Como controle de crescimento foi utilizado o frasco contendo benzoato/sulfato por se tratar da fonte de carbono utilizada em todos os ensaios anteriores e por conter uma cultura adaptada a essa fonte de carbono. O valor inicial de absorbância do inóculo

mostrado na Figura 27, foi de 0,132. Após 10 dias, o ensaio controle apresentou absorvância de 0,400.

A manutenção da predominância dos cocos presentes no inóculo foi observada com sulfato e as seguintes substâncias: acetato, benzoato (controle), butanol, butirato, formiato, metanol, propanol e propionato. Porém, o crescimento com valores de absorvância maiores que o de controle foram observados somente com butirato (0,468) e propanol (0,579). No entanto, os valores de absorvância com acetato (0,242), butanol (0,336), formiato (0,168), metanol (0,152) e propionato (0,275) ficaram abaixo do valor obtido no controle.

Utilizando-se sulfito como fonte de enxofre, a predominância dos cocos foi observada em: acetato, benzoato, butanol, butirato, metanol, propanol e propionato, porém o crescimento acima do valor controle foram obtidos com butanol (0,585), butirato (0,687) e propanol (0,450). Para acetato (0,391), benzoato (0,282), metanol (0,158) e propionato (0,321), os valores foram inferiores ao do controle.

Quando a fonte de enxofre foi tiosulfato, a predominância foi mantida em: acetato, benzoato, butirato, etanol, metanol, propanol e propionato. Os compostos que apresentaram valores acima do controle foram: butirato (0,900), etanol (0,667), propanol (0,526) e propionato (0,425). Para as outras fontes os valores foram abaixo do que do controle, ou seja, acetato (0,349), benzoato (0,305) e metanol (0,182).

Estes resultados demonstraram que quando se utilizou sulfato, propanol proporcionou o melhor crescimento (0,589). No entanto, na presença de sulfito e tiosulfato as melhores respostas foram obtidas com butirato, com valores de absorvância iguais a 0,687 e 0,900, respectivamente.

Quando se alterou a fonte aceptora de elétrons para nitrato, nenhum valor de crescimento foi superior ao do controle. Os valores de absorvância obtidos nas condições de predominância dos cocos foram acetato/nitrato (0,199), benzoato/nitrato (0,251), butirato/nitrato (0,251), formiato/nitrato (0,221), fumarato/nitrato (0,136), glicose/nitrato (0,143), malato/nitrato (0,173), metanol/nitrato (0,150), propanol/nitrato (0,309) e propionato/nitrato (0,234).

Em algumas condições ocorreram mudanças da morfologia predominante como em glicose/sulfato, glicose/sulfito, glicose/tiosulfato e etanol/nitrato, quando bacilos que antes eram raros passaram a predominar. Pode-se observar, também, a partir dos resultados, que os cocos não cresceram favoravelmente com glicose. Com etanol/nitrato, os bacilos alcançaram valor superior ao do controle e igual a 0,506.

A fermentação foi observada somente em lactato (0,204) e piruvato (0,246). Nas demais condições, o crescimento foi reduzido, com valores de absorbância na faixa entre 0,015 e 0,095. Segundo Widdel (1988), *Desulfococcus multivorans* é capaz de fermentar piruvato ou lactato a acetato e propionato. Ainda, no caso da fermentação do piruvato, onde ocorreu co-dominância, os bacilos, provavelmente utilizaram esse composto juntamente com os cocos ou utilizaram propionato ou acetato resultantes.

Em outras condições de alimentação ocorreu presença de cocos e bacilos, situações observadas na presença de: (1) etanol/sulfato (0,518), fumarato/sulfato (0,722), lactato/sulfato (0,628), malato/sulfato (0,586) e piruvato/sulfato (0,606); (2) etanol/sulfito (0,410), formiato/sulfito (0,162), fumarato/sulfito (0,853), lactato/sulfito (0,537), malato/sulfito (0,569) e piruvato/sulfito (0,527); (3) butanol/tiosulfato (0,401), formiato/tiosulfato (0,146), fumarato/tiosulfato (0,555), lactato/tiosulfato (0,636), malato/tiosulfato (0,395) e piruvato/tiosulfato (0,536); (4) os valores em nitrato foram superiores quando a cultura se manteve em co-dominância de cocos/bacilos com butanol (0,541) lactato (0,717) e inferior para piruvato (0,294).

Nas situações de co-dominância, onde a absorbância medida foi inferior ao controle, provavelmente, ocorreu competição pelo substrato ou as células não foram capazes de utilizar o composto para crescimento. Nas situações em que a absorbância foi maior, pode estar ocorrendo utilização compartilhada do composto ou uma está consumindo o produto da outra, isto é, enquanto os cocos consomem a fonte de carbono fornecida, os bacilos consomem o composto intermediário ou final resultante do metabolismo dos cocos ou vice-versa; estabelecendo interação de protocooperação.

Os resultados demonstraram que a utilização de fontes aceptoras de elétrons, sulfato, sulfito e tiosulfato, resultaram em maior crescimento, demonstrando que as bactérias presentes nos ensaios eram redutoras de sulfato. Segundo Widdel (1988), *Desulfococcus multivorans* não é capaz de desnitrificar. O crescimento em nitrato pode ser resultante da fermentação de lactato e de piruvato, pelos cocos, como mencionado anteriormente. Dessa maneira, como o nitrato fornecido não foi monitorado, pode não ter sido utilizado. O crescimento em etanol/nitrato foi devido, provavelmente, à utilização do nitrato ou à fermentação do etanol pelos bacilos.

Nas Tabelas 17, 18, 19, 20 e 21, são apresentados os resultados de absorbância. As Figuras 27 e 28 apresentam as culturas predominantes dos ensaios de caracterização nutricional.

Figura 27. Morfologias observadas em microscopia de contraste de fase, de amostras obtidas do ensaio de caracterização nutricional: (a) predomínio de cocos em benzoato/sulfato; (b) co-dominância em piruvato/sulfato; (c) predomínio de cocos e bacilos em butirato/sulfito; (d) cocos em butirato/nitrato e (e) e (f) predomínio de bacilos em etanol/nitrato.

Figura 27. Valores de biomassa, expressos em absorbância, obtidos do ensaio de caracterização nutricional.

(**bom**): absorbância acima de 0,500

(**médio**): absorbância entre 0,300 e 0,500,

(**baixo**): absorbância entre 0,170 e 0,300

(**insignificante**): absorbância entre 0,132 e 0,170.

Abaixo de 0,132: não houve crescimento.

Tabela 17. Valores de absorbância e culturas predominantes obtidos em crescimento com sulfato.

Fontes de carbono	Absorbância (600 nm)	Cultura predominante
Acetato	0,242	Cocos
Benzoato	0,400	Cocos
Butanol	0,336	Cocos
Butirato	0,468	Cocos
Etanol	0,518	Cocos/bacilos
Formiato	0,168	Cocos
Fumarato	0,722	Cocos/bacilos
Glicose	0,142	Bacilos
Lactato	0,628	Cocos/bacilos
Malato	0,586	Cocos/bacilos
Metanol	0,152	Cocos
Piruvato	0,606	Cocos/bacilos
Propanol	0,579	Cocos
Propionato	0,275	Cocos

Tabela 18. Valores de absorbância e culturas predominantes obtidos em crescimento com sulfito.

Fontes de carbono	Absorbância (600 nm)	Cultura predominante
Acetato	0,391	Cocos
Benzoato	0,282	Cocos
Butanol	0,585	Cocos
Butirato	0,687	Cocos
Etanol	0,410	Cocos/bacilos
Formiato	0,162	Cocos/bacilos
Fumarato	0,853	Cocos/bacilos
Glicose	0,139	Bacilos
Lactato	0,537	Cocos/bacilos
Malato	0,569	Cocos/bacilos
Metanol	0,158	Cocos
Piruvato	0,527	Cocos/bacilos
Propanol	0,450	Cocos
Propionato	0,321	Cocos

Tabela 19. Valores de absorbância e culturas predominantes obtidos em crescimento com tiosulfato.

Fontes de carbono	Absorbância (600 nm)	Cultura predominante
Acetato	0,349	Cocos
Benzoato	0,305	Cocos
Butanol	0,401	Cocos/bacilos
Butirato	0,900	Cocos
Etanol	0,667	Cocos
Formiato	0,146	Cocos/bacilos
Fumarato	0,555	Cocos/bacilos
Glicose	0,143	Bacilos
Lactato	0,636	Cocos/bacilos
Malato	0,395	Cocos/bacilos
Metanol	0,182	Cocos
Piruvato	0,536	Cocos/bacilos
Propanol	0,526	Cocos
Propionato	0,425	Cocos

Tabela 20. Valores de absorbância e culturas predominantes obtidos em crescimento com nitrato.

Fontes de carbono	Absorbância (600 nm)	Cultura predominante
Acetato	0,199	Cocos
Benzoato	0,251	Cocos
Butanol	0,541	Cocos/bacilos
Butirato	0,251	Cocos
Etanol	0,506	Bacilos
Formiato	0,221	Cocos
Fumarato	0,136	Cocos
Glicose	0,143	Cocos
Lactato	0,717	Cocos/bacilos
Malato	0,173	Cocos
Metanol	0,150	Cocos
Piruvato	0,294	Cocos/bacilos
Propanol	0,309	Cocos
Propionato	0,234	Cocos

Tabela 21. Valores de absorbância e culturas predominantes obtidos em crescimento apenas com compostos orgânicos.

Fontes de carbono	Absorbância (600 nm)	Cultura predominante
Acetato	0,095	Cocos
Benzoato	0,073	Cocos
Butanol	0,040	Cocos
Butirato	0,014	Cocos
Etanol	0,069	Cocos
Formiato	0,055	Cocos
Fumarato	0,067	Cocos
Glicose	0,015	Cocos
Lactato	0,204	Cocos
Malato	0,012	Cocos/bacilos
Metanol	0,070	Cocos
Piruvato	0,246	Cocos/bacilos
Propanol	0,091	Cocos
Propionato	0,066	Cocos

5.6. ENSAIOS COM DIFERENTES RELAÇÕES SULFATO/BENZOATO PARA CULTURA PURIFICADA

Os ensaios com diferentes relações benzoato/sulfato foram realizados com a finalidade de estudar a utilização desses compostos pelos microrganismos presentes, principalmente cultura de cocos, predominante no inóculo.

As relações benzoato/sulfato foram estabelecidas utilizando as seguintes concentrações: ensaio (1), 600,0 mg/L de benzoato e 2000,0 mg/L de sulfato; ensaio (2), 606,0 mg/L de benzoato e 1000,0 mg/L de sulfato; ensaio (3), 600,0 mg/L de benzoato e 500,0 mg/L de sulfato; ensaio (4), 910,0 mg/L de benzoato e 500,0 mg/L de sulfato, respectivamente relações de 0,3, 0,6, 1,2 e 1,8.

O monitoramento da concentração da fonte de enxofre demonstrou que apenas na relação de 0,3 ocorreu utilização incompleta do sulfato, ou seja, apenas 61,2%, com produção de sulfeto total dissolvido equivalente a 192,0mg/L. Sob tais condições, ocorreu o consumo de 99,0% do benzoato. A produção de acetato foi de 237,1mg/L. Não houve produção de metano. O reator foi monitorado durante 384 horas.

Na relação de 0,6, todo sulfato foi consumido e a produção de sulfeto total dissolvido foi de 164mg/L. Nesse caso, ocorreu também o consumo de 99% do composto orgânico e produção de 318,4mg/L de acetato. Durante o período de monitoramento de 312 horas não houve produção de metano.

Na relação de 1,2, o consumo de benzoato foi de 99,0%, e a utilização do sulfato atingiu também 100%, com produção de 80,0mg/L de sulfeto total dissolvido. A produção de acetato foi de 265,0mg/L. A operação dos reatores durou 312 horas, sem produção de metano.

No reator com relação de 1,8, o consumo de benzoato foi de aproximadamente 53% e produção de acetato de 238,2mg/L; houve utilização completa de sulfato e produção de 118mg/L de sulfeto total dissolvido. Como mencionado anteriormente, nesse reator também não houve produção de metano em 384 horas de ensaio.

As Figuras 29, 30 e 31 apresentam as concentrações de benzoato, sulfato e sulfeto dissolvido nos testes para estudos cinéticos. Na Tabela 22 estão apresentados os resultados finais dos ensaios em batelada realizados com cultura purificada.

O acetato produzido nas condições apresentadas, anteriormente, foram consumidos em seguida, produzindo, provavelmente, CO_2 e H_2O . As Figuras 32, 33, 34 e 35 mostram o consumo de benzoato, com produção e consumo de acetato. A produção de acetato durante o processo de mineralização do benzoato pode ser devida à presença dos bacilos, ou pela utilização da rota metabólica via Acetil-CoA por *Desulfococcus multivorans*, produzindo acetato como intermediário, que por sua vez, foi degradado a CO_2 e H_2O (Widdel, 1988).

Figura 29. Variações temporais das concentrações de benzoato em reator em batelada com cultura purificada para diferentes relações estudadas.

Figura 30. Variações temporais das concentrações de sulfato em reator em batelada com cultura purificada para diferentes relações estudadas.

Figura 31. Variações temporais das concentrações de sulfeto total dissolvido em reator em batelada com cultura purificada para diferentes relações estudadas.

Figura 32. Variações temporais das concentrações de benzoato e acetato para relação 0,3.

Figura 33. Variações temporais das concentrações de benzoato e acetato para relação 0,6.

Figura 34. Variações temporais das concentrações de benzoato e acetato para relação 1,2.

Figura 35. Variações temporais das concentrações de benzoato e acetato para relação 1,8.

Tabela 22. Concentrações iniciais de sulfato e de benzoato e suas porcentagens de remoção nos ensaios em batelada com cultura purificada.

Condições de operação	Relações			
	0,3	0,6	1,2	1,8
Benzoato (mg/L)	600,0	606,0	600,0	910,0
Sulfato (mg/L)	2000,0	1000,0	500,0	500,0
Tempo (h)	384	312	312	384
Resultados finais				
Utilização benzoato (%)	99,0	99,0	99,0	53,0
Remoção SO_4^{2-} (%)	61,2	100	100	100
Produção de sulfeto dissolvido (mg/L)	192,0	164,0	80,0	118,0

Comparando-se os resultados obtidos nos testes com relação benzoato/sulfato 0,6, com cultura enriquecida (Tabela 15) e com cultura purificada, foi possível observar que as vias de degradação do benzoato foram distintas, ocorrendo predominância de fermentação, no caso da cultura enriquecida e de sulfetogênese para cultura purificada.

A remoção de benzoato e utilização de sulfato, foram semelhantes para as relações 0,3, 0,6 e 1,2 (Tabela 22). Contudo, para a relação 1,2, foi necessário um período pouco superior a 200 horas para iniciar a degradação do benzoato (Figura 29). Do mesmo modo, foi verificado que a redução de sulfato (Figura 30) e produção de sulfeto (Figura 31) ocorreram concomitante à degradação do benzoato. Provavelmente, a quantidade de fonte de enxofre fornecida foi insuficiente.

Na relação 0,3 apesar da utilização do sulfato ter sido de apenas 61,2% da concentração total fornecida, observa-se que quantidade utilizada foi de 1224 mg/L, superior à relação 0,6, onde foi fornecido 1000 mg/L de sulfato e todo sulfato foi consumido. Em relação ao benzoato, é possível observar que o composto foi todo consumido em aproximadamente 100 horas de operação do reator. Dessa maneira, nota-se que houve excesso de sulfato.

Para relação 1,8, o consumo foi de 50% da fonte de carbono, dos 910 mg/L fornecidos apenas 455 mg/L foram consumidos. O baixo consumo de benzoato, provavelmente, foi devido ao baixo fornecimento da fonte de enxofre, 500mg/L de sulfato. Como todo sulfato foi consumido em aproximadamente 200 horas de operação, o benzoato

a partir desse momento deixou de ser consumido, fazendo com que houvesse sobra do composto aromático no sistema.

Nos ensaios com cultura purificada, apenas na relação 0,3 as concentrações de sulfato tiveram valores acima da relação teórica estabelecida por Widdel (1988). No entanto, nesses reatores foi constatada a remoção do benzoato (99%) com acúmulo de 38,8% de sulfato, para concentração inicial de 2000mg/L. Destaca-se também que a remoção de benzoato ocorreu na relação 1,2, onde o fornecimento de sulfato foi de 500mg/L. Pode-se observar, todavia, que o desempenho das bactérias na alimentação estabelecida na relação 1,8, foi extremamente comprometida devido, provavelmente, ao reduzido fornecimento de sulfato (500mg/L). Portanto, os ensaios com reatores em batelada e cultura purificada permitiram evidenciar o favorecimento metabólico para degradação do benzoato e redução de sulfato em concentrações de, aproximadamente, 600mg/L do composto orgânico e na faixa de 1000mg/L a 1200mg/L para a fonte de enxofre.

5.7. VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E TEMPO DE GERAÇÃO

Os valores da velocidade de crescimento máxima (μ) foram determinados a partir do coeficiente angular da reta equivalente a fase exponencial de crescimento, da curva de $\ln$ do valor de absorbância em relação ao tempo. Os valores do tempo de geração (T_g) foram obtidos utilizando a equação 12.

Para os ensaios de tempo de geração e velocidade de crescimento foram utilizadas as relações de 0,3 e 0,6, por apresentarem curvas de crescimento com maiores números de pontos nas fases exponenciais, isto é, com crescimento efetivo, onde a velocidade de crescimento é constante, devido à constante divisão celular. O período de adaptação para relações de 1,2 e 1,8 foram muito longos, 216 horas e 120 horas, respectivamente. As células submetidas a essas condições, provavelmente, sofreram inibição pelo baixo fornecimento de sulfato, esse fato pode ser percebido pela longa fase de adaptação ocorrida nas duas relações. A Figura 36 apresenta os crescimentos celulares expressos em absorbância em relação ao tempo.

Figura 36. Crescimento celular expresso em absorbância em relação ao tempo.

Após as análises das fases exponenciais para as relações de 0,6 e de 0,3 foi possível determinar as velocidades específicas de crescimento (μ) iguais a $0,011 \text{ h}^{-1}$ e $0,010 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Utilizando-se esses resultados foi possível, através da equação 12, calcular os tempos de geração (T_g) de 61,6h e 66,4h para relações 0,6 e 0,3, respectivamente. A Tabela 23, apresenta as velocidades de crescimento e os tempos de geração das relações de 0,6 e 0,3.

Tabela 23.. Velocidades específicas de crescimento e tempos de geração da cultura purificada

	Benzoato/Sulfato (mg/L)	Coefficiente de correlação (R^2)	Velocidade específica de crescimento (μ) (h^{-1})	Tempo de geração (T_g) (h)
Relação 0,6	606/1000	0,950	0,011	61,6
Relação 0,3	600/2000	0,991	0,010	66,4

Ao comparar-se os valores de (μ) e de (T_g) obtidos com os valores apresentados na Tabela 4, observa-se que a cultura de *Desulfococcus multivorans*, de modo geral, apresentou crescimento bem mais lento que as demais espécies de BRS descritas. Contudo, essa comparação deve considerar as condições de cultivo para cada estudo. As espécies

estudadas, em sua maioria, foram *Desulfovibrio* cultivadas em acetato/sulfato e lactato/sulfato, sob temperatura mesofílica, enquanto que *Desulfococcus multivorans* foi cultivada em benzoato, composto aromático, mais difícil de ser degradado que lactato e acetato.

Por pertencerem à mesma Família, *Desulfobacter* sp. e *Desulfobacter postgatei*, talvez sejam microrganismos mais adequados para se realizar uma comparação com a bactéria em estudo. Em meio com acetato/etanol, *Desulfobacter* sp. atingiu velocidade de crescimento (μ) entre 0,8 e 1,1d⁻¹ e tempo de geração (Tg) entre 0,6 e 0,9. *Desulfobacter postgatei* utilizando etanol/sulfato, atingiu valor de (μ) de 0,13h⁻¹ e (Tg) de 5,3h (Laambroek *et al*, 1984). Com *Desulfococcus multivorans*, os valores ficaram entre 0,010h⁻¹ e 0,011h⁻¹, e de tempo de geração entre 61,6h e 66,4h, utilizando benzoato/sulfato, muito abaixo dos obtidos com *Desulfobacter* sp. e *Desulfobacter postgatei*.

Silva(b) (1999), para *Desulfovibrio* sp, utilizando 4000 mg/L de lactato e 3600 mg/L de sulfato determinou valores de velocidade de crescimento (μ) de 0,13d⁻¹ e de tempo de geração (Tg) de 5,33d, resultados que demonstraram que a cultura teve crescimento extremamente lento.

Os resultados obtidos para *Desulfococcus multivorans* utilizando 600 mg/L de benzoato e 1000 mg/L de sulfato, foram relacionados, provavelmente, com a fonte de carbono, formada por anéis benzênicos bastante estáveis devido às suas duplas ligações difíceis de serem quebradas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Na etapa de enriquecimento, as três variações de cultivo foram seletivas para o crescimento de microrganismos anaeróbios, influenciando na produção de metano. Mesmo na presença de compostos favoráveis à fermentação, as características sulfetogênicas do inóculo, fizeram com que a produção de metano ficasse em torno de 35%.
2. No ensaio com cultura enriquecida, os ensaios tiveram comportamento semelhante para as relações benzoato/sulfato 0,9 e 0,8. As concentrações foram distintas para ambas relações, no entanto, os valores obtidos após 220h e 269h, respectivamente, sugeriram comportamento semelhante, com ligeira vantagem na relação 0,9. Para relação 0,6, a fermentação foi a rota de degradação preferencial;
3. Em todos os ensaios realizados com cultura enriquecida em meio BRS com benzoato e sulfato, foram observadas células de arqueas metanogênicas semelhantes a cocos e sarcinas. Provavelmente, a presença de tais microrganismos justifica-se pelo acetato produzido na degradação do benzoato. No entanto, em todas as condições a porcentagem de metano obtida foi reduzida;
4. Os resultados de caracterização nutricional da cultura purificada demonstraram que quando se utilizou sulfato o melhor crescimento foi observado quando a fonte de carbono foi propanol. No entanto, na presença de sulfito e tiosulfato as melhores respostas foram com butirato. Porém quando se utilizou nitrato os cocos não se desenvolveram demonstrando que tais células não foram capazes de desnitrificar. Esses resultados demonstraram que na presença de fontes aceptoras de elétrons, tais como, sulfato, sulfito e tiosulfato, resultaram num crescimento maior, demonstrando que as bactérias presentes nos ensaios eram redutoras de sulfato;
5. Nos exames microscópicos os cocos apresentaram fluorescência, esse fato pode ser devido a presença de coenzimas (NAD(P)H, flavinas) envolvidas estritamente no

metabolismo energético, o que leva a concluir que apenas a leitura da fluorescência para identificar arqueas metanogênicas, pode ser equivocada;

6. Associando os testes de caracterizações fisiológicas à hibridação *in situ* fluorescente foi possível relacionar a cultura de cocos com bactéria redutora de sulfato. Ainda, com seqüenciamento de DNAr 16S, pode-se identificar como sendo *Desulfococcus multivorans*;
7. Os resultados obtidos, com relação à utilização de benzoato, nos ensaios com cultura predominante de cocos foram semelhantes aos obtidos com células enriquecidas. Os resultados demonstraram que a cultura foi purificada, positivamente, para degradação do composto aromático;
8. A remoção de benzoato e utilização de sulfato, foram semelhantes para as relações 0,3, 0,6 e 1,2 com cultura purificada. Contudo, para a relação 1,2 foi observado período de aproximadamente 216 horas para o benzoato começar a ser degradado. Do mesmo modo foi verificado que a redução de sulfato e produção de sulfeto ocorreram concomitante à degradação do benzoato;
9. Para a relação 1,8, o consumo foi de 50% da fonte de carbono. O baixo consumo de benzoato, provavelmente foi devido ao baixo fornecimento de sulfato. Como todo sulfato foi consumido em aproximadamente 200 horas de operação, o benzoato que restou no reator, a partir desse período deixou de ser consumido;
10. O período de adaptação para relação de 1,2 e 1,8 foi muito longo, 216 horas e 120 horas, respectivamente. Esse longo período de adaptação para as duas relações, provavelmente, foi devido a baixa concentração de sulfato, que limitou o crescimento celular, já que nas duas condições o comportamento de utilização da fonte de enxofre foram semelhantes;

7. Recomendações

- Avaliar a capacidade de degradação de *Desulfococcus multivorans* utilizando outros compostos aromáticos;
- Avaliar a cultura utilizando reatores contínuos; X
- Realizar ensaio de velocidade de crescimento e tempo de geração em lactato;
- Identificar e conhecer a função dos bacilos na degradação do benzoato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA, AWWA and WEF (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th edition, American Public Health Association, Washington, D.C.
- Araújo, J. C. (1995). Caracterização e evolução de biofilme em reator anaeróbio de leite fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético. Dissertação de mestrado, EESC/USP, 158pp.
- Badziong, W.; Thauer, R. K. (1979). Acetate and carbon dioxide assimilation by *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg), growing on hydrogen plus sulfate and hydrogen plus thiosulfate as the sole energy sources. *Archives of Microbiology*, v. 117, p.209-214.
- Beller, H. R.; Spormann, A. M.; Pramod, K. S.; Cole, J. R. Reinhard, M., (1996). Isolation and Characterization of a Novel Toluene-Degrading, Sulfate-Reducing Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1188-1196.
- Boone, D. R.; Mah, R. A. (1984). Archaeobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Eds.) Krieg, N. R.; Holt, J. G.; 1: 2198 – 2205.
- Brock, TD; Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (1998) *Biology of Microorganisms*. prentice Hall, New Jersey, 909p.
- Canhos, V. P.; Vazoller, R. F. (1999). Biodiversidade do Estado de São Paulo: *Microorganismos e vírus*. São Paulo: FAPESP, p 3-23.
- Castro, H. F.; Willians, N. H.; Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 1 – 9.
- CETESB (2004), *Manual de produtos químicos perigosos*. São Paulo, BR, CETESB, 29p.
- Chinalia, F. A.; Varesche, M. B. A.; Zaiat, M.; Foresti, E.; Thiernann, O. (2004) Sequenciamento de DNA ribossomal como técnica molecular para caracterização microbiana em reatores biológicos. *III Seminário temático projeto FAPESP*:
- Cypionka, H ; (1995). *Solute transport and cell energetics*. Barton, LL *Sulfate-reducing bacteria*, Plenum Press New York, vol. 8, pp. 152–184

- Cinar, O; Gradys JR., L., (2000). Aerobic and Anoxic Biodegradation of Benzoate: Stability of Biodegradative Capability under Endogenous Conditions. *Water Research*, 35: 1015-1021.
- Dalsgaard, T.; Bak, F. (1994) Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: sulfide inhibition, kinetics, and regulation. *Applied Environmental Microbiology*. v. 60, n.1, p. 291-297.
- ✓ Devereux, R, Delaney, M, Widdel, F, Stahl, DA ; (1989). Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria. *Journal of Bacteriology*, vol. 171, pp. 6689-6695
- Egland, PG, Pelletier, DA, Dispensa, M, Gibson, J, Harwood, CS. (1997). A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proceedings in Natural Academy of Science USA* 94: 6484-6489.
- Elshahed, M. S.; Bhupathiraju, V. K.; Wooford, N. Q.; Nanny, M. A; McInerney, M. J. (2001). Metabolism of Benzoate, Cyclohex-1-ene Carboxylate, and Cyclohexane Carboxylate by "Syntrophus aciditrophicus" Strain SB in Syntrophic Association with H₂-Using Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1728-1738.
- ✓ Fang, H. H. P.; Liu, Y.; Chen, T., (1997). Effect of Sulfate on Anaerobic Degradation of Benzoate in UASB Reactors. *Journal of Environmental Engineering*. 4: 320 – 328.
- Fang, H. H. P.; Zhou, G. M., (1997). Anaerobic Degradation of Benzoate and Cresol Isomers in Sulfate Rich Wastewater. *Water Science and Technology*. 6 – 7: 7 – 14.
- Fauque, G., J. LeGall, and L. L. Barton; (1991). Sulfate-reducing and sulfur-reducing bacteria. In: *Variations in Autotrophic Life* Ed(s) J. M. Shively and L. L. Barton Academic Press London, , pp. 271-337
- Griffiths, RI, Whiteley, AS, O'Donnell, AG, Bailey, MJ. (2000). Rapid method for coextraction 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.
- Hansen, T. A.; (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 66, pp. 165-185

- Hirasawa, J. S. (2003) Avaliação da comunidade microbiana anaeróbia em reator sulfetogênico utilizando a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH). Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- Kamagata, Y.; Kitagawa, H.; Tasaki, M.; Nakamura, K.; Mikami, E. (1992). Degradation of Benzoate by an Anaerobic Consortium and some Properties of a Hydrogenotrophic Methanogen And Sulfate-Reducing Bacterium In The Consortium. *Journal of fermentation and Bioengineering*. 73: 213-218.
- Kim, S. I.; Song, S. Y.; Kim, K. W.; Ho, E. M.; Oh, K. H. (2003). Proteomic Analysis of the Benzoate Degradation Pathway in *Acinetobacter* sp. KS1. *Research in Microbiology*. 4 : 1-7.
- Knoll, G.; Winter, J. (1989). Degradation of Phenol Via Carboxylation to Benzoate by a Defined, Obligate Syntrophic Consortium of Anaerobic Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30: 318-324.
- Kobayashi, T.; Hashinaga, T.; Mikami, E.; Suzuki, T. (1989). Methanogenic Degradation of Phenol and Benzoate in Acclimated Sludges. *Water science and technology*. 21: 55-65.
- Kreke, B., and H. Cypionka; (1992). Protonmotive force in freshwater sulfate-reducing bacteria, and its role in sulfate accumulation in *Desulfobulbus propionicus*. *Archives of Microbiology*, vol. 158, pp. 183-187
- Laanbroek, H. J.; Pfenning, N. (1981). Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and marine sediments. *Archives Microbiology*. 47: 330 - 335.
- Laanbroek; H. J.; Geerligs, H.J.; Sijtsma, L.; Veldkamp, H. (1984). Competition for sulfate and ethanol among *Desulfatibacter*, and *Desulfovibrio* species isolated from *intertidal* sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 47, n.2, p.329-334.
- Lettinga, G.; Lens, P. N. L.; Visser, A.; Janssen, A. J. H. (1998). Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewater. *Water Research*, 29: 2227 - 2245.
- Li, Y. Y.; Fang, H. H. P.; Chen, T.; Chui, H. (1995). UASB Treatment of Wastewater Containing Concentrated Benzoate. *Journal of Environmental Engineering*, 121: 748-751.
- 317 - 324.

- Li, Y. Y.; Lam, S.; Fang, H. H. P. (1996). Interaction Between Methanogenic, Sulfate-Reducing and Syntrophic Acetogenic Bacteria in The Anaerobic Degradation of Benzoate. *Water Research*, 7: 1555 – 1562.
- Lo, K. C.; Chua, S. S. (2001). *Ortho* Pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: Induction of *Meta* Pathway at High Substrate concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 620 - 626.
- McInerney, J. M.; Bryant, M. P. (1981). Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 346 – 354.
- Min, H.; Zinder, S. H. (1990). Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* sp. nov. *Archives of Microbiology*, v.153, p.399-404.
- Mountfort, D. O.; Bryant, M. P., (1984). Isolation and Characterization of an Anaerobic Syntrophic Benzoate-Degrading Bacterium from Sewage Sludge. *Archives of Microbiology*, 133: 249-256.
- Okabe, S.; Nielsen, P. H.; Characklis, W.G. (1992). Factors affecting from hypersaline environments. *Microbiological Reviews*, v.40, p.725-734.
- Okabe, S.; Characklis, W. G. (1992). Effects of temperature and phosphorus concentration on microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfiricans*. *Biotechnology Bioengineering*, v. 39, p. 1031 – 1042.
- Oude Elferink, S. J. W. H.; Visser, A.; Hulshoff, L. W.; Stams, A. J. M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Review*, 15: 119 – 136.
- Oude Elferink, S. J. W. H.; Maas, R. N.; Harmsen, H. J. M.; Stams, A. J. M. (1995). *Desulfohalobos* gen. sp. nov., sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge. *Archives of Microbiology*, v. 164, p 119-124.
- Oude Elferink, S. J. W. H.; Vorstman, W. J. C.; Sopjes, A.; Stams, A. J. M. (1998). Characterization of the sulfate-reducing bacteria and syntrophic population in granular sludge from full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater. In: *Sulfate-reducing Bacteria in Anaerobic Bioreactors*, Ed. S. J. W.H. Oude Elferink p. 87-101.
- Oude Elferink, S. J. W. H.; Vorstman, W. J. C.; Sopjes, A.; Stams, A. J. M. (1998). Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular

- sludge from full-scale reactor papermill wastewater. *Microbiology Ecology*. 27: 185 – 194.
- Oude Elferink, S. J. W., W. M. Akkermans-van Vliet, J. J. Bogte, and A. J. M. Stams; (1999). *Desulfobacca acetoxidans* gen. nov., sp. nov., a novel acetate-degrading sulfate reducer isolated from sulfidogenic granular sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 49, pp. 345–350
- Plas, C.; Harant, H.; Danner, H.; Jelinek, E.; Wimmer, K.; Holubar, P. & Braun, R. (1992). Ratio of Biological and Chemical Oxidation During the Aerobic Elimination of Sulphide by Colorless Sulphur Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 817 – 82.
- Postgate, J. R. (1984). *The sulfate-reducing bacteria*. 2nd Ed. Cambridge University Press. Cambridge – EUA.
- Raskin, L.; Rittman, B. E.; Stahl, D. A. (1996). Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic population in anaerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 10: 3847 – 3857.
- Reis, M. A. M.; Almeida, J. S.; Lemos, P. C. Carrondo, M. J. T. (1992). Effects of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 40, p.593-600.
- Sakamoto, I. K.(1996). *Comportamento do consórcio microbiano existente em lodo anaeróbio granulado metanogênico, submetido a adições crescentes de sulfato*. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo
- Sembiring, T.; Winter, J., (1997). Demethylation of Aromatic Compounds by Strain B10 and Complete Degradation of 3-Methoxybenzoate in Co-Culture with *Desulfosarcina* Strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 33: 233-238.
- Silva, A. J. (1999). *Remoção de sulfato de água residuária industrial utilizando reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- ✓ Silva(b). S. O. (1999). *Isolamento e identificação de gêneros de bactérias redutoras do íon sulfato (BRS) oriundas de campos de petróleo com ocorrência de corrosão microbiana*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- Smith, P. H.; Mah, R. A.(1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Applied of Microbiology*. v. 14, p.368-371.

- So, C, Young, LY. (1999). Isolation and characterization of sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2969-2976.
- Speece, R. E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater*. Vanderbilt University. Archae Press –USA. pp. 287-318
- Stahlmann, J., R. Warthmann, and H. Cypionka; (1991). Na⁺-dependent accumulation of sulfate and thiosulfate in marine sulfate-reducing bacteria. *Archives Microbiology*, vol. 155, pp. 554–558
- Stams, A.J.M. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 271-294.
- Szewzyk, R; Pfennig, N. (1987). Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov. *Archives of Microbiology* v147, p.163 – 168.
- Traore, A. S.; Fardeau, M. L.; Hatchikian, C. E.; Le Gall, J.; Balaich, J. P. (1983). Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkerii*: interspecies hydrogen transfer in batch and continuous culture. *Applied Environmental Microbiology*, 46: 1152 – 1156.
- Tschech, A.; Schink, B.,(1986). Fermentative Degradation of Monohydroxybenzoate by Defined Syntrophic Cocultures. *Archives of Microbiology*, 145: 396-402.
- Varesche, M. B. A. (1997). *Estudo de Bactérias Fototróficas Anoxigênicas: Enriquecimento, Isolamento, Caracterização Nutricional e Cinética de Crescimento*. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.
- Vareshe, M. B. A.; Zaiat, M.; Vieira, L. G. T.; Vazoller, R. F.; Foresti, E. (1997). Microbial colonization of polyurethane from matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 48: 534-538.
- Vazoller, R. F. (1995). *Avaliação do Ecossistema Microbiano de um Biodigestor Anaeróbico de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo, Operando com Vinhaça sob Condições Termofílicas*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Videla, H. A. (1996). Manual of Biocorrosion. CRC Press, Inc., 272p.

- Warthmann, R., and Cypionka; H. (1990). Sulfate transport in *Desulfobulbus propionicus* and *Desulfococcus multivorans*. *Archives of Microbiology*, vol. 154, pp. 144–149
- Widdel, F. (1988). Microbiology and Ecology of Sulfate and Sulfur-Reducing Bacteria. In *Biology of anaerobic microorganisms*. Ed. Alexander J. B. Zehnder, John Wiley & sons, Inc., EUA, 469 – 586.
- Widdel, F.; Hansen, T. A..(1992). The Dissimilatory Sulfate and Sulfur-Reducing Bacteria. In: *The Prokaryotes* . Ed(s). A Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer. Vol. 1 p583-616.
- Widdel, F.; Pfennig, N. (1984). Dissimilatory Sulfate or Sulfur Reducing Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Eds) KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. 1: 663 – 679.
- Woese, C. R.; (1987). Bacterial Evolution. *Microbiology Review*, vol. 51, pp. 221–271.
- Zinder, S. H. (1993). *Physiological ecology of methanogens*. In Ferry, J. G. Ed. Chapman & Hall, New York. P. 128 – 206.
- Zinder, S. H. & Koch, M. (1984). Non-aceticlastic Methanogenesis from Acetate: acetate oxidation by a Thermophilic Syntrophic Coculture. *Archives of Microbiology*. 138: 263-272.
- Zhou, G. M.; Fang, H. H. P. (1998). Competition Between Methanogenesis and Sulfidogenesis in Anaerobic Wastewater Treatment. *Water Science and technology* 8-9: 317 – 324.

Anexos

Anexos Cultura Enriquecida

Anexo 1 Curva Sulfeto

Anexo 2

Benzoato/Sulfato (680/875) Relação 0,8			Benzoato/Sulfato (242/400) Relação 0,6		
Tempo (h)	Sulfato (mg/L)	Sulfeto Total (mg/L)	Tempo (h)	Sulfato (mg/L)	Sulfeto Total (mg/L)
0	870,8	0,8	0	401,7	4,2
24	801,7	13,6	24	313,3	7,4
54	745	27,6	54	333	9,8
78	684,1	30,2	78	343	14
126	441,6	58,3	126	321	19,8
149	336,6	68,1	149	340	25,8
174	289	91,3	174	329	26,3
199	159,6	80,7	199	333	13,7
225	71	101,6	225	333	13,6
245	10,9	125,6	245	333	15,5
269	0,65		269	330	

Benzoato/Sulfato (680/875) Relação 0,8					Benzoato/Sulfato (242/400) Relação 0,6				
Benzoato					Benzoato				
Tempo (h)			Média	Desv. Padrão	Tempo (h)			Media	Desv. Padrão
0	729,13	592,43	660,78	96,661497	0	216,38	268,24	242,3	36,67056
24	631,75	393,45	512,6	168,503546	24	245,4	235,6	240,5	6,929646
54	596,13	388,06	492,095	147,127708	54	229,77	224,25	227	3,903229
78	577,99	380,72	479,355	139,490955	78	166,26	176,23	171,2	7,049855
126	300,96	116,03	208,495	130,765257	126	119,32	135,45	127,4	11,40563
149	166,87	207,73	187,3	28,8923831	149	37,87	26,36	32,12	8,138799
174	131,98	188,1	160,04	39,6828326	174	29,26	27,58	28,42	1,187939
199	61,94	90,33	76,135	20,0747615	199	32,52	35,78	34,15	2,305168
225	54,74	80,43	67,585	18,1655732	225	23,92	24,41	24,17	0,346482
245	33,96	58,95	46,455	17,6705985	245	18,74	16,78	17,76	1,385929
269	11,7	27,09	19,395	10,8823734	269	24,25	17,83	21,04	4,539626

Benzoato/Sulfato (680/875) Relação 0,8					Benzoato/Sulfato (242/400) Relação 0,6				
Acetato					Acetato				
Tempo (h)			Media	Desv Padrao	Tempo (h)			Media	Desv Padrão
0	12,27	15,96	14,115	2,60922402	0	7,27	8,36	7,815	0,770746
24	15,58	20,65	18,115	3,58503138	24	13,7	11,29	12,5	1,704127
54	18	27,77	22,885	6,90843325	54	29,52	17,2	23,36	8,711556
78	16,69	31,3	23,995	10,3308301	78	35,01	23,19	29,1	8,358002
126	18,36	37,87	28,115	13,7956533	126	59,28	52,67	55,98	4,673976
149	17,7	44,31	31,005	18,8161114	149	35,62	34,97	35,3	0,459619
174	23,62	58,75	41,185	24,8406612	174	35,8	38,04	36,92	1,583919
199	26,73	59,65	43,19	23,2779552	199	67,59	67,36	67,48	0,162635
225	31,12	71,5	51,31	28,5529718	225	52,61	49,93	51,27	1,895046
245	62,86	74,25	68,555	8,05394624	245	33,82	27,6	30,71	4,398204
269	68,74	68,5	68,62	0,16970563	269	38,36	50,03	44,2	8,251936

Benzoato/Sulfato (890/975) Relação 0,9					Benzoato/Sulfato (890/975) Relação 0,9				
Sulfato (mg/L)					Sulfeto total (mg/L)				
tempo (h)			Media	Desvio Padrão	tempo (h)			Media	Desv Padrão
0	975	975	975	0	0	0,091	0,093	0,092	0,001414
18,58	900	850	875	35,3553391	18,58	0,111	0,096	0,104	0,010607
55,58	850	800	825	35,3553391	55,58	0,38	0,412	0,396	0,022627
81,91	775	775	775	0	81,91	0,591	0,62	0,606	0,020506
104,08	700	725	712,5	17,6776695	104,08	0,766	0,863	0,815	0,068589
133,08	550	550	550	0	133,08	0,134	0,129	0,132	0,003536
154,25	475	475	475	0	154,25	0,161	0,161	0,161	0
178,08	350	350	350	0	178,08	0,207	0,207	0,207	0
202,41	17	19	18	1,41421356	202,41	0,229	0,234	0,232	0,003536

Benzoato/Sulfato (890/975) Relação 0,9	
Benzoato (mg/L)	
tempo (h)	
0	891
18,58	870
55,58	605
81,91	461
104,08	382
133,08	292
154,25	248
178,08	261
202,41	257

Anexos Cultura Purificada

Anexo 1
Curva Sulfeto

Anexo 2

Densidade óptica

Relação 0,3					Relação 0,6				
Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Media	Desv Padrão	Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Media	Desv Padrão
0	0,018	0,019	0,0185	0,00071	0	0,009	0,012	0,0105	0,0021
48	0,066	0,075	0,0705	0,00636	48	0,033	0,034	0,0335	0,0007
96	0,219	0,233	0,226	0,0099	96	0,099	0,101	0,1	0,0014
144	0,362	0,375	0,3685	0,00919	120	0,201	0,2	0,2005	0,0007
192	0,509	0,5	0,5045	0,00636	144	0,27	0,271	0,2705	0,0007
240	0,566	0,577	0,5715	0,00778	168	0,344	0,346	0,345	0,0014
288	0,401	0,4	0,4005	0,00071	192	0,457	0,489	0,473	0,0226
336	0,359	0,361	0,36	0,00141	216	0,531	0,529	0,53	0,0014
384	0,23	0,237	0,2335	0,00495	240	0,568	0,563	0,5655	0,0035
					264	0,539	0,515	0,527	0,017
					288	0,515	0,51	0,5125	0,0035
					312	0,217	0,225	0,221	0,0057
Relação 1,2					Relação 1,8				
Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Media	Desv Padrão	Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Media	Desv Padrão
0	0,026	0,012	0,019	0,0099	0	0,024	0,023	0,0235	0,0007
48	0,049	0,053	0,051	0,00283	48	0,015	0,017	0,016	0,0014
96	0,041	0,041	0,041	0	96	0,061	0,058	0,0595	0,0021
120	0,035	0,038	0,0365	0,00212	144	0,078	0,051	0,0645	0,0191
144	0,035	0,038	0,0365	0,00212	192	0,24	0,232	0,236	0,0057
168	0,044	0,041	0,0425	0,00212	240	0,3	0,291	0,2955	0,0064
192	0,045	0,04	0,0425	0,00354	288	0,206	0,201	0,2035	0,0035
216	0,038	0,045	0,0415	0,00495	336	0,191	0,2	0,1955	0,0064
240	0,073	0,075	0,074	0,00141	384	0,1	0,101	0,1005	0,0007
264	0,115	0,083	0,099	0,02263					
288	0,227	0,244	0,2355	0,01202					
312	0,21	0,201	0,2055	0,00636					

Anexo 3

Relação 0,3			Relação 0,6		
Tempo (h)	Benzoato	Acetato	Tempo (h)	Benzoato	Acetato
0	596,58	8,13	0	605,95	9,57
48	554,26	27,58	48	556,61	10,7
96	7,05	237,15	96	522,67	13,28
144	7,03	115,45	120		
192	7,01	29,38	144		
240	7	8,4	168	464,16	72,34
288	6,86	1,67	192	294,12	318,48
336	6,84		216	26,63	209,31
384	6,75		240	22,74	253,54
			264	8,47	246,89
			288	8,47	9,57
			312		
Relação 1,2			Relação 1,8		
Tempo (h)	Benzoato	Acetato	Tempo (h)	Benzoato	Acetato
0	600,44	10,68	0	909,98	8,06
48	527,12	11,56	48	875,28	8,57
96	531,37	11,33	96	849,43	21,2
120			144	711,4	11,05
144			192		
168	519,18	24,17	240	432,8	238,26
192	514,8	104,88	288	422,7	232,15
216	430,83	265,01	336	422,7	232,15
240	355,55	212,06	384		
264	274,39				
288	6,66				

Anexo 4

Sulfato

Relação 0,3					Relação 0,6				
Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Media (x25)	Desv Padrão	Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Media (x25)	Desv Padrão
0	80	80	80	0	0	40	40	40	0
48	80	79	79,5	0,70711	48	39	38	38,5	0,7071
96	68	66	67	1,41421	96	38	40	39	1,4142
144	57	57	57	0	168	23	27	25	2,8284
192	48	46	47	1,41421	192	14	14	14	0
240	31	35	33	2,82843	216	3	5	4	1,4142
288	31	31	31	0	240	1	1	1	0
336	31	31	31	0	264	0	0	0	0
384	31	31	31	0	288	0	0	0	0
					312	0	0	0	0
Relação 1,2					Relação 1,8				
Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Media (x25)	Desv Padrão	Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Media (x25)	Desv Padrão
0	21	19	20	1,41421	0	20	20	20	0
48	19	19	19	0	48	20	20	20	0
96	20	20	20	0	96	20	19	19,5	0,7071
168	19	20	19,5	0,70711	144	19	19	19	0
192	17	19	18	1,41421	192	17	13	15	2,8284
216	19	20	19,5	0,70711	240	14	13	13,5	0,7071
240	17	18	17,5	0,70711	288	0	0	0	0
264	15	17	16	1,41421	336	0	0	0	0
288	4	1	2,5	2,12132	384	0	0	0	0
312	0	0	0	0					

Anexo 5

Sulfeto

Relação 0,3					Relação 0,6			
Tempo (h)	ABS	mM	Mg/L		Tempo (h)	ABS	mM	Mg/L
0	0,237	0,4926	15,76		0	0,049	0,075	2,4
48	0,371	0,7899	25,27		48	0,136	0,2689	8,6
96	0,676	1,4637	46,83		96	0,483	1,0376	33,2
144	0,146	0,2907	93		168	0,542	1,1683	37,39
192	0,204	0,4188	134		192	0,726	1,5752	50,4
240	0,287	0,6023	192,73		216	0,111	0,2139	68,43
288	0,269	0,5624	179,97		240	0,181	0,3671	117,47
336	0,249	0,5177	165,67		264	0,251	0,5233	167,45
384					288	0,247	0,5144	164,61
					312	0,231	0,479	153,27
Relação 1,2					Relação 1,8			
Tempo (h)	ABS	mM	Mg/L		Tempo (h)	ABS	mM	Mg/L
0	0,235	0,4882	15,62		0	0,241	0,5	16
48	0,326	0,6898	22,07		48	0,258	0,5388	17,24
96	0,259	0,5403	17,29		96	0,473	1,014	32,44
168	0,203	0,4177	13,36		144	0,656	1,4209	45,47
192	0,205	0,4203	13,45		192	0,772	1,6764	53,64
216	0,229	0,4734	15,15		240	0,913	1,9899	63,66
240	0,536	1,1554	36,98		288	0,182	0,307	118,41
264	0,618	1,3363	42,76		336	0,134	0,2648	84,74
288	0,126	0,2467	78,94		384			
312	0,115	0,2209	70,68					

Anexo 6

Medida de tamanho celular

Features	Measurement	Value	Nominal Val.	Min. Tol.	Max. Tol.	Pass / Fail
1 D1	Diameter		1,788201	1,788201	-.0010	.0010
2 D2	Diameter		1,788201	1,788201	-.0010	.0010
3 D3	Diameter		2,077236	2,077236	-.0010	.0010
4 D4	Diameter		1,779242	1,779242	-.0010	.0010
5 D5	Diameter		1,521599	1,521599	-.0010	.0010
6 D6	Diameter		1,800544	1,800544	-.0010	.0010
7 D7	Diameter		1,581768	1,581768	-.0010	.0010
8 D8	Diameter		1,951511	1,951511	-.0010	.0010
9 D9	Diameter		1,827404	1,827404	-.0010	.0010
10 D10	Diameter		1,771366	1,771366	-.0010	.0010
11 D11	Diameter		1,913037	1,913037	-.0010	.0010
12 D12	Diameter		1,976936	1,976936	-.0010	.0010
13 D13	Diameter		2,630274	2,630274	-.0010	.0010
14 D14	Diameter		2,009009	2,009009	-.0010	.0010
15 D15	Diameter		1,967070	1,967070	-.0010	.0010
16 D16	Diameter		1,620015	1,620015	-.0010	.0010
17 D17	Diameter		1,709538	1,709538	-.0010	.0010
18 D18	Diameter		2,025370	2,025370	-.0010	.0010
19 D19	Diameter		1,788201	1,788201	-.0010	.0010
20 D20	Diameter		2,325886	2,325886	-.0010	.0010
21 D21	Diameter		2,058715	2,058715	-.0010	.0010
22 D22	Diameter		2,069193	2,069193	-.0010	.0010
23 D23	Diameter		2,351141	2,351141	-.0010	.0010
24 D24	Diameter		1,788201	1,788201	-.0010	.0010
25 D25	Diameter		1,826976	1,826976	-.0010	.0010
26 D26	Diameter		1,976936	1,976936	-.0010	.0010
27 D27	Diameter		1,713344	1,713344	-.0010	.0010
28 D28	Diameter		1,713344	1,713344	-.0010	.0010
29 D29	Diameter		1,647446	1,647446	-.0010	.0010
30 D30	Diameter		1,581549	1,581549	-.0010	.0010

Coluna1	
Média	1,76
Erro padrão	0,02
Mediana	1,73
Modo	1,98
Desvio padrão	0,20
Variância da amostra	0,04
Curtose	2,24
Assimetria	0,99
Intervalo	1,24
Mínimo	1,39
Máximo	2,63
Soma	237,34
Contagem	135
Nível de confiança (95,0%)	0,03

31 D31	Diameter	1,845140	1,845140	-.0010	.0010	Pass
32 D32	Diameter	1,713344	1,713344	-.0010	.0010	Pass
33 D33	Diameter	1,671469	1,671469	-.0010	.0010	Pass
34 D34	Diameter	1,651185	1,651185	-.0010	.0010	Pass
35 D35	Diameter	1,804976	1,804976	-.0010	.0010	Pass
36 D36	Diameter	1,599242	1,599242	-.0010	.0010	Pass
37 D37	Diameter	1,469035	1,469035	-.0010	.0010	Pass
38 D38	Diameter	1,483858	1,483858	-.0010	.0010	Pass
39 D39	Diameter	1,764734	1,764734	-.0010	.0010	Pass
40 D40	Diameter	1,677537	1,677537	-.0010	.0010	Pass
41 D41	Diameter	1,480870	1,480870	-.0010	.0010	Pass
42 D42	Diameter	1,624031	1,624031	-.0010	.0010	Pass
43 D43	Diameter	1,804976	1,804976	-.0010	.0010	Pass
44 D44	Diameter	1,924624	1,924624	-.0010	.0010	Pass
45 D45	Diameter	1,714408	1,714408	-.0010	.0010	Pass
46 D46	Diameter	1,647446	1,647446	-.0010	.0010	Pass
47 D47	Diameter	1,921507	1,921507	-.0010	.0010	Pass
48 D48	Diameter	1,569642	1,569642	-.0010	.0010	Pass
49 D49	Diameter	1,581549	1,581549	-.0010	.0010	Pass
50 D50	Diameter	1,862987	1,862987	-.0010	.0010	Pass
51 D51	Diameter	1,677537	1,677537	-.0010	.0010	Pass
52 D52	Diameter	1,583524	1,583524	-.0010	.0010	Pass
53 D53	Diameter	1,534104	1,534104	-.0010	.0010	Pass
54 D54	Diameter	1,642378	1,642378	-.0010	.0010	Pass
55 D55	Diameter	1,729690	1,729690	-.0010	.0010	Pass
56 D56	Diameter	1,937038	1,937038	-.0010	.0010	Pass
57 D57	Diameter	1,664440	1,664440	-.0010	.0010	Pass
58 D58	Diameter	1,779242	1,779242	-.0010	.0010	Pass
59 D59	Diameter	1,773130	1,773130	-.0010	.0010	Pass
60 D60	Diameter	1,715168	1,715168	-.0010	.0010	Pass
61 D61	Diameter	1,647446	1,647446	-.0010	.0010	Pass
62 D62	Diameter	1,581549	1,581549	-.0010	.0010	Pass
63 D63	Diameter	1,583524	1,583524	-.0010	.0010	Pass
64 D64	Diameter	2,176067	2,176067	-.0010	.0010	Pass
65 D65	Diameter	1,955779	1,955779	-.0010	.0010	Pass
66 D66	Diameter	1,583524	1,583524	-.0010	.0010	Pass

67 D67	Diameter	1,480870	1,480870	-.0010	.0010	Pass
68 D68	Diameter	1,976936	1,976936	-.0010	.0010	Pass
69 D69	Diameter	1,835513	1,835513	-.0010	.0010	Pass
70 D70	Diameter	1,773130	1,773130	-.0010	.0010	Pass
71 D71	Diameter	1,566374	1,566374	-.0010	.0010	Pass
72 D72	Diameter	1,846834	1,846834	-.0010	.0010	Pass
73 D73	Diameter	1,589437	1,589437	-.0010	.0010	Pass
74 D74	Diameter	1,729690	1,729690	-.0010	.0010	Pass
75 D75	Diameter	1,449753	1,449753	-.0010	.0010	Pass
76 D76	Diameter	1,647446	1,647446	-.0010	.0010	Pass
77 D77	Diameter	1,921507	1,921507	-.0010	.0010	Pass
78 D78	Diameter	1,622533	1,622533	-.0010	.0010	Pass
79 D79	Diameter	1,458175	1,458175	-.0010	.0010	Pass
80 D80	Diameter	1,569642	1,569642	-.0010	.0010	Pass
81 D81	Diameter	1,523880	1,523880	-.0010	.0010	Pass
82 D82	Diameter	1,649343	1,649343	-.0010	.0010	Pass
83 D83	Diameter	1,994431	1,994431	-.0010	.0010	Pass
84 D84	Diameter	1,768225	1,768225	-.0010	.0010	Pass
85 D85	Diameter	1,835513	1,835513	-.0010	.0010	Pass
86 D86	Diameter	1,811364	1,811364	-.0010	.0010	Pass
87 D87	Diameter	1,723906	1,723906	-.0010	.0010	Pass
88 D88	Diameter	1,671313	1,671313	-.0010	.0010	Pass
89 D89	Diameter	1,708471	1,708471	-.0010	.0010	Pass
90 D90	Diameter	1,708471	1,708471	-.0010	.0010	Pass
91 D91	Diameter	1,697864	1,697864	-.0010	.0010	Pass
92 D92	Diameter	1,848385	1,848385	-.0010	.0010	Pass
93 D93	Diameter	1,665848	1,665848	-.0010	.0010	Pass
94 D94	Diameter	1,582921	1,582921	-.0010	.0010	Pass
95 D95	Diameter	2,000909	2,000909	-.0010	.0010	Pass
96 D96	Diameter	1,697864	1,697864	-.0010	.0010	Pass
97 D97	Diameter	1,976936	1,976936	-.0010	.0010	Pass
98 D98	Diameter	1,875069	1,875069	-.0010	.0010	Pass
99 D99	Diameter	1,759559	1,759559	-.0010	.0010	Pass
100 D100	Diameter	1,986796	1,986796	-.0010	.0010	Pass
101 D101	Diameter	1,899002	1,899002	-.0010	.0010	Pass
102 D102	Diameter	1,934481	1,934481	-.0010	.0010	Pass

103 D103	Diameter	1,525418	1,525418 -.0010	.0010	Pass
104 D104	Diameter	2,040749	2,040749 -.0010	.0010	Pass
105 D105	Diameter	1,792809	1,792809 -.0010	.0010	Pass
106 D106	Diameter	1,976936	1,976936 -.0010	.0010	Pass
107 D107	Diameter	1,603364	1,603364 -.0010	.0010	Pass
108 D108	Diameter	1,744689	1,744689 -.0010	.0010	Pass
109 D109	Diameter	1,826976	1,826976 -.0010	.0010	Pass
110 D110	Diameter	1,734303	1,734303 -.0010	.0010	Pass
111 D111	Diameter	1,868573	1,868573 -.0010	.0010	Pass
112 D112	Diameter	1,777826	1,777826 -.0010	.0010	Pass
113 D113	Diameter	1,862987	1,862987 -.0010	.0010	Pass
114 D114	Diameter	1,519028	1,519028 -.0010	.0010	Pass
115 D115	Diameter	1,429482	1,429482 -.0010	.0010	Pass
116 D116	Diameter	1,523880	1,523880 -.0010	.0010	Pass
117 D117	Diameter	1,386113	1,386113 -.0010	.0010	Pass
118 D118	Diameter	1,620015	1,620015 -.0010	.0010	Pass
119 D119	Diameter	1,720628	1,720628 -.0010	.0010	Pass
120 D120	Diameter	1,827404	1,827404 -.0010	.0010	Pass
121 D121	Diameter	1,747524	1,747524 -.0010	.0010	Pass
122 D122	Diameter	1,696227	1,696227 -.0010	.0010	Pass
123 D123	Diameter	2,264586	2,264586 -.0010	.0010	Pass
124 D124	Diameter	1,792809	1,792809 -.0010	.0010	Pass
125 D125	Diameter	1,773130	1,773130 -.0010	.0010	Pass
126 D126	Diameter	1,844387	1,844387 -.0010	.0010	Pass
127 D127	Diameter	2,034270	2,034270 -.0010	.0010	Pass
128 D128	Diameter	1,594075	1,594075 -.0010	.0010	Pass
129 D129	Diameter	1,553625	1,553625 -.0010	.0010	Pass
130 D130	Diameter	1,593857	1,593857 -.0010	.0010	Pass
131 D131	Diameter	1,461923	1,461923 -.0010	.0010	Pass
132 D132	Diameter	1,548305	1,548305 -.0010	.0010	Pass
133 D133	Diameter	1,386113	1,386113 -.0010	.0010	Pass
134 D134	Diameter	1,916076	1,916076 -.0010	.0010	Pass
135 D135	Diameter	1,603364	1,603364 -.0010	.0010	Pass