UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

THAÍS ZANINETTI MACEDO

Avaliação da influência da fonte suplementar de carbono na remoção de alquilbenzeno linear sulfonado de água de lavanderia e comunidade microbiana relacionada em reator anaeróbio de leito fluidificado

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2015

THAÍS ZANINETTI MACEDO

Avaliação da influência da fonte suplementar de carbono na remoção de alquilbenzeno linear sulfonado de água de lavanderia e comunidade microbiana relacionada em reator anaeróbio de leito fluidificado

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

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

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2015

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

M141a Macedo, Thaís Zaninetti
Avaliação da influência da fonte suplementar de
carbono na remoção de alquilbenzeno linear sulfonado de
água de lavanderia e comunidade microbiana relacionada
em reator anaeróbio de leito fluidificado / Thaís
Zaninetti Macedo; orientadora Maria Bernadete Amâncio
Varesche. São Carlos, 2015.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2015.

1. Etanol. 2. Sacarose. 3. Ion Torrent. 4.
Curvibacter. 5. Surfactante Aniônico. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **THAÍS ZANINETTI MACEDO**.

Título da dissertação: "Avaliação da influência da fonte suplementar de carbono na remoção de alquibenzeno linear sulfonado de água de lavanderia e comunidade microbiana relacionada em reator anaeróbio de leito fluidificado".

Data da defesa: 12/03/2015

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovada

Profa. Dra. **Lorena Oliveira Pires**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)

Aprovada

Dra. **Valéria Del Nery**
(Pós-Doutoranda/CNPq)

Aprovada

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

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

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Dedico este trabalho aos meus pais,
Natalino e Rosana, com amor e gratidão.

O homem parece muitas vezes não se dar conta de outros significados do seu ambiente natural, para além daqueles somente que servem para os fins de um uso ou consumo imediatos. [...]

Quando, ao contrário, era vontade do Criador que o homem se comunicasse com a natureza como “senhor” e “guarda” inteligente e nobre, e não como um “desfrutador” e “destrutor” sem respeito algum (REDEMPTOR HOMINIS, §15).

AGRADECIMENTOS

A Deus, princípio e fim de todas as coisas. À Nossa Senhora, pela intercessão. Aos anjos pelo auxílio.

À professora Dra. Maria Bernadete Varesche, pela orientação e por me abrir tantos caminhos.

Ao professor Tininho, pela co-orientação, pela disponibilidade e sugestões.

A todos os professores com os quais tive contato desde a graduação em Engenharia Ambiental e que, direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, especialmente: Prof. Eugênio Foresti, Prof. Cleto Pires, Prof. Wiclef, Prof. Márcia e Prof. Marcelo Zaiat.

Aos colegas Dagoberto, Tiago, Juliana, Fabrício, Filipe e Mariana, por todo o aprendizado e oportunidades.

Às técnicas Carol, Isabel, Janja e Elô por todo auxílio. As secretarias Priscila, Sá e Silvana por serem tão gentis e atenciosas.

A todos do LPB, sempre dispostos a acolher e ajudar: Laís, Marcus, Inaê, Clara, Paulo, Eduardo, Guilherme, Mara, Rachel, Rodrigo, Samuel, Leandro, Tiago Martins, Lucas, Lívia, Valéria, Vanessa, Vivian, Carol, Vinícius, Priscila, Regiane, Bruna, Inês.

Ao meu noivo, Luis Enrique, pela paciência, amizade e bons conselhos e também à sua família.

Aos meus pais, Natalino e Rosana, que sonharam com um futuro para mim e viabilizaram as minhas escolhas.

À minha irmã, Natália, pela amizade, pelas correções e pela torcida.

À minha prima, Lu, pelo seu exemplo e por ser tão solícita em me ajudar.

Aos meus amigos do grupo de jovens Hesed.

A toda a minha família, especialmente meus avós, tios e primos, por torcer tanto por mim. Gratidão!

RESUMO

MACEDO, T.Z. **Avaliação da influência da fonte suplementar de carbono na remoção de alquilbenzeno linear sulfonado de água de lavanderia e comunidade microbiana relacionada em reator anaeróbio de leito fluidificado**, 2015. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Neste trabalho foi avaliada a degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) de água residuária de lavanderia comercial (ARLC) em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) utilizando areia como material suporte, lodo oriundo de UASB empregado no tratamento de resíduos de suinocultura como inóculo e tempo de detenção hidráulica de 18 horas. O período de 330 dias de operação foi dividido em quatro etapas: (a) etapa I, com adaptação da biomassa ao substrato sintético contendo etanol e sacarose (1:1 DQO); (b) etapa II, com adição de ARLC ($18,2 \pm 11,5 \text{ mgLAS.L}^{-1}$) ao substrato sintético mais etanol e sacarose (1:1 DQO); (c) etapa III, com adição de ARLC ($25,4 \pm 8,8 \text{ mgLAS.L}^{-1}$) ao substrato sintético mais etanol e (d) etapa IV, com adição de ARLC ($20,4 \pm 5,8 \text{ mgLAS.L}^{-1}$) ao substrato sintético, sem adição de fonte suplementar de carbono. Equilíbrio reacional ao longo das etapas de operação foi verificado em função da baixa concentração de ácidos orgânicos voláteis e sólidos suspensos voláteis efluente. Na etapa I, verificou-se $82,9 \pm 13,6\%$ de remoção de DQO para $683,9 \pm 110,4 \text{ mgDQO.L}^{-1}$ afluente. Para todas as etapas de operação, observou-se a manutenção dessa eficiência sempre superior a 88%. Verificou-se aumento da eficiência de remoção do surfactante de $51,7 \pm 23,9\%$ na etapa II na presença de etanol e sacarose (1:1 DQO) ($872,3 \pm 141,8 \text{ mgDQO.L}^{-1}$ afluente), para $72,9 \pm 18,8\%$ na etapa III, somente com etanol ($705,0 \pm 155,8 \text{ mgDQO.L}^{-1}$ afluente), e de $76,8 \pm 16,9\%$ na etapa IV, após a retirada das fontes suplementares de carbono ($633,4 \pm 156,88 \text{ mgDQO.L}^{-1}$ afluente). A substituição de sacarose e etanol por somente etanol foi extremamente favorável para a remoção do LAS, isto porque foram identificadas alterações das populações microbianas de acordo com a modificação da fonte suplementar de carbono relacionadas, principalmente, ao nível taxonômico de família. Na etapa II, observou-se predomínio de representantes da família Comamonadaceae (abundância relativa de 47% no biofilme). Também para o biofilme das etapas III e IV, verificou-se decréscimo para menos de 4% da abundância relativa de representantes pertencentes à família Comamonadaceae. Todavia, verificou-se aumento da abundância relativa de representantes da família Rhodocyclaceae (18%, 88% e 77% no biofilme das etapas II, III e IV, respectivamente). O principal gênero da família Comamonadaceae identificado na etapa II foi *Curvibacter*, cujo crescimento pode estar associado a açúcares (abundância relativa de 28% no biofilme). Verificou-se decréscimo da abundância relativa deste gênero inferior a 0,9% nas etapas III e IV. Para os representantes da família Rhodocyclaceae foram identificados gêneros possivelmente relacionados à degradação do LAS: *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea* (78%, 67% e 98% dos gêneros pertencentes à família Rhodocyclaceae identificados no biofilme das etapas II, III e IV, respectivamente). Por meio do sequenciamento massivo, 37 gêneros possivelmente relacionados à degradação do LAS foram identificados. Quarenta compostos xenobióticos, alguns tóxicos à biota aquática, foram detectados no efluente via cromatografia gasosa/espectrometria de massas. Verificou-se, por meio do índice de Bray-Curtis, maior similaridade entre a biomassa do biofilme e do separador de fases de uma mesma etapa do que entre amostras de biomassa de etapas de operação distintas, evidenciando que houve diferenciação das populações de acordo com a fonte de carbono empregada. Por meio do balanço de massa global, observou-se que somente 0,81% do LAS removido ficou adsorvido.

Palavras-Chave: Etanol. Sacarose. Ion Torrent. *Curvibacter*. Surfactante aniônico.

ABSTRACT

MACEDO, T.Z. **Influence of supplementary carbon source in the removal of linear alkylbenzene sulfonate from laundry wastewater and related microbial community in anaerobic fluidized bed reactor**, 2015. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

In the present study, the degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) from laundry wastewater (LW) was investigated by using an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) with sand as support material, inoculum coming from a UASB reactor used in the treatment of swine manure, and hydraulic retention time of 18 hours. The operation time was divided into four stages: (a) stage I composed by the adaptation of the biomass in the presence of synthetic substrate containing sucrose and ethanol (1: 1 COD); (b) stage II with addition of LW ($18.2 \pm 11.5 \text{ mgLAS.L}^{-1}$) plus synthetic substrate containing sucrose and ethanol (1: 1 COD); (c) stage III with LW ($25.4 \pm 8.8 \text{ mgLAS.L}^{-1}$) plus synthetic substrate containing ethanol; (d) stage IV with addition of LW ($20.4 \pm 5.8 \text{ mgLAS.L}^{-1}$) plus synthetic substrate without supplementary carbon source. Low concentration of volatile organic acids and volatile suspended solids were observed in the reactor effluent indicating the system exhibited good stability. The COD removal efficiency was $82.9 \pm 13.6\%$ during the biomass adaptation in stage I ($683.9 \pm 110.4 \text{ mg.L}^{-1}$ of COD influent). That removal efficiency was high throughout the operational time, exceeding 88%. The surfactant removal efficiency increased from $51.7 \pm 23.9\%$ in stage II with the presence of ethanol and sucrose ($872.3 \pm 141.8 \text{ mgCOD.L}^{-1}$ influent) to $72.9 \pm 18.8\%$ in stage III, with only ethanol ($705.0 \pm 155.8 \text{ mgCOD.L}^{-1}$ influent). In the stage IV, after the withdrawal of additional carbon sources, the removal efficiency was $76.8 \pm 16.9\%$ ($633.4 \pm 156.88 \text{ mgCOD.L}^{-1}$ influent). The replacement of sucrose and ethanol by only ethanol favored the LAS efficiency removal due to the microbial community change according to the additional carbon source modification, what was mainly detected at family level. In stage II there was a predominance of representatives of Comamonadaceae family (relative abundance of 47% in the biofilm). That relative abundance decreased to less than 4% in stages III and IV. However, there was an increase in relative abundance of representatives of the Rhodocyclaceae family (18%, 88% and 77% of the biofilm in stages II, III and IV, respectively). The main genus of Comamonadaceae family identified in stage II was *Curvibacter* whose growth may be associated with sugars (relative abundance of 28% in the biofilm). That relative abundance was decreased to less than 0.9% in stages III and IV. For representatives of Rhodocyclaceae family, some genera possibly related to the degradation of LAS were identified: *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* and *Zoogloea* (78%, 67% and 98% of the genera of the Rhodocyclaceae family identified in the biofilm from stages II, III and IV, respectively). By means of massive sequencing, 37 genera possibly related to degradation of LAS were identified. Forty xenobiotic compounds, some of them toxic to aquatic biota, were detected in the reactor effluent through gas chromatography/ mass spectrometry. According to the Bray-Curtis similarity, the samples collected in the same operation stage showed higher similarity coefficients than those collected in the same sampling site (biofilm from support material or phase separator). That result confirms the microbial community differentiation according to the carbon source employed. Through the overall mass balance, it was found that only 0.81% of LAS added was removed by adsorption.

Keywords: Ethanol. Sucrose. Ion Torrent. *Curvibacter*. Anionic Surfactant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1-Estrutura da molécula de LAS	5
Figura 4.1 - Fluxograma experimental	21
Figura 4.2- Reator anaeróbio de leito fluidificado em escala de bancada	22
Figura 5.1-Suplementação e consumo da DQO filtrada durante a inoculação do RALF	36
Figura 5.2- Box-plot da carga orgânica volumétrica aplicada nas etapas de operação I, II, III e IV	38
Figura 5.3-Variação temporal da DQO afluenta, efluente e eficiência de remoção.....	40
Figura 5.4-Porcentagem de ácidos orgânicos voláteis para as etapas I, II, III e IV	47
Figura 5.5-Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas na etapa II: (a) cocos da biomassa da areia e (b) cocos da biomassa do separador de fases	58
Figura 5.6-Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas na etapa III: (a) filamentos na biomassa da areia (b) bacilos da biomassa da areia (c) cocos da biomassa do separador de fases	59
Figura 5.7-Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas na etapa IV do reator (a) filamentos da biomassa da areia e (b) bacilos da biomassa do separador de fases...	59
Figura 5.8- Curvas de rarefação definidas para diferentes porcentagens de similaridade. (a) 80% de similaridade para nível de Filo; (b) 95 % para nível de gênero e (c) 97 % para o nível de espécie.....	62
Figura 5.9-Dendograma baseado no índice de Bray-Curtis para amostras do RALF	65
Figura 5.10 - Abundância relativa das famílias Rhodocyclaceae e Comamonadaceae da biomassa do material suporte e separador de fases das etapas II a IV com 97% de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP-Classifer com índice de confiança de 50%	69
Figura 5.11-Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função das OTUs para material suporte II, III e IV (a) e separador de fases II, III e IV (b); em função do número de sequências para material suporte II, III e IV (c) e separador de fases II, III e IV (d).....	75
Figura 5.12-Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função das OTUs para material suporte e separador de fases II (a), para material suporte e separador de fases III (b), para material suporte e separador de fases IV (c); em função do número de sequências para material suporte e separador de fases II (d), para material suporte e separador de fases III (e), para material suporte e separador de fases IV (f).	76

Figura 5.13-Abundância relativa para *Curvibacter*, *Dechloromonas*, *Georgfuchsia*, *Zoogloea* identificados na biomassa do material suporte e separador de fases das etapas de II a IV com 97% de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP-Classifíer com índice de confiança de 50%..... 80

Figura 5.14- Árvore filogenética para as sequências representativas das OTUs com maior abundância relativa das amostras de biomassa coletadas do material suporte e do separador de fases para as etapas de II a IV. A barra de escala informa a distância filogenética e *Chloroflexi bacterium* não cultivada foi utilizada como outgroup 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1-Resumo dos estudos de remoção de LAS que variaram o co-substrato adicionado	11
Tabela 4.1-Características da areia utilizada como material suporte no RALF	23
Tabela 4.2-Composição do substrato sintético das etapas I e II	24
Tabela 4.3-Composição do substrato sintético da etapa III.....	24
Tabela 4.4-Composição do substrato sintético da etapa IV.....	24
Tabela 4.5-Composição da solução de sais adicionada ao substrato sintético	24
Tabela 4.6-Tempo de operação e concentração de LAS afluente	26
Tabela 4.7-Parâmetros de caracterização da água de lavanderia e monitoramento do reator ..	27
Tabela 5.1- Valores dos parâmetros físico-químicos de caracterização da água residuária de lavanderia comercial empregada na alimentação do reator	35
Tabela 5.2-Valores de DQO afluente e efluente, COV e eficiência de remoção de DQO para as etapas I, II, III e IV	37
Tabela 5.3 - Valores de LAS afluente e efluente, COV e eficiência de remoção de LAS para as etapas II, III e IV	41
Tabela 5.4-Carga aplicada (CA), carga removida (CR) e relação CR/CA para o LAS	43
Tabela 5.5-Contribuição do LAS na COV aplicada ao reator	44
Tabela 5.6-Valores de pH afluente e efluente para as etapas I, II, III e IV	44
Tabela 5.7-Valores de alcalinidade parcial, intermediária e a bicarbonato para as etapas I, II, III e IV	45
Tabela 5.8-Razão entre a alcalinidade intermediária e parcial no reator (AI/AP) para as etapas I, II, III e IV	46
Tabela 5.9-Concentração de ácidos orgânicos voláteis para as etapas I, II, III e IV	47
Tabela 5.10-Valores de sólidos suspensos efluente	49
Tabela 5.11-Fração de LAS removido e biodegradado no RALF.....	49
Tabela 5.12-Concentrações de nitrato, nitrito, fosfato e sulfato afluente e efluente para as etapas II, III e IV.....	51
Tabela 5.13-Compostos detectados no efluente do reator por injeção da amostra.....	56
Tabela 5.14-Compostos detectados no efluente do reator (análise por <i>Headspace</i>)	57
Tabela 5.15- Sequenciamento da biomassa do MS e SF das etapas II, III e IV de operação do RALF	61
Tabela 5.16-Resultados dos estimadores de riqueza e índices de diversidade.....	63

Tabela 5.17-Porcentagem e número de sequências classificadas para Família, Filo e Gênero	66
Tabela 5.18 - Abundância relativa dos Filos nas amostras (cut-off 0,50)	67
Tabela 5.19 - Abundância relativa das famílias nas amostras (cut-off 0,50)	71
Tabela 5.20-Percentual de gêneros identificados pertencentes a família Rhodocyclacea na biomassa das etapas II, III e IV*	81
Tabela 5.21-Gêneros possivelmente relacionados à degradação do LAS identificados na biomassa das etapas de II a IV, sendo 97% o nível de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP Classificador em um limite de confiança de 50%	82
Tabela 5.22-Gêneros possivelmente degradadores de LAS em comum com outros trabalhos	88
Tabela 9.1-Abundância relativa dos gêneros identificados nas biomassas das etapas de II a IV	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
AI	Alcalinidade Intermediária
AOV	Ácidos Orgânicos Voláteis
AP	Alcalinidade Parcial
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ASBR	Reator Anaeróbio Operado em Bateladas Sequenciais
CG-EM	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COV	Carga Orgânica Volumétrica
COXs	Compostos Orgânicos Xenobióticos
CSTR	<i>Continuous Stirred Tank Reactor</i> (Reator de Tanque Agitado Contínuo)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
EGSB	<i>Expanded Granular Sludge Bed</i> (Reator de Leito Granular Expandido)
LAS	Alquilbenzeno Linear Sulfonado
LC50	50% da concentração letal
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
Me-SPCs	Ácidos Sulfofenil Carboxílicos Metilados
Me-SPdCs	Ácidos Sulfofenil Dicarboxílicos Metilados
mgHAc	Equivalente a ácido acético
MS-II	Amostra da biomassa do material suporte retirada na etapa II
MS-III	Amostra da biomassa do material suporte retirada na etapa III
MS-IV	Amostra da biomassa do material suporte retirada na etapa IV
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NP	Nonilfenol
NPE	Nonilfenol Etoxilados
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
OTU	<i>Operation Taxonomic Units</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em Cadeia)

PVC	Cloreto de Polivinila
pH	potencial Hidrogeniônico
RAHLF	Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
RALF	Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RNAr	Ácido Ribonucléico ribossomal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SF-II	Amostra da biomassa do separador de fases retirada na etapa II
SF-III	Amostra da biomassa do separador de fases retirada na etapa III
SF-IV	Amostra da biomassa do separador de fases retirada na etapa IV
SPCs	<i>Sulfophenyl Carboxylic Acids</i> (ácidos sulfofenilcarboxílicos)
SS	Substrato Sintético
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
STV	Sólidos Totais voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> (Fluxo Ascendente e Manta de Lodo)
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\mu\text{g.L}^{-1}$	micrograma por litro
cm	Centímetro
d	Dia
g	Grama
g DQO/g STV.d	grama de demanda química de oxigênio por grama de sólidos totais voláteis por dia
g. SSV L^{-1}	grama de sólidos suspensos voláteis por litro
g.L^{-1}	grama por litro
g.SST.L^{-1}	grama de sólidos suspensos totais por litro
g/cm^3	grama por centímetro cúbico
$\text{kgDQO m}^{-3}.\text{d}^{-1}$	quilograma de DQO por metro cúbico dia
L	Litro
L.h^{-1}	litro por hora
M	Molar
mg.L^{-1}	miligrama por litro
$\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$	miligrama por litro por dia
$\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$	miligrama de carbonato de cálcio por litro
mgHAc.L^{-1}	miligrama de equivalência de ácido acético por litro
mL	mililitros
mL.min^{-1}	mililitros por minuto
mM	milimol
mm	milímetros
$\text{ng}/\mu\text{L}$	nanogramas por microlitro
μL	microlitro
mM	milimolar
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS	xvii
SUMÁRIO.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo principal	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 LAS.....	5
3.2 Água residuária de lavanderia.....	6
3.3 Co-substratos e degradação do LAS	7
3.4 Microrganismos envolvidos na degradação do LAS	14
3.5 Subprodutos metabólicos da degradação do LAS	16
3.6 Reator de leito fluidificado	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Fluxograma experimental	21
4.2 Instalação experimental	22
4.3 Composição do substrato sintético	23
4.4 Operação do RALF.....	25
4.4.1 Inoculação.....	25
4.4.2 Adaptação da biomassa e etapas contendo água residuária de lavanderia	25
4.5 Análises físico-químicas e cromatográficas	26
4.6 Microscopia óptica.....	27

4.7	Extração do LAS adsorvido e balanço de massa	28
4.8	Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)	29
4.9	Biologia Molecular	29
4.9.1	Armazenamento e extração do DNA.....	29
4.9.2	Sequenciamento massivo.....	30
4.9.2.1	Análise das sequências	30
4.10	Análises estatísticas.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Caracterização da água residuária de lavanderia	33
5.2	Inoculação do Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.....	36
5.3	Remoção de DQO	36
5.4	Remoção de LAS	40
5.5	Monitoramento de pH e alcalinidade.....	44
5.6	Monitoramento de ácidos orgânicos voláteis.....	47
5.7	Sólidos Suspensos Totais.....	48
5.8	Balanço de massa.....	49
5.9	Sulfato, nitrato, nitrito e fosfato	51
5.10	Análises por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas	54
5.11	Exames de Microscopia	58
5.12	Caracterização molecular	60
5.12.1	Índices ecológicos.....	62
5.12.2	Classificação taxonômica	65
5.12.2.1	Filos.....	66
5.12.2.2	Famílias	68
5.12.2.3	Gêneros.....	74
5.12.2.4	Árvore filogenética.....	89
5.12.3	Considerações Finais	90

6	CONCLUSÕES	91
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	93
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
9	APÊNDICE	110

1 INTRODUÇÃO

O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), componente de detergentes e produtos de higiene pessoal, é recalcitrante, refratário ao metabolismo microbiano, sobretudo em condições anaeróbias. Águas residuárias de lavanderia comercial contêm até 1.024 mg.L^{-1} de LAS (BRAGA e VARESCHE, 2014). Os significativos volumes de água consumidos por este segmento de prestação de serviço acrescidos aos potenciais efeitos adversos deste tóxico em ecossistemas aquáticos e estações de tratamento de esgoto conduzem à necessidade de explorar possibilidades de tratamento para esta água residuária.

No Laboratório de Processos Biológicos (LPB-EESC-USP), diversas configurações reacionais têm sido empregadas no estudo da remoção do LAS. Recentemente, reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), reator de leito granular expandido (EGSB) e reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) foram utilizados na avaliação da remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial (BRAGA, 2014, DELFORNO et al., 2014 e OKADA et al., 2014).

Okada et al. (2014) obtiveram maiores valores de degradação para LAS em água residuária de lavanderia comercial ($82 \pm 9\%$) do que para LAS padrão ($45 \pm 16\%$). Os autores empregaram TDH de 35 horas e concentração de LAS afluente de 11 mg.L^{-1} em UASB. Delforno et al. (2014) por sua vez, também obtiveram, em reator EGSB, porcentagens mais elevadas de eficiência de remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial. Esses autores obtiveram eficiência de remoção de LAS em água residuária de lavanderia superior a 76% para 11 mg.L^{-1} afluente e TDH de 38 horas. Em relação ao LAS padrão, a eficiência média de remoção foi próxima a 63% para as mesmas condições operacionais.

Apesar de terem sido obtidos elevados valores de eficiência de remoção de LAS de água residuária de lavanderia comercial em EGSB e UASB (DELFORNO et al., 2014 e OKADA et al., 2014), em RALF esta remoção foi inferior (BRAGA, 2014) se comparada a eficiência de remoção obtida para LAS padrão (OLIVEIRA et al., 2013).

Braga (2014) obteve, em RALF, remoção de $75 \pm 14\%$ e $65 \pm 14\%$ para $9,5 \pm 3,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $23,3 \pm 5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS de água de lavanderia afluente, respectivamente. Oliveira et al. (2013), todavia, obtiveram, em mesma configuração reacional, eficiência de remoção de $88 \pm 11\%$ e $96 \pm 5\%$ para $8,2 \pm 1,3$ e $24,4 \pm 3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS padrão, respectivamente. Ambos os trabalhos mencionados empregaram TDH de 18 horas.

Reator anaeróbio de leito fluidificado é uma alternativa promissora no tratamento de compostos recalcitrantes. A recirculação e consequente diluição afluente permite que concentrações menos tóxicas atinjam o biofilme. A imobilização dos microrganismos em biofilme aderido ao material suporte, por sua vez, permite ao sistema biológico reter grande concentração de biomassa no seu interior devido a maior área superficial, favorecendo o contato da biomassa com o substrato e aumentando assim a transferência de massa. Consequentemente, a aplicação dessa configuração reacional possibilita utilizar TDH reduzido e obter elevada eficiência de remoção de DQO.

Outro aspecto importante, além da configuração reacional, são as fontes de carbono denominadas co-substratos metabólicos, facilmente degradáveis, que podem aumentar a biodegradação de compostos recalcitrantes por meio de processo denominado co-metabolismo (BRANDT et al., 2003).

Diferentes co-substratos foram empregados nas configurações reacionais mencionadas anteriormente. Delforno et al. (2014), por exemplo, utilizaram álcoois de cadeia curta (etanol e metanol). Okada et al. (2014) empregaram suplementação semelhante à de Delforno et al. (2014) no estudo da remoção de LAS padrão. Quando a fonte de LAS foi água residuária de lavanderia comercial, Okada et al. (2014) realizaram a adaptação da biomassa na presença dos referidos álcoois, retirando-os após a adição da água residuária real.

Oliveira et al. (2010) e Braga (2014), todavia, empregaram sacarose como fonte suplementar de carbono em RALF para alimentação com LAS padrão e água residuária de lavanderia comercial, respectivamente.

Os álcoois de cadeia curta são fonte de carbonos facilmente degradável, enquanto a sacarose é um dissacarídeo formado por dois açúcares (glicose e frutose) que necessita de algumas enzimas específicas para ser quebrada em dois monossacarídeos facilmente degradáveis.

A influência da variação dos co-substratos metabólicos empregados em estudos de remoção de LAS foi observada em alguns estudos (KHEIFAT, 2006, ABOUD et al., 2007, DUARTE et al., 2010a; BRAGA, 2014). Todavia, não é possível estabelecer consenso acerca de quais fontes de carbono poderiam favorecer ou prejudicar a remoção do tóxico e se realmente deveriam ser empregadas.

Além disso, sabe-se que fontes diversas de carbono podem favorecer diferentes populações de microrganismos e, neste sentido, ainda não foi relatada na literatura caracterização microbiana utilizando sequenciamento massivo com o enfoque para identificar estas alterações de populações de bactérias e sua relação com a remoção do surfactante.

No presente trabalho foi dada continuidade ao estudo da remoção de LAS de água residuária de lavanderia em reator anaeróbio de leito fluidificado iniciado por Braga (2014) que empregou sacarose como fonte suplementar de carbono. Tendo em vista as elevadas eficiências de remoção de LAS de água residuária de lavanderia ao empregar álcoois de cadeia curta como fonte de carbono, bem como a propriedade destes álcoois de reativação de microrganismos afetados pela toxicidade do LAS (SCHÖBERL, 1989), pretendeu-se comparar a influência da sacarose e etanol como fontes suplementares de carbono e a possível alteração das populações de bactérias no reator. A caracterização microbiana foi feita através de sequenciamento massivo via plataforma Ion Torrent que fornece elevada cobertura amostral e confiabilidade dos dados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a influência das fontes suplementares de carbono, sacarose e etanol, adicionadas ao substrato sintético na remoção de LAS de água residuária de lavanderia comercial em reator anaeróbio de leito fluidificado.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência das fontes de carbono suplementares na remoção de matéria orgânica;
- Avaliar a produção de ácidos orgânicos voláteis em função da operação do reator;
- Avaliar os subprodutos gerados no efluente por meio de CG-EM;
- Avaliar, por meio do balanço de massa, a quantidade de LAS removida, adsorvida e degradada;
- Caracterizar a comunidade microbiana do RALF para diferentes condições nutricionais por meio de sequenciamento (next generation);

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LAS

LAS é o surfactante mais utilizado mundialmente em produtos de uso doméstico, sendo mais de 3 milhões de toneladas de consumo mundial por ano. Particularmente, é o surfactante predominante na composição de detergentes para lavagem de roupa, louça e produtos de limpeza em geral (MALIHI et al., 2011).

O LAS comercial consiste na mistura de 20 isômeros ou homólogos diferentes, cada um contendo um anel aromático sulfonado na posição *para* ligado a uma cadeia alquílica linear (GARCIA et al., 2005) (Figura 3.1).

Figura 3.1-Estrutura da molécula de LAS

As proporções destes homólogos são variadas nas formulações comerciais e dependem da aplicação específica do detergente (BERNA et al., 2007). Exceção dos grupos metil terminais, o anel aromático pode ser distribuído aleatoriamente ao longo da cadeia alquílica linear (SCHÖBERL, 1989).

A toxicidade do LAS é influenciada pela posição do anel benzênico. Quando o anel encontra-se em posição terminal, resulta em maior toxicidade se comparada à posição central (PRATS, 1993). A toxicidade do surfactante está ainda intrinsecamente relacionada à sua

estrutura, ou seja, quanto menor a cadeia alquílica, maior o grau de toxicidade (GARCIA et al., 2005).

O baixo custo e desempenho superior deste surfactante aniônico resultam em seu elevado consumo (SCHEIBEL, 2004). Desta forma, considerando-se a sua baixa biodegradabilidade, o LAS está presente tanto em água residuária industrial, quanto em esgoto doméstico.

3.2 Água residuária de lavanderia

A água utilizada na lavagem de roupa contém concentrações elevadas de compostos químicos, tais como sódio, fosfato, boro, surfactantes, amônia e nitrogênio. Trata-se de água residuária rica em sólidos suspensos, turbidez e demanda de oxigênio (BRAGA e VARESCHE, 2014). Desta forma, a descarga dessa água sem tratamento pode levar a prejuízos ambientais e de saúde pública (AHMAD e EL-DESSOUKY, 2008).

Braga e Varesche (2014) verificaram 12 - 1.024 mgLAS.L⁻¹ em água residuária de lavanderia comercial, diversas enzimas, metais e outros 33 compostos orgânicos xenobióticos, incluindo solventes, fragrâncias, compostos auxiliares de limpeza, conservantes, repelentes de insetos, antioxidantes e outros. Tais compostos xenobióticos podem interferir na degradação de surfactante (CAROSIA et al., 2014) e causar prejuízos ao meio ambiente.

Eriksson et al. (2002) relataram mais de 900 compostos orgânicos xenobióticos (COXs) comumente utilizados em produtos de higiene pessoal e limpeza e, portanto, potencialmente presentes em águas residuárias de lavanderias.

Steinemann et al. (2011) atentaram para o fato de que na maioria dos produtos de higiene pessoal não são identificados todos os componentes de sua composição nos rótulos. Os autores encontraram 133 compostos orgânicos voláteis em 25 produtos de higiene pessoal avaliados, com média de 17 desses compostos por produto. Dentre os 133 compostos, 24 foram classificados como tóxicos ou perigosos pelas leis federais dos EUA.

Águas residuárias de lavanderia também podem conter metais pesados como cobre e zinco, encontrados em detergentes de uso doméstico (AONGHUSA e GRAY, 2007). Esses autores mencionam ainda que as formulações de detergentes mudam rapidamente, portanto

existe a necessidade de monitoramento constante e reavaliação de concentrações de metais em águas residuárias que contenham detergente.

Considerando-se a complexa composição dessa água residuária, bem como o incipiente conhecimento de sua composição, são necessários estudos de caracterização e a proposição de sistemas capazes de promover remoção satisfatória de LAS, matéria orgânica e outros compostos que porventura possam provocar impactos negativos ao ambiente.

3.3 Co-substratos e degradação do LAS

A biodegradação é fundamental no comportamento e destino de muitos compostos químicos poluentes no ambiente. Berna et al. (2007) consideraram a degradação o mais importante mecanismo de remoção desses compostos em ambientes aquáticos. Os microrganismos podem usar os tensoativos como substrato para obter energia e nutrientes ou utilizá-los em reações microbianas co-metabólicas (YING, 2005).

O conceito de co-utilização, por exemplo, envolve o fato de que muitas espécies são capazes de usar mais de uma fonte de carbono simultaneamente, embora a disponibilidade de um substrato facilmente degradável, muitas vezes, seja suficiente para assegurar o crescimento de uma população microbiana (BRANDT et al., 2003). Dessa forma, muitos poluentes são degradados por servirem como fonte adicional de energia aos microrganismos.

No entanto, alguns compostos químicos são persistentes no ambiente. Tratam-se de compostos recalcitrantes de difícil degradação, denominados xenobióticos (JANKE e FRITSC, 1985; SINHA et al., 2009). Os surfactantes, como LAS, enquadram-se nessa categoria de compostos químicos cuja recalcitrância ocorre principalmente em condições anaeróbias (GARCIA et al., 2005).

Fontes de carbono facilmente degradáveis podem aumentar a biodegradação desses compostos químicos persistentes por meio de processo denominado co-metabolismo (BRANDT et al., 2003). O co-metabolismo tem sido demonstrado em culturas puras e mistas para gama de compostos, tais como inseticidas, herbicidas, surfactantes, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos (LUO et al., 2014).

A transformação resultante pode ser uma pequena modificação da molécula ou pode-se chegar à degradação incompleta e eventualmente completa do composto (FETZNER,

2009). No entanto, nesse referido processo, o composto não é utilizado como fonte primária de carbono ou energia pelos microrganismos que requerem a presença de outros compostos (substratos primários) facilmente degradáveis que possam suportar o seu crescimento. O substrato primário, por sua vez, induz à produção de enzimas ou coenzimas que viabilizam a metabolização do composto recalcitrante (SINHA et al., 2009).

O acoplamento entre o metabolismo de compostos xenobióticos e as fontes suplementares de carbono empregadas (substratos primários) podem variar dependendo dos substratos e das espécies microbianas envolvidas (BRANDT et al., 2003).

As bactérias que convertem LAS perdem a capacidade de oxidá-lo quando afetadas por sua toxicidade, sendo a presença de co-substratos, como álcoois alifáticos, aldeídos ou ácidos carboxílicos, um mecanismo para reativação da sua atividade, uma vez que o LAS em si não auxilia na recuperação dos microrganismos (SCHÖBERL, 1989).

Na Tabela 3.1 estão sumarizados trabalhos reportados na literatura, relacionados ao emprego de diferentes co-substratos metabólicos.

Khleifat (2006) estudou a degradação de LAS em batelada por consórcio de *Pantoea agglomerans* e *Serratia odorífera* 2 isoladas de água residuária de estação de tratamento de esgoto. A porcentagem de degradação de 200 mg.L⁻¹ de LAS pelo consórcio foi de 70% em caldo nutriente e apenas 36% em meio mínimo. A adição de fonte de carbono (glicose, sacarose, maltose, manitol e ácido succínico) e de fonte de nitrogênio (cloreto de amônio, triptona, extrato de levedura, nitrato de amônio e caseína) resultou em aumento da degradação de LAS em todos os casos, atingindo sua completa mineralização em 48-72 horas.

Abboud et al. (2007) estudaram a degradação de LAS e SDS (dodecil sulfato de sódio) por consórcio misto de bactérias anaeróbias facultativas em batelada (*Pantoea agglomerans* e *Acinetobacter calcoaceticus* isoladas de água residuária). Completa degradação do LAS foi acompanhada pela suplementação com fonte de carbono (glicose, sacarose, maltose e manitol). Por meio da suplementação com fontes de nitrogênio (nitrato de amônio, cloreto de amônio, caseína, extrato de levedura e triptona), os autores verificaram maior biodegradação de LAS de 60% a 90% (300 mg.L⁻¹ de LAS inicial). Contrariamente, para a cultura mista a suplementação com carbono e nitrogênio teve efeito adverso na indução da degradação de SDS.

Duarte et al. (2008) observaram aumento da remoção de LAS (de 20% para 37%) após adição de extrato de levedura, um co-substrato complexo contendo fonte de nitrogênio, micronutrientes e vitamina B, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Os autores empregaram TDH de 12 horas e concentrações de LAS afluente entre 7 e 14 mg.L⁻¹.

Sanz et al. (2003) avaliaram a biodegradação anaeróbia de LAS em reator UASB sob duas condições distintas: (1) reator alimentado com substrato facilmente degradável e solução de LAS comercial e (2) reator alimentado com solução de LAS comercial sem co-substrato. Os reatores foram operados com carga orgânica de 4-5 mgLAS. L⁻¹.dia⁻¹ e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas. Os autores verificaram 64-85% de remoção por meio da biodegradação, sendo maior na ausência de co-substrato.

Duarte et al. (2010a) verificaram remoção de LAS em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (5L) em ciclos de 24 horas a 50 rpm e alimentado com extrato de levedura, amido, sacarose e 22 mg.L⁻¹ de LAS. Na ausência de co-substratos foi obtida maior remoção de LAS (53%), enquanto que em sua presença, a remoção foi de 24 a 37%.

É importante notar que Sanz et al. (2003) e Duarte et al. (2010a) empregaram uma fase de adaptação da biomassa anteriormente a adição de LAS como única fonte de carbono. Sanz et al. (2003) alimentaram o reator com mistura de co-substratos (acetato, propionato, butirato, lactato, metanol, etanol e sacarose) durante 20 dias antes da adição LAS. Duarte et al. (2010a), por sua vez, alimentaram o reator em três fases distintas, com amido e sacarose como fonte de carbono, antes da retirada do co-substrato. Portanto, adaptação prévia da biomassa na presença de uma fonte de carbono adicional pode favorecer o aumento da remoção de surfactante se a fonte de carbono for removida posteriormente. Destaca-se que nesses dois casos a biomassa utilizada encontrava-se na forma de grânulos, portanto, organização estrutural de biofilme em camadas com elevada densidade celular.

Ferreira (2012) estudou a degradação de LAS oriundo de sabão em pó em RALF (TDH de 15 horas) com co-substratos metabólicos (sacarose e etanol (1:1 DQO) ou apenas sacarose) adicionados ao substrato sintético. O autor utilizou inóculo proveniente de reator UASB empregado no tratamento de água residuária de avicultura. Para todas as condições de substrato sintético foi obtida remoção de DQO superior a 78±8,4% para todas as etapas. A remoção de LAS foi de 37,7±13,7% para 12,4±8,4 mg.L⁻¹ afluente. Ferreira (2012) concluiu não ser possível determinar o nível de importância do co-substrato na remoção de matéria orgânica, bem como, inferir o grau de importância do co-substrato na remoção de LAS em seu estudo, por meio da análise de pareamento do teste de Scheffé.

No entanto, Carosia et al. (2014) verificaram remoção de LAS ligeiramente superior (47,6±10,2%). Os autores utilizaram etanol (0,75 mL.L⁻¹) como co-substrato e 15 mg.L⁻¹ de LAS proveniente do sabão em pó; além de extrato de levedura e solução de sais em RALF com areia como material suporte e TDH de 15 horas. Nesse caso, a remoção de DQO foi de 85,8±4,9% para 607±60 mg.L⁻¹ afluente.

Braga (2014) observou diminuição da remoção LAS em RALF com TDH de 18 horas, após a retirada de sacarose empregada como fonte suplementar de carbono nas etapas anteriores. A autora utilizou água residuária de lavanderia comercial como fonte de LAS e obteve $74,6 \pm 14,1\%$ e $65,3 \pm 14,3\%$ para $9,51 \pm 3,08 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS e $23,34 \pm 5,49 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS, respectivamente, na presença de sacarose e somente $39,3 \pm 20,6\%$ para $27,91 \pm 9,57 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS após a retirada do co-substrato.

Okada et al. (2013a) verificaram que a remoção de LAS em reator UASB foi maior na presença de co-substrato complexo (50%; extrato de levedura), quando comparado com a adição de álcoois de cadeia curta (29 - 41%; metanol e etanol). Nesses casos, os autores verificaram maior degradação de LAS à medida que foi aplicada menor concentração de co-substratos (carga orgânica específica). OKADA et al. (2013b) observaram eficiência de degradação de 76% para carga orgânica específica de $0,03 \text{ g DQO/g STV.d}$ e apenas 37-53% para carga mais elevada de $0,18 \text{ g DQO/g STV.d}$, TDH de 35 horas.

Tabela 3.1-Resumo dos estudos de remoção de LAS que variaram o co-substrato adicionado

Reator	Alimentação	Composição substrato	Fonte de LAS	LAS inicial	Eficiência de remoção	Referência
UASB	LAS mais fontes de carbono	Mix de acetato propionato, butirato, lactato, metanol, etanol e sacarose	Padrão	4-5 mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹	64%	Sanz et al., 2003
UASB	Somente LAS	-	Padrão	4-5 mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹	85%	Sanz et al., 2003
Batelada	LAS mais meio mínimo M9	-	Padrão	200 mg.L ⁻¹	36%	Khleifat, 2006
Batelada	LAS mais caldo nutriente	Peptona, extrato de carne e extrato de levedura	Padrão	200 mg.L ⁻¹	70%	Khleifat, 2006
Batelada	LAS mais fonte de carbono	Glicose, Manitol, sacarose, maltose e succinato	Padrão	300 mg.L ⁻¹	100%	Abboud et al., 2007
Batelada	LAS mais fonte de nitrogênio	Nitrato de amônio, cloreto de amônio, caseína, extrato de levedura e triptona	Padrão	300 mg.L ⁻¹	90%	Abboud et al., 2007
RAHLF	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de carne, amido e sacarose	Padrão	14 mg.L ⁻¹	20%	Duarte et al., 2008
RAHLF	LAS mais fonte de nitrogênio	Extrato de levedura e sacarose	Padrão	14 mg.L ⁻¹	37%	Duarte et al., 2008
Bateladas sequenciais	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura, amido e sacarose	Padrão	22 mg.L ⁻¹	24%-37%	Duarte, 2010a
Bateladas sequenciais	Somente LAS	-	Padrão	22 mg.L ⁻¹	53%	Duarte, 2010a

Tabela 3.1-Resumo dos estudos de remoção de LAS que variaram o co-substrato adicionado (continuação)

Reator	Alimentação	Composição substrato	Fonte de LAS	LAS inicial	Eficiência de remoção	Referência
RALF	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura, sacarose e etanol	Sabão em pó	7 mg.L ⁻¹	33%	Ferreira, 2012
RALF	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura, sacarose e etanol	Sabão em pó	14 mg.L ⁻¹	39%	Ferreira, 2012
RALF	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura e sacarose	Sabão em pó	16 mg.L ⁻¹	41%	Ferreira, 2012
RALF	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura e etanol	Sabão em pó	14 mg.L ⁻¹	48%	Carosia, et al. 2014
UASB	LAS mais fonte de carbono	Álcoois de cadeia curta (etanol/metanol)	Padrão	14 mg.L ⁻¹	29-41%	Okada et al., 2013 ^a
UASB	LAS mais fonte de nitrogênio	Extrato de levedura	Padrão	14 mg.L ⁻¹	50%	Okada et al., 2013 ^a
UASB	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura, metanol e etanol (0,18±0,06 g DQO/g STV.d)	Padrão	12 mg.L ⁻¹	37-53%	Okada et al., 2013b
UASB	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura, metanol e etanol (0,03±0,01 g DQO/g STV.d)	Padrão	12 mg.L ⁻¹	76%	Okada et al., 2013b
RALF	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura e sacarose	Água residuária de lavanderia comercial	9 mg.L ⁻¹	75%	Braga, 2014
RALF	LAS mais fonte de carbono e nitrogênio	Extrato de levedura e sacarose	Água residuária de lavanderia comercial	23 mg.L ⁻¹	65%	Braga, 2014
RALF	LAS mais fonte de nitrogênio	Extrato de levedura	Água residuária de lavanderia comercial	28 mg.L ⁻¹	39%	Braga, 2014

Desse modo, verifica-se que a adição de co-substratos metabólicos influenciaram na remoção de LAS para as diversas configurações reacionais. Contudo, não existe, na literatura, um consenso acerca da melhor fonte suplementar de carbono a ser empregada e se esta, realmente, necessita ser empregada. Por exemplo, nos experimentos de Sanz et al. (2003) e Duarte et al. (2010a), as fontes de carbono foram dispensadas, resultando em elevada eficiência de remoção. Por outro lado, Braga (2014) verificou diminuição na eficiência de remoção de LAS após a retirada da sacarose, mesmo tendo sido realizada uma etapa de adaptação na presença de fonte suplementar de carbono. Deve-se considerar ainda que, ao contrário de Duarte et al. (2010a) e Sanz et al. (2003), Braga (2014) não obteve redução na carga orgânica aplicada ao retirar a fonte suplementar de carbono, uma vez que manteve o extrato de levedura. Okada et al. (2013b), por sua vez, sugerem que a eficiência de remoção de LAS é afetada pela carga orgânica aplicada, ou seja, para cargas menores, maiores eficiências de remoção.

Delforno (2014) obteve eficiência de remoção de LAS de água de lavanderia comercial de até 93% em reator EGSB alimentado somente com água residuária de lavanderia ($12 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS; $1,0 \pm 0,3 \text{ mgLAS. gSTV}^{-1}.\text{d}^{-1}$). O autor aplicou carga orgânica baixa (aproximadamente $140 \text{ mgDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e adaptou a biomassa granular por 26 dias na presença de etanol e metanol.

A configuração do reator EGSB se assemelha muito à do RALF. Assim, apesar de, em um primeiro momento, os resultados obtidos por Delforno (2014) e Braga (2014) sugerirem que os álcoois de cadeia curta sejam fontes de carbono mais favoráveis à seleção de biomassa degradadora de LAS que a sacarose, diferenças operacionais não permitem que as observações sejam conclusivas. A estrutura de biofilme, por exemplo, difere nas duas configurações reacionais: estrutura granular para EGSB e biomassa aderida em material suporte para RALF. Além disso, as cargas orgânicas aplicadas, bem como a carga de LAS aplicada, variaram entre os trabalhos de Delforno (2014) e Braga (2014). A COV aplicada por Braga (2014) ficou entre $781 \text{ mgDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $894 \text{ mgDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Ademais, Delforno (2014) observou redução da eficiência de remoção do LAS para 59% ao aumentar a carga aplicada do surfactante ($29 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$; $2,7 \pm 0,7 \text{ mgLAS. gSTV}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

Observa-se que os trabalhos realizados até o presente momento possuem outras variáveis, tais como COV aplicada, carga de LAS afluyente, TDH, entre outros parâmetros de operação, que não se limitam à variação do co-substrato e podem interferir na remoção do LAS. Dessa forma, o entendimento acerca do papel do co-substrato metabólico empregado na remoção do surfactante ainda não se encontra bem elucidado na literatura.

3.4 Microrganismos envolvidos na degradação do LAS

A interação de diferentes microrganismos com as mais variadas rotas metabólicas possibilita a degradação de inúmeras substâncias recalcitrantes, uma vez que os metabólitos de determinada população podem servir como substrato para outra, favorecendo, desse modo, todo o processo de biodegradação (BRANDT et al., 2003). Esse sinergismo metabólico entre microrganismos, praticamente ausente nos organismos mais complexos, é de fundamental importância para a biodegradação de xenobióticos (GAYLARD et al., 2005).

Para a degradação completa do LAS é necessário consórcio microbiano, devido a limitada habilidade metabólica de microrganismos isolados (LEE, 1995).

Por meio da análise de regiões conservadas do gene RNA ribossômico 16S é possível caracterizar a comunidade microbiana de reatores empregados na remoção de compostos recalcitrantes e, conseqüentemente, formular hipóteses acerca de cooperações metabólicas a partir das funções fisiológicas dos grupos, gêneros ou espécies (RIVIERE et al., 2009).

Duarte et al. (2010a) identificaram as populações de microrganismos de reator operado em bateladas sequenciais usado na remoção de LAS, por meio do sequenciamento e análise filogenética do RNAr 16S. O inóculo foi proveniente de UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Os autores utilizaram amostra da última etapa de operação do reator, cuja concentração de LAS afluenta foi de 22mg.L^{-1} e alimentação sem co-substratos. Por meio da aproximação filogenética foi constatada ampla diversidade de microrganismos. Os clones foram relacionados a nove filos: Bacteroidetes (35%), Proteobacteria (18%), Verrucomicrobia (11%), Fibrobacteres (8%), Acidobacteria (5%), Chlorobi (3%), Firmicutes (3%), Actinobacteria (2%) e Chloroflexi (2%). A porcentagem de bactérias não classificadas representou 13% do total sequenciado. Segundo os autores, *Pseudomonas* spp., provavelmente, utilizaram a molécula de LAS como fonte de carbono e energia (JIMENEZ et al. 1991); espécies redutoras de sulfato, tais como *Syntrophus*, podem ter usado o enxofre da molécula de LAS (MCLNERNEY, 2007), enquanto *Dechloromonas* spp. podem ter usado o anel aromático da molécula de LAS como fonte de carbono e energia (COATES et al, 2001).

Em RALFs operados em menor escala e com concentrações de LAS afluenta de aproximadamente 20mg.L^{-1} de LAS, Oliveira et al. (2010) observaram elevada diversidade microbiana: Bacteroidetes (25%), Proteobacteria (25%), Actinobacteria (12%), Deinococcus-Thermus (12%), Firmicutes (5%), Acidobacteria (3%), Anaerolineae (2%),

Gemmatimonadetes (2%), Nitrospira (2%). Além disso, os autores observaram diferença na comunidade bacteriana dos reatores onde foram utilizadas pérolas de vidro e areia como materiais suporte. *Anaerolinea* e *Acidobacteria* foram encontrados somente no reator contendo areia. Clones relacionados a Verrucomicrobia foram verificados somente no reator contendo pérolas de vidro. Todavia, as proporções desses grupos foram menores, sendo que Proteobacteria e Bacteroidetes foram os filos mais frequentes nos dois reatores.

Oliveira et al. (2013) avaliaram a comunidade microbiana aderida ao material suporte no último estágio de operação de RALF em escala de bancada operado durante 270 dias (8,2 a 45,8 mg.L⁻¹ de LAS) empregando a técnica de clonagem e sequenciamento do RNAr 16S. Por meio dessa análise da amostra da última fase da operação do reator, os autores, recuperaram 105 clones pertencentes ao domínio Bacteria, especificamente relacionados aos filos Bacteroides (40%), Proteobacteria (42%), Verrucomicrobia (4%), Acidobacteria (3%), Firmicutes (2%), e Gemmatimonadetes (1%). Pequena fração dos clones (8%) não foi relacionada a nenhum filo. Os autores identificaram espécies possivelmente relacionadas à degradação do LAS; por exemplo, *Aeromonas* spp., *Novosphingobium* spp. e *Azospira* spp. *Aeromonas* spp. podem utilizar LAS como fonte de carbono ou energia (JIMENEZ et al. 1991). *Novosphingobium* spp. e *Azospira* spp. podem usar o anel aromático da molécula de LAS como fonte de carbono e energia (BERGEY e HOLT, 1994; SOHN et al., 2004).

A análise das mudanças no perfil da microbiota de acordo com as variações aplicadas, assim como a presença de gêneros e espécies dominantes e altamente adaptadas ao processo de degradação podem ser relevantes para a degradação de compostos recalcitrantes.

Carosia et al. (2014) verificaram estratificação da comunidade microbiana no biofilme do material de suporte e biomassa do separador de fases em RALF alimentado com substrato sintético e sabão em pó comercial como fonte de LAS (aproximadamente 15 mg.L⁻¹). Os autores consideraram que a presença de sabão em pó pode ter influenciado a comunidade microbiana desenvolvida no material suporte. Por outro lado, verificou-se menor influência dos compostos de sabão em pó na comunidade microbiana da região do separador de fase. Os autores reportaram a presença marcante de *Dechloromonas* sp. e *Geobacter* sp., ambas relacionadas à degradação de LAS e pertencentes ao filo Epsilon- Proteobacteria (COATES et al., 2001; KUEVER et al., 2005).

Delforno (2014) por meio do sequenciamento massivo do gene RNAr 16S (Plataforma 454-Pirosequenciamento e IonTorrent) identificou bactérias semelhantes à *Geobacter* nos grânulos de reator EGSB com suplementação de Fe (III) empregado na remoção de LAS padrão em meio sintético (17% da abundância relativa). No entanto, esse gênero não foi

identificado em condição semelhante, mas utilizando-se LAS proveniente de água residuária de lavanderia. Portanto, as condições impostas no primeiro reator favoreceram bactérias semelhantes a esse gênero. Por meio da comparação da análise filogenética das bactérias para reatores operados em diferentes condições o autor identificou gêneros em comum relacionados com a degradação de LAS, a saber: *Desulfobulbus*, *Geobacter*, *Syntrophorhabdus*, *Sporomusa*, *Comamonas*, *Holophaga*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Synergistes*.

Braga (2014) identificou 92 gêneros por meio da análise de pirosequenciamento das amostras da areia e separador de fases de RALF – retiradas nas duas últimas etapas de operação, etapa IV e V, na presença e ausência de sacarose como co-substrato metabólico, respectivamente. Vinte e quatro dos gêneros identificados foram relacionados com a degradação de LAS. Na biomassa da etapa IV, os seguintes gêneros foram predominantes: *Desulfobulbus* (1,1-58,5%), *Zoogloea* (0,8-5,23%), *Rhodanobacter* (0-3,34%), *Gemmatimonas* (1,2- 2%), *Geobacter* (0,63-1,26%), *Nitrosomonas* (0,8-1,7%) e *Dechloromonas* (0-1,4%). Na biomassa da etapa V os gêneros mais abundantes foram os seguintes: *Gemmatimonas* (25,5-34%), *Zoogloea* (8,9-9,2%), *Bdellovibrio* (1,2-1,4%), *Ferruginibacter* (0,8-2,6%), *Sporomusa* (0,13-0,32%) e *Sphingobium* (0,13-0,32%). Cinco gêneros foram relacionados com a degradação de carboidratos, entre eles a sacarose: *Longilinia* (2 – 3%), *Bellilinea* (0,5 – 0,51%), *Ignavibacterium* (0,45 – 0,66%), *Bosea* (0,24 – 0,48%) e *Azohydromonas* (0,13 – 0,36%) (BRENNER et al., 2005; XIE e YOKOTA, 2005; LINO et al., 2010). Exceção aos representantes semelhantes a *Bosea* que, provavelmente, foram favorecidos também pelo sulfato afluente da etapa V, os demais gêneros foram observados somente na etapa IV (com sacarose).

3.5 Subprodutos metabólicos da degradação do LAS

O co-metabolismo, muitas vezes, pode resultar em produtos intermediários mais recalcitrantes ou mais tóxicos que o LAS (ENIOLA, 2011).

Marchesi et al. (1994) observaram dodecan-1-ol como intermediário da degradação primária do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS). Os produtos de biodegradação iniciais de alquil sulfatos primários são álcoois primários (THOMAS e WHITE, 1989), que são

prontamente metabolizáveis por enzimas universais do metabolismo intermediário (WHITE e RUSSELL, 1994).

Alquil fenóis etoxilados são surfactantes não-iônicos consumidos em vários setores industriais e aplicações domésticas. Estes compostos são instáveis no ambiente cuja degradação produz metabólitos que são muitas vezes mais estáveis e, portanto, mais persistentes, e que também podem ser mais tóxicos (PRIAC et al., 2014). Nonilfenol etoxilados (NPE) são transformados no ambiente por microrganismos de modo a formar compostos mais tóxicos, tais como nonilfenol (NP) e nonilfenol de cadeia curta. Estes intermediários resultantes de transformações microbianas, para além da sua toxicidade intrínseca, parecem ser capazes de mimetizar estrogênios naturais e perturbar o sistema endócrino de organismos superiores (PORTER e HAYDEN, 2002).

Embora, as vias de degradação aeróbia do LAS sejam bem conhecidas e tenham sido o foco de estudo de muitos anos, as vias de degradação anaeróbia estão limitadas a poucos estudos (ZHANG e BENNETT, 2005).

A degradação aeróbia do LAS envolve as seguintes etapas: (1) conversão oxidativa de um ou dois grupos metila da cadeia alquílica a um grupo carboxila (ω -/ β -oxidação); (2) oxidação da cadeia alquílica (β -oxidação); (3) oxidação do anel aromático; (4) quebra da ligação C-S, liberando sulfato (dessulfonação) (SCHÖBERL, 1989).

Lara-Martín et al. (2010) propuseram uma possível rota de completa metabolização anaeróbia do LAS descrita em seis etapas: (1) Me-SPdCs (ácidos sulfonil dicarboxílicos metilados) são formados pela adição de fumarato ao átomo de carbono subterminal (C-2) da cadeia alquílica do LAS; (2) 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 produtos resultantes da etapa anterior sofrem β -oxidação, na ausência de oxigênio, gerando dois SPCs metilados (de Me-C10 a Me-C13SPC); (4) e (5) 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) degradação final da molécula de LAS com desulfonação e liberação do anel benzênico.

Segundo Kimerle e Swisher (1977), os produtos intermediários da biodegradação do LAS (SPCs) são menos tóxicos. O valor LC50 (concentração letal responsável por matar 50% dos indivíduos de determinada população) de SPCs para *Daphnia magna* foi entre 120-240% maior que o observado para LAS. Os autores afirmaram que, em termos de implicações

ambientais, é importante compreender o papel da biodegradação na redução da toxicidade do LAS.

Todavia, de acordo com Navas et al. (1999), apesar das semelhanças nas propriedades químicas com os alquilfenóis etoxilados, o LAS, bem como os SPCs, não apresentam efeitos estrogênicos.

Duarte et al. (2010b) detectaram cerca de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de benzeno e tolueno em efluente de reator anaeróbio com biomassa imobilizada empregado na degradação biológica de LAS. Os autores relacionaram a produção destes compostos à biodegradação do anel aromático de LAS, devido à falta de outras fontes de carbono, energia e enxofre para o crescimento microbiano.

Braga (2014) analisou qualitativamente efluente de RALF empregado no tratamento de LAS e demais compostos de água residuária de lavanderia por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A autora verificou quinze compostos orgânicos xenobióticos (COXs) do efluente do reator em sua última etapa de operação com seis compostos em comum com a amostra de água de lavanderia, sendo eles: decametil ciclo pentassiloxano, dodecametil ciclo hexassiloxano, octametil ciclo tetrassiloxano, dimetil pentadecilamina, éter de diglicidilbisfenol A e etilhexilftalato. Estes compostos são, em sua maioria, tóxicos à biota aquática como peixes, crustáceos e bactérias (CETESB, 1992).

Desta forma, a identificação e estudo dos subprodutos efluentes ao tratamento da água residuária de lavanderia são importantes não só a fim de se tentar estabelecer possível rota metabólica de degradação do surfactante, mas também para se controlar a toxicidade dos compostos liberados no efluente após a sua remoção e degradação.

3.6 Reator de leito fluidificado

Reator de leito fluidificado tem sido empregado na biotecnologia ambiental, principalmente no tratamento biológico de efluente industrial e esgoto sanitário (NICOLELLA et al., 2000). Trata-se de um vaso cilíndrico contendo meio suporte inerte que é fluidificado pela velocidade ascendente do líquido resultante das taxas de escoamento de alimentação e de recirculação. Esse sistema possui leito móvel e filme fixo e envolve a interação entre as fases sólida, líquida e gasosa. A fase sólida é formada pelas biopartículas

(material suporte e biofilme), que se destinam à retenção da biomassa no reator, enquanto a fase líquida é constituída pelo afluente a ser tratado; a fase gasosa, por sua vez, é oriunda da geração interna de biogás. Um separador no topo do reator garante a eficiência de separação do líquido, biogás e sólido (FAN, 1989).

No reator de leito fluidificado, ocorre aumento da perda de carga conforme o líquido atravessa o leito até que as partículas sólidas fiquem desprendidas uma das outras. O sistema apresenta as características de um fluido e, como tal, cede sob a ação de qualquer esforço externo, permitindo a flutuação de corpos menos densos do que o leito. Isto acontece quando a perda de pressão é suficiente para equilibrar o peso aparente das partículas, no qual qualquer aumento na velocidade resulta na expansão do leito, com consequente movimento das mesmas (GOMIDE, 1983).

Neste estado de transição, o leito está no ponto de fluidificação incipiente, e a correspondente velocidade superficial é denominada velocidade mínima de fluidificação. Aumento na velocidade do líquido resulta na expansão do leito, no movimento das partículas e uma distância média maior entre elas. A elevação da velocidade mínima de fluidificação depende do tamanho e da densidade das partículas, que deve ser maior do que a do líquido para garantir que as partículas fluidificadas permaneçam no reator. Desta forma, a vazão deve ser ajustada de forma a manter as partículas em movimento, mas mantida suficientemente baixa para evitar que sejam arrastadas com o efluente (KUNII e LEVENSPIEL, 1969).

Em reator de leito fluidificado ocorre diluição inicial do afluente devido à recirculação, que reduz a concentração do substrato e contribui para a diminuição do efeito tóxico no que se refere à toxicidade dos surfactantes aos microrganismos (IZA, 1991).

Oliveira et al. (2010) avaliaram 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). Foi aplicado TDH de 18 horas e inóculo proveniente de UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Os reatores foram alimentados com substrato sintético contendo extrato de levedura e sacarose como co-substratos. A remoção de LAS em todos os reatores foi superior a 90%. A maior eficiência de remoção foi evidenciada nos reatores com pérolas de vidro (R3) e areia (R4) com 99 e 98%, respectivamente, para $16,5 \text{ mg. L}^{-1}$ de LAS afluente. Estes dois foram considerados os melhores suportes para serem utilizados em reatores de leito fluidificado, uma vez que não ocorreu cisalhamento desses materiais. Em todos os reatores foi verificado que a adição de LAS não prejudicou a remoção da matéria orgânica. Além disso, foi observado que, na presença de LAS, a eficiência de remoção de DQO foi maior que na sua ausência.

Braga (2014) avaliou a remoção de LAS em água de lavanderia em RALF utilizando areia como material suporte e inóculo proveniente de UASB utilizado para tratamento de dejetos de suinocultura. A eficiência média de remoção de matéria orgânica e LAS foi 88% e 60%, respectivamente, durante toda operação do reator, para concentração de LAS entre $9,5 \pm 3$ e $27,9 \pm 9,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e DQO afluente entre 575 ± 28 e $691 \pm 103 \text{ mg.L}^{-1}$. A autora empregou extrato de levedura e sacarose como co-substratos metabólicos.

Por meio da execução deste trabalho pretendeu-se avaliar a influência das fontes suplementares de carbono sacarose e etanol na eficiência de remoção de LAS em RALF e na seleção de populações de bactérias relacionadas à degradação do tóxico. Para tanto, foram mantidos inóculo, proveniente de UASB empregado no tratamento de dejetos de suinocultura, e TDH, de 18 horas, ambos utilizados por Oliveira et al. (2010) e Braga (2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma experimental

Na Figura 4.1 está apresentado o fluxograma experimental do trabalho realizado. O RALF foi operado durante 330 dias após a inoculação do sistema. O período de operação foi dividido em 4 etapas diferenciadas pelas fontes suplementares de carbono adicionadas ao substrato sintético. Análises de monitoramento foram feitas periodicamente.

Figura 4.1 - Fluxograma experimental

4.2 Instalação experimental

O experimento foi realizado empregando-se um reator anaeróbico de leito fluidificado (RALF) em escala de bancada, fabricado em acrílico com 100 cm de altura, 4,0 cm de diâmetro interno e volume total de 1.256 mL (Figura 4.2). O reator foi instalado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) e mantido em câmara climatizada à temperatura de 30°C.

Figura 4.2- Reator anaeróbico de leito fluidificado em escala de bancada
Fonte: Oliveira et al. (2010)

Areia foi utilizada como material suporte devido aos bons resultados obtidos por Oliveira et al. (2010). A areia recebeu pré-tratamento ácido a fim de remover as impurezas e criar microvilosidades para facilitar a adesão microbiana. Para tanto, a areia foi mergulhada em solução de ácido fluorídrico (10%) até completa limpeza notada pela coloração da solução de marrom a transparente. Em seguida este material foi levado à estufa de secagem (105 °C) por 24 horas (SILVA, 1985). As características da areia estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Características da areia utilizada como material suporte no RALF

Suporte	Massa (g)	Diâmetro (mm)	Densidade (g/cm³)
Areia	310	1,4 – 1,7	2,3

Vazão de 70 mL. h⁻¹ foi empregada na alimentação do reator, resultando TDH de 18 horas. A vazão de recirculação aplicada foi de 106 L.h⁻¹, correspondendo a 79,6% superior a velocidade de mínima fluidificação de 59 L.h⁻¹ calculada por Braga (2014). Silva (1985) recomenda fluidificação de pelo menos 30% acima do valor mínimo. Desta forma, a razão de recirculação (vazão de recirculação/vazão de alimentação) neste reator foi de, aproximadamente, 1.512 vezes.

4.3 Composição do substrato sintético

O substrato sintético utilizado nas etapas I, II, III e IV foi baseado no substrato sintético formulado por Duarte (2006). A autora utilizou sacarose (80 mg.L⁻¹). Neste trabalho, foram utilizados etanol e sacarose como fonte suplementares de carbono (1:1 DQO) na etapa I (fase de adaptação) e etapa II (Tabela 4.2).. Na etapa III foi adicionado somente etanol, enquanto, na etapa IV não foi adicionada nenhuma fonte suplementar de carbono (Tabelas 4.3 e 4.4). A composição da solução de sais adicionada ao substrato sintético está descrita na Tabela 4.5. Para o cálculo da massa de etanol equivalente em termos de DQO utilizou-se as equações estequiométricas descritas a seguir.

Tabela 4.2-Composição do substrato sintético das etapa I e II

Componente	Quantidade adicionada
Extrato de levedura	500 mg.L ⁻¹
Bicarbonato de sódio	200 mg.L ⁻¹
Solução de sais	5,0 mL
Sacarose	40 mg.L ⁻¹
Etanol	0,03 mL

Fonte: modificado de Duarte (2006)

Tabela 4.3-Composição do substrato sintético da etapa III

Componente	Quantidade adicionada
Extrato de levedura	500 mg.L ⁻¹
Bicarbonato de sódio	200 mg.L ⁻¹
Solução de sais	5,0 mL
Etanol	0,06 mL

Fonte: modificado de Duarte (2006)

Tabela 4.4-Composição do substrato sintético da etapa IV

Componente	Quantidade adicionada
Extrato de levedura	500 mg.L ⁻¹
Bicarbonato de sódio	200 mg.L ⁻¹
Solução de sais	5,0 mL

Fonte: modificado de Duarte (2006)

Tabela 4.5-Composição da solução de sais adicionada ao substrato sintético

Sais	Quantidade adicionada
NaCl	50,0
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1,4
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,9

Fonte: Torres (1992)

O extrato de levedura foi adicionado em todas as etapas de operação como fonte de nitrogênio de vitaminas (MAINTINGUER, 2004).

4.4 Operação do RALF

4.4.1 Inoculação

Lodo proveniente de UASB utilizado no tratamento de resíduos de suinocultura instalado no Departamento de Engenharia Rural, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Jaboticabal, foi utilizado como inóculo. Este lodo foi empregado em outros trabalhos deste laboratório de pesquisa (LPB – USP) que estudaram degradação de surfactante aniônico (DUARTE, 2006; OLIVEIRA et al., 2010; BRAGA, 2014).

A imobilização da biomassa ao material suporte foi realizada mediante recirculação (sistema fechado) do substrato sintético (DUARTE, 2006) e 40 mL de lodo (aproximadamente 3% do volume total do reator) durante 30 dias. Neste período, foi feita suplementação da alimentação de acordo com o consumo de DQO.

Após a inoculação o sistema foi aberto (sistema contínuo) e alimentado com substrato sintético sem a adição de água de lavanderia comercial contendo LAS (etapa I). A composição do substrato sintético, excetuando-se o etanol, está descrita na Tabela 4.2, somente sacarose foi utilizada como fonte suplementar de carbono (80 mg.L^{-1}). O frasco (Duran® de 5,0 litros) contendo a alimentação, a partir desta etapa, foi mantido refrigerado (4°C) (OLIVEIRA et al., 2013).

4.4.2 Adaptação da biomassa e etapas contendo água residuária de lavanderia

Após o período de adaptação da biomassa (etapa I) ao substrato sintético, procedeu-se a adição de água de lavanderia contendo LAS à alimentação do reator (etapas II, III e IV). O tempo de operação e a concentração de LAS afluente em cada etapa operacional estão descritos na Tabela 4.6. A composição do substrato sintético empregado está descrita nas Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4.

Tabela 4.6-Tempo de operação e concentração de LAS afluyente

Etapa de operação	Tempo de operação (dias)	COV (mgDQO.L⁻¹.d⁻¹)	Concentração de LAS afluyente (mg.L⁻¹)
etapa I	45	911,9±147,2	-
etapa II	113	1.163,1±189,0	18,2±11,5
etapa III	94	940,0±207,7	25,4±8,8
etapa IV	78	839,6±226,3	20,1±6,0

4.5 Análises físico-químicas e cromatográficas

Duas amostras de água residuária de lavanderia comercial foram coletadas em uma lavanderia comercial de São Carlos, (SP) a fim de serem utilizadas na alimentação do reator.

A água residuária foi coletada em frascos de poliuretano de alta densidade de 5,0 litros. Previamente a sua adição na alimentação do reator a partir da etapa II, a água de lavanderia residuária comercial foi caracterizada físico-quimicamente (Tabela 4.7). Após a caracterização físico-química a água residuária de lavanderia foi distribuída em frascos âmbar e congelada para posterior utilização.

Análises físico-químicas e cromatográficas do afluyente e efluente do reator foram realizadas duas vezes por semana, excetuando-se sólidos suspensos, ácidos orgânicos voláteis e íons que foram realizados uma vez por semana ao longo da operação do reator (Tabela 4.7).

Análises de demanda química de oxigênio (DQO), pH (potencial hidrogeniônico), sólidos suspensos voláteis e NTK foram realizadas de acordo com APHA (2005). A determinação da alcalinidade foi realizada de acordo com Ripley (1986).

Os ácidos voláteis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Penteado et al. (2013).

As análises de nitrato, nitrito, sulfato, fosfato, fluoreto, cloreto, N-amoniacal, e brometo foram realizadas em Cromatógrafo de Íons da Marca Dionex modelo ICS 5000. Previamente a análise de íons, as amostras foram condicionadas em cartuchos C18 para remoção do surfactante. As condições empregadas no cromatógrafo para análise dos ânions foram as seguintes: eluente de 4,5mM de Ca₂CO₃/0,8mM de NaHCO₃ com vazão de 1,0

mL.min⁻¹, coluna ION PAC® ânion exchange AG23 em temperatura de 30°C, detector de condutividade, bomba supressora de auto regeneração de ânions.

Os metais pesados foram determinados por espectroscopia de absorção Atômica de acordo com APHA (2005).

As análises para a determinação da concentração de LAS foram realizadas segundo metodologia desenvolvida por Duarte et al. (2006) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu Co., Kyoto Japan) com detector de fluorescência, coluna C8 (Supelco), empregando metanol puro e perclorato de sódio (0.075 M) como fase móvel, fluxo de 0.5 mL.min⁻¹, temperatura de 35°C.

Tabela 4.7-Parâmetros de caracterização da água de lavanderia e monitoramento do reator

Parâmetro	Método	Referências
Ácidos orgânicos voláteis*	CLAE	Penteado et. al. (2012)
DQO	Espectrofotométrico	APHA (2005)
LAS	CLAE	Duarte et al. (2006)
Metais pesados**	Espectroscopia de Absorção Atômica	APHA (2005)
N-amoniaca**	Cromatografia de Íons	-
NTK**	Titulométrico	APHA (2005)
pH	Potenciométrico	APHA (2005)
Alcalinidade	Titulométrico	Ripley (1986)
Sólidos suspensos*	Gravimétrico	APHA (2005)
Sulfato, nitrato, nitrito, fosfato	Cromatografia de Íons	-
Fluoreto, brometo, cloreto**	Cromatografia de Íons	-

* Análises realizadas apenas para água residuária de lavanderia comercial e efluente do reator

**Análises realizadas apenas para água residuária de lavanderia comercial

4.6 Microscopia óptica

Nas etapas II, III e IV, amostras da biomassa do material suporte e separador de fases do reator foram examinadas em microscópio Olympus BX60 de contraste de fase e

fluorescência, acoplado à câmera com captura de imagem e software Image Pro Plus®. Para isso, em lâminas de vidro previamente limpas com álcool, foi colocada fina camada de ágar (2%). Após sua solidificação, uma gota de amostra foi adicionada e recoberta com a lamínula.

4.7 Extração do LAS adsorvido e balanço de massa

Ao final da operação do reator, após 330 dias da inoculação do reator, foram retiradas amostras em duplicata do material suporte (areia), da biomassa do separador de fases, da biomassa aderida a areia e da biomassa efluente para determinação do LAS adsorvido e cálculo do balanço de massa de LAS.

As amostras foram transferidas para estufa a 110°C por 24 horas para, posteriormente, ser realizado o processo de extração do LAS, que consistiu nas seguintes etapas (DUARTE, 2006).

- (a) A amostra, previamente seca em estufa, foi pesada e anotada a sua massa;
- (b) Transferiu-se essa massa de amostra para frasco apropriado adicionando-se 50 mL de metanol puro;
- (c) Amostra mais metanol foram transferidos para banho de ultra-som, durante 30 minutos, a temperatura de aproximadamente 50°C;
- (d) Separou-se a amostra e coletou-se a fase líquida;
- (e) As etapas (b), (c) e (d) foram repetidas mais duas vezes;
- (f) Adicionou-se 20 mL de água ultrapurificada a amostra;
- (g) As etapas (c) e (d) foram repetidas;
- (h) A solução formada pelo metanol coletado em cada etapa mais a água foi filtrada em membrana de 0,22 µm;
- (i) Evaporou-se o extrato metanólico em placa aquecida (60°C) até redução do volume em, aproximadamente, 20 mL;

4.8 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)

Ao final das etapas II, III e IV, amostra do efluente do reator foi coletada e analisada por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) com o objetivo de se avaliar os subprodutos gerados. Essa análise foi realizada de forma terceirizada pela empresa Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Para análise do *headspace*, as amostras foram aquecidas a 70°C por cinco minutos e os vapores gerados foram analisados por CG-EM. Já para análise da porção líquida (injeção direta da amostra), a amostra foi extraída em diclorometano, concentrada e analisada por CG-EM. O equipamento empregado foi espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear QP-5000 Shimadzu®. As condições empregadas foram as seguintes: coluna HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm); Hélio (99,99%) como gás de arraste (1 mL por min.); injetor a 280°C (modo Split 1:10); forno a 70°C (2 min.), 230°C (20°C por min.) e 230°C (50 min.), tempo de corrida 60 minutos e volume de amostra líquida 1 µL e gás 300 µL.

Para a identificação dos compostos detectados nos cromatogramas das amostras foi utilizada a base de dados de espectros de massas NIST105, NIST21 e WILEY139. Os picos que apresentaram relação sinal por ruído menor do que 3 ou índice de qualidade menor que 70% não foram indicados nas tabelas de resultados

4.9 Biologia Molecular

4.9.1 Armazenamento e extração do DNA

Previamente à extração de DNA, as amostras foram lavadas (3x) com tampão fosfato, seguida de centrifugação a 4°C por 3000 rpm durante 10 minutos. Após a lavagem, os *pellets* foram armazenados a -20°C para posterior extração.

O DNA foi extraído de acordo com Griffiths et al. (2000) modificado, utilizando-se fenol tamponado com Tris e clorofórmio. Na biomassa úmida (0,5 g) foi adicionado 0,3 g de *glass beads*, 1 mL de PBS, 1 mL de fenol tamponado com Tris e 1 mL de clorofórmio. Em

seguida, a amostra foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e centrifugada por 10 minutos a 6.000 rpm a 4°C. Retirou-se 1 mL do sobrenadante e adicionou-se 1 mL de fenol, a amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada nas mesmas condições iniciais. Logo em seguida, 800 µL do sobrenadante foram transferidos para tubo apropriado e o mesmo volume foi adicionado de clorofórmio. A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada nas mesmas condições iniciais. Esse mesmo procedimento foi realizado mais duas vezes (com adição de clorofórmio na mesma proporção do sobrenadante retirado). Por fim, aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo apropriado e a amostra de DNA foi armazenada a - 20°C.

4.9.2 Sequenciamento massivo

O sequenciamento massivo do gene RNAr 16S foi realizado por meio da plataforma Ion Torrent. As amostras de DNA purificado em concentração mínima de 10 ng/µL e pureza OD_{260/280} de no mínimo 1,8 foram enviadas a empresa de biotecnologia GenOne Biotechnologies, Rio de Janeiro-RJ. A quantificação e análise da pureza foram realizadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000. A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X e sua purificação realizada por meio do Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado em CHIP 318 V2 modo 400 pb. Os primers utilizados foram: 577F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') e 924R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3') que amplificam para a região V4, gerando um fragmento de tamanho médio de 347 pb (RDP's Pyrosequencing Pipeline: <http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp>).

4.9.2.1 Análise das sequências

As sequências obtidas na plataforma Ion Torrent foram analisadas utilizando-se as ferramentas disponíveis no site RDP's Pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu>; COLE et al., 2014), RDP's FunGene (<http://fungene.cme.msu.edu>; FISH et al., 2013) e Decipher Find Chimeras (<http://decipher.cee.wisc.edu>; WRIGHT et al., 2012). Programas auxiliares foram utilizados

para determinação das medidas de diversidade alfa e beta (PAST - http://folk.uio.no/ohammer/past/index_old.html; HAMMER et al., 2001), conversão de arquivos do formato .fastq para .fasta (Fastq2fasta - <http://www.blaststation.com/freestuff/en/fastq2fasta.php>) e visualização dos parâmetros de qualidade (FASTAQ; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), construção de dendograma a nível de família utilizando o índice de similaridade de Bray-curtis (MG-RAST, MEYER et al., 2008).

O processamento inicial das sequências envolveu a seleção de sequências maiores que 200 pares de bases e com coeficiente de qualidade maior que 20 (Phred), nesta etapa homopolímeros maiores que 6 e bases ambíguas foram removidas. Utilizou-se a ferramenta DECIPHER para a remoção de chimeras e o software INFERNAL (INFERENCE of RNA ALIGNment) para alinhamento das sequências. A determinação de OTUs (operation taxonomic units) foi realizada utilizando o software "complete linkage clustering" e o software "mcClust complete linkage clustering" como complemento. As sequências foram agrupadas em OTUs com três porcentagens de similaridade distintas (80% - nível de filo; 95% - nível de gênero e 97% - nível de espécie). Ressalta-se que para as análises taxonômicas a porcentagem de similaridade utilizada foi de 97%. Enquanto que as porcentagens de 80% e 95% foram utilizadas, exclusivamente, para a construção das curvas de rarefação (ferramenta rarefaction).

Os parâmetros de diversidade analisados foram: alfa e beta diversidade. A alfa-diversidade está relacionada com a diversidade dentro da amostra (intra-amstral) e permite responder quantas espécies estão presentes na amostra (riqueza) e como elas estão distribuídas (uniformidade). Para tanto, a alfa-diversidade está dividida em índices de diversidade que possibilitam avaliar, tanto a riqueza, como a abundância relativa de cada espécie e, estimadores de riqueza relacionados com o número total de espécie na amostra. A beta-diversidade corresponde ao grau em que a diversidade de duas ou mais amostras diferem entre si. Para tanto, o índice de beta-diversidade utilizado no trabalho foi Bray-Curtis que é fortemente influenciado pelas espécies dominantes. Seu cálculo é baseado nas diferenças absolutas e nas somas das abundâncias de cada espécie nas amostras (DELFORNO, 2014).

Para as análises dos índices de diversidade (alfa e beta) foram utilizados os resultados gerados na determinação de OTUs (97% de similaridade) que inclui OTUs com sequências únicas (Singletons). Enquanto, para a classificação taxonômica as Singletons foram removidas uma vez que podem representar erros (DICKIE, 2010). Tais erros advêm da baixa probabilidade de um sequenciamento massivo com alta cobertura amostral detectar apenas um único representante de uma espécie. Ressalta-se que a classificação taxonômica foi realizada

apenas das sequências representativas de cada OTU. Os limites de confiança (cut-off) adotados foram de 50 % para todos os níveis taxonômicos.

Para a construção da árvore filogenética, as sequências representativas de cada OTU foram relacionadas com banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências das OTUs e do NCBI foram alinhadas conjuntamente por meio do CLUSTAL W (HIGGINS et al., 1994). A construção da árvore filogenética foi realizada pelo método Neighbor-Joining (SAITOU e NEY, 1987), utilizando o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013) com análises de bootstrap baseadas em 1.000 reamostragens. (FELSENSTEIN, 1985).

Com o intuito de disponibilizar as sequências em um banco de dados internacional, todos os dados gerados, em seu estado bruto, foram depositados no European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk>). As sequências foram depositadas com número de projeto PRJEB7621, sob os seguintes números de acesso: ERS573648 (material suporte - etapa II), ERS573650 (material suporte - etapa III), ERS573652 (material suporte - etapa IV), ERS573649 (separador de fases - etapa II), ERS573651 (separador de fases - etapa III) e ERS573653 (separador de fases - etapa IV).

4.10 Análises estatísticas

Os valores das médias de eficiência de remoção de DQO e LAS, bem como de carga orgânica aplicada (COV), obtidos nas etapas de operação foram submetidos ao teste One-Way ANOVA para verificação de diferença significativa no conjunto de valores. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os valores obtidos para carga orgânica volumétrica (COV) foram plotados em box-plot.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da água residuária de lavanderia

Obteve-se entre 982 e 2.682 mg L⁻¹ de LAS na caracterização da água de lavanderia comercial (Tabela 5.1), resultando em diluições de 1:49 e 1:134 para se obter 20 mgLAS.L⁻¹ para alimentação do reator. Esse valor de LAS é observado em estações de tratamento de esgoto sanitário (1 a 21 mg.L⁻¹) (SCOTT e JONES 2000; MUNGRAY e KUMAR, 2009).

O valor de DQO na amostra 2 (2.502 mg DQO bruta.L⁻¹) foi ligeiramente superior ao valor obtido na amostra 1 (1.952 mg DQO bruta.L⁻¹), bem como o valor de concentração de LAS. Braga e Varesche (2014) observaram correlação positiva entre DQO e LAS na caracterização de água residuária de lavanderia comercial.

Observou-se 0,0895 g.L⁻¹ e 0,0355 g.L⁻¹ de sólidos suspensos totais para as amostras 1 e 2, respectivamente. Em ambas as amostras houve predomínio de sólidos suspensos voláteis em relação a sólidos suspensos fixos (Tabela 5.1).

Obteve-se pH levemente ácido de 6,16 e 6,86 para as amostras 1 e 2, respectivamente, provavelmente associado com a característica ácida do detergente utilizado pela lavanderia comercial. Baixos valores de alcalinidade foram observados de 23,1 e 19,5 mgCaCO₃.L⁻¹ para as amostras 1 e 2, respectivamente. Delforno et al. (2014) analisaram águas residuárias de outra lavanderia comercial de São Carlos (SP) e observaram alcalinidade total de 489±279 mgCaCO₃.L⁻¹. Todavia, a água residuária caracterizada por esses autores apresentou pH mais elevado (10±1), possivelmente relacionados à presença de alcalinizantes e neutralizantes nessa água.

Diversos ácidos orgânicos voláteis foram detectados, mas todos em baixas concentrações (Tabela 5.1). Ácido láctico foi observado em maior concentração na amostra 1 (93 mg.L⁻¹); este ácido orgânico é reportado na literatura como componente da formulação de detergentes (NARAYANAN et al., 2004).

Para os macro-nutrientes da água de lavanderia comercial, concentrações muito semelhantes àsquelas comumente encontradas em esgoto doméstico foram detectadas. Valores baixos de compostos nitrogenados foram observados nas amostras. N-amoniacal não foi observado na amostra 2. A concentração de NTK foi inferior na amostra 1 (7,7 mg.L⁻¹ e 35,9

mg.L⁻¹ nas amostras 1 e 2, respectivamente) e a concentração de nitrato variou entre 3,05 mg.L⁻¹ e 8,09 mg.L⁻¹ nas amostras 2 e 1, respectivamente. Fosfato foi detectado em concentração de 28,84 mg.L⁻¹ e 31,13mg.L⁻¹ para as amostras 1 e 2, respectivamente. Braga e Varesche (2014) encontraram concentrações de $7,0 \pm 10,8$ mg.L⁻¹ de N-amoniaco, $33,4 \pm 26,2$ de NTK mg.L⁻¹ e $8,4 \pm 6,8$ mg.L⁻¹ de nitrato, em caracterização de água residuária comercial da mesma lavanderia da cidade de São Carlos. As autoras atentam para o fato de que amônio e nitrato são raramente utilizados como contra-íons em detergentes e produtos de limpeza (ERIKSSON et al., 2002). Braga e Varesche (2014) encontraram concentração de fosfato de $94,6 \pm 75,4$ mg.L⁻¹.

A importância de detergentes de uso doméstico como uma fonte potencial de metais pesados tem sido reportada na literatura (AONGHUSA e GRAY, 2007). O cobre foi encontrado em 0,01 mg.L⁻¹ em ambas as amostras, enquanto as concentrações de zinco observadas foram entre 0,44 mg.L⁻¹ e 0,14 mg.L⁻¹ nas amostras 1 e 2, respectivamente. As concentrações de cobre em detergentes parecem ser universalmente baixas, enquanto as concentrações de zinco costumam variar significativamente entre as marcas (AONGHUSA e GRAY, 2007). Neste trabalho, o ferro foi o metal detectado em concentrações mais elevadas: 2,2 mg.L⁻¹ e 0,8 mg.L⁻¹ para amostras 1 e 2, respectivamente.

Outros metais foram identificados na caracterização da água de lavanderia via espectroscopia de absorção atômica, tais como níquel, manganês, cobre, cromo e ferro (Tabela 5.1). Braga e Varesche (2014) também encontraram diversidade de metais pesados em água residuária de lavanderia comercial, sendo os maiores valores reportados para zinco e ferro ($0,56 \pm 0,8$ mg.L⁻¹, $0,22 \pm 0,2$ mg.L⁻¹, respectivamente).

Tabela 5.1- Valores dos parâmetros físico-químicos de caracterização da água residuária de lavanderia comercial empregada na alimentação do reator

Parâmetros		Amostra 1	Amostra 2
Metais pesados (mg.L ⁻¹) Ácidos orgânicos voláteis (mgHAc.L ⁻¹)	LAS (mg.L ⁻¹)	982	2.682
	DQO bruta (mg.L ⁻¹)	1.952	2.502
	DQO filtrada (mg.L ⁻¹)	1.542	2.300
	pH	6,16	6,86
	Alcalinidade Total (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	23,1	19,5
	Sulfato (mg.L ⁻¹)	231,1	5,34
	Sólidos suspensos totais (g.L ⁻¹)	0,0895	0,0355
	Sólidos suspensos fixos (g.L ⁻¹)	0,0095	0,0025
	Sólidos suspensos voláteis (g.L ⁻¹)	0,08	0,03
	Fluoreto (mg.L ⁻¹)	0,6	0
	Cloreto (mg.L ⁻¹)	121,6	12,8
	Fosfato (mg.L ⁻¹)	28,84	31,13
	Amônia (mg.L ⁻¹)	2,33	0
	Nitrato (mg.L ⁻¹)	8,09	3,05
	NTK (mg.L ⁻¹)	35,9	7,7
	Ácido cítrico	2,0	0,0
	Ácido málico	2,1	0,0
	Ácido succínico	5,1	0,4
	Ácido láctico	93,0	3,1
	Ácido fórmico	2,3	0,0
	Ácido acético	3,8	4,2
	Ácido propiônico	23,7	0,0
	Ácido isobutírico	1,8	7,5
	Ácido butírico	4,1	0,0
	Ácido isovalérico	7,5	0,0
	Zinco	0,44	0,14
	Níquel	0,02	0,01
	Ferro	2,2	0,8
	Manganês	0,09	0,02
	Cobre	0,01	0,01
	Cromo	0,05	0,03

5.2 Inoculação do Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado

Durante a reinoculação do reator foi realizado o monitoramento da DQO filtrada (Figura 5.1). Os dias de suplementação da DQO estão marcados na Figura 5.1 por setas vermelhas. Procedimento semelhante a este foi adotado por Oliveira et al. (2010) e Braga (2014) para inoculação de RALF com inóculo oriundo de UASB empregado no tratamento de dejetos de suinocultura.

Figura 5.1-Suplementação e consumo da DQO filtrada durante a inoculação do RALF

5.3 Remoção de DQO

Durante todo o período de operação (330 dias) de operação do RALF observou-se elevada eficiência de remoção de DQO filtrada (Tabela 5.2). Na ausência de surfactante durante a etapa de adaptação da biomassa (etapa I), observou-se remoção de DQO de $82,9 \pm 13,6\%$ para $683,9 \pm 110,4$ mg DQO.L⁻¹ afluyente. Após a adição de água de lavanderia contendo LAS, observou-se elevada remoção de matéria orgânica em termos de DQO, atingindo $93,9 \pm 5,0\%$ na última etapa de operação (etapa IV) para $629,7 \pm 166,2$ mg DQO. L⁻¹ afluyente na ausência de fonte suplementar de carbono.

Tabela 5.2-Valores de DQO afluente e efluente, COV e eficiência de remoção de DQO para as etapas I, II, III e IV

Etapa	Tempo de operação	Fonte suplementar de carbono	DQO afluente (mg. L⁻¹)	DQO efluente (mg.L⁻¹)	COV (mgDQO.L⁻¹.d⁻¹)	Remoção (%)
I	45	Sacarose+etanol	683,9±110,4	110,1±71,7	911,9±147,2	82,9±13,6
II	113	Sacarose+etanol	872,3±141,8	100,1±26,2	1.163,1±189,0	88,3±3,0
III	94	Etanol	705,0±155,8	75,8±41,0	940,0±207,7	89,2±5,4
IV	78	-	629,7±166,2	32,1±28,3	839,6±226,3	93,9±5,0

De fato, assim como Duarte et al. (2008) e Oliveira et al. (2010), que estudaram a degradação do LAS em diferentes configurações reacionais, observou-se não haver interferência na remoção de matéria orgânica devido à presença do surfactante ou dos demais compostos da água residuária de lavanderia comercial (BRAGA, 2014; DELFORNO et al., 2014) ou sabão em pó (CAROSIA et al., 2014).

Elevadas eficiências de remoção de DQO foram obtidas em configuração reacional semelhante à do presente trabalho (RALF). Oliveira et al. (2010), por exemplo, obtiveram remoção de matéria orgânica de 91±3% para 665±50 mgDQO.L⁻¹ afluente empregando sacarose e extrato de levedura como co-substratos e TDH de 18 horas para 24,4±3,7 mg.L⁻¹ de LAS padrão afluente. Braga (2014) obteve 90,9±3,3% de eficiência de remoção para 686±93 mg.L⁻¹ de DQO afluente. Essa autora utilizou água residuária de lavanderia comercial diluída contendo 23,34±5,49 mg.L⁻¹ de LAS, sacarose e extrato de levedura como co-substratos e TDH de 18 horas.

Apesar de a DQO teórica afluente ter sido proposta a fim de manter a mesma carga orgânica volumétrica (COV) aplicada ao longo das etapas, esta foi ligeiramente mais elevada na etapa II, na presença de água de lavanderia comercial, quando se empregou sacarose e etanol na composição do substrato sintético (1.163,1±189,0 mgDQO.L⁻¹.d⁻¹). Entre as demais etapas de operação (etapas I, III e IV), não foi verificada diferença significativa na COV aplicada (Teste One-Way ANOVA; p<0,05; Figura 5.2). Ressalta-se que na etapa II foi utilizada a amostra de água residuária de lavanderia comercial 1 (caracterização no item 5.1). Esta amostra foi menos diluída que a amostra utilizada nas demais etapas para atingir concentração de LAS próxima de 20 mg.L⁻¹ e, portanto, pode ter contribuído com mais DQO.

Reator anaeróbio de leito fluidificado é comumente operado com carga orgânica na faixa de 20 a 27 kgDQO. $\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (ARMENANTE, 1993). Todavia, neste trabalho, aplicou-se carga orgânica volumétrica entre 0,84 e 1,2 kgDQO. $\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, ou seja, muito baixa se comparada à potencialidade que esse reator pode suportar.

Figura 5.2- Box-plot da carga orgânica volumétrica aplicada nas etapas de operação I, II, III e IV

No entanto, não foi observada influência da carga orgânica volumétrica aplicada ou da fonte suplementar de carbono empregada na eficiência de remoção de DQO, uma vez que os valores de eficiência de remoção foram elevados e próximos entre si para todas as etapas. Nas etapas II e III, a eficiência de remoção de DQO foi de $88,3 \pm 3,0\%$ e $89,2 \pm 5,4\%$ para $872,3 \pm 141,8 \text{ mg.L}^{-1}$ e $705,0 \pm 155,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de DQO afluente, respectivamente.

Okada et al. (2013b) observaram variação na remoção de DQO entre 63% e 96% em reator UASB empregado no estudo da remoção de LAS (aproximadamente 12 mg.L^{-1} afluente; TDH próximo de 35 horas). Os autores atribuíram a melhor remoção à maior concentração de DQO afluente (96%; $3.458 \text{ mg DQO.L}^{-1}$ afluente) e a pior para menor concentração (63%; 57 mg DQO.L^{-1}). Todavia, observa-se que no caso do trabalho citado houve uma diferença mais acentuada entre as cargas aplicadas.

A eficiência de remoção de matéria orgânica em sistemas de tratamento biológico está associada à capacidade da biomassa bacteriana adaptar-se às oscilações inerentes ao sistema, tais como flutuações de carga orgânica aplicada, tóxicos, substrato, entre outras.

O RALF é reportado na literatura como uma boa alternativa no tratamento anaeróbio de água residuária com baixa DQO (SHIN et al., 2011), uma vez que favorece elevada transferência de massa de substrato para o biofilme aderido ao material suporte, possui baixo potencial de entupimento e de curto-circuito do fluxo e um bom potencial para reter elevada concentração de biomassa, resultando assim em longo tempo de retenção de sólidos, mesmo em altas taxas de fluxo ascendente e baixos TDHs (RITTMAN e MCCARTY, 2001). Ainda nesse sentido, de acordo com Mihelcic (1999), a vantagem de configurações que se aproximam do modelo CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) é que a diluição do líquido interno ao reator, neste caso mantido pela alta razão de recirculação, permite que o sistema suporte variações na concentração afluente, além de ser indicado para tratamento de compostos tóxicos.

Deste modo, as características hidrodinâmicas do RALF provavelmente favoreceram seu desempenho no sentido de estabilidade na eficiência de remoção de DQO, quando comparado a outras configurações reacionais, tais como UASB empregado por Okada et al. (2013b). Além disso, no RALF, o crescimento da biomassa aderida ao material suporte não requer condições nutricionais tão específicas quanto às necessárias na manutenção e organização estrutural de grânulos característicos de UASB e que, portanto, podem ser mais susceptíveis às variações de cargas orgânicas.

Ressalta-se ainda que Okada et al. (2013b) utilizaram quantidade reduzida de co-substrato (extrato de levedura, etanol e metanol) na etapa em que obtiveram baixa remoção de DQO. Ferreira (2012), ao utilizar RALF e menores concentrações de extrato de levedura (400 mg.L^{-1}) na presença de $16,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS, também observou menores eficiências de remoção de DQO ($77,7 \pm 6,8\%$) que as costumeiramente obtidas para esta configuração reacional.

O extrato de levedura é um co-substrato muito utilizado na remoção de compostos tóxicos por ser fonte rica de nitrogênio, carboidratos, vitaminas do complexo B e aminoácidos (KHLEIFAT, 2006).

Deste modo, em relação a este trabalho, a suplementação com solução de sais, extrato de levedura e – excetuando-se a etapa IV – sacarose ou etanol como fonte de carbono adicional foi suficiente para atingir remoção de matéria orgânica satisfatória, embora Jefferson et al. (2001) mencionam que a deficiência em macro e micronutrientes nas águas de

lavanderia possa limitar a eficiência do tratamento pelo processo biológico. No caso da etapa IV do presente trabalho, isso não aconteceu; ou seja, embora para menor COV aplicada ($839,6 \pm 226,3 \text{ mgDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), obteve-se a maior remoção ($93,9 \pm 5,0\%$), em relação as demais etapas. Provavelmente, esse aspecto foi devido à organização estrutural de biofilme maduro constituído durante 252 dias de operação, com a suplementação das fontes orgânicas, com destaque para a etapa III, com etanol, cujos valores foram próximos àquele obtido para a última etapa.

Na Figura 5.3 pode-se observar a variação temporal da DQO afluente e efluente, bem como da eficiência de remoção ao longo do tempo de operação.

Figura 5.3-Variação temporal da DQO afluente, efluente e eficiência de remoção

5.4 Remoção de LAS

Na etapa II, após a adição de água de lavanderia contendo $18,2 \pm 11,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS afluente, a remoção de LAS foi de $51,7 \pm 23,9\%$. Na etapa III, após a substituição da mistura de sacarose e etanol (etapa II) por somente etanol, na presença de $25,4 \pm 8,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS afluente, a eficiência de remoção do surfactante foi mais elevada; ou seja, de $72,9 \pm 18,8\%$ (Tabela 5.3). A COV aplicada na etapa III foi menor (item 5.3). Okada et al. (2013b) sugerem que menores cargas orgânicas específicas podem favorecer a remoção do surfactante. No entanto, quando considerado o desvio padrão nas médias aplicadas, observa-se que essa

diferença, embora tenha ocorrido, não foi tão expressiva (a DQO afluente na etapa III correspondeu a somente 1,24 vezes a DQO afluente da etapa II). Okada et al. (2013b) observaram influência significativa para variações afluentes da ordem de 61 vezes (37% para 3.458 mg DQO.L⁻¹ ou 0,18 ± 0,06 g DQO/g STV.d e 76% para 57 mg DQO.L⁻¹ ou 0,03 ± 0,01 g DQO/g STV.d).

Na etapa IV, para 20,4±5,8 mg. L⁻¹ de LAS afluente na ausência de fonte adicional de carbono, a eficiência de remoção do surfactante foi tão elevada quanto na presença de somente etanol como fonte adicional de carbono, obtendo-se 76,8±16,9%, ou seja, não houve diferença significativa (p<0,05) na eficiência de remoção de LAS nas etapas III e IV. A COV aplicada também não variou significativamente entre essas etapas, respectivamente de 940,0±207,7 mgDQO/L.d e 839,6±226,3 mgDQO/L.d.

Deve-se considerar também que, provavelmente, nas duas últimas etapas de operação (etapas III e IV), a biomassa já estava mais bem estabelecida e adaptada à presença do tóxico, o que pode ter contribuído para o aumento na eficiência de remoção do LAS. Todavia, embora esta hipótese seja válida, não explica por si só o aumento na eficiência de remoção do LAS, visto que Braga (2014) observou decréscimo da eficiência de remoção do surfactante para concentração afluente próxima deste trabalho (20 mg.L⁻¹) ao longo do tempo de operação mesmo com aumento do TDH de 18 horas para 24 horas.

Tabela 5.3 - Valores de LAS afluente e efluente, COV e eficiência de remoção de LAS para as etapas II, III e IV

Etapa	Fonte suplementar de carbono	COV (mgDQO.L⁻¹.d⁻¹)	LAS afluente (mg.L⁻¹)	LAS efluente (mg.L⁻¹)	Remoção (%)
I	Sacarose+etanol	911,9±147,2	-	-	-
II	Sacarose+etanol	1.163,1±189,0	18,2±11,5	8,3±5,9	51,7±23,9
III	Etanol	940,0±207,7	25,4±8,8	6,0±3,8	72,9±18,8
IV	-	839,6±226,3	20,4±5,8	4,2±2,7	76,8±16,9

A substituição do carboidrato (sacarose) na composição do substrato sintético por somente um álcool de cadeia curta (etanol) parece ter favorecido a remoção de LAS. O co-metabolismo é um exemplo da influência que fontes de carbono secundário prontamente

degradáveis podem exercer na degradação de poluentes ambientais (SHIMP e PFAENDER 1985; SINHA et al. 2009). O etanol é uma fonte de carbono secundário facilmente degradável, enquanto a sacarose é um dissacarídeo formado por dois açúcares (glicose e frutose) que necessita de algumas enzimas específicas para ser quebrada em dois monossacarídeos facilmente degradáveis. Além disso, Schörberl (1989) verificou a reativação de bactérias degradadoras de LAS na presença de álcool alifático, tal como etanol. Consequentemente, este álcool pode estimular a recuperação de algumas populações de bactérias responsáveis pela degradação do LAS, além de possibilitar o crescimento de outras devido à sua fácil metabolização.

Braga (2014) avaliou a remoção de LAS em RALF com TDH de 18h. A autora utilizou água residuária de lavanderia comercial contendo $23,3 \pm 5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS e somente sacarose na composição do substrato sintético (idêntico ao deste estudo, contendo sais, extrato de levedura, bicarbonato de sódio) com COV aplicada de $917,5 \pm 124,2 \text{ mgDQO.L.dia}^{-1}$. A eficiência de remoção de LAS foi de $65,3 \pm 14,3\%$, ou seja, ligeiramente superior à obtida na etapa II ($51,7 \pm 23,9\%$) deste trabalho na presença de sacarose e etanol. No entanto, foi inferior à remoção que se obteve na etapa III na presença exclusiva de etanol ($72,9 \pm 18,8\%$). Delforno et al. (2012) também observaram maior eficiência de remoção de LAS (74 %) em reator EGSB utilizando álcool de cadeia curta (etanol e metanol). Portanto, etanol como fonte adicional de carbono favoreceu a remoção de LAS em água de lavanderia na configuração reacional em estudo, comparativamente ao emprego da sacarose.

Por outro lado, Oliveira et al. (2010) verificaram $93 \pm 2\%$ de remoção de LAS padrão em mesma configuração reacional para $24,4 \pm 3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS afluente. Em relação à influência da fonte de LAS, Okada et al. (2014) verificaram maior remoção de LAS em água residuária de lavanderia (82 %) do que em meio sintético com LAS Padrão (45%). Segundo os autores, a degradação do LAS em água residuária pode ter sido favorecida pela diversidade e baixa concentração de co-substratos (ácidos orgânicos voláteis). Todavia, Carosia et al. (2014) verificaram, em RALF com sabão em pó como fonte de LAS ($14,4 \text{ mgLAS.L}^{-1}$), a interferência na remoção de LAS, principalmente devido à presença de coadjuvantes que inibem alguns microrganismos. Sob tais condições, a remoção de LAS obtida foi de 48%.

Braga (2014), após quatro etapas de operação na presença de substrato sintético contendo sacarose como co-substrato, avaliou a eficiência de remoção do LAS em RALF na ausência de sacarose. A autora observou redução na eficiência de remoção para $39,3 \pm 20,6\%$ na presença de $27,9 \pm 9,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS afluente e COV aplicada de $893,9 \pm 213,4 \text{ mgDQO.L.dia}^{-1}$. O fato da remoção de LAS ter permanecido elevada neste trabalho, após a

retirada das fontes adicionais de carbono, na etapa IV, sugere que o etanol pode ser uma fonte de carbono mais adequada na adaptação da biomassa degradadora de LAS do que a sacarose. Em consequência da retirada das fontes adicionais de carbono na etapa IV, essa biomassa degradadora de LAS adaptada na presença de etanol pode ter sido favorecida na etapa IV em detrimento de outras bactérias presentes no sistema, uma vez que essas bactérias podem utilizar a molécula do surfactante como fonte de carbono e energia (SANZ et al., 2003).

Outros autores também observaram favorecimento da remoção de LAS na ausência de co-substrato metabólico como Sanz et al. (2003) e Duarte et al. (2010a). No entanto, para essas pesquisas verificou-se redução da carga orgânica aplicada na retirada do co-substrato, o que pode justificar o aumento na eficiência de remoção (OKADA et al., 2013b). No caso de Braga (2014) e do presente trabalho, a carga orgânica foi mantida praticamente constante ao longo das etapas de operação devido a adição de extrato de levedura.

A relação entre carga média de LAS removida por carga média de LAS aplicada (CR/CA) foi de $0,52 \pm 0,24$ na etapa II, $0,73 \pm 0,19$ na etapa III e $0,77 \pm 0,17$ na etapa IV (Tabela 5.4). Logo, para a maior relação, obteve-se maior remoção de LAS, $76,8 \pm 16,9\%$, na etapa IV. Braga (2014), empregando sacarose em RALF para tratar água residuária de lavanderia contendo LAS, obteve relação de 0,7 para LAS afluyente de $9,5 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}$; quando a concentração de LAS afluyente foi elevada para $23,34 \pm 5,49 \text{ mg.L}^{-1}$, a relação decresceu para 0,6, sendo que foi reduzida a 0,4 após a retirada da sacarose da alimentação.

Delforno et al. (2012) obtiveram relação entre 0,2 e 0,6 em EGSB com TDH de 26 horas para remoção de LAS ($14,4 \pm 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Os autores registraram, nessas condições, eficiência média de remoção de LAS de $47,8 \pm 6,2\%$.

Tabela 5.4-Carga aplicada (CA), carga removida (CR) e relação CR/CA para o LAS

Etapa	CA	CR	CR/CA
	(mgLAS.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	(mgLAS.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	
II	$24,3 \pm 15,3$	$13,2 \pm 11,3$	$0,52 \pm 0,24$
III	$33,8 \pm 11,8$	$25,8 \pm 12,1$	$0,73 \pm 0,19$
IV	$27,2 \pm 7,9$	$21,5 \pm 9,2$	$0,77 \pm 0,17$

A contribuição do LAS na carga orgânica volumétrica aplicada ao reator foi de 2,1 a 3,6% para todas as etapas de operação (Tabela 5.5).

Tabela 5.5-Contribuição do LAS na COV aplicada ao reator

Etapa	COV aplicada (mgDQO.L⁻¹.d⁻¹)	CA (mgLAS.L.dia⁻¹)	Contribuição do LAS (%)
II	1.163,1±189,0	24,3±15,3	2,1%
III	940,0±207,7	33,8±11,8	3,6%
IV	839,6±226,3	27,2±7,9	3,3%

5.5 Monitoramento de pH e alcalinidade

Os valores de pH médio foram próximos à neutralidade para o afluente e ligeiramente básicos para o efluente em todas as etapas (Tabela 5.6), portanto dentro do intervalo considerado conveniente para o bom funcionamento do reator (HIDALGO; GARCÍA-ENCINA, 2002). Segundo os referenciados autores, pH inferior a 6 provoca inativação da biomassa, enquanto pH maior que 8,5 promove o arraste de parte dos microrganismos do sistema. Convém registrar, entretanto, que no experimento realizado por esses autores, ácido acético foi empregado como única fonte de carbono.

Tabela 5.6-Valores de pH afluente e efluente para as etapas I, II, III e IV

pH	etapa I	etapa II	etapa III	etapa IV
Afluente	7,4±0,3	7,1±0,2	7,2±0,1	7,4±0,2
Efluente	8,2±0,1	8,2±0,1	8,2±0,2	8,1±0,3

Observou-se ligeiro consumo de alcalinidade nas três primeiras etapas de operação do reator (Tabela 5.7), assim como observado por Oliveira et al. (2013) em mesma configuração reacional empregada para remoção de LAS padrão. Na última etapa de operação, no entanto, foi observada geração de alcalinidade, o que é um bom indício de estabilidade do processo anaeróbio. Desta forma, o longo tempo de operação atingido na última etapa pode ter

favorecido essa estabilidade reacional. Ademais, a retirada da fonte de carbono não afetou a estabilidade do sistema.

Os valores de alcalinidade total observados por Oliveira et al. (2013) foram inferiores ao do presente trabalho, sendo de 164 e 154 $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para afluente e efluente, respectivamente, quando utilizado $24,4\pm 3,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de LAS afluente.

Carosia et al. (2014), em estudo da degradação do LAS em detergente em pó para mesma configuração reacional com $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de LAS afluente, verificaram valores de alcalinidade total maiores no efluente, ou seja, $334\pm 70 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ afluente e $436\pm 57 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ efluente. Assim como a água de lavanderia, o sabão em pó possui outros componentes (coadjuvantes, sinergistas, tamponantes, branqueador óptico, corantes, enzimas, fragância etc.), que, da mesma forma como os demais compostos presentes água de lavanderia, interagem no processo.

Tabela 5.7-Valores de alcalinidade parcial, intermediária e a bicarbonato para as etapas I, II, III e IV

		Alcalinidade ($\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)			
		Total	Parcial	Intermediária	Bicarbonato
etapa I	Afluente	$321,9\pm 60,0$	$219,2\pm 50,9$	$102,7\pm 12,6$	-
	Efluente	$299,3\pm 100,8$	$219,2\pm 72,4$	$80,2\pm 29,3$	$308,21\pm 98,9$
etapa II	Afluente	$275,9\pm 29,8$	$175,6\pm 19,2$	$100,3\pm 25,0$	-
	Efluente	$247,8\pm 39,6$	$184,1\pm 28,1$	$63,7\pm 19,0$	$236,7\pm 43,1$
etapa III	Afluente	$341,3\pm 81,1$	$225,1\pm 52,0$	$116,2\pm 30,0$	-
	Efluente	$263,4\pm 43,2$	$201,8\pm 34,5$	$61,5\pm 13,0$	$249,6\pm 52,6$
etapa IV	Afluente	$412,9\pm 61,2$	$295,9\pm 43,7$	$117,0\pm 24,7$	-
	Efluente	$466,3\pm 71,4$	$363,9\pm 56,0$	$102,4\pm 26,1$	$446,4\pm 68,8$

Braga (2014) observou alcalinidade total de $274\pm 17 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ e $350\pm 51 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ em RALF empregado para tratar água residuária de lavanderia comercial ($23,34\pm 5,49 \text{ mgLAS}\cdot\text{L}^{-1}$).

Houve variação nos valores da alcalinidade a bicarbonato ao longo do tempo de operação (Tabela 5.7). No entanto, verificou-se efeito tampão devido à alcalinidade a bicarbonato e a manutenção do pH ligeiramente alcalino e próximo à neutralidade em todas as etapas.

Oliveira et al. (2013), ao utilizarem a mesma configuração reacional e o mesmo inóculo para remoção do LAS padrão ($24,4 \pm 3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS afluente), registraram valor inferior à alcalinidade a bicarbonato, em relação a obtida neste trabalho ($143 \pm 12 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$). No entanto, em outras pesquisas sobre degradação anaeróbia do mesmo surfactante, empregando reator horizontal de leito fixo (DUARTE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009) verificaram-se valores de alcalinidade a bicarbonato sempre acima de $300 \text{ mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$ em todos os estágios de operação para substrato sintético contendo sacarose e LAS.

A alcalinidade parcial pode ser grosseiramente atribuída à alcalinidade a bicarbonato (JENKINS et al., 1983). Neste trabalho, os valores de alcalinidade a bicarbonato foram calculados utilizando-se os valores de ácidos orgânicos voláteis obtidos por cromatografia gasosa (PENTEADO et al., 2013), sendo ligeiramente superiores aos obtidos para alcalinidade parcial.

De acordo com Ripley et al. (1986), a razão alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial fornece indicador bastante conveniente da estabilidade do sistema, sendo alcalinidade intermediária fornecida pela titulação da amostra entre pH 5,75 e 4,30. Soma-se a isso o fato da razão ser parâmetro adimensional, o que, segundo os autores, evita erros analíticos. A referida razão foi calculada para todas as etapas de operação utilizando-se os valores da Tabela 5.8.

Tabela 5.8-Razão entre a alcalinidade intermediária e parcial no reator (AI/AP) para as etapas I, II, III e IV

AI/AP	etapa I	etapa II	etapa III	etapa IV
	$0,36 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,10$	$0,31 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,07$

Durante todo o período de operação, os valores observados foram próximos a 0,3, obtendo-se, por conseguinte, estabilidade do reator.

5.6 Monitoramento de ácidos orgânicos voláteis

Em reatores anaeróbios biológicos, o acúmulo de ácidos orgânicos voláteis indica desbalanceamento entre as velocidades de consumo de matéria orgânica por diferentes populações de bactérias. Portanto, é essencial a estabilidade do reator para a obtenção de maiores taxas de remoção dos surfactantes de água residuária de lavanderia. Não foram observados valores de ácidos orgânicos voláteis que indicassem desbalanceamento do sistema. Na etapa I, na ausência do surfactante, foi observada a maior concentração ($20,0 \pm 17,5$ mgHAc.L⁻¹) de ácidos orgânicos voláteis (Tabela 5.9).

Tabela 5.9-Concentração de ácidos orgânicos voláteis para as etapas I, II, III e IV

AOV (mgHAc.L ⁻¹)	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV
	20,0±17,5	14,3±21,7	11,0±20,1	13,9±21,6

Figura 5.4- Porcentagem de ácidos orgânicos voláteis para as etapas I, II, III e IV

Na etapa I, observou-se o predomínio de ácido láctico ($4,79$ mgHAc.L⁻¹) seguido dos ácidos isobutírico ($4,31$ mgHAc.L⁻¹) e propiônico ($2,24$ mgHAc.L⁻¹). Na etapa II, observou-se o predomínio de ácido isobutírico ($3,61$ mgHAc.L⁻¹), seguido dos ácidos valérico ($3,10$

mgHAc.L⁻¹) e isovalérico. Na etapa III e IV, verificou-se predominância do ácido capríico (4,12 mgHAc.L⁻¹ e 5,64 mgHAc.L⁻¹, respectivamente) seguido de ácido butírico na etapa III (1,65 mgHAc.L⁻¹) e ácido valérico na etapa IV (5,26 mgHAc.L⁻¹) (Figura 5.4).

Portanto, para diferentes configurações reacionais empregadas na remoção de LAS, os valores de ácidos orgânicos voláteis mantiveram-se sempre baixos.

Okada et al. (2013c) relacionaram a concentração de ácido acético no efluente com a remoção de LAS. Os autores observaram 49±4% e 29±6% de eficiência de remoção de LAS em ESGB e UASB, respectivamente. Esses autores relacionaram a maior eficiência de remoção LAS no ESGB à baixa concentração de ácido acético no efluente do reator (1-22 mg L⁻¹). Neste estudo, a concentração de ácido acético no efluente foi menor do que 5 mg L⁻¹ em todas as etapas de operação e a eficiência média de remoção foi maior (mínimo de 51,7% de remoção na etapa II) do que a obtida por Okada et al. (2013). Por meio da aplicação do RALF, é possível obter alta taxa de recirculação, assim como para ESGB, o que melhora o contato do substrato com a biomassa e facilita a utilização de substratos, tais como os ácidos orgânicos voláteis gerados na digestão anaeróbia.

5.7 Sólidos Suspensos Totais

O fluxo de sólidos em sistemas anaeróbios (entrada, saída e permanência) está intimamente relacionado à estabilidade do processo anaeróbio e, portanto, trata-se de um importante parâmetro de monitoramento.

Segundo Sanz e Polanco (1990), o reator anaeróbio de leito fluidificado parece ser o mais promissor para tratamento de águas residuárias de baixa carga, como esgoto doméstico, uma vez que o processo mantém grande massa de microrganismos ativos e efetiva remoção de sólidos suspensos totais.

Houve decréscimo na concentração de sólidos suspensos voláteis ao longo da operação, o que pode refletir o equilíbrio reacional atingido (Tabela 5.10). Para as etapas em que ocorreu a maior eficiência de remoção de LAS, houve as menores produções de SSV (etapas III e IV; 0,029±0,014 g.L⁻¹ e 0,031±0,032 g.L⁻¹, respectivamente).

Tabela 5.10-Valores de sólidos suspensos efluente

Sólidos Suspensos (g.L⁻¹)	SST	SSF	SSV
etapa I	0,085±0,038	0,0012±0,0009	0,084±0,039
etapa II	0,045±0,012	0,0048±0,006	0,042±0,013
etapa III	0,045±0,025	0,016±0,011	0,029±0,014
etapa IV	0,032±0,033	0,001±0,001	0,031±0,032

Ao contrário, Braga (2014) observou aumento de 83,3% dos SS após a adição da água de lavanderia comercial (0,036±0,01 gSST.L⁻¹ e 0,033±0,01 gSSV.L⁻¹ para adaptação e 0,066±0,05 gSST.L⁻¹ e 0,059±0,04 gSSV.L⁻¹ após adição da água de lavanderia).

Carosia et al. (2014) constataram 0,052±0,02 gSST.L⁻¹ e 0,05±0,02 gSSV.L⁻¹ ao operar reator de leito fluidificado com 14,4±3,5 de LAS.

Delforno (2011) constatou valores de sólidos suspensos próximos (0,064 g.L⁻¹ de SST e 0,045 g.L⁻¹ de SSV) ao utilizar 14,4±1,0 mg.L⁻¹ de LAS e TDH de 26 horas em reator EGSB.

5.8 Balanço de massa

O balanço de massa global para o LAS foi realizado a fim de se determinar a fração do surfactante biodegradada. Ressalta-se que este cálculo não pode ser realizado apenas considerando o que está em solução devido à capacidade de adsorção deste composto. Além do mais, um reator em escala de bancada é sensível à retirada de amostras, inviabilizando que o balanço de massa seja feito a cada etapa de operação.

Tabela 5.11-Fração de LAS removido e biodegradado no RALF

Entrada (mg)	Saída (mg)	Remoção (%)	Adsorvido (mg)	Degradado (%)
7.861,00	2.323,71	70,44	63,59	69,63

Desta forma, o ensaio de adsorção serviu para se determinar a quantidade de LAS adsorvido no sistema ao final da operação do reator, ou seja, após 330 dias de operação.

Braga (2014) não verificou LAS adsorvido na biomassa proveniente de reator UASB empregado no tratamento de dejetos de suinocultura e usada como inóculo do RALF. O LAS presente no afluente e efluente em solução foi quantificado ao longo de todo o período de operação, enquanto o LAS adsorvido na biomassa desenvolvida no separador de fases, na biomassa efluente, na biomassa do material suporte e no material suporte foi quantificado ao final da última etapa operacional.

Por meio do balanço de massa foi verificado que 69,63% do LAS adicionado ao reator foram removidos por degradação biológica. Durante o período de operação, o reator recebeu 7.861 mg de LAS, sendo que 2.323,71 mg foram observados no efluente (Tabela 5.11). A partir do total de LAS removido ao longo de todo o período de operação, 0,81% foram removidos por adsorção, sendo que a maior porcentagem do LAS adsorvido foi obtida na biomassa efluente, correspondendo a, aproximadamente, 52% do total adsorvido (33,1 mg). Do restante adsorvido, 21% ficou na biomassa do separador de fases (13,4 mg), 17,2% na areia (10,95 mg) e 9,7% na biomassa da areia (6,15 mg).

Oliveira et al. (2013) avaliaram a remoção de LAS em reator anaeróbico de leito fluidificado com areia como material suporte, TDH de 18 horas e sacarose e extrato de levedura como co-substratos. Os autores obtiveram em média 93% de biodegradação para 8 a 46 mg.L⁻¹ de LAS afluente. Provavelmente, essa alta eficiência foi devida à utilização somente de LAS padrão na composição do substrato sintético.

Carosia et al. (2014), ao avaliar a remoção de 14,4±3,5 mg.L⁻¹ de LAS presente em sabão em pó comercial, verificaram por meio do balanço de massa final que 42,4% do LAS adicionado ao reator foram removidos por degradação biológica, 0,9% ficaram adsorvidos na biomassa do leito e 4,5% adsorvidos na biomassa efluente.

Braga (2014), por meio do balanço de massa, verificou que 56,9% do LAS adicionado no reator foram removidos por degradação biológica, e 1,63% ficaram adsorvidos na areia, na biomassa do separador de fases, na biomassa do distribuidor e na biomassa efluente. Dentre a quantidade adsorvida, 97,84% do LAS ficaram adsorvidos na biomassa efluente (0,174 g), 1,49% na biomassa do separador de fases (0,0026 g), 0,55% na areia (0,001g) e 0,12 % na biomassa do distribuidor.

Delforno (2014) ressaltaram que compostos presentes na água de lavanderia como EDTA e heptanoato de sódio (BRAGA e VARESCHE, 2014 e CAROSIA et al., 2014) têm a função de complexar íons responsáveis pela dureza da água, principalmente cálcio e

magnésio. Estes íons, por sua vez, podem favorecer a adsorção de LAS (WESTALL et al., 1999) e, uma vez complexados, deixam de favorecer esta adsorção. Desta forma, LAS oriundo de água de lavanderia teria menor tendência de adsorver. No entanto, para a configuração reacional em questão, (RALF) a adsorção foi maior para os experimentos com água residuária de lavanderia, ainda que tenha sido baixa.

5.9 Sulfato, nitrato, nitrito e fosfato

Tabela 5.12-Concentrações de nitrato, nitrito, fosfato e sulfato afluente e efluente para as etapas II, III e IV

		Nitrato	Nitrito	Fosfato	Sulfato
etapa II	Afluente	0,4±0,08	0,6±0,08	7,9±4,1	5,0±3,1
	Efluente	34,9±32,1	4,4±4,1	7,1±1,2	19,8±29,1
etapa III	Afluente	-	3,3±1,4	20,4±6,1	17,2±23,2
	Efluente	25,7±29,0	9,4±5,3	15,8±3,1	17,3±18,3
etapa IV	Afluente	-	3,8±1,9	20,4±12,8	10,2±12,3
	Efluente	3,9±1,6	17,4±4,1	15,0±3,4	9,3±6,3

Na primeira etapa de operação, após a adição do LAS observou-se maiores valores de sulfato efluente (Tabela 5.12). Nesta etapa pode ter ocorrido a lise da molécula de LAS pelos microrganismos e consequente liberação do grupo sulfonado ao meio líquido. Alguns pesquisadores observaram que a liberação de sulfato, proveniente da ruptura do anel aromático e, consequentemente, dessulfonação, são os estágios finais da rota de degradação do LAS (SCHÖBERL, 1989; PERALES et al., 2007). Por meio do sequenciamento massivo via plataforma Ion-Torrent, foram identificados os gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Clostridium* e *Dechloromonas*, que possuem espécies capazes de reações de dessulfonação (KERTESZ et al., 1994; COOK et al., 1998; OKADA, 2012).

No entanto, nas etapas III e IV, não houve diferença significativa neste parâmetro para afluente e efluente. Segundo Oliveira et al. (2009), o sulfato disponível também pode ser utilizado pelos microrganismos para o seu metabolismo, como ocorreu em reatores anaeróbios

horizontais de leito fixo, no qual o comportamento observado pelos autores foi o oposto, ou seja, concentrações menores de sulfato efluente, em relação ao afluente (3 mg.L^{-1} e 8 mg.L^{-1} , respectivamente). A presença de organismos redutores de sulfato, tais como *Desulfobulbus* e *Desulfovibrio*, foi confirmada pelo sequenciamento (Apêndice), sendo que na etapa IV, em que houve ligeiro consumo de sulfato, houve predominância do gênero de BRS *Thiobacillus*, e outro gênero redutor de sulfato *Desulfomonile* apareceu como gênero exclusivo para esta etapa (BRENNER et al., 2005).

A amostra de água residuária de lavanderia comercial empregada nesta etapa (amostra 1) continha concentração de sulfato mais elevada que a empregada nas demais etapas ($231,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $5,34 \text{ mg.L}^{-1}$ para as amostras 1 e 2, respectivamente) e foi menos diluída (1:49 e 1:134 para as amostras 1 e 2, respectivamente). No entanto, não se observou relação entre os valores da caracterização da água de lavanderia e os valores de sulfato afluente para todas as etapas. A água residuária de lavanderia comercial pode conter microrganismos em sua composição que podem ter degradado aerobiamente moléculas que contenham sulfato (inclusive LAS) durante o tempo de armazenamento (mesmo mantendo-se a alimentação em geladeira), liberando sulfato ao meio líquido.

Braga (2014) observou valores maiores de sulfato efluente em RALF empregado no tratamento de água residuária de lavanderia comercial para as etapas de operação em que empregou sacarose como co-substrato metabólico. Entretanto, na última etapa de operação, foi observada menor concentração de sulfato efluente e, conseqüentemente, menor remoção de LAS em todo estudo (39%).

Carosia (2011) observou em reator de leito fluidificado com $14,4 \pm 3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS afluente, $12,5 \pm 15,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato afluente e $15,9 \pm 15,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato efluente. Assim como Oliveira et al. (2010) em semelhante configuração reacional observaram $5 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato afluente e $16 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$ efluente, quando aplicou $8,2 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS afluente. Para $24,4 \pm 3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS, Oliveira et al. (2010) obtiveram para sulfato $12 \pm 4 \text{ mg.L}^{-1}$ no afluente e $33 \pm 9 \text{ mg.L}^{-1}$ no efluente. Vale ressaltar que o método empregado neste trabalho (cromatográfico) foi diferente das autoras supracitadas (turbidimétrico).

Em relação ao fosfato, não se observou variação significativa entre afluente e efluente do RALF, tendo sido ligeiramente menores no efluente (Tabela 5.12). Por meio do sequenciamento massivo, foram identificados pelo menos 5 gêneros com capacidade de acumular fósforo, tais como *Aquabacterium* (KALMBACH et al., 1999), *Acinetobacter*, *Gemmatimonas*, *Pseudomonas* e *Aeromonas* (GEBREMARIAM et al., 2011). *Aquabacterium* também foi identificado por Braga (2014) em RALF empregado no tratamento de água

residuária de lavanderia. Ressalta-se que a manutenção de ambiente facultativo no separador de fases do RALF pode ter sido propícia ao desenvolvimento destes organismos. No entanto, outros fatores como a baixa concentração de ácidos orgânicos voláteis no reator pode ter desfavorecido o acúmulo de fósforo. Na água residuária de lavanderia, os valores de fosfato foram próximos, ou seja, $28,84 \text{ mg.L}^{-1}$ e $31,13 \text{ mg.L}^{-1}$ para as amostras 1 e 2, respectivamente. O extrato de levedura também pode ter sido uma fonte indireta de fosfato, uma vez que o levedo é uma fonte rica em fósforo (AMORIM, 1985).

Nitrato foi detectado em todas as amostras efluentes do reator e somente no afluente da etapa II (Tabela 5.12). Verificou-se baixa concentração de nitrato na água de lavanderia empregada na alimentação do reator ($5,57 \pm 2,52 \text{ mg.L}^{-1}$) e, somente na caracterização da amostra 1 ($2,33 \text{ mg.L}^{-1}$), foi identificada amônia. No entanto, pode ter ocorrido amonificação a partir dos compostos do extrato de levedura empregado na alimentação do reator, por conseguinte, com formação de nitrito e nitrato.

O nitrito foi identificado em concentrações superiores no efluente em comparação ao afluente ao longo das etapas de operação (Tabela 5.12). *Nitrosomonas* foi identificada no biofilme e está relacionada com a produção do nitrito, uma vez que este gênero tem capacidade de oxidar amônia a nitrito (BRENNER et al., 2005). Outra possibilidade é que o nitrato tenha sido reduzido a nitrito ao longo do processo. Alguns gêneros com habilidade de reduzir nitrato foram identificados nas amostras de biomassa do biofilme e do material suporte do reator: *Denitratisoma*, *Diaphorobacter*, *Thiothrix* e *Yersinia*. (ISHII et al., 2011; PHAM et al., 2009; NIELSEN et al., 2000; ZHOU et al., 2004). Além disso, também foi identificada *Nitrospira*, capaz de oxidar nitrito a nitrato, justificando, desse modo, a presença do nitrato (DAIMS et al., 2000).

Braga (2014) também identificou *Nitrosomonas* e *Nitrospira* em RALF empregado no tratamento de água residuária de lavanderia contendo LAS. Assim como neste trabalho, a autora identificou concentrações de nitrato e nitrito afluentes nulas ou baixas nas etapas ($3,45 \pm 0,91 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,59 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, para nitrato e nitrito, respectivamente, somente na última etapa) e concentrações mais elevadas no efluente.

Neste trabalho, foram identificadas também diversas bactérias (*Comamonas*, *Pseudomonas*, *Geobacter* e outros gêneros) que realizam a respiração anóxica. No entanto, a escassez do aceptor de elétrons, provavelmente, inviabilizou a expressão deste metabolismo.

5.10 Análises por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas

A caracterização qualitativa do efluente é importante principalmente para investigar os compostos xenobióticos e produtos secundários que não foram degradados ou que foram produzidos durante o tratamento.

Quarenta compostos xenobióticos foram identificados por CG-EM nas amostras efluentes coletadas ao final das etapas de operação após a adição da água residuária de lavanderia comercial (II, III e IV) (Tabelas 5.13 e 5.14). Três ésteres foram identificados em maior proporção no efluente da etapa II, éster octadecílico do ácido hexadecenóico, éster eicosílico do ácido hexadecenóico, éster hexadecenílico do ácido eicosanóico (26,18%, 16,12% e 11,43%) na análise por *headspace*. Estes compostos estão possivelmente relacionados com a composição da água residuária de lavanderia comercial, uma vez que os ésteres de ácidos graxos são amplamente utilizados para a produção de tensoativos e emulsionantes (SARNEY e VULFSON, 1995). Eriksson et al. (2003) caracterizaram águas residuárias cinzas e encontraram esses três compostos em elevada quantidade.

Na análise por *headspace* do efluente, coletado ao final da etapa III, o solvente orgânico trimetil pentano foi identificado em maior proporção (63%). Na análise por injeção direta da amostra da etapa II, ftalatos foram os principais componentes detectados (52% e 23% de ftalato butila e ftalato de octila, respectivamente). Estes compostos são utilizados como plastificantes de PVC e como emulsionantes para tintas e cosméticos (PETROVIĆ e BARCELÓ, 2000). Na etapa IV, foram detectados em quantidades elevadas triclorometano, decametil ciclopentassiloxano, dodecametil ciclohexassiloxano e dimetil formamida (26%, 22%, 22%, 19%) por *headspace*, bem como dimetilpropil fenóxi etanol e nonil fenóxi etóxi etanol (28% e 15%, respectivamente) nas análises por injeção direta. Estes compostos são reportados como "produtos de consumo perfumados", em inglês, *fragranced consumer products*, um termo que se refere a produtos com fragrância ou perfume, como purificadores de ar, desodorantes, detergentes, amaciantes, detergentes para lavar louça, desinfetantes para as mãos, produtos de cuidados pessoais, shampoo de bebê, e material de limpeza (HORII et al., 2008; STEINEMANN et al., 2011).

Compostos aromáticos foram encontrados no efluente da etapa IV (dimetilpropil fenóxi etanol e nonil fenóxi etóxi etanol, por exemplo). Provavelmente, esses compostos aromáticos não interferiram negativamente na remoção do surfactante, que foi maior nesta etapa de operação. No entanto, a presença de LAS pode ter favorecido microrganismos que

degradam o surfactante, prejudicando assim a degradação destes outros compostos aromáticos na última etapa.

Diversos solventes identificados na análise por CG-EM são listados pela Ficha de Informação de Produtos Químicos da CETESB (1992) e reportados como tóxicos, sobretudo a biota aquática.

Toxicidade do solvente ciclohexano, por exemplo, é reportada para organismos aquáticos, ratos e camundongos. Enquanto, para ciclopentano, tem-se toxicidade para peixe da espécie *Oncorhynchus Kisutch*. Diclorometano, por sua vez, é tóxico para as espécies de peixes *Poecilia Reticulata* e *Pimephales Promelas Rafinesque*, para o crustáceo *Daphnia*, para as algas da espécie *Scenedesmus* e para a bactéria *Pseudomonas* (CETESB, 1992).

Hexano – outro solvente – é tóxico para peixes da espécie *Carassius Auratus*, *Oncorhynchus Kisuth* (salmão jovem) e para alga *Microcystis Pyrifera*, enquanto triclorometano ou clorofórmio apresenta toxicidade para os organismos aquáticos, tais como peixes da espécie *Poecilia Reticulata*, algas das espécies *Microcystis Aeruginosa* e *Scenedesmus Quadricauda* (alga verde) e bactérias da espécie *Pseudomonas Putida* (CETESB, 1992).

Tabela 5.13-Compostos detectados no efluente do reator por injeção da amostra

Composto	etapa III		etapa IV	
	%A	Qualidade	%A	Qualidade
Ácido Hexadecanóico	3,03	90	0,82	96
Brometo de Dodeciltrimetil Amônio	0	0	0,91	83
Butil Dinitro Trimetilbenzeno	0	0	2,78	AMDIS
Decanal	8,18	87	1,6	91
Dimetilpropil Fenóxi Etanol	0	0	27,65	AMDIS
Esqualeno	0	0	2,85	AMDIS
Ftalato de Butila	31,66	86-94	1,42	78
Ftalato de Decila	0	0	2,21	AMDIS
Ftalato de Etil Hexila	0	0	4,24	87
Ftalato de Octil Butila	0	0	2,42	AMDIS
Ftalato de Octila	51,74	70	0	0
Hexadecanoato de Metila	0	0	1,32	97
Hidrocarboneto Alifático	0	0	28,15	AMDIS
Não Determinado	5,63	-	27,65	-
Nonanal	0	0	0,35	AMDIS
Nonil Fenóxi Etóxi Etanol	0	0	14,66	AMDIS
Octadecanoato de Metila	0	0	1,29	91
Trimetil Dodecatrienol	0	0	0,33	AMDIS
Warfarin	0	0	6,22	AMDIS

% A = Porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra. Qualidade = Índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registrados nas bibliotecas utilizadas. Foram adotados índices de qualidade > 70. AMDIS = *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*.

Tabela 5.14-Compostos detectados no efluente do reator (análise por *Headspace*)

Composto	etapa II		etapa III		etapa IV	
	%A	Qualidade	%A	Qualidade	%A	Qualidade
Acetato de Triacontil	2,22	96	0	0	0	0
Ácido Nonadecenóico	0,54	83	0	0	0	0
Ciclohexano	0	0	3,17	91	0	0
Ciclopentano	0	0	11,56	86	0	0
Decametil Ciclopentassiloxano	0	0	0	0	22,05	91
Diclorometano	0	0	17,9	91	0	0
Dimetil Formamida	0	0	0	0	18,87	90
Dimetóxi Difenil Etanona	0	0	0	0	3,67	AMDIS
Dodecametil Ciclohexassiloxano	0	0	0	0	21,54	94
Éster Eicosílico do Ácido Hexadecenóico	16,12	90-91	0	0	0	0
Éster Estearílico do Ácido Hexadecanóico	2,71	AMDIS	0	0	0	0
Éster Hexadecenílico do Ácido Eicosanóico	11,43	76	0	0	0	0
Éster Octadecílico do Ácido Hexadecenóico	26,18	81	0	0	0	0
Éster Octadecílico do Ácido Octadecanóico	2,9	AMDIS	0	0	0	0
Éter etílico	0	0	3,62	90	0	0
Hexano	0	0	0,51	AMDIS	0	0
Hidrocarboneto Alifático	2,89	89-99	0	0	0	0
Metil Éter Farnesol	0,64	90	0	0	0	0
Octadecadienol	4,68	76	0	0	0	0
Octadecametil ciclononassiloxano	2,08	78-87				
Octametil Ciclotetrassiloxano	0	0	0	0	3,96	87
Tetradecametil Cicloheptassiloxano	0	0	0	0	4,01	86
Triclorometano	0	0	0	0	25,87	96
Trimetil Pentano	0	0	63,22	78	0	0

% A = Porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra. Qualidade = Índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registrados nas bibliotecas utilizadas. Foram adotados índices de qualidade > 70. AMDIS = *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*.

5.11 Exames de Microscopia

Dentre as morfologias de organismos observadas nas amostras do RALF, verificou-se predominância de bacilos, filamentos e agregados de cocos.

Ao final da etapa II, foram coletadas amostras dos sólidos da areia e do separador de fases do reator, constatando-se que, em ambos, houve predominância de cocos (Figura 5.5).

Figura 5.5-Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas na etapa II: (a) cocos da biomassa da areia e (b) cocos da biomassa do separador de fases

Ao final da etapa III, sólidos do material suporte e do separador de fases do reator foram novamente amostrados para análise de microscopia óptica de contraste de fase. Foram identificados bacilos (com morfologia semelhante a *Zoogloea*), filamentos e cocos (Figura 5.6).

Para a etapa IV, foram analisados os sólidos do separador de fases e da areia. Na Figura 5.7, podem-se observar filamentos e agregados de cocos presentes nas amostras da areia e no separador de fases.

Portanto, grupos diferentes de microrganismos foram favorecidos pelas condições encontradas em cada região do reator associadas às suas capacidades fisiológicas, favorecendo assim a remoção dos compostos recalcitrantes. A grande diversidade de grupos bacterianos encontrados ao final da operação do reator corrobora a hipótese de que a degradação do LAS é decorrente de consórcio microbiano.

Figura 5.6-Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas na etapa III: (a) filamentos na biomassa da areia (b) bacilos da biomassa da areia (c) cocos da biomassa do separador de fases

Figura 5.7-Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas na etapa IV do reator (a) filamentos da biomassa da areia e (b) bacilos da biomassa do separador de fases.

5.12 Caracterização molecular

Foram analisadas 6 amostras da biomassa do separador de fases e do biofilme do material suporte ao longo das etapas de operação do reator, a saber: amostra da biomassa do material suporte da etapa II (MS-II), amostra da biomassa do separador de fases da etapa II (SF-II), amostra da biomassa do material suporte da etapa III (MS-III), amostra da biomassa do separador de fases da etapa III (SF-III), amostra da biomassa do material suporte da etapa IV (MS-IV), amostra da biomassa do separador de fases da etapa IV (SF-IV).

Por meio do sequenciamento massivo na plataforma Ion Torrent, foram obtidas 768.139 sequências do gene RNAr 16S da biomassa do material suporte e do separador de fases para as etapas II, III e IV de operação do RALF. Durante o processamento das sequências, foram removidas 373.077 sequências em função da qualidade das bases (Qphred>20), presença de bases ambíguas, chimeras e tamanho menor que 200 pb (pares de base). Portanto, foram descartadas 48,6% das sequências (Tabela 5.15). Foram obtidos 1629-2704 OTUs dos quais 20-28% corresponderam a *singletons*. O maior valor de *singleton* foi obtido para a biomassa do separador de fases da etapa IV (726), enquanto o menor valor foi obtido para a biomassa proveniente do material suporte da etapa II (489).

Por meio da análise de cobertura (fórmula de Good), verificou-se que 98,7%-99,4% de toda a comunidade microbiana foi amplificada. Além disso, em função das análises das curvas de rarefação, foi possível inferir que, para o nível taxonômico de Filo (80% de similaridade), o número de sequências obtidas foi suficiente para representar a diversidade da biomassa presente no RALF para todas as amostras, excetuando-se a amostra SF-IV. A curva de rarefação expressa a riqueza máxima esperada no ambiente quando há estabilização da curva. Notou-se estabilização a partir de cerca de 20.000 sequências para as amostras MS-II, SF-II, MS-III, SF-III e MS-IV (Figura 5.7 (a)). Por outro lado, verificou-se, por meio das curvas de rarefação para a amostra SF-IV a nível taxonômico de Filo (80%) e para todas as amostras a nível taxonômico de gênero (95 %) e espécie (97 %), que mesmo com elevado número de sequências, não foi possível acessar toda a diversidade da biomassa, uma vez que obteve-se menor tendência de saturação (Figura 5.8). Dessa forma, os níveis taxonômicos de gênero e espécie só poderiam ser completamente acessados com o aumento do esforço amostral. Em outras palavras, esperar-se-iam mais espécies do que as amostradas pela técnica do Ion-sequenciamento.

Tabela 5.15- Sequenciamento da biomassa do MS e SF das etapa II, III e IV de operação do RALF

	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV
Cobertura - Fórmula de Good	99,3%	99,0%	99,4%	99,2%	99,3%	98,7%
Total de sequências (dados brutos)	153.390	84.419	115.910	167.565	140.033	106.822
Total de sequências (dados filtrados)	84.240	47.451	58.859	78.851	69.855	55.806
Tamanho médio (pb)	289 ± 46	309 ± 42	303 ± 30	305 ± 35	308 ± 36	309 ± 38
Total de OTUs	2.435	2.008	1.629	2.704	2.269	2.592
Singletons	489	459	330	579	490	726
Total de OTUs (classificação taxonômica)	1.946	1.549	1.299	2.125	1.779	1.866

Delforno (2014) obteve estabilização para 10.000 sequências a nível taxonômico de Filo (80%) em reator EGSB empregado no tratamento de água de lavanderia comercial contendo LAS. Braga (2014) não observou estabilização para nenhum nível taxonômico em RALF também empregado para tratar água residuária de lavanderia comercial contendo LAS. Ressalta-se que as duas configurações reacionais envolvem a formação diversa de biofilme, sendo estrutura de biofilme em material suporte e de biofilme estruturado em camadas nos grânulos para RALF e EGSB, respectivamente.

Figura 5.8- Curvas de rarefação definidas para diferentes porcentagens de similaridade. (a) 80% de similaridade para nível de Filo; (b) 95 % para nível de gênero e (c) 97 % para o nível de espécie.

5.12.1 Índices ecológicos

Para avaliar a diversidade e complexidade da comunidade microbiana, foram analisados os índices de diversidade Shannon (H), Simpson (1-D), dominância e os estimadores de riqueza Chao1 e Rarefação (Tabela 5.16).

Tabela 5.16-Resultados dos estimadores de riqueza e índices de diversidade

Amostra	Estimadores de Riqueza		Índices de diversidade		
	Chao1	Rarefação	Shannon (H)	Simpson (1-D)	Dominância
MS - II	2.824±257	2.435±139	6,00±0,02	0,9901±0,0002	0,0088±0,0002
SF - II	2.450±284	2.008±126	5,98±0,02	0,9901±0,0002	0,0099 ±0,0002
MS - III	1.910±284	1.629±126	5,63±0,02	0,9898±0,0003	0,0102 ±0,0003
SF - III	3.186±314	2.704±163	6,23±0,02	0,9942±0,0001	0,0058 ±0,0001
MS - IV	2.661±257	2.269±138	5,59±0,02	0,9827±0,0004	0,0173 ±0,0004
SF - IV	3.301±451	2.592±196	5,93±0,02	0,9903±0,0003	0,0097 ±0,0002

Em relação aos estimadores de riqueza Chao1 e Rarefação, foram obtidos valores variando entre 1.910-3.301 e 1.629-2.704, respectivamente. Obteve-se maior valor de estimador de riqueza para a amostra da biomassa do separador de fases das etapas III e IV (3.301 e 2.704 para Chao1 no SF-III e Rarefação no SF-IV, respectivamente). O Chao1 é fortemente influenciado pelo número de *singletons*, *doubletons* e sequências por amostra. As OTUS obtidas para as amostras do SF-III e SF-IV (2.592 and 2.704, respectivamente) foram maiores, em relação às demais amostras. Além disso, a região do separador de fases é um ambiente menos restrito, uma vez que mais oxigênio pode estar disponível e a biomassa pode ser menos afetada pela turbulência da recirculação afluenta do RALF. Portanto, essas condições podem favorecer amplo número de espécies.

Verificou-se, para a amostra do material suporte da etapa III (MS-III), menor valor para os estimadores de riqueza (1.910±284 e 1.629±126 para Chao1 e Rarefação, respectivamente). O desenvolvimento da comunidade microbiana pode ser influenciado pelo material suporte utilizado, uma vez que alguns microrganismos podem ser selecionados em detrimento de outros (OLIVEIRA et al., 2009). De fato, a formação de biofilme no material suporte, acrescido do fornecimento limitado de oxigênio e a turbulência resultante da recirculação no local de amostragem podem favorecer a seleção de comunidade com menor diversidade de populações de bactérias.

Delforno (2014) obteve estimadores de riqueza Chao1 entre 544±74 e 6.214 ± 523 e rarefação entre 382±20 e 4.623±602 em EGSB aplicado na remoção de LAS de água residuária de lavanderia comercial. Braga (2014), por sua vez, observou Chao1 entre 347±61 e 488±48 e rarefação entre 215 e 346 em RALF empregado com a mesma finalidade, ou seja,

riqueza menor que a observada no presente trabalho. Provavelmente, no caso específico deste trabalho, a alimentação com etanol tenha favorecido ampla diversidade fisiológica de bactérias.

O índice de diversidade de Shannon observado para a biomassa do RALF foi superior a 5 para todas as amostras, por conseguinte, pode-se mencionar elevado número de taxon (elevada diversidade). Além disso, observou-se valores de Simpson (1-D) muito próximos de 1, o que indicou elevada diversidade e distribuição pouco equânime, confirmando a ausência de um gênero dominante. A degradação completa de LAS envolve consórcio microbiano devido à limitada capacidade metabólica de microrganismos específicos (LEE, 1995). Portanto, é possível que a elevada diversidade resultante tenha favorecido a degradação surfactante.

Tais resultados são semelhantes aos obtidos por Okada (2012), que logrou índices de Shannon entre 3,7 e 4,6 por meio do pirosequenciamento de amostras de UASB usado no tratamento de água residuária de lavanderia comercial (12mg.L^{-1} de LAS). Braga (2014), por meio de pirosequenciamento do gene RNAr 16S de amostras provenientes de reator fluidificado aplicado na degradação do LAS em água residuária de lavanderia comercial, obteve índices de Shannon de 3,4 – 4,6. Delforno (2014), por sua vez, nas amostras sequenciadas via plataforma 454 e Ion Torrent, obteve os índices de Shannon de 4,56 – 4,92 e 5,74 – 6,90 para biomassa de EGSB empregado na remoção de LAS.

Para a comparação entre as seis amostras foi utilizado o índice de Bray-Curtis. Por meio do dendrograma gerado a partir do índice de similaridade (Figura 5.9) verificou-se o agrupamento das amostras de acordo com a modificação da fonte suplementar de carbono. Em outras palavras, verificou-se para as biomassas do material suporte e separador de fases da mesma etapa operacional coeficientes de similaridade mais altos em relação àqueles obtidos para amostras de biomassa coletadas do mesmo local de amostragem em etapas distintas (material suporte ou separador de fase). Realmente, os co-substratos, nesse caso, sacarose e etanol, variam em complexidade, requerendo diferentes sistemas enzimáticos para serem metabolizados. Vias metabólicas distintas podem, portanto, serem promovidas devido à variação de co-substrato, resultando em população microbiana diversa. Além disso, o sistema de recirculação do RALF favorece a mistura completa no reator evitando a estratificação da biomassa.

Figura 5.9-Dendrograma baseado no índice de Bray-Curtis para amostras do RALF

Coefficientes de similaridade de 85%, 88% e 77% foram observados para MS-II e SF-II (etapa II - sacarose e etanol), MS-III e SF-III (etapa III - etanol) e MS-IV e SF-IV (etapa IV - ausência de fonte suplementar de carbono), respectivamente.

5.12.2 Classificação taxonômica

Por meio do RDP-Classifer, observou-se que acima de 98% das sequências foram classificadas em Filo. Essa porcentagem de classificação das sequências foi menor para família e para gênero. Para Família, o percentual de classificação observado foi entre 76,1% (MS-II) e 96% (MS-III). Para Gênero, os percentuais mínimos foram obtidos na etapa III, apenas 12,3% (MS-III) e 28% (SF-III), e os máximos na etapa IV, 81,6% e 68,2% para MS-IV e SF-IV, respectivamente (Tabela 5.17).

Tabela 5.17- Porcentagem e número de sequências classificadas para Família, Filo e Gênero

		MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV
Filo	Sequências						
	classificadas	99,5	98	99,5	99,1	98	98
	(%)						
Família	Número	15	19	16	17	19	21
	Sequências						
	classificadas	76,1	83,6	96,0	92,4	93,2	92,5
Gênero	(%)						
	Número	74	75	61	71	80	91
	Sequências						
	classificadas	50	31	12,3	28	81,6	68,2
	(%)						
	Número	136	113	100	124	154	155

5.12.2.1 Filos

As sequências identificadas foram afiliadas a 24 filos distintos. Observou-se predomínio para o filo Proteobacteria (abundância relativa superior a 90% em todas as amostras). Todavia, baixas percentagens (abundância relativa inferior a 3% em todas as amostras) foram observadas para os filos Bacteroidetes, Firmicutes, Acidobacteria, Spirochaetes, Gemmatimonadetes, Synergistetes, Planctomycetes, etc. Destaca-se que representantes pertencentes a três filos foram identificados apenas na biomassa do separador de fases na última etapa de operação (SF-IV), sendo, OD 1, OP 11 e TM 7 (Tabela 5.18).

Justifica-se a predominância de representantes pertencentes ao filo Proteobacteria devido ao elevado número de espécies identificadas, consequentemente com diversidade genética e fisiológica para a manutenção em diversas condições ambientais. Representantes deste filo foram comumente mais abundantes nos estudos realizados acerca da remoção de LAS em condições anaeróbias.

Oliveira et al. (2013), por exemplo, caracterizaram o biofilme utilizado na degradação de LAS em RALF. Assim como neste trabalho, os autores encontraram o predomínio de populações pertencentes ao filo Proteobacteria (43,8%). Os autores verificaram para os

representantes pertencentes aos filos Firmicutes e Acidobacteria menor representatividade, ou seja, 1,9% e 2,9%, respectivamente.

Tabela 5.18 - Abundância relativa dos Filos nas amostras (cut-off 0,50)

Filo (%)	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV
Acidobacteria	0,79	1,14	0,57	1,93	0,80	0,48
Actinobacteria	0,34	0,08	0,01	0,07	0,05	0,58
Armatimonadetes	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
Bacteroidetes	2,15	2,82	1,82	3,56	1,26	0,62
Chlamydiae	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02
Chlorobi	0,00	0,04	0,02	0,05	0,13	0,04
Chloroflexi	0,06	0,64	0,20	0,74	0,45	0,58
Cyanobacteria/Chloroplast	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Deinococcus-Thermus	0,00	0,02	0,03	0,18	0,04	0,01
Elusimicrobia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Euryarchaeota	0,00	0,01	0,00	0,00	0,03	0,01
Firmicutes	1,82	1,24	0,53	0,81	2,37	1,27
Fusobacteria	0,00	0,00	0,05	0,02	0,02	0,00
Gemmatimonadetes	0,12	0,69	0,08	0,79	0,12	0,29
Lentisphaerae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,01
Nitrospira	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
OD1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
OP11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Planctomycetes	0,26	0,42	0,19	0,65	0,09	0,40
Proteobacteria	93,89	90,53	95,89	90,02	90,60	91,15
Spirochaetes	0,06	0,15	0,06	0,10	1,23	2,01
Synergistetes	0,03	0,20	0,07	0,14	0,90	0,39
TM7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
Verrucomicrobia	0,02	0,03	0,01	0,03	0,19	0,09

Braga (2014) observou maior porcentagem de representantes dos filos Proteobacteria (25,8-83%), Gemmatimonadetes (2-34%), Bacteroidetes (3,1-19,2%) e Firmicutes (2,3-13,7%) para abundância relativa da biomassa da areia e separador de fases em RALF empregado no tratamento de água residuária de lavanderia contendo LAS. Em menor proporção, a autora identificou representantes pertencentes aos filos Acidobacteria (0,1-1,3%), Actinobacteria, Chlamydiae, Nitrospira, Planctomycetes e Synergistetes (0,1%). A autora também observou que o filo Proteobacteria foi o mais representativo para todas as amostras do RALF, com exceção da biomassa do separador de fases da última etapa de operação (ausência de fonte adicional de carbono). Nesta etapa, o filo Gemmatimonadetes foi o mais representativo (25,5% e 34% para a biomassa da areia e separador de fases, respectivamente).

Carosia et al. (2014) encontraram predominância do Filo Proteobacteria em RALF empregado na remoção de LAS presente em detergente em pó (88% e 39% para amostra da biomassa do material suporte e separador de fases, respectivamente). Os autores verificaram que os demais filos diferenciaram-se entre o material suporte e o separador de fases. No separador de fases, foram relacionados a Synergistetes (19%), Verrucomicrobia (12%), Fusobacteria (12%) e Cyanobacteria (2%). No material suporte foram Bacteroidetes (5%), Firmicutes (2%), Synergistetes (2%), Fusobacteria (1%), Acidobacteria (1%) e Aminanaerobia (1%). Ferreira (2012) avaliou a influência de co-substratos na degradação de LAS proveniente de sabão em pó em reator anaeróbio de leito fluidificado. Este autor também observou prevalência do filo Proteobacteria (72%). Os resultados para Acidobacteria (3%) e Firmicutes (6,3%) foram similares aos encontrados por Carosia et al. (2014) para as amostras retiradas do material suporte (areia) do reator.

5.12.2.2 Famílias

As sequências foram classificadas em 117 famílias (Tabela 5.19). A predominância de representantes pertencentes ao filo Proteobacteria neste trabalho se deu, sobretudo, devido à identificação de sequências pertencentes às famílias Rhodocyclaceae e Comamonadaceae. Observou-se predominância de representantes destas famílias em relação à abundância relativa da biomassa oriunda do material suporte e do separador de fases ao longo das etapas de operação.

Aumento da abundância relativa para representantes da família Rhodocyclaceae, bem como diminuição para aqueles pertencentes a família Comamonadaceae ocorreu, principalmente, no material de suporte nas etapas III e IV, após a substituição da mistura de sacarose e etanol por somente etanol (Figura 5.10).

Na etapa II, na presença de sacarose e etanol como fonte suplementar de carbono, obteve-se para abundância relativa de representantes da família Comamonadaceae 46,59% e 10,11% para MS-II e SF-II, respectivamente. Todavia, verificou-se redução desta para 2,41% e 6,70 % para material suporte e separador de fases da etapa III, respectivamente (MS-III e SF-III), e para 4,30% e 2,14% para MS-IV e SF-IV, respectivamente.

Figura 5.10 - Abundância relativa das famílias Rhodocyclaceae e Comamonadaceae da biomassa do material suporte e separador de fases das etapas II a IV com 97% de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP-Classifer com índice de confiança de 50%

Verificou-se que a abundância relativa de representantes pertencentes a família Rhodocyclaceae aumentou, sendo de 18,46%, 88,72% e 77,08% para a biomassa do material suporte da etapa II (MS-II), etapa III (MS-III) e etapa IV (MS-IV). Todavia, para a biomassa do separador de fases, não se verificou variação da abundância relativa entre as etapas, sendo de 67,66%, 62,91% e 75,04% para as etapas II, III e IV, respectivamente.

Braga (2014), ao caracterizar representantes pertencentes as famílias da biomassa do material suporte e separador de fases de RALF empregado no tratamento de água residuária de lavanderia comercial, observou predominância de Desulfobulbaceae (1-58%) e Rhodocyclaceae (3-12%) com sacarose como fonte suplementar de carbono. A referida autora

obteve para representantes pertencentes a outras famílias menor abundância relativa, como por exemplo, Anaerolineaceae (2,8-4,3%), Bradyrhizobiaceae (0,1-1%), Chitinophagaceae (1,8-2%), Comamonadaceae (0,3-2,4%), Gemmatimonadaceae (1,2-2%), Geobacteraceae (0,6-1,3%), Holophagaceae (0,3-1,3%), Nitrosomonadaceae (0,8-1,7%), Synergistaceae (0,06-3,8%), Veillonellaceae (0,06-3,1%) e Xanthomonadaceae (0,06-3,7%). Após a retirada da sacarose, Braga (2014) verificou alteração no predomínio de representantes pertencentes a outras famílias, como por exemplo, Gemmatimonadaceae (25,5-34%), Rhodocyclaceae (19,1-22,4%) e Chitinophagaceae (12,4-14,4%). Além disso, em menor proporção foram identificados representantes pertencentes às famílias Bdellovibrionaceae (1,2-1,8%), Bradyrhizobiaceae (0,4-2,2%), Comamonadaceae (0,7-1%), Leptospiraceae (1,9-2,6%), Peptostreptococcaceae (0,6-1,4%), Pseudomonadaceae (0,7-1,1%), Subdivision3_genera_incertae_sedis (7,1-9,1%) e Verrucomicrobiaceae (1-2,9%).

A família Chitinophagaceae, encontrada com elevada abundância relativa por Braga (2014), foi a terceira família com maior abundância relativa observada neste trabalho (máximo de 2,58% no SF-II e mínimo de 0,17% no SF-IV). Todavia, as porcentagens de abundância relativa à Chitinophagaceae ficaram bem aquém daquelas obtidas para Rhodocyclaceae e Comamonadaceae.

Carosia et al. (2014) também observaram predomínio de representantes pertencentes a Família Rhodocyclaceae em RALF empregado na remoção de LAS presente em sabão em pó.

Tabela 5.19 - Abundância relativa das famílias nas amostras (cut-off 0,50)

Família (%)	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV
0_unclassified	23,90	16,41	4,00	7,58	6,81	7,55
Acetobacteraceae	0,02	0,05	0,01	0,02	0,01	0,03
Acidaminococcaceae	0,03	0,01	0,06	0,07	0,04	0,01
Acidimicrobinae_incertae_sedis	0,00	-	-	-	-	0,01
Aeromonadaceae	0,40	0,15	0,11	0,07	0,03	0,02
Alcaligenaceae	0,03	0,41	0,21	0,30	0,19	0,25
Anaerolineaceae	0,06	0,62	0,19	0,68	0,43	0,57
Armatimonadetes_gp2	-	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
Bacteriovoracaceae	-	-	-	-	0,01	0,00
Bacteroidaceae	0,01	-	0,01	0,00	0,03	-
Bdellovibrionaceae	0,92	0,16	0,02	0,04	0,01	0,06
Beijerinckiaceae	0,00	-	-	-	-	-
Bradyrhizobiaceae	0,23	0,20	0,06	0,07	0,05	0,03
Bryobacter	0,33	0,04	-	-	-	0,01
Burkholderiaceae	-	0,01	-	-	-	0,00
Burkholderiales_incertae_sedis	0,53	0,26	0,26	0,10	0,05	0,24
Caldilineaceae	-	-	-	-	0,00	0,00
Campylobacteraceae	0,16	0,02	0,01	-	0,03	0,04
Carnobacteriaceae	0,03	0,01	-	0,01	-	0,00
Caulobacteraceae	-	0,00	-	0,02	0,03	0,06
Chitinophagaceae	1,82	2,58	1,46	3,17	0,25	0,17
Chlorobiaceae	-	-	-	-	0,00	-
Chromatiaceae	-	-	-	-	-	0,01
Clostridiaceae 1	0,09	-	0,04	0,02	0,07	0,03
Clostridiales_Incertae Sedis XI	-	-	-	-	0,01	-
Clostridiales_Incertae Sedis XIII	0,59	0,04	0,05	0,05	0,32	0,07
Comamonadaceae	46,59	10,11	2,41	6,70	4,30	2,14
Conexibacteraceae	0,01	0,02	-	0,04	0,01	0,01
Coxiellaceae	-	-	-	-	0,00	-
Cryomorphaceae	0,01	-	0,00	0,01	0,09	0,02
Cystobacteraceae	0,04	0,01	0,00	0,02	-	-
Desulfobulbaceae	0,00	0,04	0,02	0,01	0,70	0,32
Desulfovibrionaceae	0,01	0,26	0,03	0,05	0,20	0,21
Elusimicrobiaceae	-	0,00	-	-	0,00	-
Enterobacteriaceae	0,25	0,06	0,04	0,03	0,02	-
Enterococcaceae	0,04	0,02	-	0,00	0,01	0,02
Erysipelotrichaceae	0,01	-	-	-	-	-
Erythrobacteraceae	-	-	-	-	-	0,01
Flammeovirgaceae	-	-	-	-	-	0,00
Flavobacteriaceae	-	-	-	-	0,01	0,07
Fusobacteriaceae	-	-	0,05	0,02	0,02	-
Gemmatimonadaceae	0,12	0,69	0,08	0,79	0,12	0,29
Geobacteraceae	0,05	0,04	0,02	0,04	1,44	1,14
Gp17	-	-	-	-	-	0,00

Tabela 5.19 - Abundância relativa das famílias nas amostras (cut-off 0,50) (continuação)

Família (%)	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV
Gp3	0,18	0,84	0,01	0,03	0,17	0,17
Gp4	0,03	0,02	0,35	1,37	0,23	0,09
Gp6	0,09	0,03	0,15	0,28	0,18	0,12
Gp7	0,02	0,12	0,06	0,25	0,13	0,05
Haliangiaceae	-	-	-	0,01	-	-
Halomonadaceae	-	-	-	0,00	-	-
Halothiobacillaceae	-	-	-	-	0,11	-
Holophagaceae	0,06	0,01	-	-	0,07	0,03
Hydrogenophilaceae	0,03	0,04	0,01	0,01	0,90	10,49
Hyphomicrobiaceae	0,02	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01
Ignavibacteriaceae	0,00	0,04	0,02	0,05	0,13	0,04
Intrasporangiaceae	-	-	-	-	-	0,37
Lachnospiraceae	0,05	0,01	-	0,01	0,01	-
Legionellaceae	0,81	0,24	0,01	0,08	-	0,01
Leptospiraceae	0,06	0,08	-	0,01	0,02	0,05
Methanomicrobiaceae	-	0,00	-	-	-	-
Methanospirillaceae	0,00	0,01	-	-	0,03	0,01
Methylococcaceae	0,00	-	-	0,00	-	-
Methylocystaceae	0,03	0,03	-	0,01	0,02	0,04
Microbacteriaceae	0,15	0,05	-	0,01	0,02	0,01
Moraxellaceae	0,01	0,01	0,01	0,01	0,21	0,09
Mycobacteriaceae	0,16	0,01	0,01	0,02	0,00	0,07
Neisseriaceae	0,03	0,01	0,01	0,03	0,03	0,32
Nitrosomonadaceae	0,11	0,20	0,00	0,00	0,01	0,52
Nitrospiraceae	-	0,01	-	0,01	0,01	0,01
OD1_genera_incertae_sedis	-	-	-	-	-	0,01
OP11_genera_incertae_sedis	-	-	-	-	-	0,01
Opitutaceae	0,01	0,02	-	-	0,00	0,03
Oxalobacteraceae	0,99	0,61	0,21	0,42	0,05	0,13
Parachlamydiaceae	0,01	0,01	-	0,00	-	-
Pasteuriaceae	-	-	-	-	0,00	0,15
Peptostreptococcaceae	0,03	-	0,08	0,02	0,06	0,05
Phaselicystidaceae	0,02	0,11	0,03	0,01	-	-
Phyllobacteriaceae	0,11	0,11	0,06	0,19	0,03	0,02
Planctomycetaceae	0,26	0,42	0,19	0,65	0,09	0,39
Polyangiaceae	0,02	0,22	0,01	0,11	0,03	0,07
Porphyromonadaceae	0,09	0,01	0,05	0,04	0,23	0,02
Prevotellaceae	-	-	-	-	0,02	-
Prolixibacter	-	-	0,01	0,01	0,01	-
Propionibacteriaceae	0,00	-	-	-	0,01	0,00
Pseudomonadaceae	0,94	0,20	0,07	0,07	0,04	0,08
Rhizobiaceae	0,03	0,05	-	-	-	0,00

Tabela 5.19 - Abundância relativa das famílias nas amostras (cut-off 0,50) (continuação)

Família (%)	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV
Rhizobiales_incertae_sedis	-	-	-	-	-	0,00
Rhodobacteraceae	0,06	0,07	0,11	0,30	0,21	0,07
Rhodocyclaceae	18,46	62,91	88,72	75,04	77,08	67,66
Rhodospirillaceae	0,05	0,12	0,02	0,02	0,01	0,06
Ruminococcaceae	0,01	0,01	0,01	0,02	0,07	0,02
Saprospiraceae	-	-	-	-	-	0,01
Simkaniaceae	-	-	-	-	-	0,01
Sinobacteraceae	0,01	0,03	0,02	0,00	0,04	0,36
Spartobacteria_genera_incertae_sedis	-	-	0,01	0,03	0,19	0,04
Sphaerobacteraceae	0,00	0,00	0,00	-	-	0,01
Sphingobacteriaceae	-	-	0,00	-	-	-
Sphingomonadaceae	0,07	0,10	0,17	0,24	0,31	0,50
Spirochaetaceae	-	0,08	0,06	0,09	1,21	1,96
Streptococcaceae	0,07	0,04	-	-	-	0,02
Subdivision3_genera_incertae_sedis	0,01	0,01	-	-	-	0,02
Synergistaceae	0,03	0,20	0,07	0,14	0,90	0,39
Syntrophaceae	-	0,01	-	-	0,35	0,30
Syntrophobacteraceae	0,00	-	-	-	0,02	0,03
Syntrophomonadaceae	-	-	0,00	-	0,04	0,02
Syntrophorhabdaceae	-	0,00	0,03	0,02	0,33	0,21
Thermaceae	0,00	0,02	0,03	0,18	0,04	0,01
Thermoactinomycetaceae 1	-	-	-	0,01	-	-
Thiotrichaceae	-	-	-	-	-	0,23
TM7_genera_incertae_sedis	-	-	-	-	-	0,04
Veillonellaceae	0,37	0,11	0,17	0,12	0,59	0,14
Victivallaceae	-	0,00	-	-	0,07	0,01
Xanthobacteraceae	0,01	0,02	-	0,00	-	0,01
Xanthomonadaceae	0,19	0,49	0,06	0,16	0,38	0,97

5.12.2.3 Gêneros

Foram classificados 256 gêneros para a biomassa do material suporte e separador de fases do RALF para as três etapas de operação. Para a biomassa do MS-II, MS-III e MS-IV foram identificados 100, 85 e 126 gêneros, respectivamente. Para a biomassa do separador de fases foram identificados 92, 92 e 136 gêneros do SF-II, SF-III e SF-IV, respectivamente.

Por meio do diagrama de Venn para presença e ausência de gênero (Figura 5.11), quando comparados os gêneros identificados no material suporte das etapas II, III e IV, notou-se que 36% estiveram nas três amostras do MS e representaram 95% de todas as sequências. Para a biomassa do separador de fases, foram identificados 38% dos gêneros em comum nas três amostras de biomassa retiradas nas etapas II, III e IV e representaram também 95% de todas as sequências.

Entre 3% e 25% dos gêneros identificados foram exclusivos de cada amostra de biomassa do MS, representando apenas 1,32% do total de sequências obtidas. Para aquela do SF observou-se que entre 5% e 26% dos gêneros identificados foram exclusivos de cada amostra, representando apenas 1,7% do total de sequências obtidas.

Em análise comparativa das biomassas do material suporte e separador de fases, verificou-se 69% de gêneros em comum identificados para a etapa II, 17% para a etapa III e 22% para a etapa IV (Figura 5.12). Em relação ao total de sequências, no entanto, esta porcentagem observada foi de 99% para todas as etapas. Destaca-se que esse resultado obtido está em consonância com o visualizado no dendograma baseado no índice de Bray-Curtis (Figura 5.8), ou seja, verificou-se, para as biomassas coletadas na mesma etapa de operação, elevados coeficientes de similaridade, uma vez que o RALF favorece a mistura completa no reator evitando a estratificação da biomassa.

Figura 5.11-Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função das OTUs para material suporte II, III e IV (a) e separador de fases II, III e IV (b); em função do número de sequências para material suporte II, III e IV (c) e separador de fases II, III e IV (d).

Figura 5.12-Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função das OTUs para material suporte e separador de fases II (a), para material suporte e separador de fases III (b), para material suporte e separador de fases IV (c); em função do número de sequências para material suporte e separador de fases II (d), para material suporte e separador de fases III (e), para material suporte e separador de fases IV (f).

Verificou-se para a biomassa do MS-II e SF-II que *Curvibacter* foi o gênero mais abundante da etapa II (27,56% e 4,67%, respectivamente), por conseguinte, nesta etapa obteve-se maior abundância relativa para a família Comamonadaceae. Todavia, para as etapas III e IV (MS-III, SF-III, MS-IV, SF-IV), verificou-se diminuição para menos de 0,9% (Figura 5.13). Bactérias semelhantes a *Curvibacter* realizam metabolismo sob condição microaerófila, cujo crescimento está associado a açúcares e aminoácidos (DING e YOKOTA, 2010). Assim, a mistura de sacarose e etanol como fonte suplementar de carbono na etapa II pode ter favorecido esse gênero.

Verificou-se que a abundância relativa para bactérias semelhantes a *Curvibacter* foi maior na etapa com menor remoção de LAS (etapa II). Infere-se, portanto, que a presença de sacarose associada ao crescimento de *Curvibacter* pode ter possibilitado inúmeras vias metabólicas que não aquelas relacionadas com a degradação do LAS. Desta forma, a degradação do surfactante pode ter sido desfavorecida. Na etapa III, a modificação da composição do substrato sintético pela substituição da sacarose por etanol pode ter favorecido a diminuição da abundância relativa de representantes desse gênero.

Verificou-se também para a etapa II, que outros gêneros predominaram; todavia, com menor abundância relativa, tais como *Acidovorax* com 7,90% e 2,29% para MS-II e SF-II, respectivamente, e *Dechloromonas* com 3,14% e 4,83% para MS-II e SF-II, respectivamente. *Zoogloea* representou 1,65% na amostra do SF-II. Além disso, verificou-se para outros gêneros abundância relativa inferior a 1% (Apêndice).

Destaca-se que *Acidovorax* também pertence à família Comamonadaceae. Trata-se de microrganismo gram-negativo, capaz de realizar desnitrificação. Na literatura, este gênero foi reportado como capaz de degradar compostos aromáticos como monoclorobenzeno (MCB) em condições anóxicas (BALCKE et al., 2006), e também está associado a degradação de ácidos orgânicos voláteis (HEYLEN et al, 2008), os quais estiveram presentes na etapa II ($14,3 \pm 21,7$ mgHAc.L⁻¹ afluente).

Dechloromonas, pertencente à família Rhodocyclaceae, possui capacidade de degradar completamente compostos monoaromáticos a CO₂ em condições anaeróbias com (per)clorato como receptor de elétrons alternativo (CHAKRABORTY et al., 2005), nitrato e O₂ também podem atuar como receptor de elétrons e acetato como fonte de carbono (COATES et al., 2001). Hidrocarbonetos clorados, tais como diclorometano e triclorometano foram detectados por GC-EM nas amostras de efluente recolhidas no final das etapas II, III e IV, confirmando disponibilidade desses compostos para tais bactérias.

Zoogloea, também da família Rhodocyclaceae, é bactéria aeróbia facultativa e que realiza desnitrificação (SHAO et al. 2009). O uso do nitrato como aceptor final de elétrons nesta configuração reacional é uma possibilidade, no entanto, sua presença na água residuária de lavanderia foi consideravelmente baixa ($5,57 \pm 2,52 \text{ mg.L}^{-1}$). *Zoogloea* e *Dechloromonas* estão relacionados com a degradação de compostos aromáticos (tolueno, benzoato entre outros) (BRENNER et al., 2005). Estes dois gêneros foram encontrados em outros trabalhos sobre degradação de LAS e, provavelmente, podem estar envolvidas com a degradação desse surfactante (OLIVEIRA et al., 2013, BRAGA, 2014, DELFORNO, 2014, CAROSIA et al., 2014).

Na etapa III, além de *Dechloromonas* (2,15% e 3,12% para MS-III e SF-III, respectivamente), observou-se o predomínio de *Azonexus* (1,54% e 5,48% para biomassa do MS-III e SF-III, respectivamente), *Georgfuchsia* (1,19% e 2,35% para MS-III e SF-III, respectivamente) e *Zoogloea* (1,70% e 2,58% para MS-III e SF-III, respectivamente).

Representantes semelhantes a *Azonexus* pertencem à família Rhodocyclaceae, crescem em condições microaerófilas, podem utilizar N_2 da atmosfera, ácidos orgânicos (ácido succínico, propiônico e acético) e etanol como fonte de carbono (REINHOLD-HUREK, 2006). Portanto, o aumento da concentração de etanol na etapa III, provavelmente, favoreceu a predominância de bactérias semelhantes a este gênero nesta etapa em relação às demais. Braga (2014) identificou a presença deste gênero em RALF empregado no tratamento de água residuária contendo LAS na presença de somente sacarose como fonte de carbono adicional. No entanto, ácidos orgânicos oriundos da digestão anaeróbia e presentes na água residuária de lavanderia comercial também estavam disponíveis para serem utilizados como fonte de carbono. Além disso, Chou et al. (2008) reportaram que microrganismos pertencentes a este gênero possuem oxidação positiva para Tween 20 e Tween 40, dois surfactantes não iônicos.

Georgfuchsia, também pertencente à família Rhodocyclaceae, cresce em ambiente anaeróbico estrito e utiliza Fe (III), Mn (IV) e nitrato como receptor final de elétrons para crescimento com compostos aromáticos (WEELINK et al., 2009). No presente trabalho, $1,50 \pm 0,71 \text{ mg Fe.L}^{-1}$ e $0,06 \pm 0,03 \text{ mg Mn.L}^{-1}$ foram detectados na caracterização da água residuária de lavanderia comercial utilizada para alimentar o reator. Além disso, representantes deste gênero podem degradar compostos aromáticos e, possivelmente, o LAS (WEELINK et al., 2009), tendo sido identificados em outros reatores anaeróbios no tratamento de água residuária contendo LAS (DELFORNO, 2014; Tabela 5.25).

Na etapa IV, observou-se também predomínio de *Dechloromonas* (49,19% e 30,28% para MS-IV e SF-IV, respectivamente), *Georgfuchsia* (1,70% e 3,02% para MS-IV e SF-IV, respectivamente) e *Zoogloea* com 15,80% e 11,73% para MS-IV e SF-IV, respectivamente. Ademais, *Thiobacillus* foi identificado com abundância relativa de 10,49% na amostra SF-IV e *Diaphorobacter* com 2,45% e 1,08% para MS-IV e SF-IV, respectivamente. *Geobacter* foi identificada com 1,44% e 1,14% para MS-IV e SF-IV, respectivamente.

Diaphorobacter, pertencente à família Comamonadaceae, pode utilizar nitrogênio como receptor final de elétrons em substituição ao oxigênio (BRENNER et al., 200). Representantes semelhantes a este gênero são capazes de utilizar extrato de levedura (HIRAISHI e KHAN, 2002), único co-substrato residual nesta etapa de operação.

Thiobacillus pertencente à família Hydrogenophilaceae cresce em condições microaerófilas. Este gênero é capaz de reduzir sulfato, tendo sido identificado também por Okada (2012), Braga (2014) e Delforno (2014) em reatores empregados no tratamento de água residuária comercial contendo LAS. Ressalta-se que, neste caso, o sulfato pode ter sido oriundo da água residuária de lavanderia comercial e da própria molécula do LAS.

Bactérias semelhantes a *Geobacter* (família Geobacteraceae) identificadas com elevada abundância relativa na etapa IV são estritamente anaeróbias e podem atuar como redutoras de Ferro⁺³, além da possibilidade de acoplar a oxidação de compostos monoaromáticos à redução de Fe⁺³ (KUEVER et al., 2005). Representantes deste gênero já foram identificados em outros estudos de tratamento de água residuária contendo LAS (CAROSIA et al., 2014; DELFORNO et al., 2012; FERREIRA, 2012; OKADA, 2012).

Como discutido anteriormente, após a modificação da composição do substrato sintético na etapa III, observou-se aumento da abundância relativa de representantes pertencentes à família Rhodocyclaceae. Nas etapas III e IV, foi verificada elevada eficiência de remoção de LAS e predomínio da referida família; da mesma forma, verificou-se que o percentual dos gêneros relacionados com a degradação do LAS também aumentou (principalmente para aqueles semelhantes a *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea*).

Para a etapa II, verificou-se soma da abundância relativa dos gêneros *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea* de 3,86% e 7,40% para a MS-II e SF-II, respectivamente (Figura 5.12). Apesar da elevada porcentagem de gêneros não classificados na etapa III, a soma da abundância relativa dos gêneros classificados como *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea* foi de 5,04% e 8,05% para o MS-III e o SF-III, respectivamente, ou seja, ligeiramente superior à soma da abundância relativa obtida na etapa II para estes gêneros. A soma da abundância relativa de *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea* foi de 66,69% e

45,03% na etapa IV. Desse modo, pode-se mencionar que a comunidade degradadora de LAS pode ser favorecida na ausência da fonte de carbono, uma vez que o tensoativo pode ser usado como fonte de carbono e energia (SANZ et al., 2003).

Figura 5.13-Abundância relativa para *Curvibacter*, *Dechloromonas*, *Georgfuchsia*, *Zoogloea* identificados na biomassa do material suporte e separador de fases das etapas de II a IV com 97% de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP-Classifer com índice de confiança de 50%.

A elevada abundância relativa de gêneros não classificados, principalmente na etapa III, pode ter prejudicado a quantificação real dos gêneros nesta etapa, uma vez que, a nível taxonômico de família, a diferença entre as etapas II e III foi mais acentuada, ou seja, a abundância relativa da família Rhodocyclaceae aumentou de 18,46% no MS-II para 88,72% no MS-III.

A fim de facilitar a identificação dos gêneros classificados predominantes na família Rhodocyclacea, os dados de abundância relativa obtidos para gênero foram transformados em porcentagem em relação ao total de gêneros classificados somente nesta família (Tabela 5.20). Assim, para MS e SF, na etapa II, respectivamente, 78% e 48% dos gêneros pertencentes à família Rhodocyclacea foram semelhantes aos gêneros relacionados com a degradação de LAS, *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea* (Tabela 5.20). Para a etapa III, observou-se 61% e 46% dos gêneros pertencentes à família Rhodocyclacea semelhantes a *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea* para MS e SF, respectivamente, e na etapa IV 98% e 94% dos gêneros para MS e SF, respectivamente.

Tabela 5.20-Percentual de gêneros identificados pertencentes a família Rhodocyclacea na biomassa das etapas II, III e IV*

Gêneros	MS II	SF II	MS III	SF III	MS IV	SF IV
Azoarcus	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,1%	0,1%
Azonexus	0,6%	0,1%	18,7%	31,4%	0,8%	0,2%
Azospira	10,5%	6,2%	3,9%	4,2%	0,3%	0,6%
Azovibrio	1,7%	0,7%	8,3%	11,2%	0,2%	0,7%
Dechloromonas	62,2%	30,8%	26,2%	17,9%	72,0%	63,2%
Denitratisoma	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Georgfuchsia	4,0%	5,9%	14,5%	13,5%	2,5%	6,3%
Methyloversatilis	0,2%	0,2%	0,1%	0,1%	0,0%	0,0%
Propionivibrio	1,1%	0,4%	0,1%	0,1%	0,2%	0,2%
Rhodocyclus	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Shinella	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%
Sterolibacterium	0,0%	0,5%	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%
Sulfuritalea	8,6%	44,5%	7,5%	6,5%	0,7%	3,8%
Thauera	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Zoogloea	10,3%	10,5%	20,7%	14,8%	23,1%	24,5%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%

*Em 97% de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP Classifier com limite de confiança de 50% para Gênero.

No total, 37 gêneros possivelmente relacionados à degradação do LAS foram identificados, dentre os quais gêneros aeróbios, microaerófilos, anaeróbios, anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos (Tabela 5.21).

Tabela 5.21-Gêneros possivelmente relacionados à degradação do LAS identificados na biomassa das etapas de II a IV, sendo 97% o nível de similaridade.
As amostras foram classificadas usando RDP Classificador em um limite de confiança de 50%

Gênero	MS II	SF II	MS III	SF III	MS IV	SF IV	Condição	Referência
Achromobacter	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	Aeróbia	Erdlenbruch et al., (2001); Brenner et al., (2005)
Acinetobacter	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,21%	0,05%	Aeróbia	Abboud et al., (2007); Brenner et al., (2005)
Aeromonas	0,4%	0,15%	0,11%	0,07%	0,03%	0,02%	Anaeróbia facultativa	Jimenez et al., (1991); Brenner et al., (2005)
Azoarcus	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,04%	0,06%	Aeróbia/anaeróbia	Barragán et al., (2004); Brenner et al., (2005)
Bdellovibrio	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,02%	Aeróbia	Koval et al., (2013); Brenner et al., (2005)
Brevundimonas	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,01%	Aeróbia	Segers et al., (1994); Brenner et al., (2005)
Clostridium III	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	Anaeróbia estrita/Aerotolerante	Rainey e Stackebrandt (1993);
Comamonas	0,63%	0,3%	0,36%	1,00%	0,66%	0,05%	Aeróbia	Schleheck, et al., (2010); Brenner et al., (2005)
Dechloromonas	3,14%	4,83%	2,15%	3,12%	49,19%	30,28%	Anaeróbia facultativa	Brenner et al., (2005)
Delftia	0,09%	0,03%	0,03%	0,09%	0,04%	0,1%	Aeróbia	Brenner et al., (2005)
Desulfomonile	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	Anaeróbia estrita	Brenner et al., (2005)

Tabela 5.21-Gêneros possivelmente relacionados à degradação do LAS identificados na biomassa das etapas de II a IV, sendo 97% o nível de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP Classificador em um limite de confiança de 50% (continuação)

Gênero	MS II	SF II	MS III	SF III	MS IV	SF IV	Condição	Referência
Desulfovibrio	0,01%	0,26%	0,03%	0,05%	0,19%	0,21%	Anaeróbia	Zellner et al.,(1989); Cook et al., (1998) Brenner et al., (2005)
Enterococcus	0,04%	0,02%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	Anaeróbia Facultativa	Ojo et al., (2008)
Gemmatimonas	0,12%	0,69%	0,08%	0,79%	0,12%	0,29%	Aeróbia	Krieg et al., (2010)
Geobacter	0,05%	0,04%	0,02%	0,04%	1,44%	1,14%	Anaeróbia estrita	Lara-Martin et al., (2007) Brenner et al., (2005)
Georgfuchsia	0,2%	0,92%	1,19%	2,35%	1,7%	3,02%	Anaeróbia estrita	Weelink et al., (2009)
Giesbergeria	0,06%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	Aeróbia	Yilmaz et al., (2014)
Holophaga	0,06%	0,01%	0,00%	0,00%	0,07%	0,03%	Anaeróbia	Krieg et al., (2010); Brenner et al, (2005)
Hydrogenophaga	0,02%	0,01%	0,21%	0,25%	0,62%	0,1%	Aeróbia	Dangmann et al., (1989); Cook (1998); Brenner et al., (2005)
Magnetospirillum	0,02%	0,03%	0,02%	0,02%	0,01%	0,04%	Microaerófila	Brenner et al., (2005)
Mycobacterium	0,16%	0,01%	0,01%	0,02%	0,00%	0,07%	Aeróbia	Zhang e Anderson, (2012)

Tabela 5.21-Gêneros possivelmente relacionados à degradação do LAS identificadas na biomassa das etapas de II a IV, sendo 97% o nível de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP Classificador em um limite de confiança de 50% (continuação)

Gênero	MS II	SF II	MS III	SF III	MS IV	SF IV	Condição	Referência
Nitrospira	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	Aeróbia	Brandt et al., (2001)
Paracoccus	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,01%		Brenner et al., (2005)
Phenyllobacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,03%	0,05%	Aeróbia	Abraham et al., (2008); Aslam et al., (2005)
Pigmentiphaga	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,02%	0,00%	Aeróbia	Brenner et al., (2005)
Propionivibrio	0,06%	0,06%	0,01%	0,02%	0,15%	0,08%	Anaeróbia e Aerotolerante	Hippe et al.,(1999); Brenner et al., (2005)
Pseudolabrys	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	Aeróbia	Kämpfer et al., (2006)
Pseudomonas	0,94%	0,2%	0,07%	0,07%	0,04%	0,08%		Jimenez et al., (1991); Brenner et al., (2005)
Rhodanobacter	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,31%	Aeróbia	Zhang et al., (2011); Brenner et al., (2005)
Rhodopseudomonas	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,01%	Anaeróbia facultativa	Kim et al., (2004); Brenner et al., (2005)
Sedimentibacter	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	Anaeróbia estrita	Lara-Martin et al., (2007); Brenner et al., (2005)

Tabela 5.21-Gêneros possivelmente relacionados à degradação do LAS identificadas na biomassa das etapas de II a IV, sendo 97% o nível de similaridade. As amostras foram classificadas usando RDP Classificador em um limite de confiança de 50% (continuação)

Gênero	MS II	SF II	MS III	SF III	MS IV	SF IV	Condição	Referência
Sporomusa	0,05%	0,01%	0,03%	0,03%	0,01%	0,00%	Anaeróbia e Aerotolerante	Vos et al., (2009); Brenner et al., (2005)
Stenotrophomonas	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	Aeróbia	Brenner et al., (2005); Lara-Martin et al., (2007)
Syntrophomonas	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	0,02%	Anaeróbia	Tartakovsky et al., (2001); Vos et al., (2009)
Variovorax	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	Anaeróbia facultativa	Im et al., (2010)
Zoogloea	0,52%	1,65%	1,7%	2,58%	15,8%	11,73%	Aeróbia	Brenner et al., (2005)

Destaca-se que dentre os 37 gêneros possivelmente relacionados à degradação do surfactante, 22 deles possuem capacidade de desnitrificar. No total, 70 dos 257 gêneros identificados possuem habilidade desnitrificante (Apêndice). A desnitrificação tem sido amplamente reportada em RALFs usados na remoção de efluentes recalcitrantes (OMENA et al., 2013). Além disso, a redução de nitrato tem sido reportada como resistente à presença do LAS (em concentração superior a 100 mg L^{-1} do surfactante aniônico) (ELSGAARD, 2010).

A capacidade metabólica de bactérias de realizar desnitrificação pode estar relacionada com a degradação LAS. No entanto, no presente trabalho, nitrato como receptor de elétrons foi encontrado apenas até $5,57 \pm 2,52 \text{ mg.L}^{-1}$ na caracterização da água de lavanderia comercial. No caso particular deste reator, metabolismo alternativo deve ter sido adotado por estes microrganismos que são, em sua maioria, facultativos. Este resultado aponta como interessante o estudo da degradação do LAS nesta configuração reacional, todavia empregando-se condições que favoreçam a desnitrificação.

Bactérias redutoras de sulfato, tais como *Desulfovibrio* e *Desulfobulbus* foram identificadas na biomassa das etapas II, III e IV. Estas bactérias, provavelmente, utilizam o enxofre da molécula do surfactante (DELFORNO et al. 2014) tendo, portanto, implicações importantes para a remoção do LAS. O gênero redutor de sulfato *Desulfomonile* só foi identificado na última fase (etapa IV), quando a remoção LAS foi mais elevada (0,01% para MS e SF) (Apêndice). Sulfato ($2,4 \pm 2,3 \text{ mg L}^{-1}$) foi observado no afluente do reator ao longo do período operação. Portanto, esses gêneros foram favorecidos no reator mesmo em baixas concentrações de sulfato. Trata-se de gêneros anaeróbios, sendo que algumas espécies possuem capacidade metabólica de fermentar. *Desulfomonile*, por exemplo, é estritamente anaeróbia e pode fermentar piruvato a acetato e lactato (BRENNER et al, 2005). *Desulfovibrio* é estritamente anaeróbia em culturas puras, sendo que a maioria das espécies oxida incompletamente compostos como lactato a acetato (BRENNER et al, 2005). *Desulfobulbus*, por sua vez, é estritamente anaeróbia, sendo que habilidades fermentativas são encontradas em alguns membros que utilizam compostos orgânicos simples, ácidos de cadeia longa ou álcoois, como doadores de elétrons e fonte de carbono (BRENNER et al, 2005).

Comparativamente a outros estudos relacionados à degradação do LAS, foram identificados 15 gêneros em comum com Braga (2014), 6 com Delforno (2012), 26 com Delforno (2014), 6 com Carosia (2011), 29 com Okada (2012), 5 com Ferreira (2012), 13 com Oliveira (2010) e 8 com Duarte (2006) (Tabela 5.22). Ressalta-se que a maior quantidade de gêneros similares em relação a este trabalho foi encontrada para aquele realizado por Delforno (2014) e Okada (2012), em que empregaram diferentes configurações reacionais (EGSB e

UASB, respectivamente). Os referidos autores utilizaram água residuária de lavanderia comercial como fonte de LAS e álcoois de cadeia curta como co-substratos (etanol e metanol). Carosia (2011), Ferreira (2012), Oliveira (2010) e Braga (2014) também empregaram RALF, todavia somente Braga (2014) utilizou água residuária de lavanderia comercial como fonte de LAS. Delforno (2012) empregou LAS padrão afluente em reator EGSB e Duarte (2006) em RAHLF.

Oliveira (2010), Delforno (2012), Ferreira (2012) e Carosia (2011) empregaram o sequenciamento Sanger. Okada (2012) e Braga (2014) o fizeram via plataforma 454-Pirosequenciamento. Somente Delforno (2014) realizou o sequenciamento massivo através plataforma Ion-Torrent, semelhante ao utilizado neste trabalho.

Observou-se, portanto, que, para as diversas configurações reacionais, a degradação do LAS é decorrente de consórcio microbiano.

Tabela 5.22-Gêneros possivelmente degradadores de LAS em comum com outros trabalhos

Gênero	Duarte (2006)	Oliveira (2010)	Delforno (2011)	Carosia (2011)	Okada (2012)	Ferreira (2012)	Braga (2014)	Delforno (2014)
Achromobacter	-	-	-	-	X	-	-	-
Acinetobacter	-	-	-	X	X	X	-	X
Aeromonas	-	X	-	-	X	X	-	X
Azoarcus	-	-	-	-	X	-	-	X
Bdellovibrio	-	-	-	-	X	-	X	-
Brevundimonas	X	X	-	-	X	-	-	X
Clostridium III	X	X	X	X	X	-	X	-
Comamonas	X	-	-	-	X	-	-	X
Dechloromonas	-	-	X	X	X	X	X	X
Delftia	-	X	-	-	-	-	-	-
Desulfomonile	-	-	-	-	X	-	-	X
Desulfovibrio	X	-	-	-	X	-	X	X
Enterococcus	-	-	-	-	-	-	-	-
Gemmatimonas	-	X	-	-	X	-	X	X
Geobacter	-	-	X	X	-	X	X	X
Georgfuchsia		-	-	-	-	-	-	X
Giesbergeria	-	-	-	-	-	-	-	-
Holophaga	X	-	-	X	X	-	X	X
Hydrogenophaga	-	-	-	-	X	-	-	X
Magnetospirillum	-	X	-	-	X	-	X	X
Mycobacterium	-	X	-	-	X	-	-	X
Nitrospira	-	X	-	-	-	-	X	X
Paracoccus	-	-	-	-	X	-	-	-
Phenylobacterium	-	-	-	-	X	-	X	X
Pigmentiphaga		X	-	-	X	X	-	X
Propionivibrio	-	-	X	-	-	-	X	-
Pseudolabrys	-	-	-	-	X	-	-	X
Pseudomonas	-	X	-	-	X	-	-	X
Rhodanobacter	-	-	-	-	X	-	X	X
Rhodocyclus	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhodopseudomonas	X	-	-	-	X	-	-	X
Sedimentibacter	-	-	-	-	X	-	X	-
Sporomusa	-	X	X	X	X	-	X	X
Stenotrophomonas	X	X	-	-	X	-	-	X
Syntrophomonas	-	-	-	-	X	-	-	X
Variovorax	X	-	-	-	X	-	-	-
Zoogloea	-	X	X	-	X	-	X	X

5.12.2.4 Árvore filogenética

A árvore filogenética foi construída com as sequências representativas de algumas OTUs com elevada abundância relativa nas amostras da areia e do separador de fases das etapas II, III e IV (Figuras 5.14). As sequências obtidas no Genbank relacionadas às sequências provenientes das amostras coletadas estão listadas entre parênteses na figura.

Figura 5.14- Árvore filogenética para as sequências representativas das OTUs com maior abundância relativa das amostras de biomassa coletadas do material suporte e do separador de fases para as etapas de II a IV. A barra de escala informa a distância filogenética e *Chloroflexi bacterium* não cultivada foi utilizada como outgroup

5.12.3 Considerações Finais

A substituição da mistura de sacarose e etanol por apenas etanol na etapa III pode ter favorecido a redução de representantes pertencentes à família Comamonadaceae e o aumento daqueles pertencentes à família Rhodocyclaceae. O principal gênero da primeira família pode estar associado à presença da sacarose no meio nutricional, *Curvibacter*. Enquanto os principais gêneros afilados à segunda podem estar relacionados à degradação do LAS, tais como *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea*, tendo sido identificados em outros reatores anaeróbios no tratamento de água residuária contendo LAS (DUARTE, 2006; DELFORNO et al., 2012; OKADA, 2012).

Verificou-se que a eficiência de remoção de LAS foi maior após a alteração das populações da biomassa na etapa III. Por meio da análise desse aspecto, é possível inferir que as populações microbianas favorecidas com apenas etanol foram mais satisfatoriamente capazes de degradar o LAS, em relação àquelas cuja fonte suplementar era a mistura de sacarose e etanol. Além disso, com base na predominância de representantes pertencentes à família Rhodocyclaceae nas biomassas das etapas III e IV, sugere-se que esta família foi selecionada depois da substituição da mistura de sacarose e etanol por apenas etanol. Curiosamente, elevado percentual de gêneros desta família está relacionado à degradação LAS.

Desse modo, é possível inferir também que uma adaptação da biomassa anterior, na presença de fonte suplementar de carbono, tal como etanol, pode favorecer o aumento da degradação LAS. Ainda, essa remoção pode ser mantida mesmo após a retirada da suplementação de carbono. Por fim, etanol é um co-substrato mais viável que a mistura de sacarose e etanol para enriquecer a biomassa degradadora de LAS.

6 CONCLUSÕES

- A modificação das fontes suplementares de carbono adicionadas ao substrato sintético não prejudicou a remoção de matéria orgânica, que foi elevada para todas as etapas de operação;
- A substituição da sacarose e etanol por somente etanol resultou em aumento na eficiência de remoção do LAS;
- A retirada da fonte suplementar de carbono não prejudicou a remoção do surfactante, que se manteve elevada;
- A modificação das fontes suplementares de carbono não prejudicou a estabilidade reacional; o equilíbrio do sistema foi evidenciado por baixos valores de ácidos orgânicos voláteis e sólidos suspensos totais no efluente;
- No efluente do RALF, foram identificados compostos xenobióticos, dentre os quais, alguns tóxicos à comunidade aquática.
- A maior porcentagem do LAS removido foi biodegradada, tendo sido pequena parte removida por adsorção, sobretudo na biomassa efluente.
- A modificação da composição do substrato sintético (substituição da sacarose) resultou em alteração das populações de bactérias que pôde ser observada, sobretudo, a nível taxonômico de família; diminuição da porcentagem de representantes da família Comamonadaceae e aumento para aqueles pertencentes à família Rhodocyclaceae;
- O principal gênero representativo da família Comamonadaceae na etapa II, *Curvibacter*, pode estar associado à presença da sacarose. A abundância relativa desse gênero foi menor na etapa III, após a retirada da sacarose, enquanto a abundância de gêneros da família Rhodocyclaceae foi maior nessa etapa;
- Elevada porcentagem dos gêneros da família Rhodocyclaceae está possivelmente relacionadas à degradação do LAS, dentre esses *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zoogloea*;
- O etanol pode ser uma fonte de carbono mais favorável do que a mistura de sacarose e etanol na seleção de populações de bactérias degradadoras de LAS;
- Após a retirada da fonte de carbono, gêneros degradadores de LAS foram favorecidos;

- Etanol pode ser utilizado em fase de adaptação da comunidade microbiana e posteriormente retirado sem prejuízo da degradação do LAS.
- A degradação do LAS foi decorrente de consórcio microbiano observado pela análise de sequenciamento da região V4 do RNAr 16S (37 gêneros relacionados com a degradação do LAS).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base na experiência adquirida neste trabalho, sugere-se:

- Avaliar a remoção do LAS na ausência do extrato de levedura e somente na presença de água residuária de lavanderia diluída;
- Estudar a remoção de LAS utilizando a mesma configuração de reator e as mesmas condições aplicadas no presente trabalho, todavia favorecendo a desnitrificação;
- Trabalhar com água residuária de lavanderia bruta após pré-tratamento físico-químico;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ABRAHAM, W. R.; MACEDO, A. J.; LÜNSDORF, H.; FISCHER, R.; PAWELCZYK, S.; SMIT, J.; & VANCANNEYT, M. (2008). Phylogeny by a polyphasic approach of the order Caulobacterales, proposal of *Caulobacter mirabilis* sp. nov., *Phenylobacterium haematophilum* sp. nov. and *Phenylobacterium conjunctum* sp. nov., and emendation of the genus *Phenylobacterium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 8, p.1939-1949, 2008.

AHMAD, J.; EL-DESSOUKY, H. Design of a modified low cost treatment system for the recycling and reuse of laundry waste water. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 52, n. 7, p. 973-978, 2008.

AMORIM, H.V. Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA “JAIME ROCHA DE ALMEIDA”, 1985, Piracicaba. Anais. Piracicaba: ESALQ, 1985, p.144 – 148.

ANDERSON, R. T.; LOVELY, D. R. Anaerobic Bioremediation of Benzene under Sulfate-Reducing Conditions in a Petroleum-Contaminated Aquifer. *Environmental science & technology*, v. 34, n. 11, p. 2261-2266, 2000.

AONGHUSA, C. N.; GRAY, N. F. Laundry detergents as a source of heavy metals in Irish domestic wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v.37, p. 1-6, 2007.

APHA/AWWA/Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, DC, USA, 2005.

ARMENANTE, P.M. Biotreatment of industrial and hazardous waste. In.: LEVIN, M. A.; GEALT, M.A. New York: McGraw-Hill, 1993.

ASLAM, Z.; IM, W. T.; TEN, L. N.; LEE, S. T. *Phenylobacterium koreense* sp. nov., isolated from South Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n. 5, p. 2001-2005, 2005.

BALCKE, G. U.; TURUNEN, L. P.; GEYER, R.; WENDEROTH, D. F.; SCHLOSSER, D. Chlorobenzene biodegradation under consecutive aerobic–anaerobic conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 49, n. 1, p. 109–120, 2006.

BARRAGÁN, M. J. L.; CARMONA, M.; ZAMARRO, M. T.; THIELE, B.; BOLL, M.; FUCHS, G.; GARCÍA, J. L.; DÍAZ, E. . The bzd gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 17, p. 5762-5774, 2004.

BERGEY, D. H., HOLT, J. G., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. Williams & Wilkins, 9ª Edition. (books.google.com.br) (1994).

BERNA, J. L., CASSANI, 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, 312-347, 2007.

BRAGA, J. K. Caracterização microbiana e degradação de surfactante aniônico em reator anaeróbio de leito fluidificado com água residuária de lavanderia. 2014. 257F. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

BRAGA, J. K., VARESCHE, M. B. A. Commercial Laundry Water Characterization American, *Journal of Analytical Chemistry* , v.5, p. 8–16, 2014.

BRANDT, K. K.; HESSELSON, M.; ROSLEV, P.; HENRIKSEN, K.; SO, 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, p. 2489-2498, 2001.

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

BRENNER D.J., KRIEG N.R., STALEY J.T. (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Springer, v.2: The Proteobacteria.

CAROSIA, M. F. Caracterização microbiana e degradação de detergente de uso doméstico em reator anaeróbio de leito fluidificado, 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

CAROSIA, M. F.; OKADA, D. Y.; SAKAMOTO, I. K.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Microbial characterization and degradation of linear alkylbenzene sulfonate in an anaerobic reactor treating wastewater containing soap powder. *Bioresource technology*, v. 167, p. 316-323, 2014.

CETESB – COMPANHIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, Companhia de Tecnologia. Fichas de informação sobre produtos químicos. 1992.

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, p. 8649-8655, 2005.

CHOU, J. H.; JIANG, S. R.; CHO, J. C.; SONG, J., LIN, M. C.; CHEN, W. M. *Azonexus hydrophilus* sp. nov., a nifH gene-harboursing bacterium isolated from freshwater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 4, p. 946-951, 2008.

COATES, J. D.; CHAKRABORTY, R.; LACK, J. G.; O'CONNOR, S. M.; COLE, K. A.; BENDER, K. S.; ACHENBACH, L. A. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature*, v. 411, n. 6841, p. 1039-1043, 2001.

COLE, J.R.; WANG, Q.; FISH, J.A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D.M.; SUN, Y.; BROWN, C.T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C.R.; TIEDJE, J.M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 42, D633-D642., 2014.

COOK, A. M.; LAUE, H.; JUNKER, F. Microbial desulfonation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, n. 5, p. 399-419, 1998.

DAIMS, H.; NIELSEN, P.; NIELSEN, J.; JURETSCHKO, S.; WAGNER, M. Novel *Nitrospira-like* bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water science and technology*, v. 41, n. 4-5, p. 85-90, 2000.

DANGMANN, E.; STOLZ, A.; KUHM, A. E.; HAMMER, A.; FEIGEL, B.; NOISOMMITRIZZI, N.; RIZZI, M.; REUSS, M.; KNACKMUSS, H. J. Degradation of 4-aminobenzenesulfonate by a two-species bacterial coculture. *Biodegradation*, v. 7, n. 3, p. 223-229, 1989.

DELFORNO, T.P. Caracterização microbiana e remoção do alquilbenzeno linear sulfonado em reator EGSB. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

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.

DELFORNO, T. P. Degradação de surfactante aniônico em reator EGSB sob condição metanogênica e ferro redutora com água residuária de lavanderia comercial. 203 f. 2014. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

DELFORNO, T. P.; MOURA, A. G. L.; OKADA, D. Y.; VARESCHE, M. B. A. Effect of biomass adaptation to the degradation of anionic surfactants in laundry wastewater using EGSB reactors. *Bioresource technology*, v. 154, p. 114-121, 2014.

DICKIE, I.A., 2010. Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. *New Phytol*, 188, 916-918.

DING, L.; YOKOTA, A. *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water. *The Journal of general and applied microbiology*, v. 56, n. 3, p. 267-271, 2010.

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, n. 7, p. 1360-1367, 2006.

DUARTE, I.C.S. Caracterização Microbiológica da Remoção e Degradação de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) em Reatores Anaeróbios com Biofilme e Células Planctônicas. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

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.

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, 129-134, 2010a.

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. 606–12, 2010b.

ELSGAARD, L. Toxicity of xenobiotics during sulfate, iron, and nitrate reduction in primary sewage sludge suspensions. *Chemosphere*, v. 79, n.10, p. 1003-1009, 2010.

ENIOLA, K. I. T. Effect of additional carbon source on biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by las-utilizing bacteria. *Journal of Xenobiotics*, v. 1, n. 1, p. 2–4, 2011.

ERDLENBRUCH, B. N.; KELLY, D. P.; MURRELL, C. J. Alkanesulfonate degradation by novel strains of *Achromobacter xylosoxidans*, *Tsukamurella wratislaviensis* and *Rhodococcus* sp., and evidence for an ethanesulfonate monooxygenase in *A. xylosoxidans* strain AE4. *Archives of microbiology*, v. 176, n. 6, p. 406-414, 2001.

ERIKSSON, E.; AUFFARTH, K.; MOGENS, H. LEDIN, A. Characteristics of grey wastewater. *Urban Water*. v. 4, n.1, p. 58-104, 2002.

ERIKSSON, E.; AUFFARTH, K.; EILERSEN, A.M.; HENZE, M.; LEDIN, A. Household chemicals and personal care products as sources for xenobiotic organic compounds in grey wastewater. *Water SA*, v.29, n.2, p. 135–146, 2003.

FAN, L.S. Gas-liquid-solid fluidization engineering. BRENNER, N. (Ed.). Butterworths series in Chemical Engineering, 1989.

FELSENSTEIN, J. Confidence-Limites on Phylogenies – Na Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, v. 30, p.783-791, 1985.

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.

FETZNER, S. Biodegradation of Xenobiotics. In *Biotechnology* (Doelle, H.W. and DaSilva, E.J. eds), *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, EOLSS Publishers, 2009.

FISH, J.A.; CHAI, B.; WANG, Q.; SUN, Y.; BROWN, C.T.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. FunGene: the Functional Gene Pipeline and Repository. *Frontiers in Microbiology*, 4, 2013.

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, 1636-1643, 2005.

GAYLARD, C. C., BELLINASSO, M. L., MANFIO, G. P. Biorremediação. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 34, p. 36-43, 2005.

GEBREMARIAM, S. Y.; BEUTEL, M. W.; CHRISTIAN, D.; HESS, T. F. Research advances and challenges in the microbiology of enhanced biological phosphorus removal—a critical review. *Water Environment Research*, v. 83, n. 3, p. 195-219, 2011.

GOMIDE, R. (1983). Operações unitárias. São Paulo: Do Autor. v.1: Operações com Sistema de Sólidos Granulares.

GRBIC-GALIC, D.; VOGEL, T. M. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 254-260, 1987.

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

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

HEYLEN, K.; LEBBE, L.; VOS, P. D. *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 1, p. 73-77, 2008.

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

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. *Journal Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

HIPPE, H.; HAGELSTEIN, A.; KRAMER, I.; SWIDERSKI, J.; STACKEBRANDT, E. NOTE Phylogenetic analysis of *Formivibrio citricus*, *Propionivibrio dicarboxylicus*,

Anaerobiospirillum thomasi, *Succinimonas amylolytica* and *Succinivibrio dextrinosolvens* and proposal of Succinivibrionaceae fam. nov. *International journal of systematic bacteriology*, v. 49, n. 2, p.779-782, 1999.

HIRAISHI, A.; KHAN, S. T. *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly (3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *The Journal of general and applied microbiology*, 48(6), 299-308.

HORII, Y.; KANNAN, K. Survey of organosilicone compounds, including cyclic and linear siloxanes, in personal-care and household products. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 55(4), 701-710, 2008.

IM, W. T.; LIU, Q. M.; LEE, K. J.; KIM, S. Y.; LEE, S. T.; YI, T. H. *Variovorax ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. 7, p. 1565-1569, 2010.

ISHII, S.; ASHIDA, N.; OTSUKA, S.; SENOO, K. Isolation of oligotrophic denitrifiers carrying previously uncharacterized functional gene sequences. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 1, p. 338-342, 2011.

IZA, J. Fluidized Bed Reactor for anaerobic wastewater treatment. *Water Science Technology*, v. 24, n. 8, p. 109-132, 1991

JANKE D.; FRITSC W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of basic microbiology*, v. 25, p. 603–619, 1985.

JEFFERSON, B.; BURGESS, J. E.; PICHON, A.; HARKNESS, J.; JUDD, S. J. Nutrient addition to enhance biological treatment of greywater. *Water resource*, v.35, n. 11, p. 2701-2710, 2001.

JENKINS, S. R.; MORGAN, J. M.; SAWYER, C. L. Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Journal Water Pollution Control Federation*, p. 448-453, 1983.

JIMÉNEZ, L.; BREEN, A.; THOMAS, N.; FEDERLE, T. W.; SAYLER, G. S. Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n. 5, p. 1566-1569, 1991.

KALMBACH, S.; MANZ, W.; WECKE, J.; SZEWZYK, U. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and

Aquabacterium commune sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *International journal of systematic bacteriology*, v. 49, n. 2, p. 769-777, 1999.

KAMPFER, P.; FALSEN, E.; BUSSE, H. J. Reclassification of *Pseudomonas mefitica* Claydon and Hammer 1939 as a later heterotypic synonym of *Janthinobacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley et al. 1978. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 136–138, 2008.

KERTESZ, M. A.; KOLBENER, P.; STOCKINGER, H.; BEIL, S.; COOK, A. M. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related-compounds by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 7, p. 2296-2303, 1994.

KHLEIFAT KM, Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two-member facultative anaerobic bacterial consortium. *Enzyme and microbial technology*, v. 39, p. 1030-1035, 2006.

KIM, M. K.; CHOI, K. M.; YIN, C. R.; LEE, K. Y.; IM, W. T.; LIM, J. H.; LEE, S. T. *Odorous swine* wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnology letters*, v. 26, n. 10, p. 819-822, 2004.

KIMERLE, R. A.; SWISHER, R. D. Reduction of aquatic toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by biodegradation. *Water Research*, v. 11, n. 1, p. 31-37, 1977.

KOVAL, S. F.; HYNES, S. H.; FLANNAGAN, R. S.; PASTERNAK, Z.; DAVIDOV, Y.; JURKEVITCH, E. *Bdellovibrio exovorus* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v.63, n.1, p. 146-151, 2013.

KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; BROWN, D. R.; HEDLUND, B. P.; PASTER, B. J.; WARD, N. L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. ed. New York: Springer, v. 4, 2010 (The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes)

KUEVER, J., RAINEY, F.A., WIDDEL, F. Class IV. Deltaproteobacteria class nov. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.) *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*, vol. 2, The Proteobacteria – Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Springer US, p. 922, 2005.

KUNII, D.; LEVENSPIEL, O. (1969). Fluidization engineering. New York: John Wiley.

LARA-MARTÍN, P. A.; GÓMEZ-PARRA, A.; KÖCHLING, T.; SANZ, J. L.; AMILS, R.; GONZÁLEZ-MAZO, E. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonates in coastal marine sediments. *Environmental science & technology*, v. 4, n. 10, p. 3573-3579, 2007.

LARA-MARTÍN, P. A.; GÓMEZ-PARRA, A.; SANZ, J. L.; GONZÁLEZ-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.

LEE, C. Modelling the kinetics of biodegradation of anionic surfactants by biofilm bacteria from polluted riverine sites: A comparison of five classes of surfactant at three sites. *Water Research*, v. 29, n. 11, p. 2491–2497, 1995.

LINO, F. A. M.; BIZZO, W. A.; DA SILVA, E. P.; ISMAIL, K. A. R. Energy impact of waste recyclable in a Brazilian metropolitan. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 54, n. 11, p. 916-922, 2010.

LUO, W.; ZHU, X.; CHEN, W.; DUAN, Z.; WANG, L.; ZHOU, Y. Mechanisms and strategies of microbial cometabolism in the degradation of organic compounds—chlorinated ethylenes as the model. *Water Science & Technology*, v. 69, n. 10, p. 1971-1983, 2014.

MAINTINGUER, S. I. Degradação anaeróbia de fenol sob diferentes condições nutricionais. 2004. Dissertação de Mestrado, EESC, USP, São Carlos.

MALIHI, F. B.; KHAANI, A.; CHANGIZI, N.; ADEEB, B. Evaluation of Physico-Chemical Interactions between Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) and Alcohol Ethoxylates. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 4, n. 5, p. 395-399, 2011.

MARCHESI, J. R.; OWEN, S. A.; WHITE, G. F.; HOUSE, W. A.; RUSSELL, N. J. SDS-degrading bacteria attach to riverine sediment in response to the surfactant or its primary biodegradation product dodecan-1-ol. *Microbiology*, v. 140, n. 11, p. 2999-3006, 1994.

MCLNERNEY, M. J.; ROHLIN, L.; MOUTTAKI, H.; KIM, U.; KRUPP, R. S.; RIOS-HERNANDEZ, L.; SIEBER, J.; STRUCHTEMEYER, C.G., BHATTACHARYYA, A.; CAMPBELL, J. W.; GUNSALUS, R. P. The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 18, 7600-7605, 2007.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; PACZIANI, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. A. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 386, 2008.

MIHELICIC, J.R. (1999). Fundamentals of Environmental Engineering. Capítulo 4 John Wiley & Sons, New York.

MUNGRAY, A. K; KUMARB P., Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 63, p. 981-987, 2009

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; SRIVASTAVA, A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology*, v. 7, n. 2 , p. 167-178, 2004.

NAVAS, J. M.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; WENZEL, A.; GÓMEZ-PARRA, A.; SEGNER, H. Linear alkylbenzene sulfonates and intermediate products from their degradation are not estrogenic. *Marine pollution bulletin*, v. 38, n. 10, p. 880-884, 1999.

NICOLELLA, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*, v. 80, p. 1–33, 2000.

NIELSEN, P. H.; DE MURO, M. A.; NIELSEN, J. L. Studies on the in situ physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge. *Environmental microbiology*, v. 2, n. 4, p. 389-398, 2000.

OJO, O. A.; OSO, B. A. Isolation and characterization of synthetic detergent degraders from wastewater. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 20, 2008.

OKADA, D. Y. Degradação de surfactante aniônico em reator UASB com água residuária de lavanderia. 2012. 226 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

OKADA, D. Y.; ESTEVES, A. S.; DELFORNO, T. P.; HIRASAWA, J. S.; DUARTE, I. C. S.; VARESCHE, M. B. A. Influence of co-substrates in the anaerobic degradation of an anionic surfactant. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n.3, p.499-506, 2013a.

OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; ESTEVES, A. S.; SAKAMOTO, I. K.; DUARTE, I.; VARESCHE, M. Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB

reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate. *Bioresource technology*, v. 128, p. 125-133, 2013b.

OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; ESTEVES, A. S.; POLIZEL, J.; HIRASAWA, J. S.; DUARTE, I.; VARESCHE, M. Influence of volatile fatty acid concentration stability on anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Journal of environmental management*, v. 128, p. 169-172, 2013c.

OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M. B. Evaluation of the microbial community of upflow anaerobic sludge blanket reactors used for the removal and degradation of linear alkylbenzene sulfonate by pyrosequencing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96, 63-70, 2014.

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 next term sulfonate in anaerobic reactors. *Journal of Environment Managment*, v. 90, n. 2, p.1261-1268, 2009.

OLIVEIRA, L. L. Remoção de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) e Caracterização Microbiana em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado. 2009. 176 f. Tese (Doutorado) – 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.; COSTA, R. B.; SAKAMOTO, I. K.; DUARTE, I. C. S.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. LAS degradation in a fluidized bed reactor and phylogenetic characterization of the biofilm. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 3, p. 521-529, 2013.

OMENA, S. P.; SADER, L. T.; SILVA, E. L. Simultaneous removal of phenol and nitrate in an anoxic fluidized bed reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 48, n. 5, 581-591, 2013.

PENTEADO, E. D.; LAZARO, C. Z.; SAKAMOTO, I. K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 14, p. 6137-6145, 2013.

PERALES, J. A.; MANZANO, M. A., GARRIDO, M. C., SALES, D., QUIROGA, J. M. Molecular structure and biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulphonates in sea water. *Biodegradation*, v. 18, n.5, p. 567-578, 2007.

PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Determination of anionic and nonionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical chemistry*, v. 72, n. 19, p. 4560–7, 2000.

PHAM, V. H.; PARK, S. J.; ROH, Y.; ROH, D. H.; RHEE, S. K. *Diaphorobacter oryzae* sp. nov., isolated from a thiosulfate-oxidizing enrichment culture. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 59, n. 2, p. 218-221, 2009.

PORTER, A. J.; HAYDEN, N. J. Nonylphenol in the environment: a critical review. Department of Civil and Environmental Engineering, University of Vermont, Burlington, VT, USA, 2002.

PRATS, D.; RUIZ, F.; VAZQUEZ, B.; ZARZO, D.; BERNA, J. L.; MORENO, A. LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: Ecological implications. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 12, n. 9, p. 1599-1608, 1993.

PRIAC, A.; MORIN-CRINI, N.; DRUART, C.; GAVOILLE, S.; BRADU, C.; LAGARRIGUE, C.; TORRI, G.; WINTERTON, P.; CRINI, G. Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. *Arabian Journal of Chemistry*, 2014.

RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. 16S rDNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol Lett*, v. 113, p.125-128, 1993.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus sensulato* and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus*gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzaegen. nov.*, sp. nov. and *Azonexus fungiphilus*gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p.649–659., 2006.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C. CONVERSE, L.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, v. 58, p.106-111, 1986.

RITTMAN, B.E.; MCCARTY, P.L. Environmental Biotechnology: Principles & Applications. McGrawHill, Inc., USA, pp. 6–11, 577-578, 2001.

RIVIERE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBAACH, J., LI, T.; CAMACHO P. E.; SGHIR, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME Journal*, v. 3, n. 6, p. 700-714, 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.

SANZ, I.; POLANCO, F. Low temperature treatment of municipal sewage in anaerobic fluidized bed reactors. *Water research*, v. 24, n.4, p. 463-469, 1990.

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, 57-64, 2003.

SARNEY, D. B.; VULFSON, E. N. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends in biotechnology*, v. 13, n. 5, p. 164-72, 1995.

SCHEIBEL, J.J. The Evolution of Anionic Surfactant Technology to Meet the Requirements of the Laundry Detergent Industry. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 7, n. 4, p. 319-328, 2004.

SCHLEHECK, D.; VON NETZER, F.; FLEISCHMANN, T.; RENTSCH, D.; HUHN, T.; COOK, A. M.; KOHLER, H. P. E. The Missing Link in Linear alkylbenzenesulfonate Surfactant Degradation: 4-Sulfoacetophenone as a Transient Intermediate in the Degradation of 3-(4-Sulphophenyl)Butyrate by *Comamonas testosteroni* KF-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 1, p. 196-202, 2010.

SCHÖBERL, P. Basics principles of LAS biodegradation. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 26, p. 86-94, 1989.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1508, n. 1, 235-251, 2000.

SEGBERS, P.; VANCANNEYT, M.; POT, B.; TORCK, U.; HOSTE, B.; DEWETTINCK, D.; FALSEN, E.; KERSTERS, K.; VOS, P. D. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, n. 3, July 1, 1994, p. 499-510, 1994

SHAO, Y.; CHUNG, B. S.; LEE, S. S.; PARK, W.; LEE, S. S.; JEON, C. O. *Zoogloea caeni* sp. nov., a floc-forming bacterium isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 59, n. 3, p. 526-530, 2009.

SHIMP, R. J.; PFAENDER, F. K. Influence of easily degradable naturally occurring carbon substrates on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, v. 49, n.2, p. 394-401, 1985.

SHIN, C.; LEE, E.; MCCARTY, P. L.; BAE, J. Effects of influent DO/COD ratio on the performance of an anaerobic fluidized bed reactor fed low-strength synthetic wastewater. *Bioresource technology*, 102(21), 9860-9865, 2011.

SILVA, E. L. (1985). Tratamento aeróbio de fenol em reator de leito fluidificado trifasico. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1985.

SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, P.; PAN, I.; CHATTERJEE, S.; CHANDA, P.; BANDYOPADHYAY, D.; DAS, K.; SEN, S. K. Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n.22, p. 2011, 2009.

SOHN, J. H.; KWON, K. K.; KANG, J. H.; JUNG, H. B.; KIM, S. J. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 54, n. 5, p. 1483-1487, 2004.

STEINEMANN, A. C.; MACGREGOR, I. C.; GORDON, S. M.; GALLAGHER, L. G.; DAVIS, A. L.; RIBEIRO, D. S.; WALLACE, L. A. Fragranced consumer products: Chemicals emitted, ingredients unlisted. *Environmental Impact Assessment Review*, v. 31, n. 3, p. 328-333, 2011.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, v. 30, n. 12, 2725-2729, 2013.

TARTAKOVSKY, B.; MANUEL, M. F.; BEAUMIER, D.; GREER, C. W.; GUIOT, S. R. Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol-degrading consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 73, n. 6, p. 476-483, 2001.

THOMAS, O. R. T.; WHITE, G. F. Metabolic pathway for the biodegradation of sodium dodecyl sulfate by *Pseudomonas* sp. C12B. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 11, n. 3, p. 318-327, 1989.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 327-338, 1999.

VOS, P. D.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2. ed. New York: Springer, v. 3, 2009 (The Firmicutes)

WEELINK, S.A.B.; VAN DOESBURG, W.; SAIA, F.T.; RIJPSMA, W.I.C.; RÖLING, W.F.M.; SMIDT, H.; STAMS, A.J.M. A strictly anaerobic betaproteobacterium *Georgfuchsia toluolica* gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor. *FEMS microbiology ecology*, v. 70, n. 3, p. 575-585, 2009.

WESTALL, J. C.; CHEN, H.; ZHANG, W.; BROWNAWELL, B. J. Sorption of linear alkylbenzenesulfonates on sediment materials. *Environmental science & technology*, v. 33, n. 18, p. 3110-3118, 1999.

WHITE, G. F.; RUSSELL, N. J. Biodegradation of anionic surfactants and related molecules. In: Biochemistry of microbial degradation. Springer Netherlands, p. 143-177, 1994.

WILKES, H.; RABUS, R.; FISCHER, T.; ARMSTROFF, A.; BEHRENDT, 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.

WRIGHT, E. S.; YILMAZ, L. S.; NOGUERA, D. R. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 3, p. 717-725, 2012.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n.6, p. 2419-2425, 2005.

YILMAZ, F.; ICGEN, B. Characterization of SDS-degrading *Delftia acidovorans* and in situ monitoring of its temporal succession in SDS-contaminated surface waters. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 7413-7424, 2014.

YING, G.G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, v. 32, n. 3, p. 417-431, 2005.

ZELLNER, G.; MESSNER, P.; KNEIFEL, H.; WINTER, J. *Desulfovibrio simplex* spec. nov., a new sulfate-reducing bacterium from a sour whey digester. *Archives of microbiology*, v. 152, n. 4, p.329-334, 1989.

ZHANG, C.; ANDERSON, A.J. Utilization of pyrene and benzoate in *Mycobacterium* isolate KMS is regulated differentially by catabolite repression. *Journal of basic microbiology*, v. 53, n. 1, p. 81-9, 2013.

ZHANG, C.; BENNETT, G.N. Biodegradation of xenobiotics by anaerobia bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 67, n. 5, p. 600-618, 2005.

ZHANG, J.; ZHENG, J. W.; HANG, B. J.; NI, Y. Y.; HE, J.; LI, S. P. *Rhodanobacter xiangquanii* sp. nov., a Novel Anilofos-Degrading Bacterium Isolated from a Wastewater Treating System. *Current Microbiology*, v. 62, n. 2, p. 645-649, 2011.

ZHOU, D.; TONG, Z.; SONG, Y.; HAN, Y.; PEI, D.; PANG, X.; ZHAI J.; LI, M.; CUI, B.; QI, Z.; JIN, L.; DAI, R.; DU, Z.; WANG, J.; GUO, Z.; WANG, J.; HUANG, P.; YANG1,R.; Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 15, p. 5147-5152, 2004.

9 APÊNDICE

Tabela 9.1-Abundância relativa dos gêneros identificados nas biomassas das etapas de II a IV
(cut-off 0,5)

Gênero	Abundância Relativa						Capacidade de desnitrificação
	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV	
<i>O_unclassified</i>	49,93%	68,91%	87,25%	71,92%	18,36%	31,80%	
<i>Acetivibrio</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Acetoanaerobium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	
<i>Achromobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	+
<i>Acidaminobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Acidisoma</i>	0,02%	0,04%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	
<i>Aciditerrimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Acidovorax</i>	7,90%	2,29%	0,06%	0,27%	0,04%	0,01%	+
<i>Acinetobacter</i>	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,21%	0,05%	+
<i>Aeromonas</i>	0,40%	0,15%	0,11%	0,07%	0,03%	0,02%	+
<i>Afipia</i>	0,14%	0,11%	0,01%	0,03%	0,01%	0,01%	+
<i>Alkaliflexus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Alkanindiges</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	
<i>Altererythrobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Aminobacterium</i>	0,01%	0,05%	0,03%	0,06%	0,43%	0,07%	+
<i>Aminomonas</i>	0,02%	0,16%	0,04%	0,08%	0,38%	0,27%	
<i>Anaeroarcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Anaerolinea</i>	0,04%	0,38%	0,03%	0,18%	0,04%	0,03%	
<i>Anaerorhabdus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Anaerosinus</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,27%	0,07%	
<i>Anaerospora</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Anaerovorax</i>	0,59%	0,04%	0,05%	0,05%	0,32%	0,07%	
<i>Aquabacterium</i>	0,04%	0,09%	0,01%	0,03%	0,00%	0,01%	
<i>Aquaspirillum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Aquicella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Aquimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Arcobacter</i>	0,16%	0,02%	0,01%	0,00%	0,02%	0,03%	+
<i>Armatimonadetes_g p2</i>	0,00%	0,02%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	
<i>Armatimonadetes_g p5</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Azoarcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,04%	0,06%	+
<i>Azohydromonas</i>	0,02%	0,39%	0,20%	0,29%	0,14%	0,21%	+
<i>Azonexus</i>	0,03%	0,02%	1,54%	5,48%	0,53%	0,12%	+
<i>Azospira</i>	0,53%	0,97%	0,32%	0,74%	0,18%	0,28%	+
<i>Azovibrio</i>	0,09%	0,11%	0,68%	1,96%	0,16%	0,33%	
<i>Bacteriovorax</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Bacteroides</i>	0,01%	0,00%	0,01%	0,00%	0,02%	0,00%	
<i>Bauldia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	

Tabela 9.1-Abundância relativa dos gêneros identificados nas biomassas das etapas de II a IV
(cut-off 0,5)(continuação)

Gênero	Abundância Relativa						Capacidade de desnitrificação
	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV	
<i>Bdellovibrio</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,02%	
<i>Beijerinckia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Bellilinea</i>	0,01%	0,03%	0,09%	0,24%	0,08%	0,16%	
<i>Blastopirellula</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,04%	
<i>Bordetella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,04%	
<i>Bosea</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Bradyrhizobium</i>	0,03%	0,00%	0,02%	0,01%	0,01%	0,01%	
<i>Brevundimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,01%	
<i>Bryobacter</i>	0,33%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Buttiauxella</i>	0,18%	0,04%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	
<i>Byssovorax</i>	0,00%	0,08%	0,00%	0,07%	0,01%	0,05%	
<i>Caenispirillum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Caldilinea</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Carnobacterium</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	
<i>Castellaniella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Centipeda</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Cesiribacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Cetobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,05%	0,02%	0,02%	0,00%	
<i>Chelatococcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Chitinophaga</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Chlorobaculum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Chloroherpeton</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Chondromyces</i>	0,01%	0,06%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	
<i>Chryseobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	
<i>Cloacibacillus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,02%	
<i>Clostridium III</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,08%	0,00%	0,04%	0,01%	0,03%	0,03%	+
<i>Clostridium XLVa</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	+
<i>Clostridium XLVb</i>	0,05%	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	+
<i>Comamonas</i>	0,63%	0,30%	0,36%	1,00%	0,66%	0,05%	+
<i>Conexibacter</i>	0,01%	0,02%	0,00%	0,04%	0,01%	0,01%	
<i>Coxiella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Crocinitomix</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Cryptanaerobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Curvibacter</i>	27,56%	4,67%	0,16%	0,89%	0,04%	0,08%	+
<i>Cytophaga</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Dechloromonas</i>	3,14%	4,83%	2,15%	3,12%	49,19%	30,28%	+
<i>Delftia</i>	0,09%	0,03%	0,03%	0,09%	0,04%	0,10%	+
<i>Denitratisoma</i>	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	+

Tabela 9.1-Abundância relativa dos gêneros identificados nas biomassas das etapas de II a IV
(cut-off 0,5)(continuação)

Gênero	Abundância Relativa						Capacidade de desnitrificação
	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV	
<i>Desulfobulbus</i>	0,00%	0,04%	0,02%	0,01%	0,70%	0,32%	
<i>Desulfoglaeba</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Desulfomonile</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	
<i>Desulfovibrio</i>	0,01%	0,26%	0,03%	0,05%	0,19%	0,21%	+
<i>Devosia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Diaphorobacter</i>	0,31%	0,77%	0,46%	0,92%	2,45%	1,08%	+
<i>Dokdonella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Dysgonomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	
<i>Elusimicrobium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Ensifer</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Enterococcus</i>	0,04%	0,02%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	+
<i>Ferrimicrobium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Ferruginibacter</i>	0,12%	0,84%	0,07%	0,37%	0,01%	0,06%	
<i>Filimonas</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,03%	0,01%	0,00%	
<i>Flavitalea</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Flavobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,07%	+
<i>Fluviicola</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Fulvimonas</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Gallaecimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Gemmata</i>	0,01%	0,01%	0,01%	0,03%	0,00%	0,06%	+
<i>Gemmatimonas</i>	0,12%	0,69%	0,08%	0,79%	0,12%	0,29%	
<i>Geobacter</i>	0,05%	0,04%	0,02%	0,04%	1,44%	1,14%	+
<i>Georgfuchsia</i>	0,20%	0,92%	1,19%	2,35%	1,70%	3,02%	+
<i>Geothrix</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Giesbergeria</i>	0,06%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Gp16</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Gp17</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Gp3</i>	0,18%	0,84%	0,01%	0,03%	0,17%	0,17%	
<i>Gp4</i>	0,03%	0,02%	0,35%	1,37%	0,23%	0,09%	
<i>Gp6</i>	0,09%	0,03%	0,15%	0,28%	0,18%	0,12%	
<i>Gp7</i>	0,02%	0,12%	0,06%	0,25%	0,13%	0,05%	
<i>Gracilibacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Haliscomenobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Halomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Hansschlegelia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Holophaga</i>	0,06%	0,01%	0,00%	0,00%	0,07%	0,03%	
<i>Hydrogenophaga</i>	0,02%	0,01%	0,21%	0,25%	0,62%	0,10%	+
<i>Hyphomicrobium</i>	0,02%	0,03%	0,02%	0,01%	0,03%	0,01%	
<i>Ignavibacterium</i>	0,00%	0,04%	0,02%	0,05%	0,13%	0,04%	
<i>Ilumatobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Janthinobacterium</i>	0,08%	0,03%	0,03%	0,01%	0,04%	0,01%	
<i>Kaistia</i>	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	

Tabela 9.1-Abundância relativa dos gêneros identificados das biomassas das etapas de II a IV
(cut-off 0,5)(continuação)

Gênero	Abundância Relativa						Capacidade de desnitrificação
	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV	
<i>Knoellia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	
<i>Lacibacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Lactococcus</i>	0,07%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Legionella</i>	0,81%	0,24%	0,01%	0,08%	0,00%	0,01%	
<i>Leptolinea</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,02%	
<i>Leptonema</i>	0,04%	0,06%	0,00%	0,00%	0,02%	0,05%	
<i>Leptospira</i>	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Leucobacter</i>	0,15%	0,05%	0,00%	0,01%	0,02%	0,01%	
<i>Levilinea</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	0,00%	
<i>Lewinella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Limnohabitans</i>	0,03%	0,00%	0,18%	0,64%	0,01%	0,01%	
<i>Longilinea</i>	0,01%	0,18%	0,04%	0,06%	0,16%	0,09%	
<i>Luteibacter</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Luteimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,09%	0,06%	+
<i>Lysobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,09%	
<i>Magnetospirillum</i>	0,02%	0,03%	0,02%	0,02%	0,01%	0,04%	+
<i>Malikia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	
<i>Meiothermus</i>	0,00%	0,02%	0,03%	0,18%	0,04%	0,01%	
<i>Mesorhizobium</i>	0,09%	0,06%	0,05%	0,17%	0,03%	0,01%	+
<i>Methanospirillum</i>	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,03%	0,01%	
<i>Methylocystis</i>	0,02%	0,03%	0,00%	0,01%	0,01%	0,02%	+
<i>Methyloversatilis</i>	0,01%	0,03%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	+
<i>Morganella</i>	0,00%	0,00%	0,04%	0,01%	0,01%	0,00%	
<i>Mycobacterium</i>	0,16%	0,01%	0,01%	0,02%	0,00%	0,07%	
<i>Niastella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Nitratreductor</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Nitrosomonas</i>	0,10%	0,20%	0,00%	0,00%	0,01%	0,52%	+
<i>Nitrospira</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	+
<i>Nitrospira</i>	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	+
<i>Novispirillum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Novosphingobium</i>	0,01%	0,02%	0,03%	0,06%	0,04%	0,07%	+
<i>OD1_genera_incertae_sedis</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Oleiphilus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>OP11_genera_incertae_sedis</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Opitutus</i>	0,01%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	+
<i>Oscillibacter</i>	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Owenweeksia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Oxalicibacterium</i>	0,46%	0,17%	0,13%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Paludibacter</i>	0,00%	0,01%	0,01%	0,01%	0,04%	0,01%	
<i>Paludibacterium</i>	0,03%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Papillibacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,01%	

Tabela 9.1-Abundância relativa dos gêneros identificados das biomassas das etapas de II a IV
(cut-off 0,5)(continuação)

Gênero	Abundância Relativa						Capacidade de desnitrificação
	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV	
<i>Parabacteroides</i>	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,15%	0,01%	
<i>Paracoccus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,01%	+
<i>Pasteuria</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,15%	
<i>Pelagibius</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Pelomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,05%	+
<i>Phenylobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,03%	0,05%	+
<i>Phycisphaera</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Pigmentiphaga</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,02%	0,00%	
<i>Piscinibacter</i>	0,38%	0,06%	0,13%	0,00%	0,03%	0,00%	
<i>Planctomyces</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,07%	
<i>Pleomorphomonas</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	+
<i>Prevotella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	
<i>Prolixibacter</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%	
<i>Propionibacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Propionicimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Propionivibrio</i>	0,06%	0,06%	0,01%	0,02%	0,15%	0,08%	+
<i>Prostheco bacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Proteocatella</i>	0,03%	0,00%	0,08%	0,02%	0,06%	0,05%	
<i>Pseudoflavonifractor</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Pseudolabrys</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Pseudomonas</i>	0,94%	0,20%	0,07%	0,07%	0,04%	0,08%	+
<i>Pseudorhodoferax</i>	0,01%	0,00%	0,01%	0,03%	0,00%	0,02%	
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,04%	0,00%	0,01%	0,04%	0,01%	0,04%	
<i>Psychrosinus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Pusillimonas</i>	0,01%		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Ralstonia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Rhodanobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,31%	
<i>Rhodobacter</i>	0,00%	0,00%	0,04%	0,09%	0,18%	0,06%	+
<i>Rhodocyclus</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Rhodopirellula</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Rhodopseudomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,01%	+
<i>Rhodothalassium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Roseateles</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Roseomonas</i>	0,00%	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	
<i>Rubrivivax</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Saccharofermentans</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Sandarakinorhabdus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	
<i>Schlesneria</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	
<i>Schwartzia</i>	0,02%	0,01%	0,03%	0,02%	0,02%	0,01%	
<i>Sedimentibacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	
<i>Sediminibacterium</i>	0,20%	0,05%	0,03%	0,08%	0,00%	0,00%	
<i>Shinella</i>	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,02%	0,10%	+
<i>Simkania</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	

Tabela 9.1-Abundância relativa dos gêneros identificados na biomassa das etapas de II a IV
(cut-off 0,5)(continuação)

Gênero	Abundância Relativa						Capacidade de desnitrificação
	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV	
<i>Simplicispira</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Singularimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Singulisphaera</i>	0,20%	0,37%	0,02%	0,10%	0,04%	0,09%	
<i>Smithella</i>	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,18%	0,26%	
<i>Solirubrobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Spartobacteria_gene</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,03%	0,19%	0,04%	
<i>ra_incertain_sedis</i>							
<i>Sphaerobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Sphingobium</i>	0,01%	0,03%	0,07%	0,07%	0,10%	0,17%	+
<i>Sphingomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Sphingopyxis</i>	0,06%	0,04%	0,06%	0,10%	0,13%	0,17%	
<i>Sphingosinicella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	0,02%	
<i>Spirochaeta</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Sporomusa</i>	0,05%	0,01%	0,03%	0,03%	0,01%	0,00%	
<i>Stella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Stenotrophomonas</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Steroidobacter</i>	0,01%	0,02%	0,02%	0,00%	0,03%	0,36%	+
<i>Sterolibacterium</i>	0,00%	0,08%	0,00%	0,01%	0,00%	0,04%	+
<i>Streptococcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	+
<i>Streptophyta</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Subdivision3_genera</i>	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	
<i>a_incertain_sedis</i>							
<i>Succinispira</i>	0,03%	0,01%	0,06%	0,07%	0,04%	0,01%	
<i>Sulfuritalea</i>	0,43%	6,98%	0,62%	1,14%	0,50%	1,83%	
<i>Sulfurospirillum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	+
<i>Sutterella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Syntrophobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	
<i>Syntrophomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	0,02%	
<i>Syntrophorhabdus</i>	0,00%	0,00%	0,03%	0,02%	0,33%	0,21%	+
<i>Syntrophothermus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Syntrophus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,17%	0,03%	
<i>Tepidimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Terrimonas</i>	0,04%	0,06%	0,12%	0,32%	0,04%	0,01%	
<i>Thauera</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Thermacetogenium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Thermoleophilum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Thermomonas</i>	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,07%	0,09%	+
<i>Thiobacillus</i>	0,03%	0,04%	0,01%	0,01%	0,90%	10,49%	+
<i>Thiomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,15%	+
<i>Thiopropfundum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Thiothrix</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,23%	+
<i>TM7_genera_incertain_sedis</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	

Tabela 9.1-Abundância relativa dos gêneros identificados nas biomassas das etapas de II a IV
(cut-off 0,5)(continuação)

Gênero	Abundância Relativa						Capacidade de desnitrificação
	MS-II	SF-II	MS-III	SF-III	MS-IV	SF-IV	
<i>Treponema</i>	0,00%	0,00%	0,06%	0,00%	0,02%	0,05%	
<i>Trichococcus</i>	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Turicibacter</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Turneriella</i>	0,01%	0,01%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	
<i>Undibacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	
<i>Vampirovibrio</i>	0,92%	0,16%	0,02%	0,02%	0,01%	0,04%	
<i>Variovorax</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	+
<i>Victivallis</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,07%	0,01%	
<i>Vogesella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Wandonia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Xanthobacter</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Yersinia</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	+
<i>Zavarzinella</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	
<i>Zoogloea</i>	0,52%	1,65%	1,70%	2,58%	15,80%	11,73%	+