FILIPPE VASCONCELOS FERREIRA

**Influência do Co-Substrato na Remoção de Sabão em Pó de Uso Doméstico e na
Diversidade Microbiana de Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado**

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 Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2012

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

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

Ferreira, Filipe Vasconcelos.

F385i Influência do co-substrato na remoção de sabão em pó de uso doméstico e na diversidade microbiana de reator anaeróbio de leito fluidificado. / Filipe Vasconcelos Ferreira; orientador Maria Bernadete Amâncio Varesche. São Carlos, 2012.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento)-- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.

1. Etanol. 2. Sacarose. 3. Areia. 4. RALF. 5. Rhodocyclaceae. 6. Gene RNAr16S. 7. DGGE. 8. Co-substratos. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **FILIPPE VASCONCELOS FERREIRA**.

Título da dissertação: "Influência do co-substrato na remoção de sabão em pó de uso doméstico e na diversidade microbiana de reator anaeróbio de leiteo fluidificado".

Data da defesa: 25/05/2012

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof^ª. Dr^ª. **Maria Bernadete Amâncio Varesche (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof^ª. Dr^ª. **Giovana Tommaso**
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA)

Aprovado

Prof^ª. Dr^ª. **Andréa Paula Buzzini**
(Universidade Virtual do Estado de São Paulo/UNIVESP)

Aprovado

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

Prof. Titular **Edson Cezar Wendland**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo Cesar Lima Segantine**

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra e José, e aos meus irmãos Guilherme e Eduardo por fazerem parte da minha vida, tornando-a tão especial. Obrigado por tudo.

“A noite é mais escura antes do amanhecer”
Batman: O Cavaleiro das Trevas – Filme

“A felicidade só existe quando compartilhada”
Na Natureza Selvagem - Filme

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Sandra, pelo amor, carinho, compreensão e por me tornar o homem que sou hoje;

Aos meus irmãos, Eduardo e Guilherme, pela amizade, respeito e por me tornar um ser humano melhor em virtude das discussões e troca de conhecimentos; não há irmãos melhores que vocês;

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche pela disponibilidade, orientação, atenção, aprendizado, respeito e amizade ao longo da realização deste trabalho;

Às pesquisadora Dra. Lorena Lima de Oliveira pela atenção e dicas a respeito do meu trabalho;

Ao Doutorando Dagoberto Okada pela ajuda no laboratório e amizade e respeito a mim dedicados;

À Doutoranda Mariana Carosia pelo apoio e ajuda no desenvolvimento do meu trabalho e pela amizade dedicada a mim;

À Dra. Isabel Kimiko Sakamoto pelos ensinamentos em biologia molecular e pela amizade e carinho;

À técnica Maria Ângela Talarico Adorno pela ajuda em relação às análises cromatográficas e pela amizade;

À aluna de iniciação científica Thaís Zaninetti Macedo pela imensa ajuda na operação do reator;

A todos os amigos do laboratório Livia, Tiago, Flávia Martins, Fabrício Mara Rúbia, Carol, Mariana, Regiane Ratti, Regiane Corrêa, Juliana, Lorena, Dagoberto, Djalma, Priscila, Adriana, Bruna, Eduardo, Rafael, Sandra, Isabel, Eloísa, Flávia, Pilar, Rogério, Vinícios, Betão, Ana, Deize, pela paciência, atenção e amizade;

Aos meus amigos que conheci em São Carlos que me aturam desde que cheguei: Elaine, Lucas, Beto, Flávia, Samuel, Bruno e todas as outras pessoas queridas que conheci no SHS;

À Sá, Pavi e Rose sempre gentis comigo, brigado pela atenção;

Aos meus amigos de Rio Preto e Feira de Santana, vocês ajudaram para que eu chegasse até aqui, muito obrigado por vocês existirem na minha vida;

Aos professores doutores Eugênio Foresti, Márcia Damianovick, Wyclef e Marcelo Zaiat pela agradável convivência.

À USP, em especial ao SHS pela oportunidade de realização do mestrado;

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

FERREIRA, F. V. **Influência do Co-Substrato na Remoção de Sabão em Pó de Uso Doméstico e na Diversidade Microbiana de Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.** 2012. 133F. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), principal componente na formulação de detergentes e outros agentes de limpeza, é despejado constantemente em corpos de água em função da precariedade dos sistemas de tratamento de origem doméstica em países em desenvolvimento, como o Brasil. A principal motivação do presente estudo foi verificar a remoção do sabão em pó com o emprego de diferentes co-substratos em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF). O RALF foi preenchido com areia como material suporte e operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 15 horas durante 247 dias. Substrato sintético simulando esgoto sanitário foi utilizado, cuja composição incluía solução de sais, bicarbonato de sódio, sabão em pó comercial, extrato de levedura e co-substratos como sacarose e/ou etanol. A operação do reator foi dividida em cinco fases: (1) imobilização da biomassa em circuito fechado; (2) etapa I com sacarose e etanol (50/50%), sem adição de sabão em pó e circuito aberto; (3) etapa II com sacarose e etanol (50/50%) e $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS em circuito aberto; (4) etapa III com sacarose e etanol (50/50%) e $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS em circuito aberto; (5) etapa IV com apenas sacarose como co-substrato e $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS em circuito aberto. Para todas as etapas, obteve-se remoção média de DQO superior a $78 \pm 8,4\%$, para $590,2 \pm 76,2$ mg/L afluente. Houve aumento de eficiência de remoção com acréscimo de sabão em pó em torno de 12% entre a etapa I e as demais etapas; estas juntas apresentaram média de $597,7 \pm 83,1$ mg/L de DQO afluente. A remoção média de LAS foi de $37,7 \pm 13,7\%$ para $12,4 \pm 8,4$ mg/L afluente. Por meio da análise estatística não foi possível determinar o nível de importância dos co-substratos na remoção de DQO e LAS. Verificou-se remoção de 39,4% de LAS, sendo 30,6% referente à degradação biológica e 8,8% à adsorção. Populações microbianas diferentes foram observadas nas diferentes etapas por meio de análise de DGGE. Microrganismos pertencentes aos filos Proteobacteria (72%), Acidobacteria (3%), Synergistetes (3%), Bacteroidetes (6,3%) e Firmicutes (6,3%) foram identificados no biofilme do material suporte da última etapa. A maioria das seqüências foi relacionada à família Rhodocyclaceae cujos membros são capazes de degradar compostos aromáticos.

Palavras-chave: etanol, sacarose, areia, RALF, Rhodocyclaceae, gene RNAr 16S, DGGE, co-substratos.

ABSTRACT

FERREIRA, F. V. **Verification of Influence of Co-Substrate in Household Detergent Removal and Microbial Diversity in Anaerobic Fluidized Bed Biofilm Reactor.** 2012. 133F. Dissertation (Master) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Linear alkylbenzene sulphonate (LAS), main component in detergent formulation and others clean products, is constantly released in aquatic environment in face of precarious domestic wastewater treatment facilities presents in developing countries like Brazil. The main reason of this study was to verify the powder soap removal through the use of different co-substrates in anaerobic fluidized bed biological reactor (AFBBR). The AFBBR was filled with sand as support material and operated with 15 hours of hydraulic time retention (HTR) over 247 days. It was utilized synthetic sewage which composition included salt solution, sodium bicarbonate, commercial powder soap, yeast extract and co-substrate as sucrose and/or ethanol. The operation of reactor was divided in following steps: (1) biomass immobilization phase in close circuit; (2) stage I with sucrose and ethanol (50/50%) without powder soap addition in open circuit; (3) stage II with sucrose and ethanol (50/50%) and $6,8 \pm 2,1$ mg/L of LAS in open circuit; (4) stage III with sucrose and ethanol (50/50%) and $14,3 \pm 1,5$ mg/L of LAS in open circuit; and (5) stage IV with only sucrose as co-substrate and $16,4 \pm 2,5$ mg/L of LAS in open circuit. For all stages, it was obtained up $78 \pm 8,4\%$ average COD removal with $590,2 \pm 76,2$ mg/L influent. There was a increase of COD removal around 12% with powder soap addition among stage I and following stages, these last ones, together, had $597,7 \pm 83,1$ mg/L of average COD influent. The LAS removal was $37,7 \pm 13,7\%$ with $12,4 \pm 8,4$ mg/L of LAS influent. Using statistic analysis, it is not possible to define the level of co-substrates importance in COD and LAS removal. Through mass balance, it was verified 39,4% of LAS removal, with 30,6% from biological degradation and 8,8% from adsorption. Diverse microbial populations were observed from different stages by DGGE analysis. It was identified microorganisms relating to Proteobacteria (72%), Acidobacteria (3%), Synergistetes (3%), Bacteroidetes (6,3%) and Firmicutes (6,3%) phyla in biomass support material from last stage. Most of sequences were closed to Rhodocyclaceae family which members are capable to degrade aromatic compounds.

Keywords: ethanol, sucrose, sand, AFBBR, Rhodocyclaceae, gene RNAr 16S, DGGE, co-substrates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1: Estrutura do tensoativo	5
Figura 3.2: Processo de formação micelar	6
Figura 3.3: Estrutura da molécula de LAS	7
Figura 2.4: Possível rota de metabolização anaeróbia do LAS	12
Figura 4.1: Fluxograma geral dos experimentos	20
Figura 4.2: Desenho esquemático do reator de leito fluidificado	22
Figura 4.3: Sistema fechado na fase de fixação da biomassa. A: Desenho esquemático	
B: Reator em escala de bancada	25
Figura 4.4: Fluxograma com as etapas da clonagem até o sequenciamento	37
Figura 5.1: Gráfico de queda de pressão (ΔP) <i>versus</i> velocidade ascensional	43
Figura 5.2: Variação temporal da DQO filtrada durante o período de fixação da biomassa	
.....	45
Figura 5.3: Concentração de ácidos totais voláteis (AVT) ao longo do período de fixação da biomassa.....	46
Figura 5.4: Variação temporal de DQO filtrada ao longo da operação do reator	48
Figura 5.5: <i>Box-plot</i> de remoção de DQO de diferentes águas residuárias: DQO1 (etanol como co-substrato), DQO2 (etanol e sacarose como co-substratos), DQO3 (etanol como co-substrato + 14,40±3,5 mg/L de LAS), DQO4 (etanol e sacarose como co-substratos + 6,8±2,1 mg/L de LAS), DQO5 (etanol e sacarose como co-substratos + 14,3±1,5 mg/L de LAS) e DQO6 (sacarose como co-substrato + 16,4±2,5 mg/L de LAS). As barras representam os valores máximos e mínimos, $\bar{x}$ representa a média e os asteriscos constituem os <i>outliers</i> . Fonte: DQO 1 e DQO 3 (Carosia,2011)	50
Figura 5.6: Variação temporal de LAS afluente, efluente e eficiência de remoção.....	54
Figura 5.7: Variação temporal de carga de LAS removida por carga aplicada	54
Figura 5.8: <i>Box-plot</i> de remoção de LAS de diferentes águas residuárias: LAS1 (etanol como co-substrato e 14,4±3,5 mg/L de LAS), LAS2 (etanol e sacarose como co-substratos e 6,8±2,1mg/L de LAS), LAS3 (etanol e sacarose como co-substratos + 14,3±1,5 mg/L de LAS), DQO4 (+ 16,4±2,5 mg/L de LAS). As barras representam os valores máximos e mínimos, $\bar{x}$ representa a média e os asteriscos constituem os <i>outliers</i> . Fonte: LAS 1 (Carosia, 2011).....	57
Figura 5.9: Eficiência de remoção de LAS em várias configurações de reatores	59

Figura 5.10: Variação temporal de pH para RALF.....	63
Figura 5.11: Variação temporal de alcalinidade parcial para RALF.....	64
Figura 5.12: Variação temporal de alcalinidade total para RALF.....	64
Figura 5.13: Variação temporal de potencial Redox durante a operação do reator	65
Figura 5.14: Variação temporal de ácidos voláteis totais (AVT) durante a operação do RALF.....	67
Figura 5.15: Percentual de contribuição de cada espécie de ácido em cada etapa de operação do RALF	67
Figura 5.16: Variância explicativa dos componentes principais	71
Figura 5.17: Gráfico da Análise de Componentes Principais (ACP)	72
Figura 5.18: Balanço de massa do LAS	74
Figura 5.19: Dendograma a partir do DGGE com adoção do coeficiente de Jacard. A letra “B” representa amostra retirada de biofilme presente no material suporte e a “S” identifica a biomassa advinda do separador de fases. Os números representam os diferentes substratos sintéticos advindos de: Carosia (2010): etanol + 14,4±3,5 mg/L de LAS (1); etapa I: etanol e sacarose sem LAS (2); etapa II: etanol e sacarose + 6,8±2,1 mg/L de LAS (3); etapa III: etanol e sacarose + 14,3±1,5 mg/L de LAS (4); e etapa IV: etanol e sacarose + 16,4±2,5 mg/L de LAS (5).....	77
Figura 5.20: Percentagem de filos relacionados à biomassa presente na areia da etapa IV.....	79
Figura 5.21: Percentagem de classes presentes no filo Proteobacteria.....	81
Figura 5.22: Percentagem de seqüências relacionadas às diferentes famílias de <i>Bacteria</i> . Em frente as barras, encontram-se as percentagens de similaridade (mínima e máxima). Adotou-se Bootstrap de 90% no RDP-Classifier	82
Figura 5.23: Curva de rarefação das seqüências da biomassa da areia com matriz de distância evolutiva de 0; 0,03; 0,05 e 0,1	89
Figura 5.24: Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida na areia da etapa IV. Após os colchetes, os agrupamentos foram classificados em família e classe. A terminação em “aceae” indica a família. A espécie <i>Gemmata obscuriglobus</i> foi adotada como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Componentes típicos do detergente em pó	3
Tabela 3.2: Relação de trabalhos utilizando a co-digestão com compostos recalcitrantes	13
Tabela 4.1: Comparativo entre Carosia (2011) e o presente trabalho.....	21
Tabela 4.2: Especificações do material suporte	21
Tabela 4.3: Parâmetros de vazão e TDH das diferentes etapas de operação	22
Tabela 4.4: Principais características das fases de operação do reator	26
Tabela 4.5: Composição do esgoto sintético na etapa de fixação da biomassa e etapa I.....	27
Tabela 4.6: Composição do esgoto sintético das etapas 2 e 3	28
Tabela 4.7: Composição do esgoto sintético da etapa 4	28
Tabela 4.8: Solução de sais inorgânicos.....	28
Tabela 4.9: Análises de monitoramento do reator	30
Tabela 4.10: <i>Primers</i> do domínio <i>Bacteria</i>	34
Tabela 4.11: Descrição das etapas do termociclador para os <i>primers</i> do domínio <i>Bacteria</i>	35
Tabela 4.12: Componentes do “mix” usado na PCR	35
Tabela 4.13: Composição do meio Luria-Bertani (LB)	38
Tabela 4.14: <i>Primers</i> utilizados na amplificação do DNA plasmidial	39
Tabela 4.15: Descrição das etapas do termociclador para os <i>primers</i> M13f e M13r	39
Tabela 5.1: Parâmetros de fluidificação do leito	42
Tabela 5.2: Parâmetros verificados no comportamento de fluidificação do reator	43
Tabela 5.3: Parâmetros monitorados durante a etapa de fixação da biomassa	46
Tabela 5.4: Valores de DQO obtidos para cada etapa de operação	47
Tabela 5.5: Comparação par a par das médias de remoção de DQO de diferentes águas residuárias por teste Scheffé ($\alpha = 0,05$)	52
Tabela 5.6: Valores médios de LAS durante a operação	53
Tabela 5.7: Comparação par a par das médias de remoção de LAS de diferentes águas residuárias por teste Scheffé ($\alpha = 0,05$)	58
Tabela 5.8: Parâmetros dos reatores visualizados na Figura 5.9	60
Tabela 5.9: Parâmetros físico-químicos de monitoramento do RALF.....	61

Tabela 5.10: Valores médios de ácidos orgânicos voláteis do RALF.....	66
Tabela 5.11: Valores médios de sólidosdo efluente do RALF.....	69
Tabela 5.12: Balanço de massa do LAS.....	73
Tabela 5.13: Adsorção do LAS	73
Tabela 5.14: Balanço global do LAS	73
Tabela 5.15: Relação de clones e <i>contigs</i>	78
Tabela 5.16: Relação de <i>contigs</i> representativos e UTOs correspondentes	88
Tabela 5.17: Relação de UTOs e respectivas seqüências do Genbank relacionadas	90

LISTAS DE SIGLAS

- ABS** - Alquilbenzeno sulfonado (*Alkylbenzene Sulphonate*)
- ACP** - Análise de Componentes Principais
- AOV** - Ácidos orgânicos voláteis
- AP** – Alcalinidade parcial
- AT** – Alcalinidade total
- AVT** - Ácidos totais voláteis
- BRS** - Bactérias redutoras de sulfato
- BTEX** - Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
- CLAE** - Cromatografia líquida de alta eficiência
- CMC** - Concentração micelar crítica
- CSTR** - Reator de batelada contínuo (*Continuous Stirred-Tank Reactor*)
- DGGE** – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)
- DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- dNTP** - Base nitrogenada
- DQO** – Demanda química de oxigênio
- EGSB** - Reator anaeróbio do leito expandido (*Expanded Granular Sludge Bed*)
- LAE** - Etoxilato de álcool linear (*Linear Alcohol Ethoxylate*)
- LAS** - Alquilbenzeno linear sulfonado (*Linear Alkylbenzene Sulphonate*)
- LASI** - Intermediários carboxilados transientes com grupo sufofenil do LAS
- LC₁**- Concentração letal para matar ao menos um indivíduo
- LC₅₀** - Concentração letal responsável por matar 50% dos indivíduos de determinada população
- LD** – Limite de detecção
- Me-SPC** - Ácido sulfofenilcarboxílicos metilado (*Methyl Sulfophenyl Carboxylic Acids*)
- Me-SPdC** - Ácido sufofenildicarboxílico metilado (*Methyl Sulfophenyl Dicarboxylic Acids*)
- NCBI** – *National Center of Biotechnology Information*
- PAH** - Hidrocarbono aromático policíclico (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*)
- PBS** - Tampão fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
- PCB** - Bifenila policlorada (*Polychlorinated Biphenyl*)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

pH – Potencial hidrogeniônico

PYG - Peptona-levedura-glicose (*Peptone-Yeast-Glucose*)

RAHLF - Reator anaeróbio horizontal de leito fixo

RALF – Reator anaeróbio de leito fluidificado

RNAr – Ácido ribonucleico ribossômico

SCSTR – Reator de batelada semi-contínuo (*Semi-continuous Stirred-Tank Reactor*)

SPC - Ácido sulfofenilcarboxilato (*Sulfophenil Carboxilate Acid*)

SST - Sólidos suspensos totais

SSV - Sólidos suspensos voláteis

ST – Sólidos totais

STP - Tripolifosfato de sódio

STV - Sólidos totais voláteis

TAED – Tetraacetiletilenodiamina (*Tetraacetythylenediamine*)

TDH - Tempo de detenção hidráulica

UAFF - Leito fixo de fluxo ascendente (*Upflow Anaerobic Floating Filter*)

UASB – Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

UTO - Unidade taxonômica operacional

LISTA DE SÍMBOLOS

θ_c = Tempo de detenção celular

θ_h = Tempo de detenção hidráulica

Ar = Número de Arquimedes (adimensional)

ρ_s = Densidade do material suporte (M/L³)

ρ_a = Densidade da água (M/L³)

Dp = Diâmetro da partícula (L)

g = Aceleração da gravidade (L/T²)

μ = Viscosidade da água (M/L.T).

Remf = número de Reynolds na condição mínima de fluidificação

Vmf = Velocidade mínima de fluidificação (L/T).

Qmf = Vazão mínima de fluidificação (L³/T)

Sr = Seção transversal do reator (L²)

ΔP = Queda de pressão do líquido através do leito (g/cm s²)

h = altura do leito (cm)

v = Velocidade ascensional do líquido (cm/s)

ϵ = Porosidade do leito (adimensional)

Total de LAS (aflu ou eflu) = Massa total de LAS afluyente ou efluente acumulada (mg)

[LAS] = Concentração de LAS afluyente ou efluente (mg/L)

Q = Vazão de recirculação (L/d)

T = Tempo (d)

Total LAS adsorvido = Massa total de LAS adsorvida durante toda operação (mg)

Ad1 = Massa de LAS adsorvida no lodo presente dentro do reator (mg)

Ad2 = Massa de LAS adsorvida no SST efluente (mg)

Ad3 = Massa de LAS adsorvida na areia (mg)

α = Coeficiente de adsorção de LAS no lodo (mgLAS/gST)

Massa de lodo = Total de lodo presente no reator (gST)

β = Coeficiente de adsorção de LAS no SST efluente (mgLAS/gSST)

SST_{Total} = SST efluente acumulado durante toda operação (gSST)

ω = Coeficiente de adsorção de LAS no material suporte (mgLAS/gAreia)

Areia_{Total} = Massa total de areia empregada no reator (g)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTAS DE SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
1. Introdução	1
2. Objetivos	2
2.1 Objetivos Gerais	2
2.2 Objetivos específicos	2
3. Revisão Bibliográfica	3
3.1 Detergentes e Surfactantes	3
3.2 Alquilbenzeno Linear Sulfonado	7
3.3 Efeitos Biológicos do LAS	9
3.4 Degradação Anaeróbia do LAS	11
3.5 Co-digestão com compostos recalcitrantes	13
3.6 Diversidade microbiana em reatores anaeróbios	14
3.7 Reatores anaeróbios com biomassa imobilizada	16
3.8 Reator anaeróbio de leito fluidificado	17
4. Materiais e Métodos	20
4.1 Reator biológico de leito fluidificado	21
4.2 Velocidade mínima de fluidificação	23
4.3 Etapas de Operação	24
4.4 Inoculação	26
4.5 Composição do substrato sintético	27
4.6 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas	29
4.7 Extração do LAS adsorvido por Ultra-som	30
4.8 Cálculo do Balanço de massa de LAS	31
4.9 Biologia molecular	33
4.9.1 Coleta das amostras	33
4.9.2 Acondicionamento das amostras	34
4.9.3 Extração do DNA	34
4.9.4 Amplificação do DNA do domínio <i>Bacteria</i>	34
4.9.5 Purificação do produto de PCR	35

4.9.6 DGGE.....	35
4.9.7 Etapas da clonagem e seqüenciamento	36
4.9.7.1 Clonagem	37
4.9.7.2 Seqüenciamento	39
4.10 Análises estatísticas.....	40
5. Resultados e Discussão.....	42
5.1 Verificação da fluidificação do leito	42
5.2 Período de imobilização e adaptação da biomassa.....	44
5.4 Remoção de LAS	53
5.5 Monitoramento: pH, alcalinidade e potencial redox	61
5.6 Ácidos orgânicos voláteis.....	65
5.7 Sólidos suspensos totais	69
5.8 Análise de Componentes Principais (ACP).....	69
5.10 Balanço de massa do LAS.....	73
5.11 Variação da comunidade microbiana por DGGE.....	75
5.12 Análises filogenéticas.....	78
6. Conclusões.....	92
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	94
8. Referências Bibliográficas	95
8.1 Endereços eletrônicos:.....	95
8.2 Literatura científica:	95

1. Introdução

Um dos graves problemas ambientais é a poluição dos recursos hídricos por águas residuárias de origem doméstica e industrial. Muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, possuem precários sistemas de tratamento de esgoto o que acarreta gradativa deterioração do ambiente aquático.

A precariedade do tratamento das águas residuárias, principalmente de origem doméstica, contribui sobremaneira para a exposição da biota aquática a níveis elevados de surfactantes, sendo o alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) o principal representante. O LAS é o surfactante mais produzido e comercializado mundialmente na formulação de detergentes em pó e líquido, produtos de higiene pessoal, entre outras aplicações.

Embora a degradação anaeróbia do LAS fosse desacreditada em estudos anteriores, trabalhos mais recentes têm apontado para possível metabolização desse composto. O presente trabalho pretendeu contribuir para tal comprovação utilizando reator anaeróbio de leito fluidificado. Essa configuração de reator foi usada para tratamento de compostos orgânicos recalcitrantes (PEREZ et al., 2006) e surfactantes (PEREZ et al., 2006, OLIVEIRA et al., 2010). Essa configuração de reator possibilita a imobilização da biomassa em material suporte, permitindo maior contato dos microrganismos com o afluente e, conseqüentemente, maior eficiência de remoção utilizando menores tempos de detenção hidráulica. Além disso, a diluição do efluente devido a taxa de recirculação favorece sobremaneira a degradação, principalmente, de compostos tóxicos.

Outro ponto importante a ser abordado é a influência dos co-substratos na eficiência de degradação do LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado. É sabido que diferentes fontes de carbono contribuem para formação de populações diferenciadas nos reatores anaeróbios. A presença de consórcio microbiano contribui para remoção de compostos tóxicos devido à existência de diversas rotas metabólicas capazes de utilizar partes diferentes da estrutura molecular de determinada substância tóxica.

Este trabalho avaliou a remoção do LAS utilizando detergente em pó (ao invés do surfactante comercial puro), bem como, diferentes co-substratos. Além disso, investigou-se a comunidade microbiológica presente no interior do reator, uma vez que, há poucos estudos de caracterização de microrganismos em reator anaeróbio de leito fluidificado e, número ainda menor, de estudos envolvendo a remoção de surfactantes nesse sistema de tratamento.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Verificar a influência do co-substrato na remoção de detergente em pó em reator anaeróbio de leito fluidificado com biomassa imobilizada em areia.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Verificar a remoção de matéria orgânica e LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado de escala de bancada bem como os intermediários do processo de digestão anaeróbia;
- Avaliar a dinâmica da comunidade microbológica ao longo do tempo de operação do reator por meio da técnica de eletroforese de gel de gradiente desnaturante (DGGE);
- Estabelecer as relações filogenéticas dos microrganismos do domínio *Bacteria* presentes na última etapa da operação por meio do sequenciamento do RNAr 16S.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Detergentes e Surfactantes

A escassez de óleos naturais e gorduras durante a Segunda Guerra Mundial representou grande incentivo para o desenvolvimento dos detergentes sintéticos em substituição aos sabões (ICILIO, 2008). Apesar dos dois produtos apresentarem estruturas similares e mecanismos de limpeza também parecidos (BAILEY et al., 2002), os detergentes apresentam uma vantagem primordial em relação aos sabões; ou seja, não sofrem interferência das suas propriedades de limpeza em meio ácido, águas duras e/ou águas com diferentes níveis de temperatura (OSORIO; OLIVEIRA, 2001, YU; ZHAO; BAYLY, 2008).

O detergente comercial constitui-se em uma mistura de ampla variedade de substâncias, as quais são subdivididas em determinados grupos de acordo com suas funções. O detergente em pó, por exemplo, em sua maioria contém a seguinte formulação: surfactantes (tensoativos), adjuvantes ou “*builders*” (tripolifosfato de sódio, silicatos, carbonatos, zeólitas), carga (podem ser solúveis como sulfatos e cloretos, ou insolúveis como talco), agentes auxiliares na remoção da sujeira (enzimas, oxigênio ativo) e aditivos (branqueadores ópticos, perfumes, corantes, bentonitas, reguladores de espuma) (POVIA, 2007). A Tabela 3.1 elenca e explicita a função dos componentes comumente encontrados na formulação dos detergentes em pó.

Tabela 3.1: Componentes típicos do detergente em pó

Ingrediente	Função
Tripolifosfato de sódio (STP)	Diminuir a dureza da água; tamponamento (reduzir a alcalinidade)
Sulfato de sódio	Contribuir como carga adicional ao produto
“Soap noodles”	Causa rápido colapso da espuma durante o enxágüe
Zeólita	Diminuir a dureza da água pela absorção de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} ; agente granulante para concentrados detergentes
Carboximetilcelulose de sódio	Promove o aumento de cargas negativas em fibras celulósicas, deixando-as com efeito repelente às partículas de sujeira (positivamente carregadas)
Alquilbenzeno linear sulfonado (LAS)	Surfactante – principal ingrediente
Soda cáustica	Neutralizar o LAS.
Dietanolamida do coco ou álcool graxo de etoxialdo	Detergente não-iônico e formador de espuma
Fluorescente	Absorve radiação UV e emite luz azul, aumentando a sensação de branqueamento do tecido
Anidro de carbonato de sódio (Na_2CO_3)	Mantêm o pH entre 9,0 e 9,5, assegurando melhor atuação do detergente. Além disso, forma carbonatos insolúveis com Ca^{2+} e Mg^{2+} , reduzindo a dureza da água
Alvejante (usualmente usado o perborato de sódio – NaBO_3)	Branqueia manchas sem danificar tinturas de coloração permanente
Ativador do alvejante (como exemplo o TAED (tetraacetililenodiamina))	Catalisa a quebra do perborato de sódio em baixas temperaturas, permitindo sua atuação
Enzimas (exemplo: proteases alcalinas)	As proteínas são quebradas em condições alcalinas fornecidas pelo anidro de Na_2CO_3 , ajudando na remoção das manchas
Cor e perfume	Função estética

Fonte: <http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/detergents/11A.pdf>(modificado)

A ação de limpeza ou solubilização de impurezas dos detergentes pode ser atribuída à presença de tensoativos presentes na sua constituição. Essas substâncias possuem caráter anfifílico, ou seja, apresentam extremidade polar (hidrofílica) e uma cadeia hidrocarbônica constituindo a região apolar (hidrofóbica) (PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006) (Figura 3.1).

Figura 3.1: Estrutura do tensoativo

Fonte: Rinaldi et al.(2007)

A redução da tensão superficial da água é conseguida pelos surfactantes ao aderir às moléculas de água, rompendo as interações intramoleculares. Por meio desta ação, a estrutura esférica da gota entra em colapso, aumentando a superfície de contato do detergente com a sujeira (POVIA, 2007).

Uma propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar estruturas denominadas de micelas na presença de soluções polares como a água. Quando em baixas concentrações, as moléculas do surfactante apresentam-se em monômeros (GUANG-GUO, 2006). No entanto, ao aumentar a concentração do tensoativo, este tende a formar micelas, reduzindo a energia livre do sistema. A concentração de surfactante que favorece termodinamicamente a formação micelar do sistema surfactante-solvente é denominada Concentração Micelar Crítica (CMC) (HAIGH, 1996). A Figura 3.2 ilustra o processo de formação micelar quando a concentração do surfactante está acima do CMC.

Figura 3.2: Processo de formação micelar

Fonte: Maniasso (2001)

A CMC constitui importante parâmetro para medir o potencial de limpeza de determinado surfactante, definindo suas propriedades de detergência e solubilização. Em concentração acima da CMC, o surfactante tende a aumentar sua capacidade de solubilizar compostos orgânicos hidrofóbicos (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

Os agentes tensoativos podem ser classificados de acordo com a estrutura química do grupo hidrofílico: aniônico – a parte hidrofílica apresenta grupos aniônicos, garantindo carga resultante negativa à molécula; não-iônicos – carga resultante igual a zero; catiônicos – parte hidrofílica apresenta grupos catiônicos, apresentando carga resultante positiva; anfóteros – apresentam estruturas catiônicas e aniônicas na mesma molécula, podendo ser aniônico ou catiônico dependendo do pH (UPHUES, 1998, MERRETTIG-BRUNS; JELEN, 2009).

Embora os surfactantes sejam usados em diversas indústrias (cosméticos, processamento de metais, papel e couro), o maior mercado para essas substâncias está na indústria de detergentes para uso doméstico. A demanda anual nos Estados Unidos foi estimada em aproximadamente 3,47 bilhões de Kg, sendo cerca de 50 % do mercado destinados a produção de detergentes em pó e lavagem de pratos (RUST; WILDES, 2008).

Como há amplo uso dos detergentes, sua disposição no meio ambiente precisa ser verificada e monitorada. A principal via de descarga dos surfactantes se dá por meio do esgoto sanitário, característica agravada em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (como o Brasil) os quais não apresentam eficiente cobertura de esgotamento sanitário para a população (EICHHORN et al., 2001, EICHHORN et al., 2002). Os principais destinos dessas substâncias podem ser: ambiente aquático, tanto marinho como de água doce, podendo ainda estar adsorvidos em sedimentos presentes nestes ambientes; caso haja sistema de tratamento de esgoto sanitário, é possível encontrá-las também na biomassa destes sistemas de

tratamento; ou no solo devido a irrigação, *land-farming* e do uso de surfactantes na descontaminação de solos em virtude da presença de xenobióticos insolúveis (HAIGH, 1996, EICHHORN et al., 2002, BERNA et al., 2007, MERRETTIG-BRUNS; JELEN, 2009).

3.2 Alquilbenzeno Linear Sulfonado

O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), tensoativo aniônico inicialmente comercializado em 1964, é substituto dos detergentes ramificados ou alquilbenzenossulfonados (ABS). A substituição ocorreu, uma vez que, a grande quantidade de ABS que era jogada e acumulada nos rios, esgoto e estações de tratamento de efluentes produzia grande volume de espuma, ocasionando sérios problemas ambientais. A principal razão para enorme formação de espuma referia-se a composição química das cadeias ramificadas dos detergentes ABS, as quais não eram degradadas pelos microrganismos (OSORIO; OLIVEIRA, 2001).

O LAS constitui-se em surfactante aniônico composto por mistura de homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares variando de C₁₀ a C₁₆ com predominância de C₁₀ a C₁₃ (PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006) (Figura 3.3). Cada homólogo contém um anel aromático sulfonado na posição – *para* e cada isômero apresenta ligação fenila na cadeia alquílica linear em qualquer posição exceto nos carbonos terminais (SABLAYROLLES et al., 2009).

Figura 3.3: Estrutura da molécula de LAS

Fonte: Penteado, El Seoud e Carvalho (2006)

Dentre os mais variados surfactantes aniônicos utilizados, o LAS é o mais usado mundialmente: aplicado na formulação de detergentes domésticos e nos mais diversos produtos de limpeza e higiene pessoal (EICHHORN et al., 2002). Em 2003, o consumo global

de LAS foi de 2,9 bilhões de Kg, representando mais de 60% do mercado de tensoativos aniônicos e pouco mais de 30% do total de surfactantes sintéticos consumidos (excluindo o consumo de sabões) (HAUTHAL, 2004).

Nas estações de tratamento de esgoto, há concentrações elevadas de LAS nos lodos biológicos em virtude da adsorção do surfactante aniônico e do uso difundido do produto (GUANG-GUO, 2006). Em lodos digeridos aerobiamente, são encontrados entre 100 a 500 mg de LAS.Kg⁻¹ de peso seco de lodo; enquanto que em sistemas anaeróbios, há entre 1300 e 19000 mg Kg⁻¹ (JENSEN, 1999). Existem inúmeras razões para elevados valores de LAS em lodos digeridos anaerobiamente: utilização de grande volume da substância, sorção no lodo primário, precipitação como sais insolúveis de magnésio e cálcio no decantador primário e ausência de degradação anaeróbia (SCHOWANEK et al., 2007).

A entrada do LAS no ambiente terrestre se dá pela aplicação de água residuária de municípios e lodos de sistemas de tratamento no solo, sendo este agricultável ou utilizado como pasto (MUNGRAY; KUMAR, 2008). O LAS é rapidamente e extensivamente degradado em solos que recebem lodos de estações de tratamento e até mesmo naqueles sem nenhuma exposição prévia desse composto (HAIGH, 1996). Knaebel, Vestal e Federle (1990) verificaram meia-vida de dois dias para 50 µg/Kg, tanto para LAS, quanto para LAE (etoxilato de álcool linear), em onze diferentes tipos de solos. Waters et al. (1989), em condições mais realísticas, reportaram que a meia-vida de LAS após aplicação de lodo no solo foi de 7 a 22 dias.

No ambiente aquático, principalmente em rios, foi verificado aumento da concentração de LAS nas regiões onde há lançamento de efluentes domésticos e industriais. Trehy et al. (1996) reportaram diferentes concentrações de LAS e seus intermediários carboxilados transientes com grupo sufopenil (LASI) em corpos d'água dos Estados Unidos, a montante e a jusante de sistemas de tratamento de esgoto doméstico. Os valores médios de LAS foram de 16 e 35 µg/L e de LASI foram de 9,3 e 31 µg/L para as regiões a montante e a jusante, respectivamente. Eichhorn et al. (2002) constataram que as concentrações de LAS encontradas no Rio Macacu, entre a cidade de Cachoeiras de Macacu e a confluência com o Rio Guapiaçu (Rio de Janeiro), foram de 14 µg/L e 155 µg/L a montante e a jusante de Cachoeiras de Macacu, respectivamente. Portanto, houve liberação de esgoto doméstico no Rio Macacu.

A presença de LAS também pode ser constatada em ambiente marinho e estuário. Uma das razões para tal fato reside na existência dessas substâncias nos rios e canais que

desembocam nos mares devido a falta de tratamento do esgoto doméstico. González-Mazo, Forja Pajares e Gómez-Parra (1998) constataram a presença de intermediários da metabolização do LAS, os ácidos sulfonilcarboxilatos (SPCs), na Baía de Cádiz (Espanha) em virtude da presença de efluentes urbanos não tratados que são lançados em canal direcionado ao Oceano Atlântico. A concentração máxima encontrada desses compostos foi de 120 µg/L até cerca de 5 km do ponto de descarga dos efluentes urbanos.

3.3 Efeitos Biológicos do LAS

A toxicidade de surfactantes aniônicos verificada em microrganismos pode variar conforme a existência de mecanismos de adsorção, precipitação e biodegradação. Singh et al. (2002) avaliaram os efeitos tóxicos dos homólogos C₁₀-C₁₄ de LAS comercial em quatro espécies de peixes (*Carassius auratus*, *Cirrhina mrigala*, *Salmo gairdneri* e *Gambusia affinis*), uma espécie de camarão (*Gammarus pulex*) e um larva de díptera (*Chironomus bharti*). De acordo com esses autores, o maior grau de toxicidade foi observada para C₁₂-LAS, quando comparado com outros homólogos, sendo, provavelmente, consequência do equilíbrio entre os três processos acima descritos os quais ocorreram simultaneamente. No espectro de C₁₀-C₁₂, o homólogo de menor cadeia alquílica apresentou menor toxicidade. Em relação à série compreendida entre C₁₂-C₁₄, a relação foi oposta; ou seja, o homólogo de maior peso molecular (C₁₄) reportou toxicidade mais baixa devido a maior adsorção e menor biodisponibilidade do que os homólogos de menor peso molecular (C₁₂).

O efeito tóxico do LAS também está relacionado com sua capacidade de biodegradação. Esta, por sua vez, está diretamente relacionada com a sua estrutura, tanto do tamanho da cadeia linear, quanto da posição do grupo fenila na cadeia alquílica. Quanto maior a cadeia alquílica, maior o grau de toxicidade (GARCIA et al., 2006). Além disso, os isômeros internos – aqueles em que o grupo fenila está mais próximo ao átomo de carbono terminal da cadeia alquílica – possuem constante de biodegradação inferior aos isômeros externos (grupo fenila mais distante do carbono terminal) (PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006).

O LAS pode gerar efeitos tóxicos diferenciados em ampla gama de seres vivos (seres unicelulares a pluricelulares) ao se ligar a macromoléculas bioativas, tais como, peptídeos, enzimas e DNA. A ligação a proteínas e peptídeos pode provocar mudanças na configuração

da cadeia peptídica e mudança na carga superficial da molécula (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

No ambiente aquático, o LAS pode provocar os seguintes efeitos: diminuição da concentração de elementos necessários para a vida aquática, por exemplo, oxigênio dissolvido, devido à diminuição da tensão superficial água/ar; diminuição da permeabilidade da luz, por manter as partículas presentes em suspensão; aumento da concentração de compostos xenobióticos, como bifenilas policloradas (PCBs), e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) presentes no sedimento por solubilização micelar, inibindo sua degradação (PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006).

Alvarez-Muñoz et al. (2007) relataram *stress* oxidativo por meio do aumento de catalase nas brânquias de *Solea senegalensis* para exposição de 800 µg/L de LAS. A utilização de enzimas, tais como, catalase e glutathione peroxidase, são consideradas ferramentas úteis para estimar respostas mediadas por oxi-radicais, pois são componentes fundamentais no sistema de defesa antioxidante (DI GIULIO et al., 1989).

Verge et al. (2001) avaliaram a toxicidade provocada pelo LAS em *Daphnia magna*. Os autores constataram que LC₁ (concentração letal para matar ao menos um indivíduo) e LC₅₀ (concentração letal responsável por matar 50% dos indivíduos de determinada população) foram menores para menor tamanho da cadeia alquílica do LAS; sendo provável que o aumento da cadeia tenha provocado maior interação com as membranas celulares.

No ambiente terrestre, a maioria dos estudos vinculam os possíveis efeitos toxicológicos da molécula de LAS devido aplicação no solo de lodo de estação de tratamento. Ou et al. (1997) verificaram 16 mg/Kg de LAS em arroz proveniente de plantações que receberam irrigação de efluente doméstico *in natura*. Essa prática pode provocar interferência em processos biológicos, como por exemplo, a troca do contra-íon de LAS (Na⁺) pelo (NH₄⁺) perturba o equilíbrio do ciclo do nitrogênio, inibindo a conversão oxidativa da amônia em nitrato (nitrificação) promovido por bactérias autótrofas, tais como, *Nitrossomonas* sp., acarretando a morte de tais microrganismos (BRANDT et al., 2001).

Em relação aos microrganismos, Gavala e Ahring (2002) constataram que o LAS promoveu inibição, tanto da acetogênese do propionato, quanto, da metanogênese do acetato e hidrogênio. Segundo os autores, a presença de LAS pode ser o fator principal para a baixa eficiência de degradação de substratos em meio anaeróbio.

Løbner et al. (2005) avaliaram a estabilidade do reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) na presença de LAS. Os autores constataram maior instabilidade em relação a

produção de ácidos orgânicos envolvidos na digestão anaeróbia. Houve maior produção de ácidos orgânicos voláteis no reator com LAS, indicando desestabilização do processo anaeróbio. Além disso, a presença de LAS possivelmente provocou aumento do grânulo e deslocamento das arqueias metanogênicas para o centro do mesmo a fim de se proteger contra a exposição ao surfactante.

3.4 Degradação Anaeróbia do LAS

A degradação anaeróbia do LAS tem sido evidenciada em alguns estudos (SANZ et al., 2003, DUARTE et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2009, DUARTE; OLIVEIRA; MAYOR et al., 2010, DUARTE; OLIVEIRA; SAAVEDRA et al., 2010), no entanto, as etapas de metabolização desse composto, ainda, não foram elucidadas. Os principais motivos para a dificuldade de comprovação da degradação anaeróbia do LAS podem ser enumerados, como sendo: (i) menores concentrações de lodo somado a maiores concentrações de surfactante aplicados nas condições de pesquisa em comparação aos encontrados em digestores sugerem que resultados negativos de biodegradação sejam indicativo de falso comportamento recalcitrante do LAS em ambiente anaeróbio (BERNA et al., 2007); (ii) os principais métodos de determinação da possível degradação contemplam somente a detecção de CO₂ e CH₄, sendo assim, ignoram a evidenciação de compostos intermediários do composto (BIRCH et al., 1989).

Uma possível rota de completa metabolização anaeróbia do LAS foi descrita por Lara-Martín et al. (2010), como pode ser visualizado na Figura 3.4. Segundo os pesquisadores, essa rota pode ser descrita em seis etapas: (1) primeiramente, Me-SPdCs (ácidos sulfonilcarboxílicos metilados) são formados pela adição de fumarato ao átomo de carbono subterminal (C-2) da cadeia alquílica do LAS. A adição da molécula de fumarato ao C-2 é preferível não apenas no caso do LAS, mas, também para etilbenzeno utilizado por microrganismos sulfato-redutores (RABUS; HEIDER, 1998, KNIEMEYER et al., 2003); (2) na próxima etapa, há a migração do grupo carboxil do C-3 para o C-2 e subsequente descarboxilação devido à liberação do grupo carboxil no C-1, resultando na formação do Me-SPCs (ácidos sulfonilcarboxílicos metilados); (3) os metabólitos da etapa anterior sofrem β -oxidação sem que haja a presença de oxigênio gerando dois SPCs metilados (de Me-C₁₀ a Me-C₁₃SPC); (4) e (5) compreendem passos metabólicos nos quais esses compostos sofrem sucessivas β -oxidações das cadeias alquílicas para formar diferentes SPCs (ácidos sulfonilcarboxílicos) homólogos. Nessa sequência a unidade C-3 é liberada possibilitando a

regeneração do fumarato (WILKES et al., 2002); (6) essa última etapa consiste na degradação final da molécula de LAS: desulfonação e liberação do anel benzênico.

Figura 3.4: Possível rota de metabolização anaeróbia do LAS

Fonte: LARA-MARTÍN et al. (2010) modificado

A degradação anaeróbia do LAS tem sido evidenciada por meio do consórcio de bactérias presentes em determinado meio reacional: a interação das diferentes espécies

contribui para agir em distintas partes da molécula de LAS (ALMENDARIZ et al., 2001, SANZ et al., 2003, DUARTE et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2010). Khleifat (2006) verificou a biodegradação do LAS por meio do consórcio de duas bactérias facultativas: *Pantoea agglomerans* e *Serratia odorífera*. As culturas foram crescidas em diferentes meios de cultura, tanto separadas, como em consórcio. Em todas as condições estudadas, houve maior degradação do LAS nas culturas em consórcio microbiano.

3.5 Co-digestão com compostos recalcitrantes

A co-digestão é a tecnologia que combina diferentes compostos orgânicos misturados em reator anaeróbio a fim de melhorar o desempenho geral da digestão anaeróbia (BOUALLAGUI et al., 2009). Nesse processo os microrganismos utilizam diferentes fontes de carbono e energia, aumentando o nível de degradação dos compostos aplicados no reator.

Essa tecnologia vem sendo utilizada em muitos estudos sobre biodegradação de compostos recalcitrantes, como pode ser visualizado na Tabela 3.2. As principais vantagens da aplicação da co-digestão com substâncias recalcitrantes são: complementação dos componentes nutricionais de determinada água residuária (GAVALA et al., 1996, BOUALLAGUI et al., 2009, PONSÁ; GEA; SÁNCHEZ, 2011), incremento da produção de biogás (VAN LIER et al., 2001), estabilidade do pH (KAPARAJU; RINTALA, 2005) e evitar o acúmulo de ácidos orgânicos voláteis no reator (SOSNOWSKI; WIECZOREK; LEDAKOWICZ, 2003).

Tabela 3.2: Relação de trabalhos utilizando a co-digestão com compostos recalcitrantes

Componentes da co-digestão	Reator Anaeróbio	Referência
Resíduo de óleo de fluido e vinhaça	Leito fixo de fluxo ascendente (UAFF).	Perez et al. (2006)
Óleo de palma e rúmen	Batelada semi-contínuo (SCSTR)	Alrawi et al. (2011)
Lodo de alga e resíduo de papel	Digestor anaeróbio	Yen e Brune (2007)
Lixiviado e lodo de esgoto	Digestor anaeróbio	Montusiewicz e Lebiocka (2011)
Corantes azo-reativos e ácido acético Resíduos de tecido de algodão e ácido acético	Batelada contínua (CSTR)	Georgiou et al.(2004)
Resíduos de corantes e tapioca	UASB	Chinwetkivanich, Tuntoolvest e Panswad (2000)
Resíduos de vinho e esterco de porco	Batelada semi-contínua (SCSTR)	Riaño, Molinuevo e García-González (2011)
Água residuária de indústria têxtil e glicose	Leito fluidificado	Sem e Demirer (2003)

Assim como, outros compostos recalcitrantes, o LAS também já foi utilizado em processos de co-digestão. Costa et al. (2007) avaliaram a co-digestão anaeróbia de surfactantes (principalmente o LAS), óleo mineral e lodo de esgoto. Os autores verificaram a viabilidade da biodegradação desses compostos misturados em reator em batelada. A produção de gás metano não foi alterada pela presença de surfactante.

Abboud et al. (2007) avaliaram a degradação de LAS em consórcio de duas bactérias facultativas (*Acinetobacter calcoaceticus* e *Pantoea agglomerans*). Os autores relataram maior remoção do surfactante ao adicionar co-substratos. Quando os microrganismos foram incubados em meio nutricional sem adição de co-substratos apenas 60 % de LAS foram removidos. Ao adicionar fontes alternativas de carbono (glicose, sacarose, maltose e manitol) e nitrogênio (nitrato de amônio, cloreto de amônio, caseína, extrato de levedura e triptona) todo surfactante adicionado foi degradado biologicamente.

A degradação de LAS foi estudada por Carosia (2011) e Delforno et al. (2011) utilizando co-substratos metabólicos para facilitar a remoção do surfactante. Nos dois estudos foram empregados o mesmo tipo de inóculo advindo de reator UASB no tratamento de resíduos de abatedouro de aves e a remoção de LAS foi superior a 45%. Especificamente, em Carosia (2011), foi aplicado etanol como co-substrato juntamente com aproximadamente 15 mg/L de LAS, extrato de levedura e solução de sais em reator anaeróbio de leito fluidificado com areia como material suporte e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 15 horas. Enquanto isso, em Delforno et al. (2011), os autores avaliaram a remoção do LAS em reator anaeróbio de leito expandido aplicando 14 mg/L de LAS juntamente com metanol e etanol como co-substratos em diferentes TDHs (26 horas e 32 horas).

3.6 Diversidade microbiana em reatores anaeróbios

Grande parte da eficiência de remoção de compostos recalcitrantes em reatores anaeróbios se deve à presença de consórcio microbiano. A interação de diferentes microrganismos com as mais variadas rotas metabólicas possibilita a degradação de inúmeras substâncias recalcitrantes, uma vez que, os metabólitos de determinado organismo pode servir como substrato por outro, desse modo, favorecendo todo o processo de biodegradação (BRANDT; VAN LEEUWEN; KOOIJMAN, 2003).

A caracterização das comunidades microbianas em reatores anaeróbios foi facilitada e impulsionada com a utilização de técnicas de biologia molecular (GILBRIDE; LEE; BEAUDETTE, 2006). O uso das ferramentas moleculares na descoberta dos possíveis

microrganismos envolvidos na clarificação das águas residuárias permite a inferência de rotas metabólicas empregadas pelos mesmos e, em última análise, maior entendimento da operação do reator (SANZ; KOCHLING, 2007, RIVIERE et al., 2009).

Duarte et al. (2010) relacionaram a remoção anaeróbia de LAS em reatores de bateladas sequenciais com a comunidade microbiana presente nos mesmos sob diferentes tipos de alimentação. A diversidade de microrganismos do domínio *Archaea* e *Bacteria* foi constatada por meio de análises de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento do RNAr 16S. A população de microrganismos foi alterada ao longo das etapas de operação devido a modificações na composição do substrato sintético adotado na alimentação das diferentes etapas. Por meio das técnicas moleculares, os autores puderam inferir os possíveis microrganismos que contribuíram na degradação do LAS: *Pseudomonas spp.* pode utilizar o surfactante como fonte de carbono ou energia, a bactéria sulfato redutora *Syntrophus sp.* pode obter enxofre da molécula de LAS e *Novosphingobium* e *Dechloromonas* podem usar o anel aromático da estrutura molecular do LAS como fonte de carbono e energia.

Oliveira et al. (2010) descreveram os microrganismos presentes em dois tipos de reatores de leito fluidificado utilizados na degradação de 20 mg/L de LAS por meio do sequenciamento do RNAr 16S. Um deles continha esferas de vidro como material suporte e outro foi preenchido com areia. No reator com esferas de vidro, foram relatados sete diferentes filos identificados: Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Proteobacteria, Verrucomicrobia. Já no reator com areia, foram identificados oito filos: Acidobacteria, Anaerolineae Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Proteobacteria. Nos dois tipos de configuração, os filos Proteobacteria e Bacteroidetes foram os mais comuns: 36 e 26 % nas esferas de vidro e 25 e 25% na areia, respectivamente.

Carosia (2011) ao avaliar a degradação anaeróbia de LAS em reator de leito fluidificado, constatou a existência de diferentes grupos de microrganismos tanto na região do separador de fases (topo do reator) quanto no material suporte (areia, neste caso). A diversidade presente no material suporte foi pouco superior a encontrada no separador de fases, encontrando-se 11 e 9 classes de *Bacteria*, respectivamente. Nas amostras da areia, predominaram as classes Betaproteobacteria e Deltaproteobacteria que representaram 43 e 31% dos clones analisados, respectivamente. Nas amostras do material suporte foram predominantes a classe Epsilonproteobacteria (23%) e Synergistia (19%). Vale mencionar que

nas duas regiões do reator foram encontradas o gênero *Dechloromonas* sp. e *Geobacter* sp., inferindo possível importância destes microrganismos na degradação do LAS.

Delforno et. al (2011) caracterizaram a comunidade microbiana do reator anaeróbio de leito expandido (EGSB) usado na remoção de LAS, tanto, no leito de lodo, quanto, no separador de fases por meio do seqüenciamento do RNAr 16S. Os filos Proteobacteria (55%) e Synergistetes (27,9%) foram aqueles com maior representatividade entre os microrganismos verificados na manta de lodo. Para o separador de fases foi verificada diversidade diferenciada de filos, sendo Firmicutes (39%) e Proteobacteria (18,6%) os mais predominantes. Mais especificadamente, os autores destacaram a família Veillonellaceae (filo Firmicutes), especificamente, *Sporomusa*, o qual representou 39% dos clones do separador de fases e apenas 4% na manta de lodo. Referem-se a microrganismos anaeróbios, homoacetogênicos e capazes de utilizar compostos aromáticos como alternativa a homoacetogênese (BREZNAK, 2006). Outro gênero destacado pelos autores foi *Geobacter* (família Geobacteraceae) presente apenas em clones da manta de lodo. Estes são bacilos estritamente anaeróbios, Gram-negativos e capazes de oxidar ampla gama de compostos aromáticos.

3.7 Reatores anaeróbios com biomassa imobilizada

O biofilme pode ser definido como uma complexa e consistente estrutura de células procarióticas e produtos, como polímeros extracelulares, os quais podem crescer de forma espontânea formando largas e densas estruturas na forma de grânulos, bem como, podem se desenvolver fixados a superfície sólida estática ou em suspensão (LETTINGA et al., 1980; CHARACKLIS, 1990; HEIJNEN, 1984).

A formação de biofilmes é favorecida em várias tecnologias de tratamento de efluentes, tais como, filtros percoladores, reatores UASB, lodos ativados, entre outros. A biomassa imobilizada contribui para maior estabilidade do reator e promove certa resistência à carga de afluentes tóxicos (BOHLMANN; BOHNER, 2001).

Somado aos sistemas de biofilmes, o uso da tecnologia anaeróbia vem ganhando espaço nas últimas décadas com o desenvolvimento de reatores com diferentes configurações. O elevado tempo de detenção celular (θ_c) aplicado nesses reatores torna a operação mais estável e alto desempenho no tratamento pode ser alcançado mesmo com curto tempo de detenção hidráulica (θ_h) (ZAIAT; RODRIGUES; FORESTI, 2000). Outra vantagem da aplicação de reatores anaeróbios, principalmente no tratamento de águas residuárias

industriais, está em suportar altas cargas de matéria orgânica, potencial para produção de energia (por meio do hidrogênio e metano) e baixa produção de lodo excedente (CHAN et al., 2009).

A eficiência de reatores anaeróbios com biomassa aderida depende, além de vários fatores operacionais, do material suporte no qual o biofilme ficará aderido. A otimização do tratamento está vinculada à capacidade do material suporte de manter a biomassa fixada permitindo que maior quantidade de microrganismos fique exposta ao afluente.

Oliveira et al. (2009) testaram o efeito do material suporte na eficiência de remoção do LAS utilizando Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF). Nesse trabalho, foram configurados dois tipos de reatores RAHLF em função do material suporte usado: um carvão vegetal (RAHLF₁) e outro contendo mistura de argila expandida e espuma de poliuretano (RAHLF₂). Apesar de o RAHLF₁ ter apresentado menor adsorção do surfactante e maior coeficiente cinético de degradação comparado ao RAHLF₂, os valores encontrados foram bem similares. Portanto, os dois tipos de materiais suporte são apropriados para remoção do LAS em reator de leito fixo.

Oliveira et al. (2010) conferiram a eficiência de remoção de LAS em quatro diferentes materiais suportes em reator anaeróbio de leito fluidificado: carvão ativado (R₁), argila expandida (R₂), pérolas de vidro (R₃) e areia (R₄). A remoção de LAS em todos os reatores foi superior a 90 %. A maior eficiência de degradação foi evidenciada nos reatores com pérolas de vidro (R₃) e areia (R₄) com 99 e 98%, respectivamente.

3.8 Reator anaeróbio de leito fluidificado

O reator de leito fluidificado consiste em um cilindro no qual o líquido a ser tratado é bombeado através do leito formado por material suporte de pequena granulometria (exemplo típico seria a areia com partículas que variam em torno de 0,2 a 0,8 mm) com velocidade suficiente para causar fluidificação (NICOLELLA; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2000). No estado fluidificado, o material suporte favorece elevada superfície específica para fixação dos microrganismos e, conseqüentemente, desenvolvimento de concentração de biomassa em torno de 10 a 40 kg m⁻³ (COOPER; SUTTON, 1983).

No tratamento anaeróbio, o leito fluidificado apresenta-se como alternativa viável para remoção de altas cargas de matéria orgânica, principalmente, de origem industrial. Quando comparado ao reator UASB, uma das configurações de reatores anaeróbios mais utilizadas, o reator de leito fluidificado possui algumas vantagens: alta capacidade de purificação, sem

problemas de entupimento (como em filtros), não há problema de lavagem do lodo, como ocorre no UASB, quando o lodo granulado não é obtido, e necessita de baixos requerimentos em relação a volume e área para construção (HEIJNEN et al., 1989¹).

Em estudo comparativo entre duas tecnologias de tratamento anaeróbio, Pérez, Romero e Sales (1998) avaliaram filtro anaeróbio e reator de leito fluidificado no tratamento da vinhaça utilizando, em ambos os reatores, anéis de Rashig e pérolas de vidro como material suporte para crescimento da biomassa. Segundo os autores, o reator de leito fluidificado foi mais eficiente na remoção da vinhaça, uma vez que permitiu maior contato entre os microrganismos e o substrato.

Os reatores anaeróbios de leito fluidificado têm se apresentado como alternativa interessante no tratamento de compostos de difícil degradação tais como substâncias orgânicas recalcitrantes, tóxicas, surfactantes entre outros. Essa alternativa foi estudada por Sen e Demirer (2003) que avaliaram o tratamento de água residuária de indústria têxtil utilizando reatores de leito fluidificado. Por meio dos resultados, os autores inferiram que a clarificação dessa água ocorreu quando houve adição de fonte externa de carbono na forma de glicose. As velocidades máximas de remoção de matéria orgânica e cor foram de 82 e 59 %, respectivamente, com TDH de 24 horas e taxa de carga orgânica de 3 kg COD/m³/d. A adição de maior quantidade de fonte externa de carbono a partir de determinada concentração dos tóxicos não melhorou a eficiência de remoção da cor.

Oliveira (2010) utilizou em seu trabalho reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) a fim de remover LAS comercial puro misturando-o com substrato sintético simulando esgoto doméstico composto de extrato de levedura, sais, bicarbonato de sódio e sacarose. Neste estudo, a remoção de LAS atingiu valores acima de 80 % nos mais diferentes materiais suporte: com areia foi de 99% com LAS afluyente de 18,8 mg/L; utilizando pérolas de vidro, obteve-se remoção de 99% com 18,8 mg/L de LAS no líquido afluyente; na argila expandida, a remoção foi de 81% com LAS afluyente de 13,4 mg/L; e ao utilizar carvão ativado, foram removidos 95% do LAS afluyente (14,7 mg/L). Em todos os reatores foram aplicados DQO afluyente em torno de 550 mg/L e TDH de 18 horas.

Esse resultado abriu margem para verificação de remoção do LAS presente no sabão em pó, sendo característica mais semelhante a das águas residuárias domésticas. Questões

¹apud SARAVANAN, V.; SREEKRISHNAN, T. R. Modelling anaerobic biofilm reactors—a review. *Journal of Environmental Management*, v. 81, n. 1, p. 1-18, 2006.

acerca deste tema surgiram ao longo da elaboração do presente trabalho: as diversas substâncias presentes no sabão, além do LAS, poderão interferir na eficiência de remoção do surfactante pelos microrganismos? Além disso, a utilização de diferentes co-substratos no sistema biológico afetará os índices de remoção do LAS devido ao possível desenvolvimento de rotas metabólicas diferenciadas?

4. Material e Métodos

No presente estudo foi avaliada a influência do etanol e/ou sacarose como co-substrato na eficiência de remoção do LAS em reator biológico de leito fluidificado. O lodo utilizado adveio de abatedouro de aves. Todas as etapas bem como as análises realizadas durante o trabalho experimental estão delineadas detalhadamente na Figura 4.1.

Figura 4.1: Fluxograma geral dos experimentos

Todos os pontos citados no fluxograma da Figura 4.1 serão abordados mais especificadamente em tópicos posteriores da seção “Material e Métodos”. No entanto, vale ressaltar a inexistência de medição do tempo de detenção hidráulica (TDH) na etapa de fixação da biomassa em virtude do sistema fechado. Além disso, não houve etapa utilizando apenas etanol como co-substrato devido à limitação de tempo do trabalho. As etapas deste estudo foram comparadas estatisticamente com Carosia (2011) em relação a média de remoção de matéria orgânica e de LAS. Vale ressaltar que o autor do presente estudo acompanhou a parte experimental de Carosia (2011) e teve acesso aos dados semanais de

remoção de DQO e LAS. As diferenças entre os dois estudos podem ser visualizadas pela tabela 4.1 abaixo:

Tabela 4.1: Comparativo entre Carosia (2011) e o presente trabalho

Características	Carosia (2011)	Presente trabalho
Co-substrato	Etanol (100%)	Etanol/Sacarose (50/50%) e Sacarose (100%) (Figura 4.1)
LAS	14,4±3,5 mg/L (etapa única)	6,79±2,09 mg/L (etapa II); 14,28±1,5 mg/L (etapa III); 16,36±2,55 mg/L (etapa IV)
Extrato de levedura	500 mg/L	400 mg/L
Duração total de operação do reator	231 dias	247 dias

4.1 Reator biológico de leito fluidificado

O desenho esquemático do reator utilizado nos experimentos pode ser visualizado na Figura 4.2. O RALF foi confeccionado em vidro borossilicato com 4 cm de diâmetro e 100 cm de altura, seis pontos de amostragem ao longo do reator igualmente distribuídos e volume útil de 0,981 L (desconsiderando o volume do separador de fases). O material suporte utilizado foi areia com as especificações detalhadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Especificações do material suporte

Massa(g)	Densidade (g.cm ⁻³)	Diâmetro (mm)	Altura do leito fixo (cm)	Altura do leito expandido (cm)
290	2,3	1,4 – 1,7	22	24,5

Na parte superior, foi confeccionado separador de fase com intuito de diminuir a energia cinética do líquido ascendente, impedir a saída de partículas sólidas no efluente e promover possíveis reações químicas entre o meio líquido e o gasoso.

Na parte inferior, mais precisamente na base do reator, foi inserido distribuidor de vazão a fim de garantir o aporte constante e adequado da água residuária ao leito fluidificado.

Figura 4.2: Desenho esquemático do reator de leito fluidificado

A manutenção do ambiente anaeróbico foi conseguida por meio de dois procedimentos: (1) o uso do sifão próximo ao separador de fases para evitar a entrada de oxigênio pela mangueira de saída do efluente e (2) a existência de atmosfera de nitrogênio ao injetar gás N_2 (100%) em frasco Duran® de 500 mL e acoplá-lo no topo do separador de fases utilizando uma mangueira flexível (Figura 4.2).

Antes de começar a parte experimental, foi teorizado TDH de 15 horas para eficácia de remoção da matéria orgânica bem como possibilitar o crescimento celular aderido ao material suporte como verificado em Carosia (2011). Os parâmetros de vazão e TDH obtidos durante o período experimental (exceto a fase de fixação da biomassa que possui sistema fechado) estão reunidos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Parâmetros de vazão e TDH das diferentes etapas de operação

Etapas	TDH (horas)	Vol. Reator (L)	Vazão Recirculação (L/h)	Vazão Alimentação (L/h)
I	15,94±1,64	0,981	90,6	0,0622±0,007
II	16,3±2,07	0,981	90,6	0,0609±0,0063
III	16,61±1,51	0,981	90,6	0,0595±0,00545
IV	15,41±1,28	0,981	90,6	0,064±0,0052

Os valores médios de TDH mantiveram-se próximos ao longo das diferentes etapas e próximos ao valor de 15 horas pretendido antes de começar os experimentos. Os fatores de diluição foram bastante elevados (acima de 1000), garantindo distribuição homogênea da água residuária ao longo do reator. Fatores de diluição muito acima de 20 asseguram o comportamento hidráulico de mistura completa do presente reator (Levenspiel,1999).

4.2 Velocidade mínima de fluidificação

A velocidade mínima de fluidificação foi calculada com o objetivo de comprovar a fluidificação do leito. No presente estudo, a velocidade ascensional do líquido foi mantida sempre maior que a velocidade mínima de fluidificação; ou seja, assegurou-se o comportamento do material suporte como fluido durante toda a parte experimental.

A relação de equações matemáticas para obtenção da velocidade mínima de fluidificação está elencada abaixo:

$$Ar = \frac{\rho_a (\rho_s - \rho_a) (D_p)^3 g}{\mu^2} \quad \text{Equação 4.1}$$

Sendo:

Ar = número de Arquimedes (adimensional);

ρ_s = densidade do material suporte (M/L³);

ρ_a = densidade da água (M/L³);

Dp = diâmetro da partícula (L);

g = aceleração da gravidade (L/T²);

μ = viscosidade da água (M/L.T)

$$Remf = (33,7^2 + 0,0408 Ar)^{0,5} - 33,7 \quad \text{Equação 4.2}$$

Sendo:

Remf = número de Reynolds na condição mínima de fluidificação.

$$Vm_f = \frac{Remf \mu}{\rho_a D_p} \quad \text{Equação 4.3}$$

Sendo:

V_{mf} = velocidade mínima de fluidificação (L/T).

$$Q_{mf} = V_{mf} S_r \quad \text{Equação 4.4}$$

Sendo:

Q_{mf} = vazão mínima de fluidificação (L³/T);

S_r = seção transversal do reator (L²)

A fim de avaliar o comportamento do gráfico ΔP (queda de pressão do líquido através do leito) em função da velocidade ascensional, foram tomadas medidas de altura de leito em nove diferentes valores de vazões de recirculação. Os valores ΔP foram calculados pela *Equação de Ergun* como segue abaixo:

$$\Delta P = \frac{150 \mu H v (1-\varepsilon)^2}{D_p^2 \varepsilon^3} + 1,75 \frac{H v^2 \rho_a (1-\varepsilon)}{D_p \varepsilon^3} \quad \text{Equação 4.5}$$

Sendo:

ΔP = queda de pressão do líquido através do leito (M/L.T²);

H = altura do leito (L);

v = velocidade ascensional do líquido (L/T);

ε = porosidade do leito (adimensional)

4.3 Etapas de Operação

O RALF foi operado durante 247 dias, sendo a primeira fase relacionada com a fixação da biomassa (sistema fechado) e as quatro etapas posteriores (sistema aberto) com aplicação de diferentes composições de co-substrato na alimentação. O tempo de detenção hidráulica foi mantido em valores próximos durante toda parte experimental, sendo que o valor médio de TDH após todo período de operação foi de $15,97 \pm 1,6$ horas. Em todas as etapas, o reator foi mantido em câmara mesofílica em temperatura de 30 ± 1 °C.

A fase de fixação da biomassa durou 21 dias e foi realizada em sistema fechado. O lodo processado (ver seção “Inoculação”) foi colocado em frasco Duran® de 5L juntamente com 3L de esgoto sintético contendo bicarbonato de sódio, sacarose, etanol, extrato de levedura e solução de sais. Essa alimentação foi recirculada continuamente no reator a fim de garantir a fixação dos microrganismos ao material suporte. A mistura de lodo e substrato

sintético foi bombeada para entrada do reator por meio de mangueira, percorria todo o leito, saía por outra mangueira com uma das extremidades localizada no separador de fases e, finalmente, voltava para o frasco Duran®, recirculando novamente pelo reator (Figura 4.3).

Convém mencionar que todo esse processo foi mantido em atmosfera de nitrogênio para garantir anaerobiose: injeção de gás N_2 (100%), tanto, no frasco de alimentação, quanto, no frasco Duran® de 500 mL que fora acoplado ao separador de fases por meio de mangueira flexível (Figura 4.3). Além disso, a aplicação de novo ciclo de alimentação (componentes do esgoto sintético da fase de fixação da biomassa descritos na Tabela 4.4) no reator era realizada de acordo com a análise do consumo de DQO diário: quando se atingia valores de remoção de DQO próximos a 90%, pesavam-se os componentes nutricionais e adicionavam-os no frasco de alimentação.

Figura 4.3: Sistema fechado na fase de fixação da biomassa. **A:** Desenho esquemático
B: Reator em escala de bancada

A etapa 1 teve duração de 73 dias e serviu como fase de crescimento da biomassa por meio do emprego de co-substratos altamente assimiláveis pelos microrganismos (sacarose e etanol). A duração um pouco elevada dessa fase de operação se deveu a ocorrência de imprevistos: vazamentos do líquido por mangueiras, falta de energia, falta de sucção da água sintética até a bomba de alimentação.

A etapa 2 durou 58 dias e objetivou a adaptação da biomassa à presença do sabão em pó empregado no frasco de alimentação. Nessa fase, a concentração média de LAS aplicada foi de 6,79 mg/L, e co-substratos sacarose e etanol.

As etapas 3 e 4 tiveram duração de 37 e 58 dias, respectivamente. A concentração média de LAS empregada nessas fases foi de 14,3 mg/L e 16,4 mg/L nas terceira e quarta etapas, respectivamente. No entanto, o emprego de co-substratos foi diferenciado. Enquanto, na etapa 3 empregou-se sacarose e etanol, na última só houve o emprego de sacarose.

O resumo das diferentes etapas de operação pode ser visualizado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Principais características das fases de operação do reator

Etapa	Alimentação	Duração (dias)	Sistema	TDH (horas)
Fixação da biomassa	Solução de sais, bicarbonato de sódio, extrato de levedura, sacarose e etanol	21	Fechado	---*
I	Solução de sais, bicarbonato de sódio, extrato de levedura, sacarose e etanol	73	Aberto	15,94
II	Solução de sais, bicarbonato de sódio, extrato de levedura, sacarose, etanol e sabão em pó contendo $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS	58	Aberto	16,3
III	Solução de sais, bicarbonato de sódio, extrato de levedura, sacarose, etanol e sabão em pó contendo $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS	37	Aberto	16,61
IV	Solução de sais, bicarbonato de sódio, extrato de levedura, sacarose e sabão em pó contendo $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS	58	Aberto	15,41

*Tempo de cada ciclo de alimentação baseado no consumo de DQO

4.4 Inoculação

O RALF foi inoculado com lodo oriundo de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de avicultura fornecido pela Avícola Dacar LTDA, localizada no município de Tietê-SP. Antes de ser recirculado – como visto no item “Etapas de Operação” – o lodo granulado foi macerado, peneirado e lavado com a água destilada para retirada de impurezas

advindas do sistema de tratamento supracitado. Alíquota de 300 mL do lodo processado foi coletada e misturada com substrato sintético para etapa de fixação da biomassa ao reator.

4.5 Composição do substrato sintético

O reator foi alimentado com substrato sintético, todavia, com diferentes co-substratos ao longo do tempo de operação. Anteriormente à adição de surfactante na alimentação (fase 1 e de fixação da biomassa), foi usado substrato sintético de acordo com a composição descrita a seguir (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Composição do esgoto sintético na etapa de fixação da biomassa e etapa I

Composição de nutrientes		q.s.p 1 litro de água
Extrato de levedura		400 mg
Co-substratos: 50% Etanol / 50% Sacarose	0,063 ml (100 mgDQO) / 97,25 mg (108,92 mgDQO)	
Bicarbonato de sódio		400 – 450 mg
Solução de Sais (Tabela 4.8)		5 ml

Fonte: Torres (1992) modificado.

As concentrações de etanol e sacarose utilizadas foram equivalentes em termos de DQO teórica. Essa equivalência foi calculada por meio das seguintes equações a seguir:

Nas etapas posteriores, utilizou-se LAS proveniente de detergente em pó Omo Progress (Unilever®) adicionado à alimentação. Embora, se saiba que o percentual médio de surfactante aniônico utilizado em detergentes em pó de alto rendimento nos EUA e na Europa varie entre 10 a 20 % do peso total do produto (POVIA, 2007), a concentração exata de LAS nesse tipo de produto é desconhecida.

No presente trabalho, suspensão de detergente em pó em estoque na concentração de 4,5 g/L foi preparada para ser utilizada nas etapas 2, 3 e 4. A quantidade em mL dessa suspensão aplicada ao esgoto sintético variou em virtude da concentração de LAS requerida em cada etapa: na etapa 2 foi adicionado 50 mL, obtendo concentração média de LAS de 6,8 mg/L. Nas etapas 3 e 4 foram adicionados 100 mL, resultando em valor médio de 14,3 e 16,4 mg/L de LAS, respectivamente.

A composição do esgoto sintético da etapa 2 e etapa 3 encontram-se descritos na Tabela 4.6. A composição da etapa 4 pode ser visualizada na Tabela 4.7. A solução de sais presente na composição do esgoto sintético de todas as etapas foi descrita na Tabela 4.8.

Tabela 4.6: Composição do esgoto sintético utilizados nas etapas 2 e 3

Composição de nutrientes	q.s.p 1 litro de água
Extrato de levedura	400 mg
Co-substratos: 50% Etanol / 50% Sacarose	0,063 ml (100 mgDQO) / 97,25 mg (108,92 mgDQO)
Bicarbonato de sódio	400 – 450 mg
Solução de Sais (Tabela 4.8)	5 ml
Suspensão em estoque de detergente em pó	10 ml ^a / 20 ml ^b

Fonte: Torres (1992) modificado.

a: concentração da etapa 2 ; b: concentração da etapa 3

Tabela 4.7: Composição do esgoto sintético utilizado na etapa 4

Composição de nutrientes	q.s.p 1 litro de água
Extrato de levedura	400 mg
Co-substrato: 100% Sacarose	194,5 mg (216 mgDQO)
Bicarbonato de sódio	400 – 450 mg
Solução de Sais (Tabela 4.8)	5 ml
Suspensão em estoque de detergente em pó	10 ml

Fonte: Torres (1992) modificado.

Tabela 4.8: Solução de sais inorgânicos

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

Fonte: Torres (1992).

Na última etapa foi adicionado apenas sacarose como co-substrato. Portanto, a concentração da mesma foi dobrada em comparação com as demais etapas anteriores a fim de manter a equivalência do valor de DQO teórica (calculado a partir das equações 4.6, 4.7 e 4.8).

Os valores de bicarbonato de sódio variaram entre 400 e 450 mg/L em virtude dos valores de pH e alcalinidade encontrados nos dias de análises físico-químicas.

A preparação do esgoto sintético seguiu os seguintes passos:

- a) Pesagem dos nutrientes descritos acima;
- b) Lavagem do frasco Duran® de 5 L usado para alimentação;
- c) Preenchimento parcial do frasco de alimentação com água de abastecimento;
- d) Adição da sacarose, extrato de levedura e bicarbonato de sódio dissolvidos em água de abastecimento público ao frasco de Duran®;
- e) Agitação do frasco para facilitar a dissolução dos nutrientes;
- f) Preenchimento do volume do frasco de alimentação até aproximadamente 4,8 L;
- g) Adição da solução de sais (Tabela 4.7) que fora previamente preparada em água destilada e mantida em frasco âmbar de 1,0 L a 4 °C;
- h) Adição da suspensão de detergente em pó estocada (renovada periodicamente) que fora preparada na concentração de 4,5 g/L e armazenada a 4 °C;
- i) Adição lenta do restante do volume de água para completar 5 L;
- j) Homogeneização vagarosa do esgoto sintético para evitar a formação de espuma com bastão de vidro;
- k) Transferência do substrato sintético devidamente preparado à geladeira para ser acoplado à mangueira de alimentação.

4.6 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas

As amostras de afluente e efluente foram analisadas periodicamente como consta na Tabela 4.9. Demanda química de oxigênio (DQO), potencial hidrogeniônico (pH), sólidos totais voláteis (STV) e sulfeto foram realizados de acordo com APHA (2005). Alcalinidade foi determinada segundo Dillalo e Albertson (1961), modificada por Ripley, Boyle e Converse (1986).

Os ácidos voláteis foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo Lazaro et al. (2008). Essa metodologia permite visualizar uma gama grande

de ácidos voláteis: capróico, isovalérico, valérico, butírico, acético, isobutírico, propiônico, fórmico, láctico, málico, succínico e cítrico.

As análises de LAS foram realizadas por meio de CLAE de acordo com metodologia desenvolvida por Duarte et al. (2006).

O potencial redox do efluente foi aferido com objetivo de verificar o nível de anaerobiose do meio líquido. A análise foi realizada por método potenciométrico.

Tabela 4.9: Análises de monitoramento do reator

Análises	Método	Frequência	Referência
pH (unidade)	Potenciométrico	2X semana	APHA (2005)
DQO filtrada (mg/L)	Espectrofotométrico	2X semana	APHA (2005)
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	Titulométrico	2X semana	Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley, Boyle e Converse (1986)
Ácidos voláteis totais (mg HAc/L)	Cromatográfico (HPLC)	2X semana	Lazaro et al. (2008)
LAS (mg/l)	Cromatográfico (HPLC)	2X semana	Duarte et al. (2006)
Potencial Redox	Potenciométrico	2X semana	----
Vazão (mL/h)	Volumétrico	Diariamente	-----

4.7 Extração do LAS adsorvido por Ultra-som

A extração do LAS adsorvido foi realizada segundo metodologia desenvolvida por Duarte (2006) e Oliveira (2006) ao final do período operacional. Esse experimento teve como objetivo realizar o balanço de massa do LAS. Para tanto, verificou-se a quantidade de surfactante adsorvido no lodo e no material suporte para descobrir qual percentual de remoção biológica foi encontrada dentro do reator.

As análises do material suporte (areia) foram feitas em triplicata. As amostras foram mantidas em estufa por 24 horas. Em seguida, foi realizado o processo de extração seguindo as seguintes etapas:

- a) Após prévia secagem, as triplicatas foram pesadas em balança analítica, registrando as seguintes massas: 5,03; 5,031 e 5,038 g.

- b) Adicionaram-se 50 mL de metanol puro ao suporte;
- c) A mistura heterogênea foi submetida a banho de ultra-som durante 30 minutos na temperatura de cerca de 50 °C;
- d) A fase líquida foi separada da areia por meio de peneira;
- e) As etapas (b), (c), e (d) foram repetidas duas vezes mais;
- f) 20 mL de água destilada foram adicionadas à areia;
- g) As etapas (c) e (d) foram repetidas mais uma vez;
- h) Ao final da etapa (g), a solução constituída de metanol e água foi filtrada em membrana de 0,22 µm;
- i) A solução filtrada foi aquecida em placa aquecida (60 °C), resultando nos seguintes volumes finais das triplicatas: 25 mL, 15 mL e 27 mL;
- j) As amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência para medição das concentrações de LAS.

O lodo, aderido às paredes do reator, foi coletado praticamente em sua totalidade e duas alíquotas de 0,2650 e 0,2598 g foram selecionadas para extração do LAS. Todo o procedimento experimental descrito acima foi realizado para essas amostras. Apenas convém mencionar que a separação do lodo da fase líquida (etapa “d”) foi obtida por meio do uso de centrífuga (6000 rpm durante 5 minutos a 20 °C) e os volumes finais das duplicatas na etapa “i” foram de 30 e 47 mL.

4.8 Cálculo do Balanço de massa de LAS

Os totais de massa de LAS afluyente e efluente foram calculadas segundo a equação abaixo:

$$Total\ de\ LAS(aflu\ ou\ eflu) = [LAS] \cdot Q \cdot T \quad \text{Equação 4.9}$$

Sendo:

Total de LAS (aflu ou eflu) = massa total de LAS afluyente ou efluente acumulada (mg);

[LAS] = concentração de LAS afluyente ou efluente (mg/L);

Q = vazão de recirculação (L/d);

T = tempo (d)

O total de LAS adsorvido foi obtido por meio do procedimento de extração do surfactante da areia e do lodo (descrito no tópico 4.7) somado à quantidade adsorvida no SST efluente como descrito na Equação 4.10:

$$Total\ LAS\ adsorvido = Ad1 + Ad2 + Ad3 \quad \textbf{Equação 4.10}$$

Sendo:

Total LAS adsorvido = massa total de LAS adsorvida durante toda operação (mg);

Ad1 = massa de LAS adsorvida no lodo presente dentro do reator (mg);

Ad2 = massa de LAS adsorvida no SST efluente (mg);

Ad3 = massa de LAS adsorvida na areia (mg)

A quantidade de LAS adsorvido no lodo (Ad1) foi calculada como segue abaixo:

$$Ad1 = \alpha \cdot Massa\ de\ lodo \quad \textbf{Equação 4.11}$$

Sendo:

α = coeficiente de adsorção de LAS no lodo (mgLAS/gST) (calculado pelo autor deste trabalho);

Massa de lodo = Total de lodo presente no reator (gST)

De maneira similar, o lodo adsorvido no SST efluente (Ad2) foi calculado:

$$Ad2 = \beta \cdot SST_{Total} \quad \textbf{Equação 4.12}$$

Sendo:

β = coeficiente de adsorção de LAS no SST efluente (mgLAS/gSST) (calculado pelo autor deste trabalho);

SST_{Total} = SST efluente acumulado durante toda operação (gSST)

A quantidade de LAS adsorvida na areia foi mensurada segundo a equação 4.13:

$$Ad3 = \omega \cdot Areia_{Total} \quad \textbf{Equação 4.13}$$

Sendo:

ω = coeficiente de adsorção de LAS no material suporte (mgLAS/gAreia) (calculado pelo autor deste trabalho);

$Areia_{Total}$ = Massa total de areia empregada no reator (g)

4.9 Biologia molecular

A caracterização qualitativa da diversidade microbiana presente no reator foi realizada por meio das técnicas moleculares de eletroforese de gel de gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento.

4.9.1 Coleta das amostras

As amostras para biologia molecular foram retiradas do separador de fases (o qual havia presença de grande quantidade de lodo aderido à superfície do reator) e do material suporte ao longo da operação do reator. Ao término de cada fase, eram coletadas amostras do material suporte e do separador de fases, totalizando oito amostras, após término da última fase. Além dessas, mais duas amostras (uma do material suporte e outra do separador de fases) oriundas do estudo de Carosia (2011) foram adquiridas para estudo comparativo da comunidade microbiana por meio do DGGE (método explicitado mais adiante).

Amostras do trabalho de Carosia (2011) foram coletadas porque neste caso foi utilizado apenas etanol como co-substrato e condições de operação muito semelhante ao do presente trabalho: mesma dimensão do reator de leito fluidificado, mesmo inóculo e valores de TDH muito próximos.

A grande preocupação com a retirada de amostras ao final de cada fase de operação foi a influência que o decréscimo de biomassa e material suporte poderia provocar a cada etapa subsequente à retirada. A fim de minimizar esse problema, o volume coletado da biomassa do separador de fases ao final de cada etapa de operação foi menor que 10 mL e a quantidade de areia coletada foi inferior a 5 g. No primeiro caso, as amostras foram retiradas do reator abrindo sua parte superior e succionando a biomassa pastosa com auxílio de seringa. No segundo caso, a biomassa aderida à areia foi retirada através de um dos pontos de amostragem do reator. Após desprendimento da biomassa da areia como descrito no tópico “4.9.2 Acondicionamento das amostras”, a areia era recolhida e disposta novamente no reator por meio de um dos pontos de amostragem.

Todas as amostras foram coletadas em frascos de antibióticos. Após a coleta, gás nitrogênio foi fluxionado em cada um dos frascos e lacrados para manter condições de anaerobiose antes do próximo procedimento.

4.9.2 Acondicionamento das amostras

O acondicionamento das amostras para posterior caracterização por técnicas de biologia molecular seguiu os seguintes passos:

- a) Transferência das amostras do separador de fases e da areia para tubos *Falcon* de 15 mL estéreis;
- b) Centrifugação das amostras a 6000 rpm;
- c) Lavagem do material com 5 mL de tampão fosfato (PBS);
- d) Descarte do sobrenadante;
- e) Repetição da etapa “c” e “d” por mais duas vezes;
- f) Armazenamento das amostras a -20 °C.

A biomassa presente nas amostras oriundas do material suporte necessita ser desprendida do mesmo antes de iniciar as etapas de acondicionamento descritas acima. Para tanto, a agitação mecânica manual do frasco foi realizada por 20 minutos segundo Vazoller (1995).

4.9.3 Extração do DNA

O DNA foi extraído seguindo metodologia descrita por Griffiths et al. (2000) modificado, por meio de *glass beads* e dissolução das amostras em fenol/clorofórmio.

4.9.4 Amplificação do DNA do domínio *Bacteria*

Diversos estudos relacionados com a degradação biológica do LAS consideraram e/ou sugeriram maior participação do Domínio *Bacteria* na remoção deste surfactante (OLIVEIRA, 2010, CAROSIA, 2011 e DELFORNO, 2011). Sendo assim, *primers* específicos para região do RNAr 16S de *Bacteria* foram utilizados no presente estudo para amplificação dos materiais genéticos das amostras, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Tabela 4.10). As etapas do termociclador para os primers do domínio *Bacteria* são descritos na Tabela 4.11.

Tabela 4.10: *Primers* do domínio *Bacteria*

<i>Primers</i>	<i>Seqüências (5'→ 3')</i>
27F	5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3'
1100R	5' – AGG GTT GCG CTC GTT G – 3'

Fonte: Lane (1991)

Tabela 4.11: Descrição das etapas do termociclador para os *primers* do domínio *Bacteria*

Nº de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Resfriamento
30	94 °C, 5 min	94 °C, 45 s	55 °C, 45 s	72 °C, 105 s	4 °C, ∞

A descrição dos reagentes e suas concentrações utilizadas na PCR estão especificadas na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Componentes do “mix” usado na PCR

Reagentes	Concentração	Quantidade para 1 amostra (µL)
Água ultrapura	---	34
Tampão PCR Invitrogen®	10X	5,0
MgCl ₂	50mM	1,5
dNTP (base nitrogenada)	2mMcada	5,0
<i>Primer 27F</i>	100pmol/ µL	0,5
<i>Primer 1100R</i>	100pmol/ µL	0,5
Taq DNA Polimerase Invitrogen®	5U/ µL	0,5
Amostra (<i>Template</i>)	100ng	3,0

4.9.5 Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi purificado utilizando o *Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*.

4.9.6 DGGE

A técnica molecular do DGGE foi empregada com o objetivo de visualizar as modificações da comunidade microbiana entre as diferentes etapas da operação do reator, ou seja, verificar quanto a população de microrganismos variou em virtude das diferentes composições do esgoto sintético, especificamente relacionado com os co-substratos aplicados no reator ao longo do período de operação.

O DGGE foi realizado segundo Sakamoto (2001). Os produtos de PCR foram aplicados dentro do gel gradiente desnaturante (40% de gel acrilamida; solução 50 x TAE;

formamida e uréia): uréia e formamida variando entre 30 e 60%. A eletroforese foi realizada com voltagem constante de 75 V a 65 °C por 16 horas. Após este período, as amostras foram transferidas para uma bandeja e adicionados 15 mL de brometo de etídio. As bandas do gel contendo material genético de diferentes pesos moleculares foram visualizadas com auxílio de iluminação UV utilizando o aparelho Eagle Eye TM III densitometer (Stratagene) acoplado ao computador com o software Eagle Sight para tratamento adequado da imagem.

A construção de dendograma a partir da análise dos diferentes perfis de bandas das distintas amostras foi realizada com auxílio do software *Bionumerics*. O teste de similiaridade entre as amostras foi realizado utilizando Jaccard.

4.9.7 Etapas da clonagem e seqüenciamento

As etapas de clonagem (adenilação, ligação do vetor plasmidial, transformação da *E. coli* e amplificação do DNA plasmidial) e seqüenciamento foram realizadas apenas para a amostra da última fase de operação (16,4 mg/L de LAS com apenas sacarose como co-substrato) retirada do material suporte. A seleção desta amostra para realização dos procedimentos citados acima se deu em virtude da possibilidade de melhor representar a diversidade microbiana presente no reator.

O fluxograma dos procedimentos laboratoriais até chegar à etapa de seqüenciamento pode ser visualizado na Figura 4.4.

Figura 4.4: Fluxograma com as etapas da clonagem até o sequenciamento

4.9.7.1 Clonagem

As amostras de produtos de PCR purificados foram clonadas por meio do plasmídeo *pGEM Easy Vector System I* (50ng).

A adenilação dos fragmentos foi realizada utilizando os seguintes reagentes: 3µL do produto de PCR, 1 µL de tampão PCR (10X) com MgCl₂, 1 µL de ATP (5mM), 1 µL de *Taq*DNA polimerase e 4 µL de água purificada estéril. O “mix” foi incubado a 70 °C por 30 minutos em termociclador.

O próximo passo foi a ligação do vetor *pGEM* aos fragmentos de RNAr 16S. O produto de PCR adenilado (2µL) foi adicionado a 5 µL de *2x Rapid Ligation Buffer*, 1 µL de *pGEM Easy Vector System I*, 1 µL de *T4 DNA ligase* (3 *weiß units*/µL) e 1 µL de água ultra purificada. Esta solução foi misturada cuidadosamente com pipeta e incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

A transformação em células competentes de *E. coli*, anteriormente armazenadas a -80 °C, foi realizada seguindo os seguintes passos:

- a) Manutenção em banho de gelo por 5 minutos;
- b) Mistura de 2 µL do produto de ligação com as células *E. coli*;
- c) Incubação no gelo por 20 minutos;
- d) Banho-maria a 42 °C por 50 segundos e sem agitação das células;
- e) Agitação manual dos tubos e banho de gelo por 2 minutos;
- f) Adição de 200 µL de meio Luria-Bertani (LB) (sem ágar) (Tabela 4.13) na temperatura ambiente;
- g) Incubação do meio juntamente com as células a 37 °C por 90 minutos em agitação automática (150 rpm).

Tabela 4.13: Composição do meio Luria-Bertani (LB)

Nutrientes	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
Cloreto de Sódio	5
Ágar	15

Ao término da etapa anterior que fora descrita acima, 150 µL do material transformado foi adicionado a 50 mL de meio LB contendo os seguintes reagentes: 64 µL de Xgal (40 mg/mL); 80 µL de IPTG (23 mg/mL) e 30 µL de ampicilina (50 mg/mL). Esta nova solução foi dividida em duas placas de *Petri* (25 mL da solução em cada uma) que foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

As placas foram retiradas da estufa e submetidas a 4 °C por 1 hora a fim de intensificar a tonalidade das colônias azuis. As colônias brancas (característica de células com presença do vetor *pGEM* no meio intracelular) foram pinçadas e transferidas para tubos de ensaio contendo meio LB líquido (5 mL) e 3 µL de ampicilina (50 mg/L). Estes foram incubados a 37 °C por 16 horas em agitação mecânica (150 rpm) dentro de câmara de germinação.

Após o período de incubação, foi verificada a turvação do meio nutriente. O conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido para tubos *eppendorf* e as amostras foram centrifugadas para retirada do DNA plasmidial.

A confirmação da presença de material genético nas amostras ocorreu por meio de eletroforese em gel de agarose 1 %. Para tanto, o DNA plasmidial foi amplificado por PCR utilizando os *primers* M13f e M13r (Tabela 4.14) e o “mix” descrito na Tabela 4.12 (excetuando os *primers* 27f e 1100r). A programação do termociclador para realizar a amplificação do material genético é descrito na Tabela 4.15.

Tabela 4.14: *Primers* utilizados na amplificação do DNA plasmidial

<i>Primers</i>	Seqüências (5' → 3')
M13F	5' – CGC CAG GGT TTC CCC AGT CAC GAC – 3'
M13R	5' – TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC – 3'

Fonte: Chun (1995)

Tabela 4.15: Descrição das etapas do termociclador para os *primers* M13f e M13r

Nº de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Resfriamento
30	94 °C, 3 min	94 °C, 20 s	60 °C, 20 s	72 °C, 90 s	4 °C, ∞

4.9.7.2 Seqüenciamento

As amostras que apresentaram bandas de aproximadamente 800 bp foram selecionadas e enviadas à empresa MacroGen Inc. localizada na Coréia do Sul para realizar o seqüenciamento.

Os arquivos das amostras já seqüenciadas mandadas pela empresa vieram no formato *.abi* e foram trabalhadas no programa SeqMan com a retirada de regiões de poliadenilação e seqüências do vetor e SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único). Após este procedimento, foi elaborado um banco de dados no formato *.fasta* com as seqüências selecionadas no SeqMan.

O banco de dados obtido foi comparado com o banco de dados do RDP-project (Ribossomal Database Project) utilizando a ferramenta SEQMATCH para estabelecer relações taxômicas (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

As seqüências foram alinhadas por meio da ferramenta ALIGNER do RDP-project (<http://pyro.cme.msu.edu/spring/align.spr>) que usa o método de alinhamento *Infernal* (“INFERence of RNA ALignment”) (NAWROCKI; EDDY, 2007).

A definição de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi obtida utilizando a ferramenta COMPLETE LINKAGE CLUSTERING do RDP-project (<http://pyro.cme.msu.edu/spring/cluster.spr>). A formação dos *clusters* foi realizada por meio método de “*complete-linkage*”. Os números de UTOs bem como as seqüências de cada UTO foram encontrados admitindo-se 0,03 como sendo a distância evolutiva.

A curva de rarefação das UTOs foi determinada com objetivo de verificar a abrangência de cobertura dos clones em função da diversidade presente no reator. Ela foi obtida com ajuda da ferramenta RAREFACTION do RDP-project (<http://pyro.cme.msu.edu/spring/rarefaction.spr>).

Apenas as seqüências representativas de cada UTO foram consideradas, ou seja, aquelas que minimizam a soma do quadrado das distâncias de todos os membros de uma determinada UTO. Para tanto, a ferramenta DEREPLICATE do RDP-project foi utilizada (<http://pyro.cme.msu.edu/spring/derep.spr>). As seqüências representativas de cada UTO foram relacionadas com banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As seqüências das UTOs e do NCBI foram alinhadas conjuntamente por meio do CLUSTAL W (HIGGINS et al., 1994). A árvore filogenética foi realizada por meio do software MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) utilizando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) de agrupamento das seqüências, *bootstrap* de 100 amostragens e distâncias evolucionárias computadas pelo método *Kimura 2-parameter* (KIMURA, 1980).

4.10 Análises estatísticas

Os valores das médias de remoção de DQO e LAS obtidos em cada etapa (exceto na fase de imobilização da biomassa) bem como aqueles advindos de Carosia (2011) foram submetidos a diferentes análises estatísticas: 1) os dados de LAS e DQO foram comparados por *box-plot*; 2) teste Anova-one way para verificação de diferença significativa no conjunto de valores; e 3) teste Scheffé para comparação de diferença significativa das médias par a par, ou seja, a média de um conjunto de dados advindo de uma determinada configuração de água residuária era comparada apenas com uma outra por vez, formando pares.

O teste Scheffé foi utilizado para tentar responder duas perguntas principais: existiu pareamento com diferença estatística relevante? É possível inferir qual fator (co-substrato ou LAS) foi mais importante para explicar uma possível diferença estatística relevante entre duas configurações de águas residuárias distintas ao serem pareadas?

Os dados de monitoramento do reator obtidos a partir das análises de alcalinidade, remoção de LAS, pH, ácidos totais voláteis, potencial redox e remoção de DQO das etapas II, III e IV foram submetidos à análise de componentes principais (ACP). O ACP foi utilizado afim de visualizar quais dos fatores descritos na frase anterior (alcalinidade, remoção de LAS, pH, ácidos totais voláteis, potencial redox e remoção de DQO) promoveram maior variabilidade dos dados de monitoramento, ou seja, quais desses fatores foram preponderantes em cada etapa e, por conseguinte, ajudaram a descrever melhor os processos físico-químicos e biológicos que aconteceram dentro do reator.

5. Resultados e Discussão

5.1 Verificação da fluidificação do leito

A fluidificação do leito foi verificada em função do cálculo da velocidade mínima de fluidificação como descrito nas equações 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4. A velocidade ascensional e a vazão da bomba de recirculação empregados no presente estudo foram de 2,62 cm/s e 90,6 L/s, respectivamente (Tabela 5.1). Estes valores foram 87% acima daqueles normalmente usados para a velocidade e vazão mínima de fluidificação, respectivamente, portanto, garantindo a fluidificação do leito.

Tabela 5.1: Parâmetros de fluidificação do leito

Velocidade mínima de fluidificação (cm/s)	Vazão mínima de fluidificação (L/h)	Velocidade ascensional adotada (cm/s)	Vazão de recirculação adotada (L/h)
1,40	48,6	2,6	90,6

O comportamento da queda de pressão (ΔP) em função da velocidade ascensional está descrito na Tabela 5.2. Após atingida a velocidade mínima de fluidificação, o aumento da velocidade ascensional não mais provoca queda de pressão no leito, ou seja, o diferencial de pressão apresenta-se estável (KUNNI; LEVENSPIEL, 1969²). Este comportamento foi observado no reator de leito fluidificado usado nesse trabalho (Figura 5.1).

²apud MENDONÇA, N. M. *Tratamento de esgoto sanitário empregando reator de leito expandido em escala plena com zonas anaeróbia e aeróbia sobrepostas: Concepção, construção e operação*. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, São Carlos, 2004.

Tabela 5.2: Parâmetros verificados no comportamento de fluidificação do reator

Vazão (L/h)	Velocidade ascensional (cm/s)	ΔP (g/cm.s ²)
0	0	0
39	1,13	505,57
69,3	2,00	1495,22
90,6	2,62	2539,68
96,6	2,79	3369,33
112,2	3,24	5128,46
126	3,64	6889,91
129,3	3,73	7335,24
129,9	3,75	7400,58

Figura 5.1: Gráfico de queda de pressão (ΔP) *versus* velocidade ascensional

5.2 Período de imobilização e adaptação da biomassa

Obteve-se as seguintes quantidades de sólidos para a biomassa usada com inóculo de imobilização na areia: 12,6 g/L de sólidos totais, sendo 5,2 g/L de sólidos totais fixos e 7,3 g/L de sólidos totais voláteis.

Na etapa de fixação da biomassa, o esgoto sintético foi recirculado durante 21 dias em sistema fechado. Análises de DQO, alcalinidade, pH e ácidos foram realizadas diariamente até o término dessa etapa.

A alimentação era trocada em função do consumo de matéria orgânica (DQO) pelos microrganismos. Para tanto, avaliou-se a remoção de DQO filtrada (Figura 5.2). Três ciclos de alimentação foram realizados ao longo do período de 21 dias. Os valores iniciais de DQO de cada ciclo foram de 451,20 mg/L na primeira sequência, 634,20 mg/L na segunda e 757,00 mg/L na última. A diferença máxima foi de 305,79 mg/L de DQO no início de cada ciclo. Este valor foi menor do que aquele verificado por Oliveira (2010) (acima de 1.000 mg/L), nesta mesma fase de adaptação da biomassa em reator anaeróbio de leito fluidificado de pequena escala com carvão ativado como material suporte.

A fim de encontrar valores de remoção de DQO acima de 90 % no segundo ciclo, após o nono dia o reator não foi mais alimentado. Mais especificadamente, no décimo primeiro dia de operação, foi registrado valor de DQO de 1.115,64 mg/L. Inicialmente, creditou-se esse alto valor a possível erro no procedimento de análise da DQO. No entanto, altos valores de DQO foram verificados, tanto no décimo quarto, quanto no décimo sexto dia (antes da alimentação do terceiro ciclo); ou seja, 701,6 e 948,5mg/L, respectivamente (Figura 5.2). Sendo assim, provavelmente houve a geração de produtos metabólicos solúveis oriundos da fase de endogenia celular em virtude da falta de fontes de carbono facilmente assimiláveis (BARKER; STUCKEY, 1999).

Figura 5.2: Variação temporal da DQO filtrada durante o período de fixação da biomassa

A baixa remoção de DQO encontrada no décimo primeiro dia não correspondeu a maior produção de ácidos totais voláteis verificados no reator (Figura 5.3); ou seja, a produção de ácidos totais voláteis (AVT) no décimo primeiro dia foi de 12,53 mg/L, sendo que a média durante o período de 21 dias foi de 44,04 mg/L (Tabela 5.3). Portanto, a falta de fontes de carbono e energia não desestabilizou os processos de acidogênese e metanogênese. Além disso, o valor encontrado esteve bem abaixo do limite de até 1.000 a 1.500 mg/L de AVT propício para ocorrência da degradação anaeróbia da maioria dos compostos (MALINA; POHLAND, 1992). Os valores de AVT registrados nos últimos dois dias do segundo ciclo foram abaixo de 50 mg/L.

Os valores de pH foram acima de 8,5 e tiveram pouca variação (Tabela 5.3). A alcalinidade total foi em média de 700 mg /L. Os valores de pH e alcalinidade podem ser atribuídos às características do lodo de UASB de abatedouro de aves associada ao emprego de bicarbonato de sódio na alimentação. Segundo Garcia-Encina e Hidalgo (2005) valores de pH acima de 8,5 provocam o desprendimento da biomassa do material suporte, passando para o líquido. Isso acontece porque os ácidos orgânicos voláteis apresentam-se dissociados, prejudicando os mecanismos de adesão da célula bacteriana. A presença de produtos

microbianos solúveis no líquido pode ter contribuído para o aumento dos valores de pH e alcalinidade total.

Tabela 5.3: Parâmetros monitorados durante a etapa de fixação da biomassa

Parâmetro	Valor médio
pH	8,7±0,20
Alcalinidade Total	700,0±287,5 mg/L
Ácidos Totais Voláteis (ATV)	44,0±34,3 mg/L

Figura 5.3: Concentração de ácidos totais voláteis (AVT) ao longo do período de fixação da biomassa

5.3 Remoção da matéria orgânica

O período de remoção da matéria orgânica abordado neste tópico se deu a partir da etapa I até a IV (Tabela 5.4), pois a etapa de fixação da biomassa já fora discutida na seção anterior. A composição do esgoto sintético de cada etapa pode ser visualizada na Tabela 4.3.

No presente trabalho, o extrato de levedura foi considerado substrato e não co-substrato, como a sacarose e etanol. As médias de remoção da matéria orgânica são apresentadas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Valores de DQO em cada etapa de operação

Etapa	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	Remoção (%)
I	575,3±59,3	156,9±53,4	72,9±8,3
II	615,6±99,1	94,8±47,6	84,7±6,3
III	598,5±7,4	127,7±43,0	78,5±7,4
IV	581,9±80,5	128,1±39,3	77,7±6,8

A remoção média foi de 78 %. Este valor de remoção não foi o mesmo encontrado por Oliveira et al. (2010), cujo valor foi de 94% para RALF com areia como material suporte operado em condições similares. Convém mencionar, no entanto, que o trabalho supracitado utilizou LAS comercial, diferentemente do presente estudo, que aplicou detergente em pó na composição do substrato sintético. Tempo de detenção hidráulica de 18 horas (no presente estudo foi de 15 horas), inóculo diferente, bem como, a maior concentração de extrato de levedura utilizada em Oliveira et al. (2010) (100 mg/L a mais) podem ter contribuído para diferenças de desempenho dos dois estudos. Todavia, Carosia (2010), na etapa de aplicação de detergente em pó no RALF com areia como material suporte, mesmo inóculo e TDH de 15 horas, obteve média de remoção de DQO de 85,9% bem próxima a encontrada na Etapa II e similar aos valores das Etapas III e IV deste trabalho.

A Etapa I teve duração de 73 dias, todavia, sem adição de detergente em pó, mas com sacarose e etanol. Nessa etapa a DQO afluente foi de 575,3±59,3 mg/L e 72,9%±8,3% de remoção de matéria orgânica (Figura 5.4). Esse valor obtido foi inferior àquele apresentado por Carosia (2011), (87,2±5,4%) ao utilizar apenas etanol como co-substrato no RALF em sistema aberto e sem presença de surfactante. Nesse último caso, foi usado 100 mg/L a mais de extrato de levedura na composição do meio nutricional. Desse modo, em comparação ao presente trabalho, provavelmente, pode ter sido a razão para tal fato. Além disso, como no presente estudo foram usados dois co-substratos (sacarose e etanol), é possível que tenha havido competição dos microrganismos na utilização dos co-substratos. Sendo assim, um dos co-substratos empregados, sacarose ou etanol, pode ter sido preferencialmente degradado pelo

consórcio microbiano. Zoetemeyer et al. (1982) estudaram a acidificação de água residuária de refinaria de açúcar em reator anaeróbio contendo sacarose, lactato e etanol. Os autores verificaram que praticamente todo o etanol contido no afluente não foi fermentado durante a acidogênese ao contrário da sacarose e lactato.

Figura 5.4: Variação temporal de DQO filtrada ao longo da operação do reator

A duração da Etapa II foi de 58 dias e acréscimo de 10 ml/L ($6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS) de suspensão de detergente em pó, servindo como fase de adaptação da biomassa à presença de surfactante. A DQO afluente foi de $615,6 \pm 99,1$ mg/L e $84,7 \pm 6,3\%$ de remoção da matéria orgânica. (Tabela 5.4). Portanto, houve acréscimo na eficiência de remoção em comparação a Etapa I. A possível razão para o aumento na eficiência de remoção pode residir no fato de que o pequeno acréscimo de LAS não foi capaz de inibir os microrganismos participantes da degradação anaeróbia e, além disso, serviu como fonte alternativa de carbono e energia. Soma-se a isso, a possibilidade do LAS presente no detergente em pó ter adsorvido nutrientes da alimentação, tornando-os facilmente disponíveis para comunidade microbiana.

A duração da Etapa III foi de 37 dias e a presença de 20 ml/L (média de $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS aplicado nesta etapa) de suspensão de detergente em pó na alimentação. A DQO afluenta foi de $598,50 \pm 7,4$ mg/L e $78,5 \pm 7,4\%$ de remoção, sendo assim, inferior a registrada na Etapa II. A redução na remoção pode ser creditada ao aumento da concentração de LAS afluenta. Segundo Garcia et al. (2006), a adição de 14 mg/L de LAS foram tóxicos aos microrganismos anaeróbios, reduzindo em 50% a produção de biogás. A concentração de LAS aplicada nesta etapa, bem como, na Etapa IV foi em de $14,3 \pm 1,5$ mg/L (Tabela 4.4).

A última etapa da operação durou 58 dias e a alimentação consistiu de 20 ml/L ($16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS) de suspensão de detergente em pó e apenas sacarose como co-substrato. A DQO afluenta foi de $581,90 \pm 80,5$ mg/L e ocorreu $77 \pm 6,8\%$ de remoção. Para as Etapas III e IV praticamente foi observada a mesma percentagem de remoção, independente do co-substrato usado na alimentação do reator. Provavelmente, após 247 dias de operação (Etapas I, II, III e IV), a biomassa presente no reator já se encontrava adaptada à presença de surfactante, possuindo microrganismos específicos degradadores da molécula de LAS. Esta possibilidade diminui a importância do co-substrato como fonte de carbono e energia.

As percentagens de remoção de DQO nas diferentes etapas de operação foram analisadas por meio de gráfico *box-plot* (Figura 5.5). A composição do esgoto sintético em relação à presença de determinado co-substrato somado a existência ou não de LAS foram denominadas da seguinte maneira: DQO1 teve etanol como co-substrato, DQO2 com etanol e sacarose como co-substratos, DQO3 com etanol como co-substrato somado a $14,40 \pm 3,5$ mg/L de LAS, DQO4 teve etanol e sacarose como co-substratos mais $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS, DQO5 teve na composição etanol e sacarose como co-substratos mais $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS e DQO6 com sacarose mais $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS. Os valores de DQO1 e DQO3 foram retirados de Carosia (2011) a fim de obter abordagem mais ampla de comparação entre as diferentes composições de co-substratos.

Figura 5.5: *Box-plot* de remoção de DQO de diferentes águas residuárias: DQO1 (etanol como co-substrato), DQO2 (etanol e sacarose como co-substratos), DQO3 (etanol como co-substrato + $14,40 \pm 3,5$ mg/L de LAS), DQO4 (etanol e sacarose como co-substratos + $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS), DQO5 (etanol e sacarose como co-substratos + $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS) e DQO6 (sacarose como co-substrato + $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS). As barras representam os valores máximos e mínimos, (□) representa a média e os asteriscos constituem os *outliers*. Fonte: DQO 1 e DQO 3 (Carosia, 2011)

Os valores de remoção de matéria orgânica obtidos para DQO1(etanol como co-substrato), DQO3 (etanol como co-substrato + $14,40 \pm 3,5$ mg/L LAS) e DQO4 (etanol e sacarose como co-substratos + $6,8 \pm 2,1$ mg/L LAS) foram semelhantes, ou seja, acima de 84 %. Embora, na condição DQO3 tivesse $14,40 \pm 3,5$ mg/L LAS, os valores de remoção nessa condição e na DQO1(sem adição de LAS) foram similares. Portanto, a presença de LAS não afetou significativamente a remoção de matéria orgânica nestas duas condições. Por outro lado, para condição DQO4 verificou-se remoção ligeiramente inferior, podendo ser atribuída à presença de dois co-substratos; provavelmente, nessa condição ocorreu o favorecimento de

algumas populações em detrimento de outras. Além disso, a quantidade de extrato de levedura na DQO4 foi 100 mg/L inferior aquilo adicionado nas condições DQO1 e DQO3.

Para condição DQO5 (etanol e sacarose como co-substratos + $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS), foi observada remoção de matéria orgânica inferior a DQO4 (etapa II). A duplicação da concentração de detergente em pó da etapa II para a III ($6,8 \pm 2,1$ mg/L para $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS, respectivamente) pode ter afetado negativamente parte dos microrganismos no início da etapa III (Figura 5.4). Como esta etapa durou apenas 37 dias, o efeito da adaptação da biomassa à nova concentração do detergente, que provocou aumento nos níveis de degradação da matéria orgânica no final desta fase, foi reduzido, resultando em remoção de $78,5 \pm 7,4\%$ da DQO5 contra $84,7 \pm 6,3\%$ da DQO4 (Figura 5.4 e Tabela 5.4).

A média de remoção obtida para condição DQO6 (sacarose + $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS) foi bem próxima da condição DQO5, entretanto, teve menor amplitude em seus valores. Provavelmente, os microrganismos já estavam adaptados a concentração de detergente aplicado ao reator (mesma da DQO5).

Para a condição DQO2, foi registrada a menor média em relação a todas outras as demais condições (Figura 5.5).

Aplicou-se o teste ANOVA-*one way* para os valores de remoção de matéria orgânica obtidos para as diferentes condições de co-substratos (DQO1 a DQO6). A média de uma ou mais amostras foram consideradas estatisticamente diferentes para $\alpha = 5\%$ ($F_{\text{crítico}} = 13,08$; $\text{Prob} > F = 1,6145 \times 10^{-9}$).

Além disso, os conjuntos de amostras foram comparados par a par por meio do teste Scheffé a fim de verificar se havia diferença significativa de remoção entre duas composições de esgoto sintético (Tabela 5.5), em relação a presença de co-substratos.

Tabela 5.5: Comparação par a par das médias de remoção de DQO de diferentes águas residuárias por teste Scheffé ($\alpha = 0,05$)

Número	Pareamento	Diferença entre as médias (%)	Erro padrão da média	Significância
1	DQO2/ DQO1	-14,36066	2,23069	1
2	DQO3/DQO1	-1,42054	2,0205	0
3	DQO3/DQO2	12,94012	1,98283	1
4	DQO4/DQO1	-2,54667	2,44565	0
5	DQO4/DQO2	11,81399	2,41463	1
6	DQO4/DQO3	-1,12613	2,22191	0
7	DQO5/DQO1	-8,71202	2,77311	0
8	DQO5/DQO2	5,64864	2,74579	0
9	DQO5/DQO3	-7,29148	2,57794	0
10	DQO5/DQO4	-6,16535	2,92311	0
11	DQO6/DQO1	-9,51714	2,3437	1
12	DQO6/DQO2	4,84352	2,31131	0
13	DQO6/DQO3	-8,0966	2,10917	1
14	DQO6/DQO4	-6,97047	2,51941	0
15	DQO6/DQO5	-0,80512	2,83837	0

Obs.: Valores de significância iguais a 1 representam diferença significativa entre dois conjuntos de amostras e valores iguais a zero inferem que os dois conjuntos são estatisticamente iguais para $\alpha = 0,05$.

Os pareamentos que tiveram diferença significativa entre os valores de remoção foram os seguintes: 1, 3, 5, 11 e 13. Excetuando o par 5, as diferenças significativas destes pareamentos pareceram residir principalmente nas diferenças de co-substratos entre os pares comparados, do que em relação a presença ou ausência de surfactante.

O pareamento 5 (DQO4 e DQO2) teve diferença significativa mesmo apresentando os mesmos co-substratos (sacarose e etanol). Apenas neste pareamento, o surfactante parece ter sido fator preponderante para explicar a diferença de rendimento da remoção da matéria orgânica. O detergente em baixa concentração, provavelmente, não provocou inibição aos microrganismos, bem como, foi fonte alternativa de carbono e energia.

Nenhuma análise conclusiva pode ser obtida acerca de qual condição nutricional (co-substrato ou surfactante) foi preponderante dentre os resultados obtidos experimentalmente (Tabela 5.5) na remoção de DQO. Para as condições com diferentes co-substratos e mesma concentração de LAS (DQO6 e DQO5), bem como, para aquelas com mesmos co-substratos e diferentes concentrações de LAS (DQO5/DQO4), não foi observado nenhuma diferença significativa no conjunto de dados.

5.4 Remoção de LAS

O período de aplicação de detergente em pó na alimentação durou 153 dias. Os valores médios de LAS afluyente e efluente, bem como, de remoção deste surfactante estão presentes na Tabela 5.6.

A variação temporal de LAS pode ser visualizada por meio das Figuras 5.6 e 5.7.

Tabela 5.6: Valores médios de LAS durante a operação

Etapa	LAS afluyente (mg/L)	LAS efluente (mg/L)	Remoção (%)
II	6,8±2,1	4,6±1,8	33,1±12,1
III	14,3±1,5	8,7±2,6	39,4±15,8
IV	16,4±2,5	9,7±2,3	40,7±13,5

Figura 5.6: Variação temporal de LAS afluyente, efluente e eficiência de remoção

Figura 5.7: Variação temporal de carga de LAS removida por carga aplicada

Na etapa II, obteve-se para $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS afluyente, remoção de $33,1 \pm 12,1\%$. Desse modo, a menor média de remoção de todas as etapas. No entanto, a média de remoção de DQO foi a maior registrada entre todas as etapas; ou seja, $84,7 \pm 6,3\%$, para $615,6 \pm 99,1$ mg/L afluyente (Tabela 5.4). É provável que outros componentes do detergente em pó tenham contribuído em maior proporção, como fonte de carbono e energia, do que a molécula de LAS. Além disso, é possível que a molécula de LAS tenha promovido maior disponibilidade de co-substratos (sacarose e etanol) e macro e micronutrientes presentes no extrato de levedura para degradação pelos microrganismos. Garcia et al. (2005) avaliaram a degradação de vários homólogos de LAS em ensaios em batelada. Os autores constataram que o homólogo com a maior cadeia hidrofóbica (tetradodecilbenzeno sulfonado) aumentou a produção de biogás. Este homólogo, provavelmente, aumentou a disponibilidade de compostos orgânicos adsorvidos no lodo, promovendo a biodegradação dos mesmos.

A explicação explicitada no parágrafo anterior, apesar de plausível, deve ser relativizada pois os pareamentos DQO4/DQO5 e DQO4/DQO6 não apresentaram diferença significativa de acordo com o teste Scheffé (Tabela 5.5)

Para as etapas III (sacarose e etanol como co-substratos) e IV (apenas sacarose como co-substrato) obteve-se remoção de LAS ao redor de 40% ($39,4 \pm 15,8\%$ na etapa III e $40,7 \pm 13,5\%$ na etapa IV) para $14,3 \pm 1,5$ mg/L e $16,4 \pm 2,5$ mg/L afluyente, respectivamente. A eficiência de remoção pouco foi alterada em virtude da composição de diferentes co-substratos. Diferenças evidentes de eficiência de remoção de LAS foram relatados por Duarte et al. (2010) ao utilizar diferentes co-substratos em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais. Entretanto, no presente estudo houve pequenas alterações na composição do esgoto sintético das etapas III (etanol e sacarose) e IV (sacarose), enquanto, no trabalho supracitado as mudanças na composição do esgoto sintético foram mais profundas; ou seja, aumento da concentração do extrato de levedura de 50 para 500 mg/L, em duas etapas de operação; e utilização apenas de detergente como fonte de carbono na última etapa de operação.

Durante a aplicação do sabão em pó foram registrados picos de remoção de LAS no começo de cada etapa (Figura 5.6 e 5.7). Nas etapas II, III e IV, além da degradação biológica, provavelmente ocorreu processo de adsorção inicial do LAS na biomassa e no material suporte. Segundo Mogensen, Haagenzen e Ahring (2003) e Okada et al. (2009), a adsorção de LAS em lodo está diretamente associada com a concentração do surfactante dissolvido no meio líquido. Portanto, é possível que o aumento da concentração de LAS da

etapa II ($6,8 \pm 2,1$ mg/L) para III ($14,3 \pm 1,5$ mg/L) tenha contribuído para o incremento da adsorção do surfactante, resultando em um pico de remoção do LAS no início da etapa III.

Não houve aumento significativo de concentração de LAS entre as etapas III e IV ($14,3 \pm 1,5$ mg/L e $16,4 \pm 2,5$ mg/L) e, mesmo assim, registrou-se um pico de remoção no início da última etapa. A mudança da constituição dos co-substratos pode ter afetado de alguma maneira a remoção inicial de LAS. Segundo Fanton, Fayet e Gelas (1997), vários tipos de açúcares, como a sacarose (utilizada como único co-substrato na etapa IV, apresentando maior concentração do que nas etapas anteriores), apresenta vários grupos hidroxila que podem constituir a parte hidrofílica de um detergente quando associados a uma cadeia hidrofóbica. Ogunmoyela e Birch (1983) evidenciaram a presença de interação molecular entre sacarose e surfactante não-iônico (monoestearato de glicerol) e anfifílico (lecitina) por meio de teste de diálise e ponto de congelamento da mistura açúcar/surfactante. A sacarose, em maior concentração, ao se ligar a cadeia alquílica da molécula de LAS poderia aumentar sua solubilidade, tornando-a mais facilmente disponível para biodegradação. No entanto, em segundo momento, a sacarose também seria utilizada como fonte de carbono pelos microrganismos, diminuindo sua atuação na molécula de LAS e, por conseguinte, a eficiência de remoção do surfactante.

Oliveira (2010) avaliou a remoção de LAS em RALF com areia como material suporte e obteve remoção do surfactante acima de 90% para concentração afluyente de $45,8 \pm 5,4$ mg/L, na última etapa de operação com duração de 47 dias. No entanto, a autora utilizou 500 mg/L de extrato de levedura, TDH de 18 horas e LAS comercial (ao contrário do presente trabalho que empregou detergente em pó). Estas características da operação contribuíram para diferenças na eficiência de remoção encontradas nos dois trabalhos.

As percentagens de remoção foram analisadas por meio de gráfico *box-plot* (Figura 5.8): LAS1 - retirados de Carosia (2011) - uso de etanol como co-substrato e $14,4 \pm 3,5$ mg/L de LAS; LAS2 constituiu os dados retirados da etapa II (sacarose e etanol como co-substratos e $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS); LAS3 - valores de remoção da etapa III (sacarose e etanol como co-substratos e $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS); LAS4 representou a etapa IV (sacarose como co-substrato e $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS).

Figura 5.8: *Box-plot* de remoção de LAS de diferentes águas residuárias: LAS1 (etanol como co-substrato e $14,4 \pm 3,5$ mg/L de LAS), LAS2 (etanol e sacarose como co-substratos e $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS), LAS3 (etanol e sacarose como co-substratos + $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS), DQO4 (sacarose + $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS). As barras representam os valores máximos e mínimos, (▢) representa a média e os asteriscos constituem os *outliers*. Fonte: LAS 1 (Carosia, 2011).

Para a condição LAS1, foi obtida maior média de remoção dentre os co-substratos avaliados; ou seja, 47,3%. Esta composição do esgoto sintético foi utilizada por Carosia (2011), com 100 mg/L a mais de extrato de levedura em relação ao presente estudo e apenas etanol como co-substrato, durante 112 dias de operação.

A mediana do LAS2 ficou em torno de 30%, ou seja, 50% dos valores de remoção da etapa II foram abaixo de 30%. A média do período foi de 33,1%, portanto, próxima da mediana. A amplitude dos valores não foi acentuada em virtude do tempo de operação de 58 dias da etapa II.

Para a condição LAS3 foi registrada a maior amplitude de valores em relação ao restante das demais condições, devido ao menor tempo de operação da fase III; ou seja de 37

dias. Apesar disso, os valores de remoção foram similares a condição LAS4, com tempo de operação de 58 dias, todavia, com menor amplitude de valores.

As médias de remoção dos diferentes conjuntos de amostras (LAS1 a LAS4) foram comparadas estatisticamente por meio do teste ANOVA-*one way* com $\alpha = 0,05$: a média de um ou mais conjuntos registraram diferença significativa ($F_{\text{crítico}} = 4,46$; $\text{Prob} > F = 0,0065$).

Os valores médios de remoção de LAS para os diferentes co-substratos foram comparados par a par pelo teste Scheffé, a fim de verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente relevantes entre os pares (Tabela 5.7). Os valores de significância iguais a 1 representam diferença significativa entre dois conjuntos de amostras e valores iguais a zero inferem que os dois conjuntos são estatisticamente iguais para $\alpha = 0,05$.

Tabela 5.7: Comparação par a par das médias de remoção de LAS de diferentes águas residuárias por teste Scheffé ($\alpha = 0,05$)

Número	Pareamento	Diferença entre as médias (%)	Erro padrão da média	Significância
1	LAS2 /LAS1	-14,14285	3,94728	1
2	LAS3/LAS1	-7,85292	4,54466	0
3	LAS3/LAS2	6,28993	5,03632	0
4	LAS4/LAS1	-6,57111	3,79308	0
5	LAS4/LAS2	7,57174	4,37012	0
6	LAS4/LAS3	1,28181	4,91639	0

Observou-se somente para o pareamento 1 (LAS2/LAS1) diferença significativa de remoção. A diferença referente a composição dos co-substratos (somente 0,126 ml/L de etanol em LAS1 e 97,25 mg/L de sacarose e 0,063 ml/L de etanol em LAS2), maior

concentração de extrato de levedura (500 mg/L) e surfactante (14,40 mg/L) na condição LAS1 em relação a condição LAS2 (400 mg/L de extrato de levedura e 6,79 mg/L de LAS) foram fatores, que somados, possivelmente explicam a diferença estatística relevante entre os dois conjuntos de dados.

Para os outros pareamentos observou-se pelo menos um fator em comum; ou seja, pareamento 2 (LAS3/LAS1) teve concentração similar de surfactante ($14,3 \pm 1,5$ mg/L em LAS3 e $14,4 \pm 3,5$ mg/L em LAS1); pareamento 3 ocorreu para a mesma constituição de co-substratos (LAS3 e LAS2, ambos apresentam sacarose e etanol como co-substratos); pareamento 4 deteve concentração similar de LAS ($16,4 \pm 2,5$ mg/L em LAS4 e $14,4 \pm 3,5$ mg/L em LAS1); pareamento 5 teve a mesma concentração de extrato de levedura (400 mg/L) e, pelo menos, com um co-substrato em comuns nas condições LAS4 e LAS2 que foi a sacarose; e pareamento 6 para concentração similar de LAS ($16,4 \pm 2,5$ mg/L em LAS4 e $14,3 \pm 1,5$ mg/L em LAS3).

Figura 5.9: Eficiência de remoção de LAS em várias configurações de reatores

* A carga de LAS específica aplicada no CSTR foi calculada em função do valor de sólidos totais (ST) multiplicado pelo fator 0,6.

Fonte: Okada et al. (2009): UASB; Delforno et al (2011): EGSB; Mogensen et al. (2003): CSTR

As diferenças de remoção do LAS foram comparadas em função da carga específica do surfactante aplicado em diferentes configurações de reatores: UASB, EGSB, CSTR e RALF (do presente trabalho) (Figura 5.9). Os dados dos três primeiros reatores foram

retirados da literatura e podem ser visualizados na Tabela 5.8. O valor de remoção do EGSB foi retirado de Delforno et al. (2011) com TDH de 26 horas. A carga específica de LAS aplicada do CSTR foi calculada em função dos dados apresentados em Mogensen, Haagenzen e Ahring (2003) com valor médio de LAS aplicado afluyente de 104,3 mg/L. Como os autores deste trabalho apresentaram somente o valor de sólidos totais por litro (ST/L), os sólidos voláteis por litro (STV/L) foram encontrados multiplicando ST/L pelo fator 0,6. Este coeficiente indica que 60% do lodo digerido (utilizado em Mogensen, Haagenzen e Ahring (2003) foi constituído por STV, percentagem máxima encontrada em lodos digeridos segundo Metcalf e Eddy (1991)).

Tabela 5.8: Parâmetros dos reatores visualizados na Figura 5.9

Reator	Carga específica de LAS aplicada (mgLAS/gSTV.d)	Remoção (%)	TDH (horas)	Referência
UASB	2,7	50	24	Okada et al. (2009)
EGSB	2,61	47,8	26	Delforno et al (2011)
RALF	5,45	39,4	16	Presente estudo
CSTR	8,74*	20	360 (15 dias)	Mogensen et al. (2003)

* A carga de LAS específica aplicada no CSTR foi calculada em função do valor de sólidos totais (ST) multiplicado pelo fator 0,6.

Relação inversa entre remoção e carga específica de LAS aplicada foi observada para as diferentes configurações de reatores (Figura 5.9). O aumento de carga de LAS aplicada pareceu provocar efeito negativo aos microrganismos responsáveis pela degradação do surfactante, mesmo para valores de carga específica (Tabela 5.8) abaixo do limite de 14 mgLAS/gSTV, como aqueles mencionados por Gavala e Ahring (2002).

No presente estudo, obteve-se 39,4% de remoção do LAS para TDH de 16 horas no RALF, enquanto, Delforno et al. (2011) obtiveram para EGSB 48% de remoção para TDH de 26 horas. Neste estudo, obteve-se carga removida específica média de 2,0 mgLAS /gSTV.d, enquanto, para EGSB foi de 0,90 mgLAS /gSTV.d (Delforno et al., 2011). A maior eficiência de remoção específica pode ser creditada ao maior fator de diluição obtido para RALF em relação ao EGSB, provavelmente, possibilitando menor inibição do LAS aos microrganismos.

5.5 Monitoramento: pH, alcalinidade e potencial redox

Os valores médios de pH, alcalinidade e potencial redox, tanto do afluente como do efluente, podem ser visualizados na Tabela 5.9. Os valores de DQO também foram incluídos nesta tabela uma vez que os parâmetros de monitoramento supracitados podem interferir na remoção de matéria orgânica

Tabela 5.9: Parâmetros físico-químicos de monitoramento do RALF

Etapa	Amostra	DQO (mg/L)	pH	AP (mgCaCO₃/L)	AT (mgCaCO₃/L)	Potencial Redox (mV)
I	Afluente	575,3±59,3	7,68±0,17	219±32,9	303,2±36,5	
	Efluente	156,9±53,4	7,45±0,30	243,1±51,1	369,2±41,2	-35,6 ±140,63
	Remoção (%)	72,86±8,33				
II	Afluente	615,6±99,1	7,48±0,44	257,3±66,8	364,5±71,4	
	Efluente	94,8±47,6	7,41±0,15	356,20±42,0	493,6±70,7	-126,46 ±135,33
	Remoção (%)	84,67±6,32				
III	Afluente	598,50±7,4	7,52±0,46	215,9±38,4	307,9±36,8	
	Efluente	127,7±43,0	7,35±0,12	287,6±35,8	405,9±30,5	-329,27 ±25,62
	Remoção (%)	78,50±7,45				
IV	Afluente	581,90±80,5	7,68±0,39	176,0±43,0	267,5±28,1	
	Efluente	128,1±39,3	7,48±0,21	292,90±29,7	405,1±40,60	-215,33 ±209,12
	Remoção (%)	77,70±6,77				

Em relação ao pH afluente e efluente observou-se valores médios de $7,58 \pm 0,38$ e $7,43 \pm 0,2$ para todas as etapas de operação, respectivamente. Estes valores abrangem a faixa de pH de atuação da maioria dos microrganismos que participam do processo de digestão anaeróbia. A Figura 5.10 mostra a variação dos valores de pH ao longo da operação.

Na Etapa II observou-se diminuição de pH efluente de $7,45 \pm 0,30$ para $7,41 \pm 0,15$, em relação a Etapa I (Tabela 5.9). Esse aspecto foi observado após adição do sabão em pó na alimentação do reator.

Na Etapa III observou-se pH efluente de $7,35 \pm 0,12$, valor abaixo ao registrado na etapa II ($7,41 \pm 0,15$). A terceira etapa foi caracterizada pelo aumento, em aproximadamente duas vezes, da concentração de LAS em relação à segunda (na etapa III, a média afluente de LAS foi de $14,3 \pm 1,5$ mg/L e na II foi de $6,8 \pm 2,1$ mg/L) (Tabela 4.3), justificando a diminuição do valor médio de pH.

Para a Etapa IV observou-se pH efluente de 7,5, enquanto, para etapa III foi de 7,3. Oliveira (2010) registrou valores médios de pH afluente e efluente de 7,6 a 7,7 e 7,8 a 8,0, respectivamente. A autora utilizou sacarose como co-substrato e 400 mg/L de bicarbonato de sódio no estudo da remoção de LAS comercial em RALF.

Em relação a alcalinidade total, verificou-se valores maiores no efluente após adição do sabão em pó para as últimas três etapas (Etapa I sem LAS: $369,2 \pm 41,2$ mg/L; Etapa II com LAS: $493,6 \pm 70,7$ mg/L; Etapa III com LAS: $405,9 \pm 30,5$ mg/L; Etapa IV com LAS: $405,1 \pm 40,60$ mg/L) (Tabela 5.9). Este fato também foi evidenciado por Carosia (2011) que registrou valores de alcalinidade total no efluente acima de 400 mg/L. Oliveira (2010), no entanto, após adição de LAS comercial, registrou valores menores à média obtida em etapa anterior à adição de surfactante: valores médios em torno de 160 mg/L com LAS e 300 mg/L sem LAS. Os compostos presentes no sabão em pó podem ter contribuído para maiores valores de alcalinidade obtida nesse trabalho. A variação temporal da alcalinidade parcial e total podem ser visualizadas na Figura 5.11 e 5.12.

Em relação aos valores médios de potencial redox observou-se -35,6, -126,46, -329,27 e -215,33 mV, em amostras obtidas para as Etapas I, II, III e IV, respectivamente. Sendo assim, o ambiente anaeróbio para degradação da matéria orgânica foi garantido.

Vale ressaltar que após adição do sabão em pó na etapa II ($6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS afluente), os valores de potencial redox decresceram em relação a etapa I (sem LAS afluente) e mantiveram-se inferiores a -200 mV em quase todo o período restante de operação (Figura

5.13). O mesmo comportamento de redução dos valores de potencial redox foi observado por Carosia (2011) após adição de sabão em pó no RALF.

Figura 5.10: Variação temporal de pH para RALF

Figura 5.11: Variação temporal de alcalinidade parcial para RALF

Figura 5.12: Variação temporal de alcalinidade total para RALF

Figura 5.13: Variação temporal de potencial Redox durante a operação do reator

5.6 Ácidos orgânicos voláteis

O monitoramento da natureza e quantidade de ácidos orgânicos voláteis (AOV) é uma das ferramentas mais úteis na verificação da estabilidade da degradação em reatores anaeróbios (AHRING; SANDBERG; ANGELIDAKI, 1995). Os AOV foram monitorados durante a operação do RALF, para as quatro etapas da operação do reator (Tabela 5.13 e Figura 5.15). A variação temporal dos ácidos voláteis totais (AVT), obtidos pela soma de todos os AOV mensurados em HPLC, pode ser visualizada na Figura 5.14.

Tabela 5.10: Valores médios de ácidos orgânicos voláteis do RALF

Espécie de Ácido	Concentração média (mg/L)			
	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV
Cítrico	1,47±2,77	≤ LD*	≤ LD*	≤ LD*
Málico	≤ LD*	≤ LD*	1,4±3,7	≤ LD*
Succínico	2,56±4,16	≤ LD*	0,9±1,32	≤ LD*
Lático	4,96±13,28	≤ LD*	3,6±7,65	≤ LD*
Fórmico	0,85±1,94	≤ LD*	≤ LD*	≤ LD*
Acético	4,52±6,63	≤ LD*	7,02±10,20	1,01±2,97
Propiônico	2,59±7,39	0,62±1,95	2,49±2,92	≤ LD*
Isobutírico	1,69±2,12	≤ LD*	5,45±13,35	0,13±0,49
Butírico	13,23±22,28	≤ LD*	49,15±85,13	≤ LD*
Isovalérico	30,12±24,37	≤ LD*	≤ LD*	≤ LD*
Valérico	0,64±1,72	≤ LD*	1,15±2,81	≤ LD*
Capróico	9,19±4,56	9,31±1,74	8,67±1,72	8,28±0,59

LD* = Limite de detecção

Figura 5.14: Variação temporal de ácidos voláteis totais (AVT) do RALF

Figura 5.15: Percentual de contribuição de cada ácido em cada etapa de operação do RALF

Na Etapa I observou-se maior produção de ácidos orgânicos, em relação às demais etapas. Além disso, houve variação de valores ao longo de toda esta fase. Nesta etapa, ocorreram alguns problemas pontuais de operação do reator: vazamento do substrato sintético da mangueira de alimentação, falta de energia, vazamento do efluente devido a problemas de vedação na mangueira de recirculação. Certamente estes imprevistos supracitados contribuíram para a produção de ácidos e sua variação ao longo da etapa. No entanto, os valores de AVT foram inferiores a 125 mg/L, ou seja, valores inferiores aqueles observados por Carosia (2011) em etapa anterior a adição de sabão em pó.

Os principais ácidos encontrados na primeira etapa foram butírico e isovalérico com valores médios de 13,23 e 30,12 mg/L, respectivamente. Ácido butírico é, juntamente com ácido acético e ácido propiônico, um dos principais ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta verificados para comprovar a estabilidade de reatores anaeróbios (LIN et al., 1986, BUYUKKAMACI; FILIBELI, 2004).

A adição de sabão em pó (concentração média de $6,8 \pm 2,1$ mgLAS/L) (Tabela 4.3) na etapa II não promoveu aumento da concentração de AVT. O mesmo comportamento foi verificado por Oliveira (2010) ao aplicar concentrações crescentes de LAS comercial no RALF (etapa I, sem LAS; na etapa II, $8,2 \pm 1,3$ mg/L de LAS; etapa III, $24,4 \pm 3,7$ mg/L de LAS; etapa IV, $30,8 \pm 4,5$ mg/L de LAS; etapa V, $38,4 \pm 5,7$ mg/L de LAS; e etapa VI, $45,8 \pm 5,4$ mg/L de LAS), ou seja, independentemente da presença de LAS, os valores de AVT permaneceram estáveis na faixa entre 12 e 18 mg/L durante toda operação.

No início da etapa III, com a duplicação da concentração de detergente em pó para 20 ml/L ($14,3 \pm 1,5$ mgLAS/L), em relação à fase anterior ($6,8 \pm 2,1$ mgLAS/L), houve aumento da concentração de AVT. A concentração média de ácido acético aumentou em relação à etapa II, registrando o valor médio de 7,02 mg/L (Tabela 5.10). Além disso, ocorreu o incremento da produção de ácido butírico (49,1 mg/L) em comparação à etapa anterior, representando aproximadamente 50% do total de ácidos produzido na terceira etapa (Tabela 5.10 e Figura 5.15).

Para a última etapa foram registrados valores de AVT inferiores 15 mg/L. Os valores médios de ácido acético (1,01 mg/L) e ácido butírico (concentração inferior ao limite de detecção) foram inferiores àqueles obtidos na terceira etapa. O impacto de 15 mg/L de LAS já não fora tão sentido pela biomassa em relação a etapa III.

5.7 Sólidos suspensos totais

As concentrações de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) ao longo do período de operação do reator foram baixas e pouco variaram entre as etapas (Tabela 5.11).

No presente estudo, a média de SST foi de $69,2 \pm 45,6$ mg/L, sendo $55,1 \pm 27,4$ mg/L desse total, constituído por SSV. Carosia (2011) ao verificar a remoção de LAS em RALF, obteve média de $52,0 \pm 20,5$ mg/L de SST e $50,1 \pm 21,2$ mg/L de SSV. Portanto, o percentual de SSV em relação a SST registrado em Carosia (2011) foi maior do que a verificada neste presente estudo; ou seja, 96,3% e 79,6%, respectivamente.

Tabela 5.11: Valores médios de sólidos do efluente do RALF

Etapas	SSV (g/L)	SST (g/L)
I	$0,06 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,05$
II	$0,03 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,03$
III	$0,05 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,03$
IV	$0,07 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,055$

5.8 Análise de Componentes Principais (ACP)

Os dados da maior parte das análises de monitoramento – pH, remoção de DQO, potencial redox, concentração de ácidos voláteis totais (AVT), alcalinidade total e remoção de LAS – foi vislumbrado por meio da Análise de Componentes Principais (ACP). Vale ressaltar que foram plotados no gráfico de ACP (Figura 5.17) apenas os dados coletados a partir da segunda etapa que coincide com a aplicação de sabão em pó no reator, pois a verificação de remoção do LAS representou um dos principais focos do presente trabalho.

A componente 1 e 2 explicaram cerca de 60% dos dados aferidos durante a operação do reator (Figura 5.16). A primeira é mais bem descrita pelas variáveis “Ácidos Totais” e “LAS-remoção”, explicando aproximadamente 40% dos valores das análises aferidas (Figura 5.17 e 5.18). A segunda explica cerca de 20% dos dados, sendo que é melhor descrita pelas variáveis “Alcalinidade total” e “DQO-remoção” em primeiro lugar e em menor escala por “Ácidos Totais” e “LAS-remoção” (Figura 5.16 e 5.17).

Em relação aos pontos da etapa II do gráfico de ACP, estes foram influenciados pelos fatores “DQO-remoção”, “Alcalinidade total” e “Redox” (Figura 5.17). Nesta etapa, registrou-se o começo da aplicação de sabão em pó no reator, podendo ter tido papel

importante na maior variabilidade dos valores de remoção de DQO, alcalinidade total e potencial redox registrados nesse período de operação. O sabão em pó possui componentes que conferem mudanças no afluente líquido e estas provavelmente influenciaram a comunidade microbiana, resultando em variações nos valores das variáveis supracitadas.

Na etapa III, a distribuição dos pontos apresentou uma particularidade; ou seja, metade dos dados foi influenciada pelos fatores “DQO-remoção”, “Alcalinidade total”, enquanto, a outra teve maior influência do “LAS-remoção” (Figura 5.17). Como esta etapa teve a menor duração (37 dias) entre todas as outras, a padronização de única tendência na distribuição dos dados tornou-se mais difícil; ou seja, verificou-se influência da etapa anterior e posterior na análise desses valores.

Em relação aos valores obtidos para etapa IV observou-se forte tendência em relação aos fatores “LAS-remoção”, “Ácidos Totais” e em menor escala para “pH” (Figura 5.18). A aplicação de maior concentração de LAS (média de 16,4 mg/L) durante quase dois meses parece ter sido decisiva na tendência de distribuição dos dados desta etapa, majoritariamente influenciados pela remoção de LAS e produção de AVT. A variabilidade dos dados de remoção do LAS, acentuada pela alta concentração aplicada, pode ser atribuída a processos de adsorção e degradação biológica. Este último pode ter sido afetado pela aplicação de uma concentração maior de sacarose nesta etapa em relação a anterior (194,5 mg/L na etapa IV e 97,25 mg/L na etapa III). Além disso, é importante ressaltar que a influência do fator “Ácidos Totais” nesta etapa não foi relacionada a alta produção de ácidos, mas, para variabilidade maior deste fator em relação a outros durante essa etapa.

Em resumo, pode-se observar que as etapas II, III e IV foram influenciadas, respectivamente, em maior parte pelo componente 2, por dois componentes (1 e 2) em escalas similares e componente 1.

Figura 5.16: Variância explicativa dos componentes principais

Figura 5.17:Análise de Componentes Principais (ACP)

5.10 Balanço de massa do LAS

A quantidade de LAS afluyente e efluente acumulado durante toda a operação bem como o percentual de remoção do surfactante pode ser visualizado na Tabela 5.12.

Tabela 5.12: Balanço de massa do LAS

Afluyente (mg)	Efluente (mg)	Remoção (%)
2931,55	1777,80	39,36

Os valores de adsorção de LAS no lodo (Ad1), no SST efluente (Ad2) e na areia (Ad3) e o percentual de adsorção em relação à quantidade de LAS afluyente podem ser visualizados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13: Adsorção do LAS

Ad1(mg)	Ad2 (mg)	Ad3 (mg)	Total (mg)	Adsorção (%)
16,89	231,48	9,37	257,74	8,8

A reunião dos dados de LAS afluyente e efluente e de adsorção permitiu calcular o balanço de massa global do LAS, obtendo-se os percentuais de remoção e degradação biológica deste surfactante (Tabela 5.14 e Figura 5.18).

Tabela 5.14: Balanço global do LAS

Entrada	Saída				Resultado	
Afluyente (mg)	Efluente (mg)	Ad1 (mg)	Ad2 (mg)	Ad3 (mg)	Remoção (mg)	Degradação (mg)
2931,55	1777,80	16,89	231,48	9,37	1153,75	896,01
----	60,64%	7,9%	0,58%	0,32%	39,36%	30,56%

Figura 5.18: Balanço de massa do LAS

O percentual de LAS removido ao final da operação do reator foi superior a 39%, sendo 30% referente a degradação e 9% a adsorção (Figura 5.18). O valor de degradação biológica do LAS inferior aos resultados encontrados por Oliveira (2010) e Carosia (2011). Oliveira (2010) obteve degradação de 93%, para LAS comercial, após 285 dias de operação com TDH de 18 horas.

Em relação ao segundo estudo, a diferença do valor registrado não foi muito grande: apenas 8% maior do que o presente trabalho. A utilização de 500 mg/L de extrato de levedura em Carosia (2011) e o emprego de diferentes co-substratos no presente estudo podem ter sido pontos relevantes para justificar a diferença de eficiência de degradação biológica encontrada.

Convém ressaltar que o atual estudo e o realizado por Carosia (2011) apresentaram valores similares de adsorção total do LAS: 6 e 9%, respectivamente. Esta similaridade nos resultados de adsorção está ligada à presença do mesmo tipo de lodo empregado e a utilização de areia como material suporte em RALF de mesmas dimensões, mesmo com composição diferente de co-substratos entre os dois estudos. Portanto, a possível interação da molécula de LAS com os co-substratos empregados nos dois estudos (etanol em Carosia (2011) e etanol e sacarose no presente trabalho) parece não ter tido papel importante na quantidade total de surfactante adsorvido.

5.11 Variação da comunidade microbiana por DGGE

Por meio do DGGE foi possível visualizar alteração na comunidade de bactérias em função da aplicação de diferentes co-substratos na composição do esgoto sintético (Figura 5.19). Ao lado de cada ramificação do cladograma da Figura 5.19, há a presença de um número e uma letra: o primeiro representa uma determinada composição de esgoto sintético e o segundo a localização da amostra retirada do RALF (“B” para biofilme do material suporte e “S” para material biológico advindo do separador de fases).

De maneira geral, foi possível distinguir dois grandes agrupamentos no gel de DGGE, sendo o primeiro relacionado com a presença de sabão em pó com 54% de similaridade e outro com ausência do mesmo com 92% de similaridade. No primeiro grupo, estão incluídas as amostras das etapas II (3B e 3S), III (4B e 4S) e IV (5B e 5S), bem como, aquelas de Carosia (2011) (1B e 1S) que possuíam em comum a presença de LAS no substrato sintético.

A discrepância entre a constituição de co-substratos e/ou concentração de LAS das amostras deste grupo (etapa II com sacarose e etanol e $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS; etapa III com sacarose e etanol e $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS; etapa IV com sacarose e $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS; e Carosia (2011) com etanol e $14,4 \pm 3,5$ mg/L de LAS) pode explicar a baixa similaridade deste grupo (54%). O outro agrupamento foi formado pelas bandas oriundas da etapa I (2B e 2S) que compartilhavam a mesma constituição de co-substratos (etanol e sacarose) e não continham LAS no substrato sintético foram similares em 92%. Portanto, a presença de surfactante provocou alterações na população do domínio Bacteria; comportamento semelhante foi verificado por Duarte et al. (2010).

Dentro do grande grupo formado pelas amostras contendo detergente em pó (54% de similaridade), destacam-se dois agrupamentos menores, sendo um constituído por biomassa advinda da etapa II (3B e 3S) e de Carosia (2011) (1B e 1S) com similaridade de 59% e outro por amostras das etapas III (4B e 4S) e IV (5B e 5S) com similaridade de 69%. Estes sub-agrupamentos indicam menor importância do fator “co-substratos” em relação ao fator “concentração de detergente em pó” na formação dos mesmos.

O clado formado por 4S, 4B, 5S e 5B (etapas III e IV) é justificado pela presença de concentrações similares de detergente em pó nas etapas III e IV, $14,3 \pm 1,5$ e $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS, respectivamente (Tabela 4.3). Embora, a sequência de bandas 4S compreenda biomassa da mesma etapa da 4B, a primeira forma agrupamento mais próximo ao clado formado por 5B e 5S (etapa IV, sacarose como co-substrato), apresentando 73% de similaridade do que com 4B (69% de similaridade). Embora, as amostras 4B e 4S foram oriundas da condição com

sacarose e etanol, como co-substratos, provavelmente, a sacarose teve maior influência para a amostra 4S em relação à 4B, uma vez que, etanol pode ter sido consumido em grande proporção na região do material suporte, resultando em similaridade alta da comunidade microbiana 4S com o grupo 5B-5S (73%), proveniente de amostra com apenas sacarose como co-substrato. A presença de apenas sacarose na etapa IV parece ter sido decisiva na formação do grupo 5B-5S com similaridade de 81%, não levando em consideração a presença ou ausência de material suporte.

O agrupamento formado por 1B, 1S, 3B e 3S com similaridade de 59% foi intrigante; ou seja, as amostras de Carosia (2011) (1B e 1S, com etanol e $14,4 \pm 3,5$ mg/L de LAS) foram mais similares às da etapa II (3B e 3S, com etanol e sacarose e $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS) do que com a biomassa da etapa III (4B e 4S), sendo que nesta foi adicionado $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS (próximo da apresentada por Carosia, 2011) e etanol no substrato sintético. É provável que a aplicação de 14 mg/L de LAS por mais de cem dias tenha promovido adaptação de rica comunidade microbiana, semelhante àquela presente na etapa II (3S e 3B), a qual fora aplicada 6,8 mg/L LAS durante 58 dias.

As comunidades microbianas presentes no início e no final da operação do RALF podem assemelhar-se sob determinadas condições, como por exemplo, presença de pelo menos um co-substrato em comum (neste caso, o etanol) somado a aplicação de surfactante em diferentes concentrações, sendo a menor no início da operação para diminuir seu efeito inibitório à comunidade microbiana. Vale mencionar, ainda, que o grupo 1B-1S (Carosia (2011)) foi similar em 67%, enquanto, 3S-3B (etapa II) foram 83% similares. Portanto, houve maior diferenciação da comunidade microbiana do material suporte (B), em relação aquela presente no separador de fases (S) no agrupamento 1B-1S em comparação ao 3S-3B. Provavelmente, devido ao uso de etanol como co-substrato que deve ter sido assimilado em maior proporção na região do material suporte somado a duração de mais de cem dias de operação em Carosia (2011).

De maneira geral, amostras com mesma constituição de co-substratos apresentaram mais semelhanças entre si do que àquelas com constituição diferente (Figura 5.19). Como exemplo, têm-se os grupos 1S-1B (etanol como co-substrato (Carosia (2011))), 2S-2B (etapa I com etanol e sacarose como co-substratos) e 5S-5B (etapa IV com sacarose como co-substrato) que apresentaram similaridades elevadas: 67%, 92%, e 81%, respectivamente. Este comportamento pode ser explicado devido ao fato de que co-substratos diferenciados promovem rotas metabólicas distintas e, conseqüentemente, populações microbianas distintas.

Figura 5.19: Dendrograma a partir do DGGE com adoção do coeficiente de Jaccard. A letra “B” representa amostra retirada de biofilme presente no material suporte e a “S” identifica a biomassa advinda do separador de fases. Os números representam os diferentes substratos sintéticos advindos de: Carosia (2010): etanol + $14,4 \pm 3,5$ mg/L de LAS (1); etapa I: etanol e sacarose sem LAS (2); etapa II: etanol e sacarose + $6,8 \pm 2,1$ mg/L de LAS (3); etapa III: etanol e sacarose + $14,3 \pm 1,5$ mg/L de LAS (4); e etapa IV: etanol e sacarose + $16,4 \pm 2,5$ mg/L de LAS (5).

5.12 Análises filogenéticas

Ao final da etapa IV (sacarose como co-substrato e 16,4 mg/L de LAS), amostras da biomassa presente no material suporte foram retiradas para realização da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S. As seqüências, após serem trabalhadas no programa SeqMan, resultaram em 32 *contigs* (Tabela 5.15). Esses *contigs* representam conjuntos de seqüências clonais sobrepostas que originaram segmentos contínuos diferenciados uns dos outros (NELSON; COX, 2000).

Tabela 5.15: Relação de clones e *contigs*

Clones	Contigs
A11, E5, A8	1
C2, D4	2
E3, D10	3
C10	4
D3	5
D2	6
B9	7
D1	8
B11	9
H12	10
G6, C9	11
D7, A10, B10	12
B7, C3, A3, A7	13
D6, F10	14
C12, A9, B2	15
G4, D8	16
G7, H5	17
B1, H7	18
A6, D11, H3, E6, F11, A4	19
F12, F3	20
E2, G12, B5, E12, G3	21
C7, C8	22
G5, E4, E10, C1, G9	23
D12, F2, F7, B8	24
H11, A1, H4	25
D9, B4, G11, E7	26
G8, C4, A12, B12, G2, E1, H8, C5, G10, F9	27
H1, D5, F1	28
H2, C11, H6, B6, E9	29
H10, F8	30
B3, F4, E8, F5, C6	31
H9, E11, A5, F6, A2	32

Os *contigs* obtidos foram relacionados a diferentes filos: Proteobacteria, Acidobacteria, Synergistetes, Bacteroidetes e Firmicutes presentes em 72, 3, 3, 6,3 e 6,3% das seqüências analisadas, respectivamente (Figura 5.20).

Figura 5.20: Percentagem de filos relacionados à biomassa presente na areia da etapa IV

A composição de filos identificados no presente trabalho foi diferente da encontrada por Oliveira (2010). Neste estudo, a autora identificou nove filos dos quais cinco não foram encontrados no presente estudo; ou seja, Gemmatimonadetes, Deinococcus-Thermus, Nitrospira, Chloroflexi e Actinobacteria. Diferenças na composição e diversidade da comunidade microbiana entre os dois trabalhos podem ser atribuídas à utilização de inóculos diferentes, concentrações distintas de extrato de levedura e aplicação de LAS comercial (Oliveira, 2010), ao invés de detergente comercial utilizado no atual estudo.

Todavia, pouca variação na composição da comunidade microbiana foi verificada quando comparada com a distribuição dos filos obtida por Carosia (2011), provavelmente, em virtude das características operacionais similares, como por exemplo, a utilização do mesmo tipo de inóculo e aplicação de sabão em pó como fonte de LAS. As diferenças verificadas na composição dos filos podem ser atribuídas ao uso de co-substratos diferentes nos dois estudos; ou seja, etanol (Carosia, 2011) e sacarose na última etapa de operação do presente trabalho.

Representantes do filo Acidobacteria estiveram presentes em 3% das seqüências analisadas. Microrganismos deste filo são encontrados nos mais diferentes ambientes, tais como, solos, águas termais, lodos ativados e sedimentos de lagos (QUAISER et al., 2003).

Os representantes do filo Synergistetes compreenderam 3% da biomassa presente na areia. As bactérias deste filo são Gram-negativas, estritamente anaeróbias, móveis, mesófilas, apresentam formato de bacilo ou vibrião e crescem em pH ótimo em torno de 7,0 (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2007). Além disso, esses microrganismos são encontrados em ampla diversidade de ambientes, como por exemplo, reator anaeróbio, poços de extração de petróleo, solo e no trato digestivo de porcos, aves e humanos (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2007). Outra característica importante do grupo é a capacidade de degradar aminoácidos em condição anaeróbia (GODON et al., 2005). A presença deste filo pode ser justificada em virtude da origem do inóculo advindo de lodo de UASB no tratamento de resíduos de avicultura. É provável que os representantes deste filo tenham utilizado aminoácidos advindos do extrato de levedura em função das condições impostas no reator.

O filo Bacteroidetes foi relacionado a 6,3% das seqüências analisadas. Este compreende diversos grupos de microrganismos com grande diversidade fenotípica, sendo, tanto, anaeróbios, quanto, aeróbios e habitam ampla gama de ecossistemas como cavidade oral e intestinal de animais, solo e ambientes aquáticos (VINGADASSALOM et al., 2005).

O filo Firmicutes constituiu 6,3% do biofilme da areia. Os membros deste filo são altamente diversos em sua morfologia, fisiologia, características de membrana e habitat (HAAKENSEN et al., 2008). Eles são comumente encontrados em digestores anaeróbios, sendo microrganismos sintróficos que podem degradar ácidos orgânicos voláteis (AOV), como butirato e esta degradação produz hidrogênio, o qual pode ser usado pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (RIVIERE et al., 2009).

Os representantes do filo Proteobacteria constituíram 72% da biomassa da areia. Este grupo compreende bactérias Gram-negativas em sua grande maioria, apresentam grande diversidade de morfologia, ecologia e metabolismo (KERSTERS et al., 2006). O filo Proteobacteria ainda possui grande importância nos processos do ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre, compreendendo mais de 40% de todos os microrganismos procariotos registrados em literatura (KERSTERS et al., 2006). Além disso, este grupo engloba seres quimiolitotróficos, quimiorganotróficos e fototróficos (KERSTERS et al., 2006).

Em relação ao filo Proteobacteria foram encontradas quatro classes: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria representando 4,3; 74; 8,7 e 13% das seqüências, respectivamente (Figura 5.21).

Figura 5.21: Percentagem de classes presentes no filo Proteobacteria

A maior parte das proteobactérias encontradas foi pertencente à classe Betaproteobacteria. Nesta classe estão incluídas bactérias que possuem diversidade de morfologia, metabolismo, sendo a maior parte das espécies não parasita de animais, nem simbiótica, com algum tipo de locomoção, e alguns integrantes possuem cobertura externa à parede celular (KERSTERS et al., 2006). Nessa classe estão incluídos representantes relacionados com a degradação anaeróbia de hidrocarbonos aromáticos, sob condição anóxica, bem como, de alcanos de curta e longa cadeia (PARALES, 2010). Sendo assim, há a possibilidade de membros dessa classe estarem envolvidos na degradação, tanto, da cadeia alquílica, quanto, do anel aromático da molécula de LAS.

Carosia (2011) ao classificar a biomassa da areia em estudo de remoção de LAS em RALF, constatou que a maioria dos clones identificados foram relacionados a classe Betaproteobacteria (43%) e Deltaproteobacteria (31%). Diferentemente de Carosia (2011), no presente trabalho, as betaproteobactérias constituíram a grande maioria das seqüências analisadas (74%). É provável que as diferenças de co-substratos adotados nos dois estudos

(etanol em Carosia (2011) e sacarose, na etapa IV, desse trabalho tenham selecionados as diferentes populações do filo *Proteobacteria*.

Os microrganismos presentes na biomassa da areia foram identificados em nível de família a fim de aprofundar a discussão acerca do metabolismo e filogenia dos mesmos (Figura 5.22).

Figura 5.22: Percentagem de seqüências relacionadas às diferentes famílias de *Bacteria*. Em frente as barras, encontram-se as percentagens de similaridade (mínima e máxima). Adotou-se Bootstrap de 90% no RDP-Classifier.

As duas famílias mais representativas pertencentes a classe Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, respectivamente, identificadas na biomassa da areia foram Rhodocyclaceae (abundância em torno de 45%) e Aeromonadaceae (6%). As demais famílias (Desulfovibrionaceae, Flavobacteriaceae, Geobacteraceae, Holophagaceae, Moraxellaceae, Peptostreptococcaceae, Ruminococcaceae e Synergistaceae) apresentaram abundância relativa menor que 5%. Outras seqüências não foram classificadas em família em virtude do *bootstrap* adotado (90%): domínio *Bacteria* não classificado (9%), filo Bacteroidetes não classificado (3%), classe Alphaproteobacteria não classificada (3%) e classe Betaproteobacteria não

classificada (6%). Ao todo 10 famílias diferentes foram identificadas com a grande maioria das seqüências apresentando similaridades maiores que 93%. As características das famílias relacionadas à biomassa da areia foram descritas a seguir.

Para a família Rhodocyclacea (filo Proteobacteria e classe Betaproteobacteria) foi registrada abundância maior em comparação com outras famílias (Figura 5.22). Esta agrega conjunto de microrganismos com alta diversidade ecológica, morfológica e metabólica, incluindo microrganismos fotoheterotróficos, aeróbios, anaeróbios, fermentadores e fixadores de nitrogênio (GARRITY et al., 2005). Vários trabalhos relacionam esta família com a degradação de compostos aromáticos em processos metabólicos anaeróbios (SHINODA et al., 2000, SHINODA et al., 2004, DURANTE-RODRIGUEZ et al., 2006, SALINERO et al., 2009). Microrganismos relacionados à Rhodocyclaceae devem ter representado participação importante na degradação do LAS, uma vez que, são os mais abundantes na biomassa analisada do presente trabalho.

As UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) 11, 13, 15 e 18 foram identificadas a esta família, mais especificadamente ao gênero *Dechloromonas* sp. com similaridades de 88, 97, 92 e 97%, respectivamente, exceção feita a UTO 14 que foi relacionada a bactéria não cultivada pertencente a Rhodocyclacea com similaridade de 91% (Tabela 5.17 e Figura 5.24). Bactérias semelhantes a *Dechloromonas* são Gram-negativas, não-fermentativas, anaeróbias facultativas e capazes de oxidar acetato utilizando clorato, perclorato e nitrato (ACHENBACH et al., 2001). Além disso, foi relacionado à degradação anaeróbia de compostos aromáticos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), podendo reduzir nitrato na presença de tolueno, etilbenzeno e xileno como doadores de elétrons (CHAKRABORTY et al., 2005). Integrantes deste gênero podem utilizar acetato, propionato, butirato, lactato ou extrato de levedura, como doadores de elétrons, além do Fe^{+2} e sulfeto quando acoplado a redução do clorato; são mesofílicas e crescem em pH próximo de 7,0

A família Aeromonadaceae (filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria) foi a segunda mais abundante entre as famílias identificadas (Figura 5.22). Esta agrupa microrganismos com as seguintes características: bacilos Gram-negativos, mobilidade por meio de flagelo, quimiorganotróficos, anaeróbios facultativos e fermentativos (a maioria utiliza D-glicose como fonte principal de carbono e energia), psicrofílicos e mesofílicos, encontrados em corpos de água e esgoto e, muitas espécies são patogênicas a humanos e outros animais (COLWELL; MACDONELL; DELEY, 1986). A UTO 19 foi relacionada com *Aeromonas* sp. com similaridade de 94% (Tabela 5.17) de cobertura das seqüências. Os

membros deste gênero são fermentadores de glicose, anaeróbios facultativos e podem apresentar espécies mesofílicas e psicofílicas (MARTINEZ-MURCIA et al., 1992). A presença deste táxon pode ser justificada pela sua alta afinidade pela sacarose: o único co-substrato utilizado na etapa IV.

Os membros da família Synergistaceae (filo Synergistetes e classe Synergistia) são anaeróbios estritos, Gram-negativos, possuem morfologia variada, habitam vários ecossistemas (podendo ser encontrados em águas residuárias, lodo de esgoto, rúmen de certos vertebrados, na região bucal de humanos, entre outros), quimiorganotróficos, degradam aminoácidos, sendo que a maioria não metaboliza a sacarose (MCSWEENEY; ALLISON; MACKIE, 1993, JUMAS-BILAK et al., 2007, GANESAN et al., 2008, LABUTTI et al., 2010, PITLUCK et al., 2010). Como o substrato sintético utilizado em todas as etapas continha extrato de levedura, a presença desta família é justificada. O gênero *Synergistes* sp. (família Synergistaceae) foi relacionado com a UTO 3 (similaridade de 90%) (Tabela 5.17). Kumar et al., (2008) identificaram essa bactéria em amostra originária de lodo de reator anaeróbio utilizado para tratamento de resíduos de curtume.

A maioria das espécies da família Desulfovibrionaceae (filo Proteobacteria e classe Deltaproteobacteria) é sulfato redutora, podendo utilizar hidrogênio, formiato, lactato, piruvato e outros compostos orgânicos, incluindo componentes do petróleo bruto, como doadores de elétrons para redução do sulfato (VOORDOUW, 1995). A UTO 16 foi relacionada à deltaproteobactéria não cultivada pertencente à família Desulfovibrionaceae com similaridade de 86% (Tabela 5.17). A versatilidade metabólica e a presença de LAS, sendo substância derivada do petróleo que contém sulfato em sua estrutura química, justificam a presença desta família.

A família Flavobacteriaceae (filo Bacteroidetes e classe Flavobacteria) apresenta microrganismos Gram-negativos, quimiorganotróficos, mesofílicos em geral, espécies tanto aeróbias quanto anaeróbias, habitantes de ecossistemas terrestres e aquáticos e muitos estão associados a doenças em humanos e animais (BERNARDET et al., 1996). A UTO 6 foi relacionada à família Flavobacteriaceae, mais especificadamente ao gênero *Chryseobacterium* sp. com 100% de similaridade (Tabela 5.17). A presença desse gênero aeróbio pode ser creditada no fato de microrganismos anaeróbios poderem gerar ambientes microaeróbios pela redução do sulfato, nitrato ou perclorato presentes na água sintética (LOVLEY; COATES, 2000, DA CRUZ et al., 2011).

Microrganismos da família Geobacteraceae (filo Proteobacteria e classe Deltaproteobacteria) são usualmente isolados de ambientes anóxicos, sendo que a fixação do nitrogênio é um traço fisiologicamente conservado entre seus membros e ocorre durante a biorremediação de compostos orgânicos ou metais (HOLMES; NEVIN; LOVLEY, 2004). Em relação a UTO 17 obteve-se similaridade de 99% a *Geobacter* sp. (família Geobacteraceae) (Tabela 5.17). Todas as espécies deste gênero são capazes de reduzir Fe^{+3} e algumas capazes de utilizar enxofre e certos compostos aromáticos como aceptores finais de elétrons (HOLMES; NEVIN; LOVLEY, 2004). Além disso, a grande maioria é capaz de oxidar acetato e diversas fontes orgânicas de carbono a dióxido de carbono, incluindo os derivados de petróleo (HOLMES; NEVIN; LOVLEY, 2004, TUNTOOLAVEST; BURGOS, 2005). A capacidade de oxidar compostos aromáticos derivados de petróleo somada à diversidade metabólica apresentada por essa família é indicativo de participação desse representante na degradação anaeróbia do sabão em pó.

A família Holophagaceae (filo Acidobacteria e classe Holophagae) engloba microrganismos anaeróbios estritos, Gram-negativos, mesofílicos e quimiorganotróficos que utilizam como doadores de elétrons fumarato, compostos orgânicos metilados aromáticos, citrato e piruvato, tanto, na respiração anaeróbia, quanto, na fermentação homoacetogênica (LIESACK et al., 1994, COATES et al., 1999). Dentro da família Holophagaceae, a UTO 4 se relacionou a uma bactéria não cultivada (similaridade 98%) (Tabela 5.17) encontrada em palha de arroz. A diversidade metabólica do grupo, especialmente relacionada à degradação de compostos aromáticos metilados presentes na composição do detergente em pó, justifica a presença dos membros da família Holophagaceae nas seqüências analisadas.

A família Moraxellaceae pode exibir diversas morfologias, sendo incluídos nessa categoria microrganismos Gram-negativos, quimiorganotróficos, mesofílicos ou psicofílicos, aeróbios, sendo a maioria das cepas oxidase positiva, exceto as do gênero *Acinetobacter*, habitantes de diversos ecossistemas, podendo ser encontrados em membranas da mucosa de animais e homens ou em amostras ambientais (ROSSAU et al., 1991). Apesar das espécies dessa família serem aeróbios, *Acinetobacter* sp., relacionada a UTO 12 com 98% de similaridade (Tabela 5.17) foi encontrada em ambientes anaeróbios em amostras de petróleo e relacionadas com a degradação dos hidrocarbonetos (DA CRUZ et al., 2011).

Os membros da família Peptostreptococcaceae (filo Firmicutes e classe Clostridia) incluem microrganismos anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos, são Gram-positivos em sua maioria com morfologia variada, habitam os mais diversos ecossistemas desde cavidades

internas de animais a fontes hidrotermais e reservas de petróleo, metabolizam PYG (peptona-levedura-glicose) produzindo diversos ácidos, como acético, butírico, capróico e láctico (EZAKI, 2009). A presença dessa família pode ser explicada pela utilização de extrato de levedura e sacarose presentes no esgoto sintético, bem como, ácidos orgânicos voláteis (AOV), como registrado na etapa IV da operação do reator.

Representantes da UTO 7 foram relacionados à família Peptostreptococcaceae. Similaridade de 93% foi obtida com *Fusibacter* não cultivada (Tabela 5.17). Este gênero inclui espécies que metabolizam carboidratos, e podem utilizar tiosulfato ou enxofre como aceptores de elétrons (RAVOT et al., 1999). A glicose oriunda da degradação da sacarose aliada à existência do elemento enxofre (S^0) na molécula de LAS são fatores que podem explicar a presença deste gênero neste estudo.

A UTO 5 foi relacionada à família Bacteroidaceae, a qual foi descrita como “Bacteroidetes não-classificado” (Figura 5.22) em virtude do *bootstrap* de 90% adotado no RDP-Classifier. A família Bacteroidaceae é representada por microrganismos aneróbios estritos, Gram-negativos, capazes de realizar fermentação de carboidratos e, frequentemente, encontrados em mucosas e trato intestinal de animais de sangue quente (BREED; MURRAY; SMITH, 1957). Mais especificadamente para essa UTO obteve-se similaridade de 99% com *Anaerophaga* sp. (Tabela 5.17) os representantes deste gênero são quimiorganotróficas, capazes de degradar sacarose (DENGGER et al., 2002), característica que justifica sua presença na biomassa da etapa IV deste estudo.

A família Ruminococcaceae (filo Proteobacteria e classe Betaproteobacteria) é formada por microrganismos anaeróbios estritos com morfologia e metabolismo variados, a partir da degradação de PYG (peptona, extrato de levedura e glicose) produzem acetato, lactato, formiato ou etanol (CHEN; DONG, 2004, CHASSARD et al., 2012). Várias espécies desse agrupamento produzem H_2 como produto da fermentação de glicose, polissacarídeos e compostos protéicos (CHEN; DONG, 2004). A versatilidade metabólica das bactérias pertencentes a essa família possivelmente contribuiu na remoção anaeróbia de matéria orgânica. A UTO 2 relacionou-se a esta família com similaridade de 84% por meio de bactéria não cultivada (Tabela 5.17).

A família Rhodospirillaceae agrupa bactérias púrpuras não-sulfurosas com metabolismo diversificado, sendo capazes de crescer em condição aeróbia, anaeróbia, fototrófica e fermentativa (SAUNDERS, 1978). Além disso, são capazes de fixar N_2 e produzir H_2 (MADIGAN; COX; STEGEMAN, 1984). Especificamente em relação a essa

família foi obtida similaridade de 88% com *Aquaspirillum* sp. ((UTO 1) (Tabela 5.17), a qual inclui bactérias Gram-negativas, mesofílicas, aeróbias facultativas e anóxicas (STRENGTH et al., 1976). Vale mencionar que apesar da UTO 1 apresentar similaridade de 82% com família Rhodospirillaceae (dado não mostrado), esta foi relacionada a “Alphaproteobacteria não-identificado” (98% de similaridade na Figura 5.22) em virtude do valor de 90% de *bootstrap* adotado.

Delforno et al. (2012), ao estudar a degradação anaeróbia de LAS em EGSB, encontraram diferente composição das famílias dos microrganismos da região do leito de lodo em relação a verificada no leito de areia do presente estudo. A discrepância foi relacionada com a formação de biofilme na areia do RALF e biomassa granulada no EGSB. Além disso, a diferença na composição da água residuária sintética dos dois estudos foi fundamental para seleção das populações; ou seja, emprego de LAS comercial, etanol, metanol e solução de vitaminas em Delforno et al. (2012) e detergente em pó, sacarose e extrato de levedura, na última etapa de operação, desse estudo.

Exemplo interessante que deve ser mencionado refere-se a grande percentagem da família Synergistaceae obtida por Delforno et al. (2012) (30 % da biomassa do leito granulada) em comparação a este estudo; ou seja, menor que 5% (Figura 5.22). A presença dessa família em maior quantidade no EGSB deveu-se a pouca variedade de outras fontes de carbono aplicadas no substrato sintético (LAS, etanol e metanol) que pudessem promover rotas metabólicas mais diversificadas e, por conseguinte, modificar a composição das famílias identificadas. Sendo assim, a alta carga protéica no lodo oriunda de água residuária de avicultura, provavelmente favoreceu a rota metabólica de degradação de aminoácidos comum a membros da família Synergistaceae (JUMAS-BILAK; ROUDIERE; MARCHANDIN, 2009). No presente trabalho, foi usado detergente em pó cuja composição inclui vários compostos orgânicos, além da adição de extrato de levedura e sacarose na preparação do esgoto sintético. Além disso, a presença da areia no RALF favoreceu a formação de biofilme diferente daquele estabelecido nos grânulos do EGSB.

Os 32 *contigs* visualizados na Tabela 5.15 foram agrupados em 19 unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com distância evolutiva de 0,03. A relação de *contigs* representativos de cada UTO e seus UTOs correspondentes pode ser observada na Tabela 5.16. A curva de rarefação dos *contigs* foi realizado para diferentes níveis de dissimilaridade entre as seqüências (0; 0,3; 0,5; 1) (Figura 5.23).

Tabela 5.16: Relação de *contigs* representativos e UTOs correspondentes

<i>Contig</i> representativo	UTOs
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
16	13
23	14
24	15
25	16
26	17
28	18
31	19

Figura 5.23: Curva de rarefação das seqüências da biomassa da areia com matriz de distância evolutiva de 0; 0,03; 0,05 e 0,1

As UTOs apresentadas na Tabela 5.16 foram relacionadas, em função de similaridade, com as seqüências advindas do NCBI como mostra a Tabela 5.17. Além disso, foi construída árvore filogenética mostrando os agrupamentos filogenéticos entre as UTOs e as seqüências advindas do NCBI (Figura 5.24).

Tabela 5.17: Relação de UTOs e respectivas seqüências do Genbank relacionadas

UTOs	Clones	NCBI	Similaridade (%)	Espécime	Referência
1	A11, E5, A8	AY379976	88	<i>Aquaspirillum</i> sp.	Valle et al. (2004)
2	C2,D4	JF826575	84	Bactéria não cultivada	Wang (não publicado)
3	E3,D10	DQ640074	90	<i>Synergistes</i> sp.	Kumar et al. (2008)
4	C10	DQ829872	98	Bactéria não cultivada	Upchurch, Tarlera e Whitman (não publicado)
5	D3	EU214542	99	<i>Anaerophaga</i> sp.não cultivada	Chang et al. (2008)
6	D2	HQ259087	100	<i>Chryseobacterium</i> sp.	Davila-Costa et al. (não publicado)
7	B9	EU721808	93	<i>Fusibacter</i> sp.não cultivada	Pham et al. (2009)
11	G6, C9	EF632559	88	<i>Dechloromonas</i> sp.	Lynn e Childers (não publicado)
12	D7, A10, B10	FJ494707	98	<i>Acinetobacter</i> sp.	Tao e Song (não publicado)
13	G4, D8	AF479766	97	<i>Dechloromonas</i> sp.	Zhang, Bruns e Logan(2002)
14	G5, E4, E10, C1, G9	JF429292	91	Bactéria não cultivada	Liu et al.(2012)
15	D12, F2, F7, B8	JN125758	92	<i>Dechloromonas</i> sp. não cultivada	Xia et al. (não publicado)
		EF033500	92	<i>Dechloromonas</i> sp. não cultivada	Gentile et al. (2007)
16	H11, A1, H4	EF619954	86	Deltaproteobacteria não cultivada	Morris et al (não publicado)
17	D9, B4, G11, E7	AY780563	99	<i>Geobacter</i> sp. não cultivada	Duhamel e Edwards(2006)
18	H1, D5, F1	FJ525459	97	<i>Dechloromonas</i> sp. não cultivada	Li et al. (2010)
19	B3, F4, E8, F5, C6	FJ947056	94	<i>Aeromonas</i> sp.	Chen (não publicado)

Figura 5.24: Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida na areia da etapa IV. Após os colchetes, os agrupamentos foram classificados em família e classe. A terminação em “aceae” indica a família. A espécie *Gemmata obscuriglobus* foi adotada como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.

6. Conclusões

- Para todas as condições de substrato sintético obteve-se eficiente remoção de matéria orgânica. Pelo pareamento do teste de Scheffé, não foi possível determinar o nível de importância do co-substrato na remoção de matéria orgânica.
- A remoção média de LAS para todas as etapas foi superior a 33%. Em todas as etapas ocorreram processos de adsorção e degradação biológica do surfactante. O pareamento pelo teste de Scheffé não permitiu inferir o grau de importância do co-substrato na remoção de LAS.
- Por meio da análise de componentes principais (ACP), foram registradas diferentes tendências no comportamento dos dados nas diferentes etapas de operação. Na etapa II, os dados foram influenciados pelos fatores “DQO-remoção”, “Alcalinidade total” e “Redox”; na etapa III, houve influência dos fatores “DQO-remoção”, “Alcalinidade total” e “LAS-remoção”; e na etapa IV, os fatores mais importantes foram “LAS-remoção”, “Ácidos Totais” e “pH”.
- Por meio do balanço de massa do LAS, obteve-se remoção de 39,4%, sendo 8,8% devido à adsorção e 30,6% pela degradação biológica. Pormenorizando, a adsorção do LAS: 7,9% ocorreu no SST efluente, 0,58% no lodo e 0,32% na areia.
- Mudanças na diversidade microbiana ao longo da operação do reator foi constatada sendo constatados agrupamentos influenciados, tanto, pelo detergente em pó, como, pelos co-substratos.
- As seqüências obtidas da biomassa da areia na etapa IV foram relacionadas a diferentes filos: Proteobacteria, Acidobacteria, Synergistetes, Bacteroidetes e Firmicutes.

- Cerca de metade dos clones de RNAr 16S foram relacionados com a família Rhodocyclaceae com destaque para o gênero *Dechloromonas*. Os membros deste táxon estão envolvidos com a degradação anaeróbia de compostos aromáticos derivados do petróleo.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Utilização de outros tipos de co-substratos, tais como acetato, formiato ou metanol, na constituição dos substratos sintéticos associado a etapas mais longas de operação;
- Avaliação dos intermediários de degradação do LAS por meio de espectrometria de massa;
- Avaliação da possível associação da sacarose com o detergente em pó em ensaios de diálise, adsorção. Além disso, realização de ensaios em batelada com detergente, sacarose e lodo biológico para verificar aspectos da cinética de degradação dos compostos;
- Possibilidade de empregar *primers* de BRS e *Archaea* na avaliação da degradação do detergente em pó;
- Coleta de amostras não apenas da biomassa aderida à areia, mas também a contida no separador de fases para seqüenciamento.

8. Referências Bibliográficas

8.1 Endereços eletrônicos:

<http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/detergents/11A.pdf>. Acesso em: 12 de janeiro de 2012.

http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp. Acesso em: 7 de fevereiro de 2012.

<http://pyro.cme.msu.edu/spring/align.spr>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2012.

<http://pyro.cme.msu.edu/spring/cluster.spr>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2012.

<http://pyro.cme.msu.edu/spring/rarefaction.spr>. Acesso em 8 de fevereiro de 2012.

<http://pyro.cme.msu.edu/spring/derep.spr>. Acesso em 9 de fevereiro de 2012.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 12 de fevereiro de 2012.

8.2 Literatura científica:

ABBOUD, M. M.; KHLEIFAT, K. M.; BATARSEH, M.; TARAWNEH, K. A.; AL-MUSTAFA, A.; AL-MADADHAH, M. Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzosulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of acinetobacter calcoaceticus and pantoea agglomerans. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 4, p. 432-439, 2007.

ACHENBACH, L. A.; MICHAELIDOU, U.; BRUCE, R. A.; FRYMAN, J.; COATES, J. D. Dechloromonas agitata gen. Nov., sp. Nov. And dechlorosoma suillum gen. Nov., sp. Nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 2, March 1, 2001, p. 527-33, 2001.

AHRING, B.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 43, n. 3, p. 559-565, 1995.

ALMENDARIZ, F. J.; MERÁZ, M.; SOBERÓN, G.; MONROY, O. 44: 183-188 p. 2001.

ALRAWI, R. A.; AHMAD, A.; ISMAIL, N.; KADIR, M. O. A. Anaerobic co-digestion of palm oil mill effluent with rumen fluid as a co-substrate. *Desalination*, v. 269, n. 1-3, Mar 15, p. 50-57, 2011.

ÁLVAREZ-MUÑOZ, D.; LARA-MARTÍN, P. A.; BLASCO, J.; GÓMEZ-PARRA, A.; GONZÁLEZ-MAZO, E. Presence, biotransformation and effects of sulfophenylcarboxylic acids in the benthic fish solea senegalensis. *Environment International*, v. 33, n. 4, p. 565-570, 2007.

APHA; AWWA; WPCF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005.

BAILEY, R. A.; CLARK, H. M.; FERRIS, J. P.; KRAUSE, S.; STRONG, R. L. 7 - soaps, synthetic surfactants, and polymers. In: (Ed.). *Chemistry of the environment (second edition)*. San Diego: Academic Press, 2002. p.193-221

BARKER, D. J.; STUCKEY, D. C. A review of soluble microbial products (smp) in wastewater treatment systems. *Water Research*, v. 33, n. 14, p. 3063-3082, 1999.

BERNA, J. L.; CASSANT, G.; HAGER, C. D.; REHMAN, N.; LÓPEZ, I.; SCHOWANEK, D.; STEBER, J.; TAEGER, K.; WIND, T. Anaerobic biodegradation of surfactants - scientific review. *Tenside, Surfactants, Detergents*, v. 44, n. 6, p. 312-347, 2007.

BERNARDET, J.-F.; SEGERS, P.; VANCANNEYT, M.; BERTHE, F.; KERSTERS, K.; VANDAMME, P. Cutting a gordian knot: Emended classification and description of the genus *flavobacterium*, emended description of the family *flavobacteriaceae*, and proposal of *flavobacterium hydatis* nom. Nov. (basonym, *cytophaga aquatilis* strohl and tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 46, n. 1, January 1, 1996, p. 128-148, 1996.

BIRCH, R. R.; BIVER, C.; CAMPAGNA, R.; GLEDHILL, W. E.; PAGGA, U.; STEBER, J.; REUST, H.; BONTINCK, W. J. Screening of chemicals for anaerobic biodegradability. *Chemosphere*, v. 19, n. 10-11, p. 1527-1550, 1989.

BOHLMANN, U.; BOHNER, M. Improvement of process stability of microbiological quinoline degradation in a three-phase fluidized bed reactor. *Chemical Engineering & Technology*, v. 24, n. 8, Aug, p. 91a-96a, 2001.

BOUALLAGUI, H.; LAHDHEB, H.; BEN ROMDAN, E.; RACHDI, B.; HAMDI, M. Improvement of fruit and vegetable waste anaerobic digestion performance and stability with co-substrates addition. *Journal of Environmental Management*, v. 90, n. 5, p. 1844-1849, 2009.

BRANDT, B. W.; VAN LEEUWEN, I. M. M.; KOOIJMAN, S. A. L. M. A general model for multiple substrate biodegradation. Application to co-metabolism of structurally non-analogous compounds. *Water Research*, v. 37, n. 20, Dec, p. 4843-4854, 2003.

BRANDT, K. K.; HESSELSON, M.; ROSLEV, P.; HENRIKSEN, K.; SORENSEN, J. Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on metabolic activity, growth rate, and microcolony formation of *nitrosomonas* and *nitrospira* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 6, June 1, 2001, p. 2489-2498, 2001.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; SMITH, N. R. Family VI. *Bacteroidaceae* fam. nov. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The proteobacteria)*, seventh edition. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1957, 1094 p.

BREZNAK, J. A. The genus *sporomusa*: The prokaryotes In: DWORKIN, M.; FALKOW, S. et al (Ed.): Springer US, 2006. p.991-1001

- BUYUKKAMACI, N.; FILIBELI, A. Volatile fatty acid formation in an anaerobic hybrid reactor. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 11, p. 1491-1494, 2004.
- CAROSIA, M. F. *Caracterização microbiana e degradação de detergente de uso doméstico em reator anaeróbio de leite fluidificado*. 2011. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *Fems Microbiology Ecology*, v. 31, n. 1, Jan, p. 1-9, 2000.
- CHAKRABORTY, R.; O'CONNOR, S. M.; CHAN, E.; COATES, J. D. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by dechloromonas strain rcb. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, December 2005, p. 8649-8655, 2005.
- CHAN, Y. J.; CHONG, M. F.; LAW, C. L.; HASSELL, D. G. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal*, v. 155, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- CHANG, H.-W.; SUNG, Y.; KIM, K.-H.; NAM, Y.-D.; ROH, S. W.; JEON, C. O.; BAE, J.-W. Development of microbial genome-probing microarrays using digital multiple displacement amplification of uncultivated microbial single cells. *Environ Sci Technol*, v. 42, n. 22, p. 8614-8614, 2008.
- CHARACKLIS, W.G. Biofilm processes. In: Characklis, W.G., Marshall, K.C. (Eds.). *Biofilms*. New York: Wiley, 1990.
- CHASSARD, CHRISTOPHE; DELMAS, EVE; ROBERT, CÉLINE; LAWSON, P. A.; BERNALIER-DONADILLE, A. *Ruminococcus champanellensis* sp. Nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, n. 1, January 1, 2012, p. 138-143, 2012.
- CHEN, Y. Phylogenetic Analysis of Denitrogenated Bacteria in Sewage. *Trabalho não publicado*.
- CHEN, S.; DONG, X. *Acetanaerobacterium elongatum* gen. Nov., sp. Nov., from paper mill waste water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, November 1, 2004, p. 2257-2262, 2004.
- CHINWEKITVANICH, S.; TUNTOOLVEST, M.; PANSWAD, T. Anaerobic decolorization of reactive dyebath effluents by a two-stage uasb system with tapioca as a co-substrate. *Water Research*, v. 34, n. 8, Jun, p. 2223-2232, 2000.
- CHUN, J. *Computer assisted classification and identification of actinomycetes*. 1995. Ph.D. Thesis, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK, 1995.
- COATES, J. D.; ELLIS, D. J.; GAW, C. V.; LOVLEY, D. R. *Geothrix fermentans* gen. Nov., sp nov., a novel fe(iii)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 1615-1622, 1999.

- COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; DELEY, J. Proposal to recognize the family aeromonadaceae fam-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 36, n. 3, Jul, p. 473-477, 1986.
- COOPER, P. F.; SUTTON, P. M. Treatment of wastewaters using biological fluidized-beds. *Chemical Engineer-London*, n. 392, p. 65-65, 1983.
- COSTA, M. J. C.; SOUSA, J. T. D.; LEITE, V. D.; LOPES, W. D. S.; SANTOS, K. D. Co-digestão anaeróbia de substâncias surfactantes, óleo e lodo de esgoto. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 12, p. 433-439, 2007.
- DA CRUZ, G.; DE VASCONCELLOS, S.; ANGOLINI, C.; DELLAGNEZZE, B.; GARCIA, I.; DE OLIVEIRA, V.; DOS SANTOS NETO, E.; MARSAIOLI, A. Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs? *AMB Express*, v. 1, n. 1, p. 47, 2011.
- DAVILA-COSTA, M. J.; MASINO, L. M.; PEROTTI, N. I.; ABATE, C. M.; MARTINEZ, M. A. Chryseobacterium sp. AR160 isolated from industrial samples. *Trabalho não publicado*.
- DELFORNO, T. P.; OKADA, D. Y.; POLIZEL, J.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. *Bioresource Technology*, v. 107, n. 0, p. 103-109, 2012.
- DENGER, K.; WARTHMAN, R.; LUDWIG, W.; SCHINK, B. Anaerophaga thermohalophila gen. Nov., sp. Nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 1, January 1, 2002, p. 173-8, 2002.
- DI GIULIO, R. T.; WASHBURN, P. C.; WENNING, R. J.; WINSTON, G. W.; JEWELL, C. S. Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 8, n. 12, p. 1103-1123, 1989.
- DILLALO, R., ALBERTSON, O.E. Volatile acids by direct titration. *Journal WPCF*, v. 33, p. 356-365, 1961.
- DUARTE, I. C. S. *Caracterização microbiológica da remoção e degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reatores anaeróbios com biofilme e células planctônicas*. 2006. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.
- DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; BUZZINI, A. P.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Development of a method by hplc to determine las and its application in anaerobic reactors. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 1360-1367, 2006.
- DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; MAYOR, M. S.; OKADA, D. Y.; VARESCHE, M. B. A. Degradation of detergent (linear alkylbenzene sulfonate) in an anaerobic stirred sequencing-batch reactor containing granular biomass. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 64, n. 2, p. 129-134, 2010.

- DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; SAAVEDRA, N. K.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; MENEZES, C. B. A.; OLIVEIRA, V. M.; VARESCHE, M. B. A. Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in a horizontal anaerobic immobilized biomass reactor. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 2, p. 606-612, 2010.
- DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; SAAVEDRA, N. K. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of the microbial diversity in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor treating linear alkylbenzene sulfonate. *Biodegradation*, v. 19, n. 3, p. 375-385, 2008.
- DUHAMEL, M.; EDWARDS, E. A. Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by dehalococcoides. *Fems Microbiology Ecology*, v. 58, n. 3, p. 538-549, 2006.
- DURANTE-RODRIGUEZ, G.; ZAMARRO, M. T.; GARCIA, J. L.; DIAZ, E.; CARMONA, M. Oxygen-dependent regulation of the central pathway for the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp strain cib. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 7, Apr, p. 2343-2354, 2006.
- EICHHORN, P.; FLAVIER, M. E.; PAJE, M. L.; KNEPPER, T. P. Occurrence and fate of linear and branched alkylbenzenesulfonates and their metabolites in surface waters in the philippines. *Science of the Total Environment*, v. 269, n. 1-3, p. 75-85, 2001.
- EICHHORN, P.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W.; KNEPPER, T. P. Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. *Science of the Total Environment*, v. 284, n. 1-3, p. 123-134, 2002.
- FANTON, E.; FAYET, C.; GELAS, J. Long-chain acetals derived from sucrose as a new class of surfactants. *Carbohydrate Research*, v. 298, n. 1-2, p. 85-92, 1997.
- GANESAN, A.; CHAUSSONNERIE, S.; TARRADE, A.; DAUGA, C.; BOUCHEZ, T.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; SGHIR, A. *Cloacibacillus evryensis* gen. Nov., sp nov., a novel asaccharolytic, mesophilic, amino-acid-degrading bacterium within the phylum 'synergistetes', isolated from an anaerobic sludge digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 2003-2012, 2008.
- GARCÍA ENCINA, P. A.; HIDALGO, M. D. Influence of substrate feed patterns on biofilm development in anaerobic fluidized bed reactors (afbr). *Process Biochemistry*, v. 40, n. 7, p. 2509-2516, 2005.
- GARCÍA, M. T.; CAMPOS, E.; RIBOSA, I.; LATORRE, A.; SÁNCHEZ-LEAL, J. Anaerobic digestion of linear alkyl benzene sulfonates: Biodegradation kinetics and metabolite analysis. *Chemosphere*, v. 60, n. 11, p. 1636-1643, 2005.
- GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; SÁNCHEZ-LEAL, J.; RIBOSA, I. Effect of linear alkylbenzene sulphonates (las) on the anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, v. 40, n. 15, p. 2958-2964, 2006.

GAVALA, H. N.; AHRING, B. K. Inhibition of the anaerobic digestion process by linear alkylbenzene sulfonates. *Biodegradation*, v. 13, n. 3, p. 201-209, 2002.

GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; BOZINIS, N. A.; LYBERATOS, G. Anaerobic codigestion of agricultural industries' wastewaters. *Water Science and Technology*, v. 34, n. 11, p. 67-75, 1996.

GENTILE, M. E.; JESSUP, C. M.; NYMAN, J. L.; CRIDDLE, C. S. Correlation of functional instability and community dynamics in denitrifying dispersed-growth reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 3, February 1, 2007, p. 680-690, 2007.

GEORGIU, D.; METALLINOU, C.; AIVASIDIS, A.; VOUDRIAS, E.; GIMOHOPOULOS, K. Decolorization of azo-reactive dyes and cotton-textile wastewater using anaerobic digestion and acetate-consuming bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, v. 19, n. 1, Jul 1, p. 75-79, 2004.

GILBRIDE, K. A.; LEE, D. Y.; BEAUDETTE, L. A. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, n. 1, Jul, p. 1-20, 2006.

GODON, J.-J.; MORINIÈRE, J.; MOLETTA, M.; GAILLAC, M.; BRU, V.; DELGÈNES, J.-P. Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: The 'synergistes' example. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 2, p. 213-224, 2005.

GONZÁLEZ-MAZO, E.; FORJA PAJARES, J. M.; GÓMEZ-PARRA, A. Identifying the processes involved in the hydrochemistry and environmental quality of a littoral system (bay of cadiz, spain): A case study using factor analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 17, n. 2, p. 58-69, 1998.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G. Rapid Method for coextration of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied an Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

GUANG-GUO, Y. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, v. 32, n. 3, p. 417-431, 2006.

HAAKENSEN, M.; DOBSON, C. M.; DENEER, H.; ZIOLA, B. Real-time pcr detection of bacteria belonging to the firmicutes phylum. *International Journal of Food Microbiology*, v. 125, n. 3, p. 236-241, 2008.

HAIGH, S. D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Science of the Total Environment*, v. 185, n. 1-3, p. 161-170, 1996.

HAUTHAL, H. G. Dynamic surfactants and nanostructured surfaces for an innovative industry. *SOFW J*, English version, v. 130, p. 3-17, 2004.

HEIJNEN, J. J. *Biological industrial wastewater treatment minimizing biomass production and maximizing biomass concentration*. 1984. Ph.D. Thesis, Delft University of Technology, Delft, 1984.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON T.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

HOLMES, D. E.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Comparison of 16s rrna, nifd, reca, gyrb, rpob and fusa genes within the family geobacteraceae fam. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p. 1591-1599, 2004.

ICILIO, A. Production of linear alkylbenzene sulfonate and _-olefin sulfonates. In: (Ed.). *Handbook of detergents, part f*: CRC Press, 2008. p.83-115. (Surfactant science)

IVANKOVIĆ, T.; HRENOVIĆ, J. Surfactants in the environment. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, v. 61, n. 1, p. 95-110, 2010.

JENSEN, J. Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (las) in the terrestrial environment. *Science of the Total Environment*, v. 226, n. 2-3, p. 93-111, 1999.

JUMAS-BILAK, E.; CARLIER, J.-P.; JEAN-PIERRE, H.; CITRON, D.; BERNARD, K.; DAMAY, A.; GAY, B.; TEYSSIER, C.; CAMPOS, J.; MARCHANDIN, H. *Jonquetella anthropi* gen. Nov., sp. Nov., the first member of the candidate phylum 'synergistetes' isolated from man. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 12, December 1, 2007, p. 2743-2748, 2007.

JUMAS-BILAK, E.; ROUDIERE, L.; MARCHANDIN, H. Description of 'synergistetes' phyl. Nov and emended description of the phylum 'deferribacteres' and of the family syntrophomonadaceae, phylum 'firmicutes'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 1028-1035, 2009.

KAPARAJU, P.; RINTALA, J. Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 43, n. 2, p. 175-188, 2005.

KERSTERS, K.; VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the proteobacteria: The prokaryotes. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S. et al (Ed.): Springer New York, 2006. p.3-37

KHLEIFAT, K. M. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two-member facultative anaerobic bacterial consortium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 5, p. 1030-1035, 2006.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, p. 111-120, 1980.

KNAEBEL, D. B.; VESTAL, J. R.; FEDERLE, T. W. Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate (las) and linear alcohol ethoxylate (lae) in 11 contrasting soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 9, n. 8, p. 981-988, 1990.

KNIEMEYER, O.; FISCHER, T.; WILKES, H.; GLÖCKNER, F. O.; WIDDEL, F. Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 2, February 1, 2003, p. 760-768, 2003.

KUMAR, A. G.; NAGESH, N.; PRABHAKAR, T. G.; SEKARAN, G. Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by synergistes sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 7, p. 2364-2372, 2008.

LABUTTI, K.; MAYILRAJ, S.; CLUM, A.; LUCAS, S.; GLAVINA DEL RIO, T.; NOLAN, M.; TICE, H.; CHENG, J. F.; PITLUCK, S.; LIOLIOS, K.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; PATI, A.; GOODWIN, L.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y. J.; JEFFRIES, C. D.; ROHDE, M.; SPRING, S.; GOKER, M.; WOYKE, T.; BRISTOW, J.; EISEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P.; LAPIDUS, A. Permanent draft genome sequence of dethiosulfovibrio peptidovorans type strain (sebr 4207). *Stand Genomic Sci*, v. 3, n. 1, p. 85-92, 2010.

LARA-MARTIN, P. A.; GOMEZ-PARRA, A.; SANZ, J. L.; GONZALEZ-MAZO, E. Anaerobic degradation pathway of linear alkylbenzene sulfonates (las) in sulfate-reducing marine sediments. *Environmental Science & Technology*, v. 44, n. 5, p. 1670-1676, 2010.

LANE, D. J. 16s/23s RNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. UK: Academic, Chichester, 1991, p. 115–175.

LAZARO, C. Z.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A.; ADORNO, M. A. T. Development of an HPLC method for the analysis of eleven short chain organic acids in bioproduction of hydrogen. In: *XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO)*. Florianópolis, SC, 2008.

LETTINGA, G.; VAN VELSEN, A. F. M.; HOMBA, S. W.; DE ZEEUW, W.; KLAPWIJK, A. Use of the upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 22, p. 699–734, 1980.

LI, X.; UPADHYAYA, G.; YUEN, W.; BROWN, J.; MORGENROTH, E.; RASKIN, L. Changes in the structure and function of microbial communities in drinking water treatment bioreactors upon addition of phosphorus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 22, November 15, 2010, p. 7473-7481, 2010.

LIESACK, W.; BAK, F.; KREFT, J.-U.; STACKEBRANDT, E. *Holophaga foetida*; gen. Nov., sp. Nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Archives of Microbiology*, v. 162, n. 1, p. 85-90, 1994.

LIN, C.-Y.; SATO, K.; NOIKE, T.; MATSUMOTO, J. Methanogenic digestion using mixed substrate of acetic, propionic and butyric acids. *Water Research*, v. 20, n. 3, p. 385-394, 1986.

LIU, Z.; HUANG, S.; SUN, G.; XU, Z.; XU, M. Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the dongjiang river, china. *Fems Microbiology Ecology*, v. 80, n. 1, p. 30-44, 2012.

LØBNER, T.; TORÄNG, L.; BATSTONE, D. J.; SCHMIDT, J. E.; ANGELIDAKI, I. Effects of process stability on anaerobic biodegradation of las in uasb reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, n. 7, p. 759-765, 2005.

LOVLEY, D. R.; COATES, J. D. Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 252-256, 2000.

MADIGAN, M.; COX, S. S.; STEGEMAN, R. A. Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family rhodospirillaceae. *Journal of Bacteriology*, v. 157, n. 1, January 1, 1984, p. 73-78, 1984.

MALINA, J. F.; POHLAND, F. G. *Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes*. Lancaster: Technomic Publishing, v. 7, 1992. 214 p.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, v. 24, p. 87-93, 2001.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; ESTEVE, C.; GARAY, E.; COLLINS, M. D. *Aeromonas allosaccharophila* sp. Nov., a new mesophilic member of the genus aeromonas. *Fems Microbiology Letters*, v. 91, n. 3, p. 199-206, 1992.

MCSWEENEY, C. S.; ALLISON, M. J.; MACKIE, R. I. Amino acid utilization by the ruminal bacterium synergistes jonesii strain 78-1. *Archives of Microbiology*, v. 159, n. 2, p. 131-135, 1993.

MENDONÇA, N. M. *Tratamento de esgoto sanitário empregando reator de leito expandido em escala plena com zonas anaeróbia e aeróbia sobrepostas: Conceção, construção e operação*. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, São Carlos, 2004.

MERRETTIG-BRUNS, U.; JELEN, E. Anaerobic biodegradation of detergent surfactants. *Materials*, v. 2, n. 1, p. 181-206, 2009.

METCALF; EDDY. Design of Facilities for the Treatment and disposal of Sludge. In:_____. *Wastewater Engeneering-Treatement, Disposal And Reuse*. U.S.A: McGraw-Hill International Editions, 3rd ed., 1991, p.765-926.

MOGENSEN, A. S.; HAAGENSEN, F.; AHRING, B. K. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, n. 4, p. 706-711, 2003.

MONTUSIEWICZ, A.; LEBIOCKA, M. Co-digestion of intermediate landfill leachate and sewage sludge as a method of leachate utilization. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, Feb, p. 2563-2571, 2011.

MORRIS, J. M.; JIN, S.; CRIMI, B.; PRUDEN, A. Enhanced anaerobic biodegradation of diesel in a microbial fuel cell. *Trabalho não publicado*.

- MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Degradation of anionic surfactants during drying of uasbr sludges on sand drying beds. *Journal of Environmental Management*, v. 88, n. 4, p. 995-1002, 2008.
- NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Query-dependent banding (qdb) for faster rna similarity searches. *PLoS Comput Biol*, v. 3, n. 3, p. e56, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 3rd edition, 2000, pp. 1255.
- NICOLELLA, C.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*, v. 80, n. 1, Jun 9, p. 1-33, 2000.
- OGUNMOYELA, O. A.; BIRCH, G. G. Intrinsic significance of molecular aggregation in sucrose-surfactant separation by dialysis. *Food Chemistry*, v. 12, n. 4, p. 229-240, 1983.
- OKADA, D. Y.; ESTEVES, A. S.; HIRASAWA, J. S.; ADORNO, M. A. T.; DUARTE, I. C. S.; VARESCHE, M. B. A. Degradação de alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente. In: VI CONGRESSO DE MEIO AMBIENTE DA AUGM, 2009, São Carlos, SP. *Proceedings...* São Carlos: UFSCar, 2009.
- OLIVEIRA, L. L. *Influência do Material Suporte na Degradação de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) em Reator Anaeróbio*. 2006. Dissertação de Mestrado, EESC, USP, São Carlos, 2006.
- _____. *Remoção de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado*. 2010. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- OLIVEIRA, L. L.; COSTA, R. B.; OKADA, D. Y.; VICH, D. V.; DUARTE, I. C. S.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (las) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 14, p. 5112-5122, 2010.
- OLIVEIRA, L. L.; DUARTE, I. C. S.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. *Journal of Environmental Management*, v. 90, n. 2, p. 1261-1268, 2009.
- OSORIO, V. K. L.; OLIVEIRA, W. D. Polifosfatos em detergentes em pó comerciais. *Química Nova*, v. 24, p. 700-708, 2001.
- OU, Z.; JIA, L.; JIN, H.; YEDILER, A.; SUN, T.; KETTRUP, A. Ultrasonic extraction and lc determination of linear alkylbenzene sulfonate in plant tissues. *Chromatographia*, v. 44, n. 7, p. 417-420, 1997.
- PARALES, R. E. Hydrocarbon degradation by betaproteobacteria handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. In: TIMMIS, K. N. (Ed.): Springer Berlin Heidelberg, 2010. p.1715-1724

PENTEADO, J. C. P.; EL SEOUD, O. A.; CARVALHO, L. R. F. Alquilbenzeno sulfonato linear: Uma abordagem ambiental e analítica. *Química Nova*, v. 29, p. 1038-1046, 2006.

PEREZ, M.; RODRIGUEZ-CANO, R.; ROMERO, L. I.; SALES, D. Anaerobic thermophilic digestion of cutting oil wastewater: Effect of co-substrate. *Biochemical Engineering Journal*, v. 29, n. 3, p. 250-257, 2006.

PEREZ, M.; ROMERO, L. I.; SALES, D. Comparative performance of high rate anaerobic thermophilic technologies treating industrial wastewater. *Water Research*, v. 32, n. 3, Mar, p. 559-564, 1998.

PHAM, V. D.; HNATOW, L. L.; ZHANG, S.; FALLON, R. D.; JACKSON, S. C.; TOMB, J.-F.; DELONG, E. F.; KEELER, S. J. Characterizing microbial diversity in production water from an alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 176-187, 2009.

PITLUCK, S.; YASAWONG, M.; HELD, B.; LAPIDUS, A. L.; NOLAN, M.; COPELAND, A.; LUCAS, S.; GLAVINA DEL RIO, T.; TICE, H.; CHENG, J.-F.; CHERTKOV, O.; GOODWIN, L. A.; TAPIA, R.; HAN, C.; LIOLIOS, K.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; OVCHINNIKOVA, G.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M. L.; HAUSER, L. J.; CHANG, Y.-J.; JEFFRIES, C.; PUKALL, R.; SPRING, S.; ROHDE, M.; SIKORSKI, J.; GOKER, M.; WOYKE, T.; BRISTOW, J.; EISEN, J.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H.-P. Non-contiguous finished genome sequence of aminomonas paucivorans type strain (glu-3t). *Journal Name: Standards in Genomic Sciences; Journal Volume: 3; Journal Issue: 3*, p. Medium: X; Size: 285-293, 2010.

PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Anaerobic co-digestion of the organic fraction of municipal solid waste with several pure organic co-substrates. *Biosystems Engineering*, v. 108, n. 4, p. 352-360, 2011.

POVIA, G. S. *Determinação dos parâmetros de qualidade de detergentes em pó utilizando espectroscopia no infravermelho próximo*. 2007. 70 f. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2007.

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S. C.; TREUSCH, A. H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: Evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 563-575, 2003.

RABUS, R.; HEIDER, J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, v. 170, n. 5, p. 377-384, 1998.

RAVOT, G.; MAGOT, M.; FARDEAU, M.-L.; PATEL, B. K. C.; THOMAS, P.; GARCIA, J.-L.; OLLIVIER, B. Fusibacter paucivorans gen. Nov., sp. Nov., an anaerobic, thiosulfate-reducing bacterium from an oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, n. 3, July 1, 1999, p. 1141-1147, 1999.

- RIANO, B.; MOLINUEVO, B.; GARCIA-GONZALEZ, M. C. Potential for methane production from anaerobic co-digestion of swine manure with winery wastewater. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 5, Mar, p. 4131-4136, 2011.
- RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. *Química Nova*, v. 30, p. 1374-1380, 2007.
- RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic-digestion of high-strength wastes. *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 58, n. 5, May, p. 406-411, 1986.
- RIVIERE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBAACH, J.; LI, T.; CAMACHO, P.; SGHIR, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *Isme Journal*, v. 3, n. 6, Jun, p. 700-714, 2009.
- ROSSAU, R.; VANLANDSCHOOT, A.; GILLIS, M.; DELEY, J. Taxonomy of moraxellaceae fam.-nov, a new bacterial family to accommodate the genera moraxella, acinetobacter, and psychrobacter and related organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 41, n. 2, Apr, p. 310-319, 1991.
- SABLAYROLLES, C.; MONTR; #233; JAUD-VIGNOLES, M.; SILVESTRE, J.; #244; ME; TREILHOU, M. Trace determination of linear alkylbenzene sulfonates: Application in artificially polluted soil - carrots system. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2009, 2009.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p. 406-425, 1987.
- SAKAMOTO, I K. *Comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica do fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)*. 2001. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, São Carlos, 2001.
- SALINERO, K. K.; KELLER, K.; FEIL, W. S.; FEIL, H.; TRONG, S.; DI BARTOLO, G.; LAPIDUS, A. Metabolic analysis of the soil microbe dechloromonas aromatica str. Rcb: Indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation. *Bmc Genomics*, v. 10, Aug 3, 2009.
- SANZ, J. L.; CULUBRET, E.; DE FERRER, J.; MORENO, A.; BERNA, J. L. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (las) in upflow anaerobic sludge blanket (uasb) reactors. *Biodegradation*, v. 14, n. 1, p. 57-64, 2003.
- SANZ, J. L.; KOCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 2, Feb, p. 119-133, 2007.
- SAUNDERS, V. A. Genetics of rhodospirillaceae. *Microbiological Reviews*, v. 42, n. 2, p. 357-384, 1978.

- SCHOWANEK, D.; DAVID, H.; FRANCAVIGLIA, R.; HALL, J.; KIRCHMANN, H.; KROGH, P. H.; SCHRAEPEN, N.; SMITH, S.; WILDEMAN, T. Probabilistic risk assessment for linear alkylbenzene sulfonate (las) in sewage sludge used on agricultural soil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 49, n. 3, p. 245-259, 2007.
- SEN, S.; DEMIRER, G. N. Anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor. *Water Research*, v. 37, n. 8, Apr, p. 1868-1878, 2003.
- SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UE, M.; HIRAISHI, A.; KATO, N. Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 4, Apr, p. 1286-1291, 2000.
- SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UENISHI, H.; UCHIHASHI, Y.; HIRAISHI, A.; YUKAWA, H.; YURIMOTO, H.; KATO, N. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, thauera sp strain dnt-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 3, Mar, p. 1385-1392, 2004.
- SINGH, R. P.; GUPTA, N.; SINGH, S.; SINGH, A.; SUMAN, R.; ANNIE, K. Toxicity of ionic and nonionic surfactants to six macrobes found in agra, india. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 69, n. 2, p. 265-270, 2002.
- SOSNOWSKI, P.; WIECZOREK, A.; LEDAKOWICZ, S. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. *Advances in Environmental Research*, v. 7, n. 3, p. 609-616, 2003.
- STRENGTH, W. J.; ISANI, B.; LINN, D. M.; WILLIAMS, F. D.; VANDERMOLLEN, G. E.; LAUGHON, B. E.; KRIEG, N. R. Isolation and characterization of aquaspirillum fasciculus sp. Nov., a rod-shaped, nitrogen-fixing bacterium having unusual flagella. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 26, n. 2, April 1, 1976, p. 253-268, 1976.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. v.24, p. 1596-1599, 2007.
- TAO, J.; SONG, C. Direct Submission. *Trabalho não publicado*.
- TORRES, P. *Desempenho de um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação*. 1992. Dissertação de Mestrado, EESC, USP, São Carlos, 1992.
- TREHY, M. L.; GLEDHILL, W. E.; MIEURE, J. P.; ADAMOVE, J. E.; NIELSEN, A. M.; PERKINS, H. O.; ECKHOFF, W. S. Environmental monitoring for linear alkylbenzene sulfonates, dialkyltetralin sulfonates and their biodegradation intermediates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 233-240, 1996.
- TUNTOOLAVEST, M.; BURGOS, W. D. Anaerobic phenol oxidation by geobacter metallireducens using various electron acceptors. *Environmental Engineering Science*, v. 22, n. 4, Jul-Aug, p. 421-426, 2005.

UPCHURCH, R. A.; TARLERA, S.; WHITMAN, W. B. Comparison of Bacterial Communities and Diversity of Soil from Three Sites at an Experimental Rice Station. *Trabalho não publicado*.

UPHUES, G. Chemistry of amphoteric surfactants. *Lipid / Fett*, v. 100, n. 11, p. 490-497, 1998.

VALLE, A.; BAILEY, M. J.; WHITELEY, A. S.; MANEFIELD, M. N-acyl-l-homoserine lactones (ahls) affect microbial community composition and function in activated sludge. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 424-433, 2004.

VAN LIER, J. B.; TILCHE, A.; AHRING, B. K.; MACARIE, H.; MOLETTA, R.; DOHANYOS, M.; POL, L. W. H.; LENS, P.; VERSTRAETE, W. New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, v. 43, n. 1, p. 1-18, 2001.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. The division "synergistes". *Anaerobe*, v. 13, n. 3-4, p. 99-106, 2007.

VAZOLLER, R. F. *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. 1995. Tese de doutorado. EESC, USP, São Carlos, 1995.

VERGE, C.; MORENO, A.; BRAVO, J.; BERNÁ, J. L. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (las). *Chemosphere*, v. 44, n. 8, p. 1749-1757, 2001.

VINGADASSALOM, D.; KOLB, A.; MAYER, C.; RYBKINE, T.; COLLATZ, E.; PODGLAJEN, I. An unusual primary sigma factor in the bacteroidetes phylum. *Molecular Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 888-902, 2005.

VOORDOUW, G. The genus *Desulfovibrio* - the centennial. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 8, Aug, p. 2813-2819, 1995.

WANG, T. Mud of the wall of fermentation pit 1. *Trabalho não publicado*.

WATERS, J.; HOLT, M. S.; MATTHIJS, E. Fate of LAS in sludge-amended soils. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 26, p. 129-135, 1989.

WILKES, H.; RABUS, R.; FISCHER, T.; ARMSTROFF, A.; BEHRENDTS, A.; WIDDEL, F. Anaerobic degradation of n-hexane in a denitrifying bacterium: Further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl)succinate via c-skeleton rearrangement. *Archives of Microbiology*, v. 177, n. 3, p. 235-243, 2002.

YEN, H. W.; BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 1, Jan, p. 130-134, 2007.

YU, Y.; ZHAO, J.; BAYLY, A. E. Development of surfactants and builders in detergent formulations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 16, n. 4, p. 517-527, 2008.

XIA, S.; LI, H.; YANG, X.; XU, X.; LIANG, J.; JIA, R.; XIE, K. Microbial biofilm-community structure dynamics during bioreduction of nitrate, sulfate and parachloronitrobenzene in a hydrogen-based membrane biofilm reactor. *Trabalho não publicado*.

ZAIAT, M.; RODRIGUES, J. A. D.; FORESTI, E. External and internal mass transfer effects in an anaerobic fixed-bed reactor for wastewater treatment. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 9, May 9, p. 943-949, 2000.

ZHANG, H.; BRUNS, M. A.; LOGAN, B. E. Perchlorate reduction by a novel chemolithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Environmental Microbiology*, v. 4, n. 10, p. 570-576, 2002.

ZOETEMEYER, R. J.; BORGERDING, P. H.; VAN DEN HEUVEL, J. C.; COHEN, A.; BOELHOUWER, C. Pilot scale anaerobic acidification of waste water containing sucrose and lactate. *Biomass*, v. 2, n. 3, p. 201-211, 1982.