

TIAGO PALLADINO DELFORNO

**DEGRADAÇÃO DE SURFACTANTE ANIÔNICO EM
REATOR EGSB SOB CONDIÇÃO METANOGÊNICA E
FERRO REDUTORA COM ÁGUA RESIDUÁRIA DE
LAVANDERIA COMERCIAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche

VERSÃO CORRIGIDA

SÃO CARLOS

2014

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.

D351d Delforno, Tiago Palladino
Degradação de surfactante aniônico em reator EGSB sob condição metanogênica e ferro redutora com água residuária de lavanderia comercial. / Tiago Palladino Delforno; orientadora Maria Bernadete A. Varesche. São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.

1. DGGE. 2. Ion Torrent. 3. Pirosequenciamento. 4. microrganismos redutores de ferro. 5. alquilbenzeno linear sulfonado. 6. reator anaeróbio. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **TIAGO PALLADINO DELFORNO**.

Título da tese: "Degradação de surfactante aniônico em reator EGSB sob condição metanogênica e ferro redutora com água residuária de lavanderia comercial".

Data da defesa: 05/09/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovado

Prof. Associado **Marcelo Zaiat**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Profa. Dra. **Katia Sivieri**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Aprovado

Prof. Dr. **Cláudio Antônio de Andrade Lima**
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

Aprovado

Profa. Dra. **Silvana de Queiroz Silva**
(Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP)

Aprovado

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

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

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

Aos meus pais Mauro e Rosa
Minhas irmãs Juliana e Mariana
Minha sobrinha Nina
Pelo amor e carinho
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora das Graças.

Aos meus pais, Mauro e Rosa, dos quais orgulho imensamente e que representam exemplos de caráter, responsabilidade, generosidade e sabedoria.

As minhas irmãs Juliana e Mariana, essenciais na minha vida. Tanto no desenvolvimento do meu caráter como na minha formação profissional. Não há irmãs melhores que vocês. A minha sobrinha, Nina, que chegou para alegrar minha vida. Aproveito para agradecer meus cunhados Pedro e Evandro, amigos para todas as horas.

Agradeço minha querida Priscila Camiloti pela paciência, carinho e amor. Representa exemplo de caráter e compaixão. Presença incondicional em todas as horas, sem você o caminho seria, definitivamente, mais difícil. Obrigado por me tornar a cada dia uma pessoa melhor.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche pelo apoio constante durante a realização desse trabalho, confiança e ensinamento profissional e pessoal.

Ao amigo Dr. Dagoberto Okada pela colaboração direta em todo o projeto e pela paciência em ensinar passo a passo a rotina no laboratório, pelas discussões, sugestões e companheirismo.

À graduanda em Engenharia Ambiental, Alana Lima de Moura, pela ajuda constante, disposição, competência e paciência.

Aos membros do grupo de surfactantes, pelo convívio e troca de experiências: Alana Lima, Amanda Tavares, Fabricio Moterani, Filipe Vasconcelos, Juliana Kawanishi, Juliana Polizel, Mariana Carosia, Lorena Oliveira, Rachel B. Costa, Thais Zaninetti, Marcus Vinicius e Clara Faria.

Aos amigos do LPB: Adriana Maluf (Drica), Adys, Ana Cláudia Barana, Ariovaldo Silva (Ari), Bruna Moraes, Bruna Carrer, Camila, Carla Diniz, Carol Gil, Carol Zampol, Clara Faria, Daniel Moureira, Davi Andrade, Débora Fonseca, Djalma Ferraz, Eduardo Penteado (Dú), Filipe Vasconcelos Ferreira, Flavia Talarico Saia, Gleyce, Guilherme Peixoto, Guilherme Oliveira, Gustavo Mockaitis, Inês Tomina, Jorge Pantoja, José Alberto Corrêa Leite (Betão), Laís, Leandro Godói, Lênin, Lívia Botta, Lucas Marcon, Lucas Fuess, Marcus Vinicius, Mariana Carosia, Méliida Del Pilar, Paulo Clairmont, Rachael Biancalana, Rafael Brito (Bazola),

Regiane Corrêa, Regiane Ratti, Ricardo Almeida, Rogério Vilela, Samantha Santos, Sami Chatila, Sandra Maintinguer, Thaís Zaninetti, Tiago Martins, Tiago (Cebola), Theo Souza, Túlio Siqueira.

Ao corpo técnico e administrativo: Carol, Fernando, Eloísa, Maria Angela, Isabel e Sá.

A Sra. Teresinha, responsável pela lavanderia comercial da qual foi coletada a água residuária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio concedido por meio de bolsa de doutorado (Processo n.º. 2011/06783-1).

À Escola de Engenharia de São Carlos (USP), SHS, CNPQ e FAPESP pelo apoio.

Obrigado.

RESUMO

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

Nesse trabalho avaliaram-se quatro hipóteses sobre a remoção do alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reator EGSB (*expanded granular sludge bed*) alimentado ora com água residuária de lavanderia comercial, ora como meio sintético acrescido de LAS Padrão, com e sem suplementação de Fe(III) afluyente. Para tanto, em todas as hipóteses utilizou-se reator EGSB (1,4 L) com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 36h, condição mesofílica (30°C) e carga de LAS específica aplicada (CLEA) variando de 1,0 - 2,7 mgLAS.gSTV⁻¹.d⁻¹. DGGE e sequenciamento massivo do gene rRNA 16S (Plataforma 454-Pirosequenciamento e Ion Torrent) foram utilizados para caracterização microbiana. Em relação à **Hipótese A** avaliou-se o efeito da adaptação prévia da biomassa na remoção do LAS em água residuária. Para tanto, o EGSB-BA (biomassa adaptada) teve uma etapa prévia com LAS padrão e meio sintético (Etapa I), seguida da Etapa II com água residuária; e o EGSB-BNA (biomassa não adaptada) teve etapa única e alimentação diretamente com água residuária. Para a **Hipótese B** avaliou-se o efeito da suplementação com meio sintético na remoção de LAS em água residuária. Para tanto, o EGSB-Ag.Lav foi alimentado apenas com água residuária e bicarbonato de sódio e duas CLE (Etapa II - 1,0 e Etapa III - 2,7 mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹). Em relação às **Hipóteses C e D**, avaliou-se o efeito da suplementação de Fe(III) na remoção de LAS Padrão em meio sintético e LAS em água residuária, respectivamente. A **Hipótese A foi refutada** uma vez que as remoções de LAS em EGSB-BA-Etapa II (76%) e EGSB-BNA-Etapa I (78%) foram similares (ambas com água residuária). A remoção de LAS foi maior quando foi adicionada água residuária (EGSB-BA-Etapa II-76%) do que com LAS Padrão (EGSB-BA-Etapa I-63%). A **Hipótese B foi aceita**, uma vez que a alimentação do EGSB apenas com água residuária de lavanderia (CLE 1,0 mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹) mais bicarbonato de sódio resultou em remoções do surfactante de 93%, ou seja, 15-17 % maior que nos reatores suplementados com meio sintético (EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I). Na Etapa III verificou-se diminuição da remoção em 30 %. A **Hipótese C foi aceita** uma vez que se notou 20 % de aumento na remoção de LAS quando comparado com reator não suplementado com Fe(III) (EGSB-Fe - 84,3 % e EGSB-BA Etapa I - 63,5 %). A **Hipótese D foi refutada**, uma vez que embora tenha sido obtida alta remoção de LAS (91,2 %), esta não foi acompanhada pela redução férrica. Por meio do DGGE (domínio Bactéria) notou-se estratificação microbiana ao longo do reator na Etapa III (Hipótese B), provavelmente, em função do tamanho do grânulo que variou ao longo do reator. Por meio do sequenciamento massivo identificou-se bactérias semelhantes à *Geobacter* na amostra proveniente do reator EGSB-Fe da Hipótese C (17 % da abundância relativa), portanto, as condições impostas favoreceram esse gênero. Fato este não observado para o reator EGSB-Fe-Ag.Lav. da Hipótese D. A comparação da análise filogenética das bactérias para os diferentes reatores permitiu identificar gêneros em comum relacionados com a degradação de LAS, a saber: *Desulfobulbus*, *Geobacter*, *Syntrophorhabdus*, *Sporomusa*, *Comamonas*, *Holophaga*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Synergistes*.

Palavras-Chave: DGGE; Ion Torrent; Pirosequenciamento; microrganismos redutores de ferro; alquilbenzeno linear sulfonado; reator anaeróbio.

ABSTRACT

Delforno, T.P. **Degradation of anionic surfactant in EGSB reactor under methanogenic and iron-reducing conditions with commercial laundry wastewater.** 2014. 204 f. Thesis (Doctoral) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

This study evaluated four hypotheses about the removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in EGSB reactor (expanded granular sludge bed) fed sometimes with commercial laundry wastewater, sometimes with synthetic medium more Standard LAS, with and without Fe(III) influent supplementation. Therefore, in all hypotheses were used an EGSB reactor (1.4 L) with a hydraulic retention time (HRT) of 36 h, mesophilic condition (30 ° C) and load specific LAS (CLE) ranging from 1,0 to 2,7 mgLAS.gSTV⁻¹.d⁻¹. DGGE and massive sequencing of 16S rRNA gene (454-pyrosequencing and Ion Torrent platform) were used for microbial characterization. Regarding the **Hypothesis A**, it was evaluated the effect of biomass pre-adaptation for removal of LAS in wastewater. Then, the EGSB-BA (adapted biomass) had a previous step with standard LAS and synthetic medium (Phase I), followed by Stage II with wastewater; and EGSB-BNA (not adapted biomass) had single step and feeding directly with wastewater. Regarding the **Hypothesis B**, it was evaluated the effect of synthetic medium supplementation in the removal of LAS in wastewater. Then, the EGSB-Ag.Lav was fed only with wastewater and sodium bicarbonate with two CLE (Stage II - 1,0 e Stage III - 2,7 mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹). Regarding the **Hypothesis C and D**, it was evaluated the effect of Fe(III) supplementation in the removal of standard LAS and LAS in wastewater, respectively. The **Hypothesis A was refuted** since the LAS removal in EGSB-BA-Stage II (76%) and EGSB-BNA-Step I (78%) were similar (both with wastewater). The LAS removal was highest when wastewater was added (EGSB-BA-Stage-II 76%) than with standard LAS (EGSB-BA-Stage-I 63%). The **Hypothesis B was accepted**, since the feed of the EGSB only with wastewater from laundry (CLE 1,0 mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹) more sodium bicarbonate resulted in removal of 93% of surfactant, in other words, 15-17% higher than in the reactors supplemented with synthetic medium (EGSB-BA Stage II e EGSB-BNA Stage I). In the Stage III, there was a decrease by 30% of LAS removal. The **Hypothesis C was accepted**, since there was an increase of 20 % in the removal of LAS as compared to unsupplemented reactor with Fe (III) (EGSB-Fe - 84,3 % e EGSB-BA Stage I - 63,5 %). The **Hypothesis D was refuted** since although high LAS removal was obtained (91,2 %), this was not accompanied by ferric reduction. By means of DGGE (Bacteria domain) was noted a microbial stratification along the reactor in the Stage III (Hypothesis B), probably in function of granule size along the reactor. By means of massive sequencing were identified bacteria similar to *Geobacter* in the sample from the reactor EGSB-Fe Hypothesis C (relative abundance 17 %), therefore, the conditions favored this genre. This fact was not observed in the reactor EGSB-Fe-Ag.Lav. hypothesis D. A comparison of phylogenetic analysis of bacteria for different reactors allowed to identify common genera related to LAS degradation, namely: *Desulfobulbus*, *Geobacter*, *Syntrophorhabdus*, *Sporomusa*, *Comamonas*, *Holophaga*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Synergistes*.

Keywords: DGGE; Ion Torrent; Pyrosequencing; iron reducing microorganisms; linear alkylbenzene sulphonate; anaerobic reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura do alquilbenzeno linear sulfonado.....	29
Figura 3.2: Síntese das reações redox do Ferro.	39
Figura 3.3: Esquema da cascata enzimática no pirosequenciamento. Em vermelho destacam-se as enzimas que participam do processo e em azul os substratos enzimáticos. (Modificado de Ronaghi, <i>et al.</i> , 1998 e Margulies <i>et al.</i> , 2005)	49
Figura 4.1: Detalhes do reator EGSB: (A) esquema do reator, (B) detalhe do selo hídrico e sifão.....	56
Figura 4.2: Hipóteses elaboradas e fluxogramas experimentais dos reatores não suplementados com Ferro.....	66
Figura 4.3: Hipóteses elaboradas e fluxogramas experimentais dos reatores suplementados com Ferro III.....	67
Figura 4.4: Pontos de coleta de amostras para a PCR-DGGE da Etapa III do EGSB-Ag.Lav.	71
Figura 5.1: Variação temporal da concentração de LAS: (●▲) Afluente e (○□) Efluente.	82
Figura 5.2: <i>Box-Plot</i> da porcentagem de remoção de LAS e da concentração de LAS afluente e efluente. EGSB-BA Etapa I (53 amostras) e EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I (35 amostras).	83
Figura 5.3: Distribuição do destino final de LAS.....	85
Figura 5.4: <i>Box-Plot</i> de ácidos orgânicos voláteis efluente do EGSB-BA e EGSB-BNA.	86
Figura 5.5: <i>Box-Plot</i> do diâmetro médio dos grânulos. EGSB-BA e EGSB-BNA.....	87
Figura 5.6: Grânulos do (A) EGSB-BA Etapa I, (B) EGSB-BA Etapa II, (C) Inóculo e (D) EGSB-BNA Etapa I.	88
Figura 5.7: Análise de Cluster (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do RNAr 16S para o domínio <i>Bacteria</i> . (a) Amostras do EGSB-BA e EGSB-BNA, (b) Amostras do EGSB-BA e (c) Amostras do EGSB-BA e EGSB-BNA apenas com água de lavanderia.	91

Figura 5.8: Análise de Cluster (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do RNAr 16S para o domínio Archaea. (a) Amostras do EGSB-BA e EGSB-BNA, (b) Amostras do EGSB-BA e (c) Amostras do EGSB-BA e EGSB-BNA apenas com água de lavanderia.	92
Figura 5.9: Curvas de rarefação definidas para diferentes percentagens de similaridade. (A) 80% de similaridade para nível de Filo; (B) 95 % para nível de gênero e (C) 97 % para o nível de espécie.....	95
Figura 5.10: Abundância relativa de filós para biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I.....	97
Figura 5.11: Distribuição da condição de crescimento dos gêneros em função do número de sequências.	99
Figura 5.12: Variação temporal da porcentagem de remoção de LAS (▲), sulfeto (□) e LAS afluyente (●).....	107
Figura 5.13: <i>Box-Plot</i> da concentração de LAS afluyente (A), efluente (B) e porcentagem de remoção de LAS (C). Etapa II (24 amostras), Etapa III 90° ao 150° (21 amostras), Etapa III 150° ao 185° (12 amostras) e Etapa III 185° ao 217° (7 amostras).	108
Figura 5.14: Distribuição do destino final de LAS em EGSB-Ag.Lav.	110
Figura 5.15: Análise de <i>cluster</i> (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE do gene RNAr 16S para o domínio <i>Bacteria</i> . (A) Foto do gel de DGGE. (B) Biomassa da Etapa II (12mgLAS/L) e Etapa III (29mgLAS/L). (C) Biomassa obtida ao longo do reator durante a Etapa III. (D) Distribuição espacial de pontos de amostragens em EGSB. ML – manta de lodo; SF – separador de fases e DV – distribuidor de vazão. .	112
Figura 5.16: (A) Biomassa do separador de Fases; (B) Região superior da manta de lodo (grânulos cisalhados) e (C) Manta de lodo completa.	113
Figura 5.17: Curvas de rarefação definidas para diferentes percentagens de similaridade. (A) 80% de similaridade para nível de Filo; (B) 95 % para nível de gênero e (C) 97 % para o nível de espécie.	115
Figura 5.18: Dendograma baseado no índice de Bray-Curtis para amostras do EGSB-Ag.Lav.	116

Figura 5.19: Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função das OTUs (A) e.....	117
Figura 5.20: Abundância relativa de filo nas amostras do EGSB-Ag.Lav Etapa II e Etapa III.....	119
Figura 5.21: Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes nas amostras do EGSB-Ag.Lav Etapa II e Etapa III. Gêneros sublinhados estão em comum nas 4 amostras entre os mais abundantes.....	120
Figura 5.22: Gêneros relacionados com a degradação de LAS e/ou compostos aromáticos.....	123
Figura 5.23: Abundância relativa do total de gêneros classificados, relacionados com ω -oxidação, β -oxidação, dessulfonação e degradação de compostos aromáticos.....	126
Figura 5.24: Abundância relativa do total de gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos e de crescimento aeróbio, anaeróbio e anaeróbio facultativo. .	127
Figura 5.25: <i>Box-Plot</i> de LAS afluente (A), efluente (B) e porcentagem de remoção de LAS (C) da Etapa I (23 amostras).....	134
Figura 5.26: <i>Box-Plot</i> da concentração de Fe(Total) (A, D), Fe(II) (B, E) e porcentagem de redução (C, F) no afluente e efluente (28 amostras).	136
Figura 5.27: Variação temporal da relação Fe(II; \square) e Fe(Total; \triangle) afluente e efluente. (■) Concentração de LAS afluente e (▲) porcentagem de remoção.	137
Figura 5.28: Distribuição do destino final de LAS em EGSB-Fe.	138
Figura 5.29: <i>Box-Plot</i> da concentração de LAS afluente (A), efluente (B) e porcentagem de remoção de LAS (C) da Etapa I (16 amostras) para o reator EGSB-Fe-Ag.Lav. ...	141
Figura 5.30: <i>Box-Plot</i> da concentração de Fe(Total) (A, D), Fe(II) (B, E) e porcentagem de redução (C, F) afluente e efluente (28 amostras) do EGSB-Fe-Ag.Lav.	142
Figura 5.31: Distribuição do destino final de LAS em EGSB-Fe-Ag.Lav.....	145
Figura 5.32: 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; nas amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.....	147
Figura 5.33: Dendograma baseado no índice de Bray-Curtis para amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.....	149

Figura 5.34: Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função das OTUs (A) e em função do número de sequências (B) na biomassa do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.	150
Figura 5.35: Abundância relativa de filos nas biomassas do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.	152
Figura 5.36: Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes nas amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav. Gêneros sublinhados estão em comum nas 3 amostras entre os mais abundantes.	153
Figura 5.37: Gêneros relacionados com a degradação da molécula de LAS e/ou compostos aromáticos nas amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.	156
Figura 5.38: Abundância relativa do total de gêneros classificados relacionados com ω -oxidação, β -oxidação, dessulfonação e degradação de compostos aromáticos nas biomassas do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.	160
Figura 5.39: Abundância relativa do total de gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos de crescimento aeróbio, anaeróbio e anaeróbio facultativo nas biomassas do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.	161
Figura 5.40: Curvas de rarefação de todas as amostras sequenciadas neste trabalho. 80 % nível de filo, 95 % nível de gênero e 97 % nível de espécie. Amostras EGSB-BA e EGSB-BNA o sequenciamento foi realizado na plataforma 454 e as demais na plataforma Ion Torrent.	168
Figura 5.41: Condição de crescimento dos gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos e/ou LAS para todas as condições de operação do EGSB.	173
Figura 5.42: Árvore filogenética das principais OTUs relacionadas com a degradação do LAS nas amostras obtidas durante a hipótese A. A barra de escala informa a distância filogenética e <i>Chloroflexus aurantiacus</i> foi utilizada com outgroup. <T> significa é uma espécie tipo.	174
Figura 5.43: Arvore filogenética das principais OTUs relacionadas com a degradação do LAS nas amostras obtidas durante a hipótese B. A barra de escala informa a distância filogenética e <i>Chloroflexus aurantiacus</i> foi utilizada com outgroup. <T> significa é uma espécie tipo.	175
Figura 5.44: Arvore filogenética das principais OTUs relacionadas com a degradação do LAS nas amostras obtidas durante a hipótese C, D e inóculo. A barra de escala informa	

a distância filogenética e <i>Chloroflexus aurantiacus</i> foi utilizada com outgroup. <T> significa é uma espécie tipo.....	177
Figura 10.1 Distribuição do tamanho das sequências para as amostras EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I. (A) e (B) dados brutos; (C) e (D) dados processados.....	194
Figura 10.2: Distribuição do tamanho das sequências nos dados brutos para as amostras do EGSB Ag.Lav.....	195
Figura 10.3: Distribuição do tamanho das sequências nos dados processados para as amostras do EGSB Ag.Lav. ML – manta de lodo e SF – separador de fase.....	196
Figura 10.4: Distribuição do tamanho das sequências nos dados brutos para as amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.....	197
Figura 10.5: Distribuição do tamanho das sequências nos dados processados para as amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.	198

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Resumos dos trabalhos realizados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) com reatores anaeróbios.	33
Tabela 3.2: Relação DQO, LAS e Sulfeto na redução do Fe(III).....	40
Tabela 3.3: Valores de qualidade Phred, probabilidades de erro e acuracidade.	46
Tabela 3.4: Gêneros relacionados com a degradação de LAS.	53
Tabela 4.1: Meio Mineral Modificado*	54
Tabela 4.2: Solução de Vitaminas	54
Tabela 4.3: Análises físico-químicas.....	57
Tabela 4.8: Etapas da análise das sequências obtidas nas plataformas 454 e Ion Torrent.	64
Tabela 4.5: Parâmetros de alfa-diversidade.....	65
Tabela 4.6: Parâmetros Operacionais. Avaliação da Adaptação da Biomassa.....	68
Tabela 4.7: Parâmetros Operacionais. Avaliação da remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial sem adição de macro/micro nutrientes, vitaminas e co-substratos (metanol, etanol e extrato de levedura)	70

Tabela 4.8: Condições operacionais para avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS Padrão em reator EGSB.	72
Tabela 4.9: Condições operacionais para avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS presente em água residuária de lavanderia.	73
Tabela 5.1: Resultados das caracterizações da água de lavanderia.	76
Tabela 5.2: Resultados dos reatores EGSB-BA e EGSB-BNA.	79
Tabela 5.3: Balanço de massa de LAS do EGSB-BA e EGSB-BNA.	84
Tabela 5.4: Resultados de Pirosequenciamento.	93
Tabela 5.5: Abundância relativa de OTUs e sequências classificadas em cada amostra.	96
Tabela 5.6: Abundância relativa de sequências e número de OTUs de gêneros nas amostras EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I.	98
Tabela 5.7: Abundância relativa de sequências e Número de OTUs de Gêneros relacionados com a degradação de LAS e outros compostos aromáticos em biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I.	101
Tabela 5.8: Resultados dos parâmetros analisados em EGSB-Ág. Lav.	105
Tabela 5.9: Balanço de massa de LAS do reator EGSB-Ag.Lav.	109
Tabela 5.10: Resultados do sequenciamento das amostras do EGSB Ag. Lav. (Hipótese B) pela plataforma Ion Torrent.	114
Tabela 5.11: Número de OTUs e abundância relativa de sequências classificadas em cada amostra.	118
Tabela 5.12: Gêneros relacionados com a degradação de LAS e/ou compostos aromáticos.	124
Tabela 5.13: Comparação dos parâmetros operacionais aplicados em reatores suplementados com ferro (EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav) e sem ferro (EGSB-BA Etapa II, Hipótese A) e (EGSB-Ag.Lav Etapa II, Hipótese B)	131
Tabela 5.14: Resultados dos parâmetros analisados em EGSB-Fe.	133
Tabela 5.15: Comparação dos resultados EGSB-BA Etapa I e EGSB-Fe.	135
Tabela 5.16: Balanço de massa de LAS do EGSB-Fe.	138
Tabela 5.17: Resultados dos parâmetros analisados em EGSB-Fe-Ag.Lav.	140

Tabela 5.18: Comparação dos resultados em EGSB-Ag.Lav Etapa III e EGSB-Fe-Ag.Lav.....	143
Tabela 5.19: Balanço de massa de LAS em EGSB-Fe-Ag.Lav.	144
Tabela 5.20: Resultados do sequenciamento das amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav. via plataforma Ion Torrent.....	146
Tabela 5.21: Número de OTUs e abundância relativa de sequências classificadas nas amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.	151
Tabela 5.22: Gêneros relacionados com a degradação de LAS e/ou compostos aromáticos.....	158
Tabela 5.23: Resumo dos resultados da operação dos reatores nas diferentes hipóteses.	165
Tabela 5.24: Resumo dos resultados do sequenciamento das amostras nas diferentes hipóteses.	167
Tabela 5.25: Abundância relativa dos gêneros relacionados com a degradação de composto aromáticos.	171
Tabela 10.1: Abundância relativa de sequências e OTUs de Filo nas amostras EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I.	199
Tabela 10.2: Abundância relativa de filo para amostras do EGSB-Ag.Lav.....	200
Tabela 10.3: Abundância relativa de gêneros relacionados com a degradação da molécula de LAS e/ou compostos aromáticos para amostras do EGSB-Ag.Lav.....	201
Tabela 10.4: Abundância relativa de filamentos para amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.....	202
Tabela 10.5: Abundância relativa de gêneros relacionados com a degradação da molécula de LAS e/ou compostos aromáticos. para amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.	203

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante)
DIRM	<i>Dissimilatory iron reduction microbe</i>
AOV	Ácidos orgânicos voláteis
APHA	American public health association
ASBR	Reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLEA	Carga de LAS específica Aplicada
CLE	Carga de LAS específica
COE	Carga Orgânica Específica
COEA	Carga Orgânica Específica Aplicada
CONAMA	Conselho nacional de meio ambiente
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (bases nitrogenadas)
DQO	Demanda química de oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EGSB	<i>Expanded granular sludge bed</i> (Reator de leito granular expandido)
EGSB-Ag.Lav.	Reator de leito granular expandido alimentado apenas com água de lavanderia mais bicarbonato de sódio
EGSB-BA	Reator de leito granular expandido com Biomassa Adaptada
EGSB-BNA	Reator de leito granular expandido com Biomassa Não Adaptada
EGSB-Fe	Reator de leito granular expandido alimentado com LAS Padrão e meio sintético
EGSB-Fe-Ag.Lav	Reator de leito granular expandido alimentado apenas com água de lavanderia mais bicarbonato de sódio e EDTA-Fe(III)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
IC50	50% da concentração máxima de inibição
INDEAR	Instituto de Agrobiotecnologia Rosario
LAS	Alquilbenzeno linear sulfonado
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
mgHAc	Equivalente a ácido acético
ML	Manta de Lodo
MRF	Microrganismos redutores de Ferro
NMP	Número mais provável
NTA	Ácido nitriloacético
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl

OTU	Operation taxonomic units
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação de polimerização em cadeia)
pH	Potencial hidrogeniônico
RAHLF	Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
RDP	Ribossomal database project
RLF	Reator de Leito Fluidificado
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SDF	Sólidos dissolvidos fixos
SDT	Sólidos dissolvidos totais
SDV	Sólidos dissolvidos voláteis
SF	Separador de Fase
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
STF	Sólidos totais fixos
STV	Sólidos totais voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulico
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket (Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic averages</i>
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SIMBOLOS

°C	graus Celsius
µg/Kg	micrograma por kilograma
µg/L	micrograma por litro
µL	microlitro
µmol	micromol
µmol/L	micromol por litro
C10-18	cadeia alquílica com 10 a 18 carbonos
cm	centímetro
d	dia
g	grama
g/cm	grama por centímetro
g/L	grama por litro
h	hora
kg	quilograma
L	litro
L/h	litros por hora
m	metro
M	molar
m/s	metros por segundo
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/L	miligrama por litro
mgCaCO₃/L	miligrama de carbonato de cálcio por litro
mgDQO/gSTV.d	miligrama de DQO por sólidos totais voláteis por dia
mgDQO/L.d	miligrama de DQO por litro por dia
mgHAc/L	miligrama de equivalência de ácido acético por litro
mgLAS/gSTV.d	miligrama de LAS por sólidos totais voláteis por dia
mgLAS/L	miligrama de LAS por litro
mgLAS/L.d	miligrama de LAS por litro por dia
mL	mililitro
mL/h	mililitros por hora
mL/L	mililitros por litro
mL/min	mililitros por minuto
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimol
mV	milivolt
ng	nanograma
ng/L	nanograma por litro
nm	nanômetros
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
LISTA DE SIMBOLOS	xx
SUMÁRIO.....	xxi
1 Introdução.....	24
2 Objetivos e Hipóteses.....	27
3 Revisão Bibliográfica.....	28
3.1 Alquilbenzeno Linear Sulfonado	28
3.2 Reator EGSB.....	34
3.3 Tratamento biológico de água residuária de lavanderia comercial.....	35
3.4 Microrganismos Redutores de Ferro.....	36
3.5 Diversidade Microbiana.....	41
3.5.1 PCR/DGGE	42
3.5.2 Sequenciadores de alto rendimento	43
3.5.2.1 Pirosequenciamento	47
3.5.2.2 Ion Torrent	50
3.6 Diversidade microbiana em reatores aplicados na degradação do LAS	50
4 Material e Métodos.....	54
4.1 Meio Sintético.....	54
4.2 Água Residuária de Lavanderia Comercial	55
4.3 Alquilbenzeno Linear Sulfonado – LAS (Padrão).....	55
4.4 Inóculo	55
4.5 Descrição do Reator.....	56

4.5.1	EGSB - Expanded Granular Sludge Bed.....	56
4.6	Análises Físico-Químicas e Cromatográficas.....	56
4.6.1	Determinação de Fe(II) e Ferro Total.....	58
4.6.2	Granulometria.....	59
4.7	Análises Microbiológicas	59
4.7.1	Estocagem de Amostra e Extração de DNA.....	59
4.7.2	PCR-DGGE	60
4.7.3	Sequenciamento Massivo	60
4.7.3.1	Sequenciamento gene rRNA 16S– Plataforma 454.....	61
4.7.3.2	Sequenciamento gene rRNA 16S – Plataforma Ion Torrent.....	61
4.7.3.3	Análise das Sequências	61
4.8	Procedimento Experimental.....	65
4.8.1	Hipótese A - Avaliação da adaptação da biomassa no tratamento de água residuária de lavanderia comercial.....	68
4.8.2	Hipótese B - Avaliação do tratamento de água residuária de lavanderia comercial sem adição de meio sintético.....	69
4.8.3	Hipótese C - Avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS padrão em reator EGSB.....	71
4.8.4	Hipótese D - Avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS presente em água residuária de lavanderia em reator EGSB..	73
5	Resultados e Discussão	75
5.1	Caracterização da Água de Lavanderia.....	75
5.2	Hipótese A - Avaliação da adaptação da biomassa no tratamento de água residuária de lavanderia comercial.....	78
5.2.1	Operação dos Reatores	78
5.2.2	Caracterização Microbiana.....	89
5.2.3	Considerações Parciais	102
5.3	Hipótese B - Avaliação do tratamento de água residuária de lavanderia comercial sem adição de meio sintético	104
5.3.1	Operação do Reator	104

5.3.2	Caracterização Microbiana	110
5.3.3	Considerações Parciais	128
5.4	Hipótese C e D - Reatores Suplementados com Ferro.....	130
5.4.1	Hipótese C - Avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS padrão em EGSB	131
5.4.2	Hipótese D - Avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS em água residuária de lavanderia em EGSB	139
5.4.3	Caracterização Microbiana	145
5.4.4	Considerações Parciais	161
5.5	Comparação dos resultados em relação as diferentes hipóteses	162
5.5.1	Operação dos reatores.....	163
5.5.2	Caracterização Microbiana	166
6	Considerações Finais.....	178
7	Conclusões	181
8	Sugestões.....	181
9	Bibliografia.....	182
10	Apêndice.....	194
10.1	Figuras	194
10.2	Tabelas	199

1 Introdução

Os tenso-ativos ou surfactantes são substâncias que têm em sua estrutura química, uma parte polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica). Essa característica faz com que sejam empregados em ampla variedade de produtos, principalmente no campo da detergência (sabões, sabão em pó, detergentes). Nesse contexto, destaca-se um surfactante aniônico, o alquilbenzeno linear sulfonado - LAS, com produção mundial de milhões de toneladas ao ano (Sanz *et al.* 2003). Sua elevada produção aliada a sua baixa biodegradabilidade em condição anaeróbia faz com que esse surfactante seja detectado em esgoto doméstico (1-18 mg/L) (Mungray e Kumar, 2009), água residuária de lavanderia comercial (até 1.024 mg/L) (Seo *et al.*, 2001; Braga e Varesche, 2014), além de sedimentos de rios (28 mg/g) (Lais *et al.* 2010) e solos poluídos.

O destino inadequado de água residuária contendo LAS pode acarretar na formação de espumas que inibe os processos naturais de autodepuração de rios e lagoas, assim como, o processo aeróbio e/ou anaeróbio em estações de tratamento de esgoto. Dessa forma, diante do elevado consumo de surfactantes, em especial do LAS, e dos impactos causados pelo seu destino inadequado, há necessidade de desenvolvimento de tecnologias de tratamento deste poluente. Nesse contexto, por meio da aplicação de diferentes configurações de reatores anaeróbios busca-se a remoção química, física e biológica do LAS.

O Laboratório de Processos Biológicos – LPB (USP-São Carlos) a partir de 2007 iniciou-se uma série de estudos visando à remoção do LAS em reatores biológicos anaeróbios. Ao longo de cinco anos de pesquisa muito se avançou sobre a remoção de LAS (padrão Sigma) em condição fermentativa-metanogênica. A partir dessa perspectiva adquiriu-se conhecimento científico e, atualmente novas possibilidades direcionadas na aplicação de água residuária real (água de lavanderia comercial).

Dentre os reatores estudados, observou-se maior eficiência de remoção de LAS Padrão (acima de 90%) em reator de leito fluidificado com areia como material suporte (Oliveira *et al.*, 2010). Todavia, o custo de bombeamento para fluidificação de um leito de areia torna esse reator menos atraente para aplicação em escala real. Desse modo, outra possibilidade é o reator de leito de lodo expandido (*Expanded Granular Sludge Bed – EGSB*), no qual se utiliza lodo granulado, cuja expansão exige menor vazão de bombeamento quando comparado com o leito de areia. As características do EGSB são

similares ao reator de leito fluidificado, ou seja, regime de mistura completa, alta relação comprimento-diâmetro e recirculação efluente, adequada para diluir água residuária (Seghezzo *et al.*, 1998).

A água residuária de lavanderia comercial corresponde a um efluente com altas concentrações de surfactantes (12 - 1.024 mgLAS/L) e matéria orgânica (620-4800 mgDQO/L) (Okada, 2012; Braga e Vareche, 2014 e). Nessa água, outros compostos como neutralizantes, alcalinizantes (hidróxido de sódio), sequestrantes, coadjuvantes, branqueador óptico entre outros fazem parte da sua composição. Todavia, são escassos os relatos sobre a degradação de LAS em água residuária de lavanderia.

Além dos desafios encontrados em relação à degradação de LAS em água residuária de lavanderia comercial, pouco se tem avançado na aplicação de outros receptores de elétrons. Ressalta-se que a escassez de receptores de elétrons em condição anaeróbia representa uma barreira na remoção de compostos recalcitrante e/ou de moléculas extensas (Reddy *et al.*, 2002), como a molécula de LAS.

Alguns receptores finais de elétrons como nitrato e sulfato podem estimular o metabolismo de carbono. Todavia, nitrato não pode ser adicionado em concentrações elevadas uma vez que está associado a doenças como metahemoglobinemia e à ocorrência de câncer de estômago (Metcalf & Eddy, 2003). O sulfato quando reduzido em condição anaeróbia produz sulfeto, extremamente corrosivo. Dessa forma, Fe(III) pode ser uma alternativa com baixo risco a saúde humana e/ou ao meio ambiente.

A molécula de LAS pode ser oxidada a dióxido de carbono e metano, ou via redução de nitrato ou sulfato (Sanz *et al.*, 2003; Lobner *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2010). Entretanto, não há nenhum relato na literatura relacionado à remoção de LAS com redução de ferro (III). Deve-se salientar que Fe(III), como receptor final de elétrons favorece o desenvolvimento de microrganismos, relacionados com a remoção de hidrocarbonetos aromáticos, portanto, tendo participação ativa na biorremediação de ambientes contaminados (Lovley, 1991).

Dessa forma, foram avaliados alguns aspectos envolvidos com a remoção de LAS em água residuária de lavanderia, tais como, adaptação da biomassa e suplementação afluente (macro/micro nutrientes, vitaminas, e co-substratos (etanol, metanol e extrato de levedura)) em reator EGSB. Além disso, avaliou-se também a remoção de LAS em reatores suplementados com Fe(III).

Ao longo do trabalho, duas técnicas de biologia molecular foram utilizadas como o DGGE (eletroforese gel em gradiente desnaturante) e sequenciamento massivo do gene rRNA 16S. No sequenciamento massivo foram utilizadas duas plataformas, a 454-Pirosequenciamento e Ion Torrent. Dessa forma, foi obtida elevada cobertura amostral e, conseqüentemente, maior confiabilidade dos dados.

2 Objetivos e Hipóteses

Nesta tese estão abordadas quatro hipóteses distintas associadas aos seus respectivos objetivos gerais:

Hipótese A: Um reator EGSB com biomassa adaptada ao alquilbenzeno linear sulfonado, terá maior estabilidade e maior eficiência de remoção (DQO e LAS), no tratamento de água residuária de lavanderia comercial em comparação com um sistema com biomassa adaptada.

- **Objetivos:** Avaliar o efeito da adaptação da biomassa ao alquilbenzeno linear sulfonado na remoção desse surfactante em água residuária de lavanderia comercial e na comunidade microbiana.

Hipótese B: A alimentação de um reator EGSB apenas com água residuária de lavanderia comercial e agente tamponante (bicarbonato de sódio), é suficiente para manter a estabilidade do sistema e remoções satisfatórias de DQO e LAS.

- **Objetivos:** Avaliar a influência da suplementação com meio sintético na remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial e caracterizar a comunidade microbiana.

Hipótese C: A disponibilidade de Ferro III, como receptor final de elétrons, resulta em maiores eficiências de remoção do alquilbenzeno linear sulfonado (LAS Padrão) em reator EGSB.

- **Objetivos:** Avaliar a influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS padrão e caracterizar a comunidade microbiana.

Hipótese D: A disponibilidade de Ferro III, como receptor final de elétrons, resulta em maiores eficiências de remoção do alquilbenzeno linear sulfonado (presente em água de lavanderia) em reator EGSB.

- **Objetivos:** Avaliar a influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS em água de lavanderia e caracterizar a comunidade microbiana.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Alquilbenzeno Linear Sulfonado

Surfactantes constituem uma importante classe de produtos industriais químicos amplamente utilizados em quase todos os setores da indústria moderna. São compostos orgânicos anfipáticos constituídos de uma região hidrofóbica e outra região hidrofílica. A porção hidrofóbica (apolar) é frequentemente composta por uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto, a porção hidrofílica (polar) pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfótera. Alguns exemplos são os seguintes: Alquilbenzeno linear sulfonado (aniônico), Álcool Etoxilado (não-iônico) e Sais de Amônio Quaternário (catiônicos).

O comportamento anfifílico, decorrente da presença de uma região hidrofóbica e outra hidrofílica na mesma molécula, confere aos surfactantes uma propriedade única; ou seja, a redução da tensão superficial. Essa propriedade representa a base para uma gama de aplicações importantes, por exemplo, na formulação de agroquímicos, fármacos e produtos de consumo (xampus, condicionadores), no combate a vazamento de petróleo e, ainda, em outros usos específicos (Penteado *et al.*, 2006). A maior utilização de surfactantes concentra-se na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene.

Devido às excelentes propriedades e custo relativamente baixo, LAS é o surfactante aniônico mais amplamente utilizado em todo o mundo (Garcia *et al.*, 2005) e aliado a sua baixa biodegradabilidade está presente, tanto em água residuária industrial, como em esgoto doméstico.

Comercialmente, o LAS é vendido como uma mistura de homólogos (em função do tamanho da cadeia alquílica) e isômeros de posição (em função da posição do anel aromático). Estruturalmente é constituído de uma cadeia alquílica, com diferentes números de átomos de carbono (de 10 a 14), enquanto a outra parte, hidrofílica corresponde ao anel aromático sulfonado. O grupo sulfonado pode estar ligado a qualquer átomo de carbono com exceção aos carbonos terminais da cadeia alquílica (Figura 3.1).

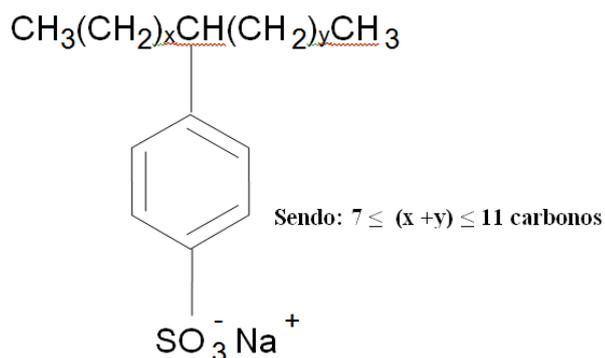


Figura 3.1: Estrutura do alquilbenzeno linear sulfonado.
(Sanz *et al.*, 2003)

Segundo HERA (*Human and Environmental Risk Assessment*, 2007), a remoção de LAS pode ocorrer pela combinação de três processos: precipitação, biodegradação e adsorção. A principal forma de remoção em condição anaeróbia é a degradação microbiana, geralmente em torno de 80 % (Painter & Zabel, 1989); precipitação e adsorção em sólidos suspensos podem representar de 30 a 70% (Berna *et al.*, 2007)

Segundo Painter & Zabel (1989) a degradação microbiana aeróbia, em especial por lodos ativados podem remover mais de 95% de surfactantes aniônicos encontrados no esgoto doméstico (1 a 21 mg/L).

Em relação à degradação anaeróbia do LAS, algumas constatações foram verificadas, por exemplo, Mogensen *et al.* (2003) detectaram ácido benzeno sulfônico e benzaldeído e, Duarte *et al.* (2010) encontraram benzeno e tolueno em efluente de reator anaeróbio alimentado com LAS.

Lara-Martin *et al.* (2010) observaram a rota de degradação do LAS utilizando sedimento marinho anóxico como inóculo para testes em batelada usando frasco de 300 mL. Para tanto, foram criados microcosmos com o sedimento coletado no litoral de Cádiz (Espanha), com N₂/CO₂ (80:20%) no *headspace*, e 10, 20 e 50 mg/L de LAS. Segundo os autores ocorreu remoção de 79% em 165 dias de operação. Inicialmente, ocorreu adição de fumarato a molécula de LAS, biotransformação em ácido sulfofenil carboxílico (SPC) e sucessivas reações de β-oxidação.

Em relação ao efeito inibitório da molécula de LAS verificou-se a inibição das atividades metanogênica e acidogênica (Garcia-Morales *et al.*, 2001; Mösche e Meyer, 2002; Angelidaki *et al.*, 2004). Angelidaki *et al.* (2004) avaliaram o potencial de

inibição para microrganismos consumidores de propionato, acetato, butirato, glicose e H_2CO_2 . Na presença de 50mgLAS/L, houve 100% de inibição dos microrganismos consumidores de propionato. Enquanto, para os demais microrganismos consumidores de acetato, butirato, glicose e H_2CO_2 o valor da concentração de inibição foi de 141 mgLAS/L. Por outro lado, Garcia-Morales *et al.* (2001) observaram IC_{50} (50% da concentração máxima de inibição) de 6,3 mgLAS/L para atividade metanogênica e 18,9 mgLAS/L para atividade acidogênica. Ressalta-se que o tamanho da cadeia alquílica tem relação direta com o potencial de inibição (Garcia *et al.*, 2006). Quanto menor a cadeia alquílica maior a inibição de microrganismos metanogênicos. Utilizando homólogos C_{10} - C_{12} , Garcia *et al.* (2006) observaram que para concentrações acima de 100 mgLAS/L ocorreu completa inibição de microrganismos metanogênicos. Enquanto, para homólogos C_{13} - C_{14} , não foi observada inibição para concentrações acima de 200 mgLAS/L.

Reatores biológicos tem sido empregados em ampla variedade de condições para a remoção do LAS. Até o presente momento foram estudados os seguintes reatores: reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) (Duarte *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009;), reator de leito fluidificado (RALF) (Oliveira *et al.*, 2010; Carosia *et al.*, 2014), reator operado em bateladas sequenciais (Duarte *et al.*, 2010), reator de manta de lodo granulado expandido (Delforno *et al.*, 2012) e reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) (Okada *et al.*, 2012) (Tabela 3.1).

Por meio da análise dos dados apresentados na Tabela 3.1 e demais publicações científicas (Lobner *et al.*, 2005; Mogensen & Ahring, 2002; Mogensen *et al.*, 2001) observou-se que alguns parâmetros operacionais foram abordados, tais como, concentração de LAS, suplementação afluente, estabilidade do processo, TDH, temperatura, biodisponibilidade de LAS, efeito do material suporte na remoção de LAS e a fonte de LAS (LAS Padrão, água de lavanderia e sabão em pó).

Dessa forma, notou-se tendencia de utilizar concentrações inferiores à 20 mg/L de LAS afluente, provavelmente, em virtude dos valores obtidos por Angelidaki *et al.*, (2004). Esses autores verificaram que 50 mgLAS/L inibiram os grupos microbianos que participavam do processo anaeróbio.

Além de concentrações menores que 50 mgLAS/L a suplementação afluente com macro/micro nutrientes, vitaminas e co-substratos é frequentemente relatada nos trabalhos envolvendo a remoção biológica de LAS. Tal fato deveu-se aos resultados

obtidos por Abboud *et al.*, (2007), em que a suplementação com fonte de carbono e nitrogênio acarretou em aumento da biodegradação de LAS de 60% para 90% em culturas mistas de bactérias anaeróbias facultativas semelhantes a *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pantoea agglomerans*, ambos isolados de água residuária. As diferentes fontes de carbono e nitrogênio utilizadas foram as seguintes: glicose, sacarose, maltose, manitol, succinato, nitrato de amônio, cloreto de amônio, caseína, extrato de levedura e triptona.

Essa suplementação foi necessária para reatores usados no tratamento de LAS na forma de Padrão-Sigma, todavia, foi desnecessária para reatores UASB alimentados com água residuária de lavanderia (Okada, 2012) devido à concentração constante de ácidos voláteis, nitrogênio e fósforo (Okada, 2012; Braga e Varesche 2014).

Duarte *et al.* (2010) observaram aumento da eficiência de remoção (34% - 53%) após a retirada de co-substratos (extrato de levedura, amido e sacarose) em reator em batelada sequencial. Além disso, Okada (2012) observou aumento na remoção de LAS para carga orgânica aplicada de 30 mgDQO/ST.d em reatores UASB com 10 mgLAS/L afluente (Tabela 3.1).

Além da carga orgânica aplicada a estabilidade do processo anaeróbio, ou seja, produção de ácidos orgânicos voláteis é importante na degradação de LAS (Lobner *et al.*, 2005). Analisando um reator UASB com TDH de 48 horas com 10 mgLAS/L afluente, os autores verificaram que maiores remoções de LAS foram obtidas para concentração de ácidos voláteis abaixo de 50 mgHAc/L.

Em relação ao TDH, melhora significativa da remoção do LAS foi observada com o aumento do TDH, provavelmente, devido ao maior tempo de contato do LAS com a biomassa (Okada *et al.*, 2011; Delforno *et al.*, 2012). Nesse sentido, Delforno *et al.* (2012) observaram diminuição de 26 % na remoção de LAS com a redução do TDH de 32 h para 26 h. Além do incremento na CLE (carga de LAS específica) que em TDH de 32h e 26h foram de $1,63 \pm 0,48$ mg/gSTV.d e $2,61 \pm 0,54$ mg/gSTV.d, respectivamente, o tempo de contato biomassa-LAS foi decisivo para as remoções obtidas. Okada *et al.* (2011) avaliaram o efeito do TDH (6h, 35h e 80h) em reator UASB para CLE variando de 0,6 – 10,1 mg/gSTV.d. Os autores supracitados observaram as seguintes remoções: 6h – 18 %; 35h – 37-53 % e 80h – 55 % e verificaram que em TDH de 35h ocorria equilíbrio entre o tempo necessário para as reações de degradação de LAS e CLE aplicada.

Em relação a temperatura Lobner *et al.* (2005) avaliaram a remoção de LAS em reator UASB (200mL) para concentração de LAS de 10 mg/L, TDH de 48h a 55°C e 32° C. Os autores obtiveram remoção de 40-80%, para as duas condições de temperatura testadas e nenhuma diferença foi encontrada na eficiência de remoção de LAS sob tais condições.

Em relação ao material suporte Oliveira *et al.* (2010) avaliaram a remoção de LAS padrão (18,8 mg LAS/L afluente) em reator de leito fluidificado (volume total de 353 mL) com diferentes materiais suportes (carvão ativado, argila expandida, pérolas de vidro e areia), sob condição mesofílica e TDH de 18 horas. Os autores supracitados observaram diferença na remoção do LAS em função dos diferentes materiais suportes. A areia e vidro foram aqueles em que se obteve maior remoção (>98 %), enquanto, para argila expandida e carvão ativado as remoções foram de 83 e 86 %, respectivamente.

Em relação à influência da fonte de LAS, Okada (2012) verificou maiores remoções de LAS em água residuária de lavanderia (85 %) do que em meio sintético com LAS Padrão (~52 %; Tabela 3.1). Segundo o autor supracitado, a degradação do LAS em água residuária é favorecida pela diversidade e baixa concentração de co-substratos (ácidos orgânicos voláteis - fórmico, isovalérico, capróico). Por outro lado, Carosia *et al.* (2014) operando RALF com sabão em pó como fonte de LAS (14,4 mgLAS/L) observaram interferência na remoção de LAS, principalmente, devido a presença de coadjuvantes que inibem alguns microrganismos. Sob tais condições, as remoções de LAS obtidas foram de 48 %. Por outro lado, Oliveira *et al.* (2010) verificaram 95 % de remoção de LAS Padrão em reator RALF para mesma concentração de LAS.

Tabela 3.1: Resumos dos trabalhos realizados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) com reatores anaeróbios.

Reator	Alimentação	TDH h	Duração Dias	Carga de LAS mg.gSV ⁻¹ .d ⁻¹	LAS Afluente mg/L	Degradação %	Remoção %	Condição °C	Referência
Reator EGSB	Metanol, Etanol	32 26	126 111	1,5 2,6	15 15	48 *	68 48	30	Delforno <i>et al.</i> 2012
Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado	Extrato de Levedura e Sacarose	18	70	-	20	98	98	30	Oliveira <i>et al.</i> (2010)
Reator Horizontal com biomassa Imobilizada	Extrato de Levedura, Amido e Sacarose	12	313	2,8	15	~ 34	~ 40	30	Duarte <i>et al.</i> (2010)
Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial	Extrato de Levedura, Amido e Sacarose	24 **	143	6,8 – 9,8	22	~ 36	-	30	Duarte <i>et al.</i> (2010)
Reator UASB	Etanol, Metanol e Extrato de Levedura	35	90	0,6	15	38	71	30	Okada <i>et al.</i> (2012)
		35	89	1,9	15	36	66		
		35	89	6	15	54	67		
		35	89	11,8	15	47	52		
		35	92	6,6	15	77	85		
		6	92	9,6	15	21	24		
79	87	3,7	15	29	62				
Reator UASB	Água de Lavanderia	35	97	16	11	82	85	30	Okada (2012)
Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado	Água de Lavanderia + substrato sintético	18	106	-	24	-	68	30	Braga <i>et al.</i> (2012)
Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado	Sabão em pó comercial + substrato sintético	19	124	-	14	-	47	30	Carosia <i>et al.</i> 2014

* ao final de 237 dias

** 50 rpm de agitação.

3.2 Reator EGSB

O reator EGSB (*expanded granular sludge bed*) ou reator anaeróbio de leito granular expandido surgiu da necessidade de minimizar problemas hidráulicos apresentados por reatores anaeróbios já consolidados, tais como, reator UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*). Suas características são similares à do reator UASB, porém, com relação altura/diâmetro maior, ou seja, da ordem de 20, sendo aplicadas velocidades ascensionais acima de 2,5 m/h, podendo chegar até 10 m/h (Kato *et al.*, 1994). A alta velocidade ascensional aplicada resulta no aumento da agitação do leito de lodo (granulado ou floculento denso) e, conseqüentemente, melhor contato biomassa-água residuária. Segundo Seghezzi *et al.*, (1998), a recirculação do efluente promove a diluição do afluente o que permite o tratamento de poluentes solúveis. Todavia, os sólidos suspensos não são retidos de forma eficaz devido à alta velocidade ascensional.

Costa *et al.*, (2007) estudaram o comportamento do reator EGSB exposto a dois choques tóxicos utilizando detergente comercial. Os autores utilizaram reator EGSB de 1,15 L de volume útil, a 37°C, 1.500mg/L de DQO afluente (etanol) e detergente comercial composto de glicol éter (1-10%), surfactante aniônico (1-10%), aditivos de *performance* (1-10%) e corantes (<1%). A DQO do detergente comercial foi de 98g/L. Os autores realizaram choque tóxico nas seguintes condições: (I) 150 mg DQO/L de detergente comercial durante 56 h e (II) 300 mg DQO/L de detergente comercial durante 222 h. Sob tais condições, a remoção de matéria orgânica permaneceu inalterada no primeiro choque tóxico, todavia, ocorreu redução de 75% para 17% no segundo choque tóxico. A atividade metanogênica específica, no primeiro choque, foi estimulada durante as primeiras 8h, diminuindo após esse período e recuperada 5 dias, após o choque tóxico. Todavia, no choque tóxico II a atividade metanogênica foi imediatamente reduzida durante todo o período de exposição.

Delforno *et al.* (2012) estudaram a remoção de LAS em reator EGSB sob condição mesofílica (30° C), com carga de LAS específica variando de 1,50 – 2,61 mg/gST.d e TDH de 26 horas para 32 horas. Segundo os autores supracitados o TDH influenciou na remoção do LAS (26h – 48 % e 32h – 68 %), principalmente, devido ao tempo de contato LAS e biomassa.

3.3 Tratamento biológico de água residuária de lavanderia comercial

A água residuária de lavanderia comercial é caracterizada pela presença de alta concentração de LAS (12-1.024 mgLAS/L) e matéria orgânica (620-4.800 mgDQO/L) (Braga e Vareche, 2014). Dependendo dos produtos utilizados durante a lavagem (estabilizantes e neutralizantes) a concentração de sulfato pode chegar a 2.000mg/L (Okada, 2012). Na literatura são poucos os trabalhos que abordam o tratamento biológico de água residuária de lavanderia comercial sendo comum tratamento físico-químico (processo oxidativos avançado, osmose reversa entre outros). A seguir serão detalhados alguns trabalhos envolvidos com o tratamento biológico de água residuária de lavanderia.

Carosia *et al.* (2014) avaliaram a remoção de LAS, presente em sabão em pó comercial, em RALF, TDH de 19h e a 30° C. Para tanto, os autores operaram o RALF por 124 dias com 14mgLAS/L afluente suplementado com substrato sintético (sacarose, extrato de levedura, bicarbonato de sódio e solução de sais) e verificaram remoção de LAS de 48±10 %, sendo 42 % atribuídos à degradação biológica.

Por outro lado, Braga *et al.* (2011) e Okada *et al.* (2012) avaliaram a remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial, em RALF e UASB, respectivamente. O RALF foi operado com substrato sintético (sacarose, extrato de levedura, bicarbonato de sódio e solução de sais) acrescido de água residuária de lavanderia comercial com 9,5 mgLAS/L (Etapa I) e 24 mg LAS/L (Etapa II) afluente. A concentração de matéria orgânica afluente foi de 650mg/L. Nesse caso, verificou-se 74% (9,5mgLAS/L) e 68% (24mgLAS/L) de remoção de LAS. Os autores constataram que a remoção de matéria orgânica não foi inibida nas condições impostas. Nos reatores UASB operados por Okada (2012) as remoções de LAS foram de 82 % para 10 mgLAS/L, 30°C, TDH de 35h e sem suplementação afluente. Todavia, para concentrações oscilando entre 10 a 20 mgLAS/L as remoções foram de 58%. Nesse caso, não houve suplementação afluente uma vez que na caracterização da água residuária de lavanderia foi detectado a presença de ácidos orgânicos voláteis (lático, málico, isovalérico, cítrico e capróico) que resultaram em uma DQO afluente variando de 170-320 mg/L, nitrogênio e fósforo.

Dentre os tratamentos físico-químicos os mais promissores referem-se às tecnologias eletroquímicas que inclui a eletrocoagulação, eletroflotação e oxidação eletroquímica (Ge *et al.*, 2004). Por outro lado, métodos tradicionais como coagulação,

flotação, adsorção e oxidação química, também vem sendo aplicados no tratamento de água residuária de lavanderia (Wang *et al.*, 2009).

Sostar-Turk *et al.* (2004), avaliaram o tratamento de água residuária de lavanderia por meio de dois processos. **(i)** Primeiro foi aplicada coagulação seguida da adsorção em carvão ativado. Para tanto, foi usada água residuária com 10,1 mg/L de surfactante aniônico e 280 mg/L de DQO. Após a etapa de coagulação a concentração de DQO reduziu para 180 mg/L e surfactante aniônico para 10,0 mg/L. Enquanto que após a etapa de coagulação e adsorção a DQO reduziu para 20 mg/L e o surfactante aniônico para <0,5 mg/L. **(ii)** Segundo foi ultrafiltração (UF) seguida por osmose reversa (OR). Para tanto, foi usada água residuária com as mesmas características citadas anteriormente (280 mgDQO/L e 10,1 mg/L de surfactante aniônico). Após a etapa de UF observou-se redução da DQO para 130 mg/L e 7,2 mg/L para o surfactante. Após a etapa UF e OR observou-se diminuição da DQO para 3 mg/L e 0,91 mg/L de surfactante. Segundo os autores supracitados, os custos envolvidos com as tecnologias citadas representam uma das principais desvantagens; ou seja, de € 0,51/m³ e € 1,35/m³, respectivamente, para coagulação-adsorção e ultrafiltração-osmose reversa.

Ge *et al.* (2004), avaliaram o tratamento de água residuária de lavanderia por eletrocoagulação-eletroflotação em reator em escala piloto (1,5 m³/h). Os maiores valores de remoção de DQO foram de 70 % (DQO afluente de 1000 mg/L), enquanto que >90 % do surfactante foi removido (surfactante afluente de 72,3 mg/L).

Dessa forma, diante da complexidade da água residuária de lavanderia, nota-se que, tanto processos biológicos, como físico-químicos vêm sendo estudados. Além disso, com base em estudos fundamentais, futuramente, sistemas combinados (biológico + físico-químico) podem ser propostos conciliando custos e eficiência.

3.4 Microrganismos Redutores de Ferro

Nos seres vivos a obtenção de energia ocorre mediada por reações de oxidação/redução (quimiotróficos) ou através da energia luminosa (fototróficos).

Contrariamente, à respiração aeróbia, o mecanismo de obtenção de energia, na respiração anaeróbia, utiliza receptores de elétrons diferentes do oxigênio. Tais receptores são os seguintes: nitrato (NO⁻³), ferro férrico (Fe³⁺), sulfato (SO₄²⁻), carbonato (CO₃²⁻), entre outros.

Nesse contexto, surge a redução não-assimilável de Ferro (*dissimilatory iron reduction* - DIR). DIR é definido como um processo em que microrganismos utilizam Fe(III) como receptor externo de elétrons para oxidar matéria orgânica ou hidrogênio para as atividades metabólicas. Microrganismos que reduzem o ferro de forma não-assimilável (*dissimilatory iron reduction microbe* – DIRM) são potencialmente atrativos na biorremediação de ambientes contaminados.

Ferro é um dos elementos mais abundante do nosso planeta, ocupando o quarto lugar dentre os elementos da crosta terrestre. Classificado como metal de transição, apresenta d-orbitais que não são completamente preenchidos com elétrons. Dessa forma, tem-se para o ferro diferentes estados de oxidação (0, +II, +III, as vezes +IV ou +VI).

Na natureza é encontrado em muitos minerais principalmente em estado de oxidação ^{+II} (ferroso) ou ^{+III} (férico). O íon Fe (II), em solução tende a se oxidar a Fe(III) (estado mais estável), na presença de oxigênio dissolvido ou do próprio ar. O Fe(III) é insolúvel ($\text{Fe(OH)}_3, K_{sp}=10^{-39}$ M; pH=7,0; 25°C), enquanto, o Fe(II) [$\text{Fe(OH)}_2 - K_{sp}=10^{-17}$ M; pH=7,0; 25°C] apresenta maior solubilidade. A solubilidade do Fe(III) aumenta em pH ácido, valores abaixo de 4,0 faz com que o Fe(II) coexista mesmo na presença de oxigênio sem oxidar para o estado férico.

Como mecanismo para aumentar a solubilidade, o Fe(III) pode ser complexado com quelantes fortes como NTA (ácido nitriloacético) ou EDTA (ácido etilenodiaminotetra acético), aumentando assim sua biodisponibilidade.

O ciclo redox do Ferro envolve, tanto processos bióticos, quanto abióticos, estendendo à ambiente anaeróbio e aeróbio (Figura 3.2). Pode modificar aspectos geoquímicos (morfologia do solo/sedimento), remoção de matéria orgânica, solubilidade de metais, formação geológica de minerais, mobilização ou imobilização de vários ânions e cátions (incluindo contaminantes) (Lack *et al.*, 2002; Stumm & Sulzberger, 1992).

Em ambientes anaeróbios, pH>4,0, o íon férico pode ser reduzido quimicamente e biologicamente. Por meio de microrganismos redutores de ferro (MRF), Fe(III) pode funcionar com receptor final de elétrons permitindo a oxidação da matéria orgânica e/ou H₂. Os microrganismos redutores de ferro (MRF) são conhecidos desde 1920, todavia, apenas depois do isolamento da cepa GS-15 por Lovley *et al.* (1988), posteriormente identificada como *Geobacter metallireducens* (Lovley *et al.* 1993), esse grupo

microbiano foi estudado com mais detalhe. Esse grupo é extremamente distinto filogeneticamente, com espécies pertencentes, tanto ao domínio *Bacteria*, quanto *Archaea* (Vargas *et al.*, 1998). Quimicamente (forma abiótica), o Fe(III) pode ser reduzido a Fe(II) na presença de sulfeto (H₂S) ou de compostos como hidroxilamina (Widdel *et al.*, 1993).

Como consequência da redução do Fe(III), biótica e/ou abiótica, há geração de Fe(II) aquoso e/ou Fe(II) sólido. Dentre os compostos de Fe(II) sólido estão incluídos alguns minerais, como siderite (FeCO₃), vivianite (Fe₃(PO₄)₂.8(H₂O)), magnetite (FeO.Fe₂O₃) e *green rust* (Vargas *et al.*, 1998).

A oxidação do Fe(II) até recentemente era tratada como evento estritamente abiótico. Entretanto, alguns microrganismos podem oxidar o Fe(II), tanto em ambiente aeróbio como anaeróbio (Heising *et al.*, 1999; Heising & Schink, 1998). A oxidação abiótica pode ocorrer, tanto por Mn(IV) e/ou pela reação com oxigênio molecular (O₂). Em condição anaeróbia o Fe(II) pode ser oxidado associado com a redução de nitrato, perclorato e clorato (Coates & Achenbach, 2004; Straub *et al.*, 1996). Já em locais com penetração suficiente de luz, o Fe(II) pode ser oxidado por bactérias fototróficas (Widdel *et al.*, 1993).

A redução do Fe(III) a Fe(II) pode ocorrer de forma biótica (com participação microbiana, funcionando como receptor de elétrons na degradação da matéria orgânica) e de forma abiótica (quando o processo não envolve organismos vivos, mas, reações com substâncias químicas inorgânicas). A seguir serão detalhadas as reações envolvendo a redução do Fe(III) de forma biótica (com etanol e LAS como fonte de carbono) e abiótica com sulfeto de hidrogênio, além da oxidação com oxigênio.

- Como, por exemplo, etanol (fonte de carbono facilmente assimilável):



- Como, por exemplo, LAS (fonte de carbono de assimilação mais difícil pelos microrganismos):



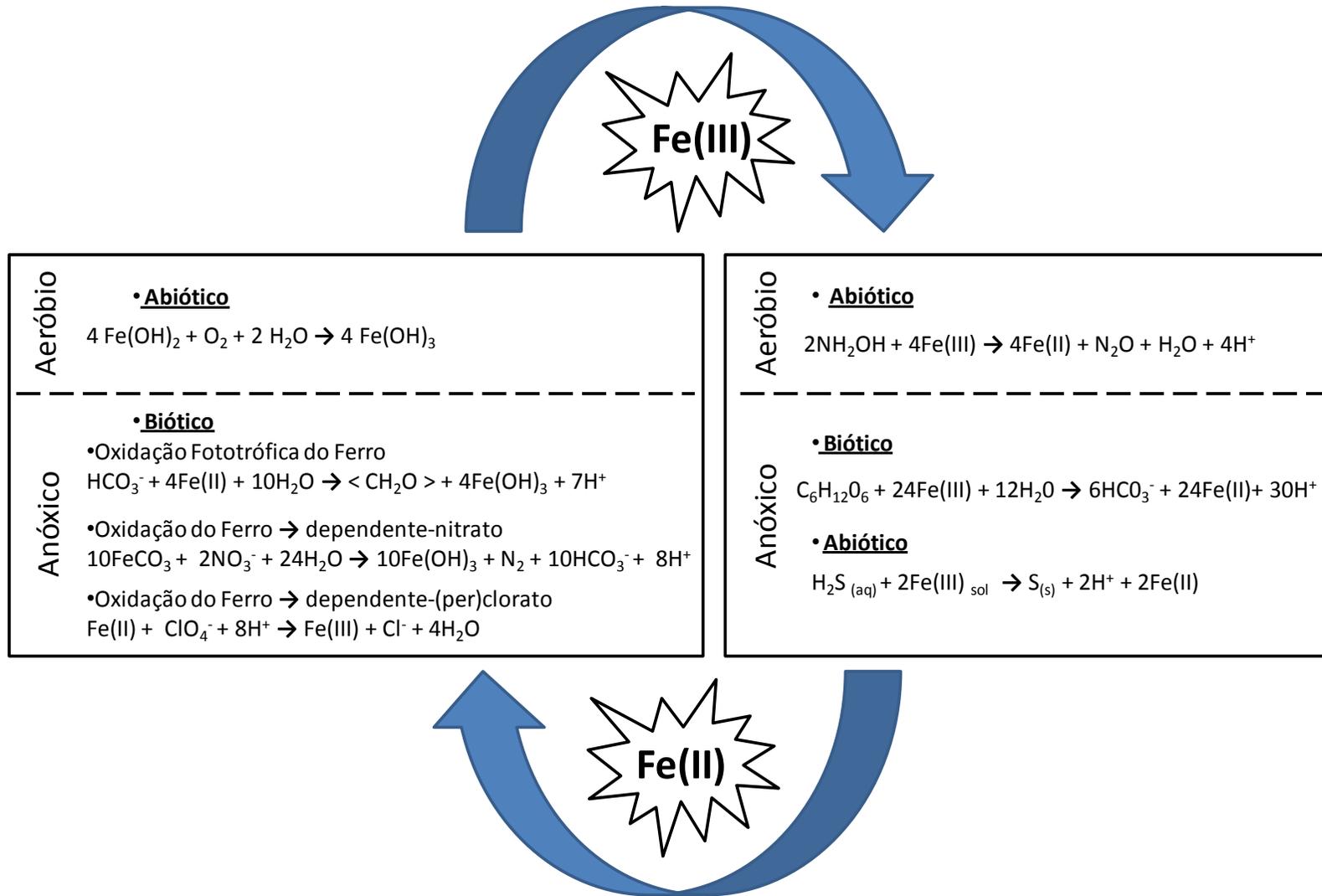


Figura 3.2: Síntese das reações redox do Ferro.

- No caso de redução abiótica do ferro, têm-se a redução pela presença de sulfeto:



É importante ressaltar que o contato do Fe^{2+} com o ar, devido a presença de oxigênio pode oxidar o Fe^{+2} a Fe^{+3} pela seguinte reação:



Com base nas relações estequiométricas acima, a partir de 1.000 mg/L de DQO é possível redução biótica de Fe(III) de 125 mMol/L, enquanto, para 15 mg/L de LAS aproximadamente 4,1 mMol/L Fe(II) pode ser reduzido. Todavia, a partir de 1.000 mg/L de sulfeto obtém-se redução abiótica de Fe(II) de 58,7 mMol/L (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Relação DQO, LAS e Sulfeto na redução do Fe(III).

	Fe(III) Reduzido (mMol/L)	DQO (mg/L)
DQO (mg/L) 1000	125	-
LAS (mg/L) 15	4,1	32,7
Sulfeto (mg/L) 1000	58,7	2.000

Dessa forma, a diversidade metabólica dos MRF vem resultando na aplicação de várias estratégias biológicas a fim de remediar compostos orgânicos recalcitrantes e metais em ambientes contaminados (Lovley, *et al.*, 1994)

Por meio das análises de solo verificou-se que MRF apresentam susceptibilidade elevada ao LAS (Elsgaard *et al.*, 2001; Kristiansen *et al.*, 2003; Jensen *et al.* 2007). No entanto, esta susceptibilidade está mais relacionada com a adsorção do LAS no Fe(III) sólido, que interfere na transferência de elétrons, do que na toxicidade ao surfactante (Kristiansen *et al.*, 2003).

A insolubilidade do Fe(III) pode representar uma barreira na velocidade de degradação de compostos aromáticos, uma vez que, os compostos insolúveis não são facilmente acessíveis ao MRF. Adicionalmente, o envolvimento de MRF com a remoção de LAS em reatores de fluxo contínuo já foram previamente reportados em EGSB (Delforno *et al.* 2012) e RALF (Carosia *et al.* 2014).

Por meio de testes em batelada, Dong *et al.* (2013) avaliaram a oxidação de compostos orgânicos, como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) por DIRM.

Segundo os autores supracitados, as oxidações desses compostos aromáticos associado com DIRM seguem cinética de primeira ordem. Além disso, a taxa de oxidação aumenta na seguinte ordem: benzeno < tolueno < etilbenzeno < xileno.

A utilização de Fe(III) quelado na forma de EDTA-Fe(III) como estímulo a degradação de benzeno em sedimento de aquífero contaminado com petróleo foi previamente reportado por Lovley *et al.* (1995). Para tanto, os autores ressaltaram que a biodisponibilidade do Fe(III) correspondeu a principal limitação do processo. A utilização de Fe(III) insolúvel reduziu significativamente a taxa de oxidação de compostos aromáticos.

Cabe ressaltar que, além da aplicação do Fe(III) para estimular a oxidação de compostos aromáticos, observa-se o uso de DIRM em etapas da remoção de óxidos de nitrogênio (NO_x). Para tanto, o EDTA-Fe(II) é introduzido como agente de complexação para promover a absorção do NO. Dessa forma, o NO quelado é reduzido à N₂ por bactérias desnitrificantes gerando EDTA-Fe(III) (Dong, 2012)

Em relação à redução microbiana do Fe(III) em fluxo contínuo destaca-se o trabalho de Roden *et al.* (2000). Para tanto, foi avaliado um reator em coluna (fluxo contínuo) e em batelada. No reator em coluna aplicou-se TDH de 6 horas e completamente preenchido com areia revestida com óxido de Ferro (2,2g de Oxido de Ferro), enquanto, nos reatores em batelada foi adicionada a mesma quantidade de areia com o mesmo peso de óxido de Ferro. Ao final de 180 dias de operação foi observada maior redução no reator de fluxo contínuo (95 %), em relação ao reator em batelada (13 %). Segundo os autores supracitados, no sistema de fluxo contínuo ocorreu diminuição do potencial de inibição do Fe(II) sobre a microbiota, fato este, não observado nos reatores em batelada, onde ocorreu acumulação de Fe(II) a medida que foi gerado.

3.5 Diversidade Microbiana

A diversidade microbiana, em última análise, representa um vasto repertório genético com grande potencial biotecnológico para diversas áreas do conhecimento. Esse vasto repertório genético deve-se a enorme quantidade de microrganismos presente nos mais diversos habitats. Esses habitats podem ser desde lugares comuns, até lugares extremos que são considerados inadequados para formas de vida superiores. Dessa forma, a sobrevivência dos microrganismos nesses diferentes ambientes é dependente das suas estratégias para obtenção de energia e macro/micro nutrientes, ou seja, das suas

estratégias moleculares. Por meio da aplicação de ferramentas de biotecnologia é possível explorar esse potencial na busca de produtos de elevado valor comercial e/ou remediação de ambientes contaminados.

Basicamente, há duas abordagens para o estudo da diversidade microbiana: **(i)** as dependentes de cultivo e **(ii)** as independentes de cultivo. Essas abordagens são consideradas completares uma vez que apenas 1% dos microrganismos é detectado em meios de cultura, por outro lado, por meio da abordagem independente de cultivo tem-se a predominância de muitas espécies não cultivadas.

As técnicas dependentes de cultivo correspondem aos métodos tradicionais, como isolamento e manutenção de microrganismos em laboratório. As técnicas independentes de cultivo estão relacionadas com polimorfismos de comprimento de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP), análises de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento (metagenômica e/ou amplicons da região do gene rRNA 16S) (Madingan *et al.*, 2000)

Neste trabalho a caracterização da diversidade microbiana foi realizada mediante o uso das técnicas de DGGE e sequenciamento massivo de amplicons da região do gene rRNA 16S e, portanto, serão detalhadas a seguir.

3.5.1 PCR/DGGE

A reação em cadeia da polimerase-eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE) consiste na separação dos fragmentos de DNA baseada na mobilidade eletroforética do DNA em gel de poliacrilamida contendo gradiente linear desnaturante (mistura de uréia e formamida). O primeiro relato do uso do DGGE para separação de molécula de DNA foi feito em 1983, por Fischer e Lerman. Todavia, a aplicação para ecologia microbiana foi introduzido apenas em 1993 por Muyzer *et al.*

Por meio da aplicação da PCR-DGGE é possível o estudo de amostras complexas, com ampla diversidade microbiana a partir da diferenciação das comunidades em função do padrão de bandamento do gene ribossomal. Além disso, é possível realizar a análise de várias amostras ambientais simultaneamente, sendo bastante úteis para o monitoramento e compreensão de variações temporais e espaciais das comunidades complexas. Dessa forma, a PCR-DGGE quando associada com a caracterização

ambiental (aspectos físicos e químicos) é ferramenta poderosa para avaliação da comunidade microbiana e, por conseguinte, das populações dominantes.

Para tanto, faz-se amplificação da região de interesse por PCR com um dos iniciadores ligados ao GC-Clamp (região rica em G+C). O GC-Clamp visa impedir a total desnaturação da dupla fita do DNA durante a eletroforese. Os amplicons de mesmo tamanho são então separados de acordo com a composição das bases nitrogenadas, através da eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante. À medida que os amplicons vão percorrendo o gel de poliacrilamida as concentrações dos agentes desnaturantes vão aumentando, resultando no rompimento das pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos e formação de DNA de duas fitas simples ligadas ao GC-Clamp. Dessa forma, amplicons totalmente desnaturados não tem mais mobilidade eletroforética e ficam imóveis. Cada banda pode representar uma população microbiana Muzer *et al.* (1993).

3.5.2 Sequenciadores de alto rendimento

Passados 20 anos da descoberta da estrutura do ácido desoxiribonucleico - DNA por Waston e Crick, (1953) surgiram às primeiras técnicas de sequenciamento da molécula de DNA. A primeira delas foi idealizada por Maxam e Gilbert, em 1973, por meio do uso de substâncias químicas que lisam a molécula de DNA em nucleotídeos específicos. Essa técnica foi definida como degradação química do DNA.

A segunda foi idealizada por Sanger *et al.* (1977), frequentemente chamada de método do dideoxinucleotídeos - ddNTP, no qual eram empregados ddNTPs marcados radioativamente e, atualmente, ddNTPs com fluorocromo. A automatização do método de Sanger por volta de 1986 (ABI 370) permitiu que este fosse aplicado em larga escala, inclusive no sequenciamento do genoma humano (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Desde a sua idealização em 1977 até 2005, o método de Sanger foi o único viável comercialmente para o sequenciamento do DNA. Todavia, limitações como a clonagem física dos fragmentos, longos tempos de preparação das amostras e custos envolvidos incentivaram o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento mais velozes, sensíveis e acuradas.

Em 2005, a Roche Applied Science iniciou a comercialização do 454-Life Science-Pirosequenciamento, um equipamento de sequenciamento de DNA de alto rendimento, que dentre os avanços em relação ao método de Sanger refere-se a não

necessidade de clonagem, o sequenciamento massivo e de forma paralela. Desde então, outras empresas iniciaram a comercialização de sequenciadores de alto rendimento, como GAIIx, HiSeq e MiSeq da empresa Illumina, SOLiD , Ion Proton e Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) da empresa Life Technologies, Pac-Bio Smrt da empresa Pacific Biosciences e HeliScope pela empresa Helicos Biosciences. As principais diferenças entre os equipamentos estão no tamanho do fragmento sequenciado e no rendimento por corrida conforme os manuais disponíveis para os equipamentos.

Em relação ao tamanho do fragmento destaca-se o Pac-Bio Smrt que apresentam tamanho superior a 1.500 pb, enquanto no rendimento por corrida destaca-se o Illumina HiSeq 2000 com valores acima de 600 Gb por corrida. Em relação à taxa de erro, de acordo com alguns relatos, verifica-se que por meio da plataforma Pac-Bio Smrt a maior taxa (16 %), enquanto, para as demais tecnologias os valores observados são abaixo ou próximos de 1 % (Loman *et al.*, 2012).

A aplicação de sequenciamentos de alta rendimento para o estudo da diversidade de microrganismo seja por metagenômica ou por *pool* de amplicons do rRNA 16S, apresentam melhores resultados quando alguns parâmetros são levados em conta. Tais parâmetros são os seguintes: tamanho do fragmento, cobertura da amostragem (rendimento da corrida), acuracidade e custo por amostra.

Pequenos fragmentos do gene rRNA 16S podem dificultar a taxonomia e limitar a resolução filogenética (Liu *et al.*, 2007), além de exigir maiores recursos computacionais. Segundo Hamady e Knight (2008), para estudos do gene rRNA 16S, fragmentos de 250 pb podem ser essencialmente tão bons quanto sequências completas desse gene, quando o objetivo for a comparação de comunidades microbianas e atribuição taxonômica. Entretanto, a região 16S a ser sequenciada deve ser cuidadosamente escolhida. Dentre as principais regiões do 16S destacam V2 e V4 (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Situações em que se deseja definir novos filos bacterianos, ou em casos em que as sequências são altamente divergentes ao banco de dados, o sequenciamento do 16S inteiro é desejável. Para metagenômica, o tamanho dos fragmentos é mais importante devido à dificuldade de identificar a função e/ou espécies de cada gene.

O número de sequências (rendimento da corrida) para caracterizar uma amostra dependerá do objetivo do estudo, da diversidade de espécies na amostra, do tamanho do fragmento e no caso de amplicons, da escolha do gene e região de sequenciamento.

Caso o objetivo for estimar os maiores filos bacterianos em uma amostra, poucas sequências por amostra são necessárias. Ley *et al.* (2008) observaram na caracterização de 22 amostras intestinais humanas que seriam necessários apenas 350 sequências por amostra para chegar a comunidade média de 78 % de *Firmicutes* e 18 % *Bacterioidetes*. Todavia, se o objetivo for a completa caracterização de uma amostra com alta diversidade, com muitas espécies raras até níveis taxonômicos de família/gênero, vasto número de sequências pode ser necessário. Isso é aplicado, por exemplo, para amostras provenientes de ambiente marinho e solos.

O sequenciamento do gene rRNA 16S inteiro com alta acuracidade é inviável usando sequenciadores de alto rendimento no momento. Dessa forma, é necessário o uso de regiões desse gene. Segundo Neefs *et al.*, 1990, o gene 16S é dividido em nove regiões variáveis (V1-V9), sendo as regiões V2, V4 e V6 as mais utilizadas para afiliação filogenética. Em geral, a combinação de regiões variáveis e moderadamente conservadas é ótima para a realização de análises em diferentes profundidades filogenéticas (Hamady e Knught, 2009). Liu *et al.*, (2007) e Wang *et al.*, (2007) afirmaram que baixa taxa de erros é obtida para as regiões V2 e V4, relacionadas a atribuição taxonômica. Todavia, não há na literatura consenso sobre a melhor região para filogenia.

A acuracidade de um equipamento está relacionada com a precisão na sua medição. Dessa forma, pode-se medir a acuracidade em função de indicadores de erros. A métrica mais comum utilizada para avaliar a precisão de uma plataforma de sequenciamento é o índice de qualidade Phred. Historicamente, esse índice originou-se como um algoritmo para medição da acuracidade no sequenciamento do tipo Sanger, levando em conta o espaçamento entre bandas, largura e altura dos picos, intensidade absoluta do sinal e ruído de fundo. Segundo Richterich, (1998) e Ewing e Green (1998), a aplicação desse método é eficaz para uma gama de instrumentos e química de sequenciamento, tornando, o Phred um índice de qualidade padrão para todas as tecnologias de sequenciamento comerciais. Ressalta-se que os sequenciamentos de alto rendimento variam bastante em relação ao sequenciamento de Sanger, todavia, o processo para gerar o índice de Phred é basicamente o mesmo. A estimativa da

probabilidade da base nitrogenada estar correta (índice de Phred) é representada pela fórmula abaixo.

$$Q = -10 \log_{10} P_{\text{erro}}$$

Sendo, “ P_{erro} ” a probabilidade da base ter sido identificada de maneira errada. Ressalta-se que o “ Q Phred” é construído com base em uma série de preditores de qualidade que são calibrados com dados reais para gerar uma estimativa de probabilidade de erro. Na Tabela 3.3 têm-se exemplos de alguns valores de Phred.

Tabela 3.3: Valores de qualidade Phred, probabilidades de erro e acuracidade.

Q	Probabilidade de erro	Acurácia da base
10	1 em 10	90 %
20	1 em 100	99 %
30	1 em 1000	99,9 %
40	1 em 10000	99,99 %
50	1 em 100000	99,999 %

Geralmente, emprega-se como padrão aceitável de qualidade valor Q_{20} que corresponde a 99 % de exatidão na base indicada. Por padrão o *Ribosomal Database Project*, também, utiliza Q_{20} para o processamento de dados brutos de sequenciadores de alto rendimento. Dessa forma, como resultados práticos têm-se os valores de qualidade na escala Phred para cada base nitrogenada sequenciada. Como exemplo, tem-se uma sequência de nucleotídeos no formato *.fasta* e logo abaixo o seu respectivo arquivo *.qual* que corresponde a escala Phred de cada base.

.fasta

>Exemplo
CTCATTGCCCTCAAC

.qual

>Exemplo
24 21 31 29 24 26 31 33 27 25 36 26 31 19 32

Por fim, os custos envolvidos para cada equipamento devem ser analisados. Os valores encontrados na literatura referem-se ao custo por corrida e custo por megabase (\$/Mb). Segundo Loman *et al.*, (2012), o menor \$/Mb refere-se aos equipamentos da empresa Illumina (\$ 0,74 - MiSeq até \$0,10 – HiSeq) com maiores rendimentos,

todavia, para menores fragmentos. Equipamentos da empresa Roche, como 454 GS Junior e 454 FLX+ apresentam \$/Mb de \$31,0 e \$12,4, respectivamente. Por outro lado, tem-se \$/Mb para o uso da linha Ion Torrent da Life Technologies de \$ 4,25 e \$ 0,63 para o Chip 316 e 318, respectivamente. A partir do desenvolvimento de análises multiplex através de *barcodes* é possível o sequenciamento de diferentes amostras em uma mesma corrida (Hamady *et al.*, 2008) reduzindo os custos por amostra e tornando essas tecnologias ainda mais acessíveis.

3.5.2.1 Pirosequenciamento

O pirosequenciamento corresponde a um método de sequenciamento baseada na detecção do pirofosfato (PPi – pyrophosphate), durante a síntese de DNA (Ronaghi, *et al.*, 1996; Ronaghi, *et al.*, 1998). Para tanto, faz-se necessário quatro enzimas: DNA Polimerase I, ATP Sulfurilase, Luciferase e Apirase, e três substratos enzimáticos: adenosina fosfosulfato (APS), D-luciferina e um DNA molde acoplado com um iniciador (Ronaghi, *et al.*, 1998).

O processo de sequenciamento é feito por ciclos. Dessa forma, em um ciclo os quatro nucleotídeos são adicionados separadamente. Com a incorporação de um nucleotídeo pela DNA Polimerase I ocorre a liberação de uma molécula de PPi e a cascata enzimática é iniciada (Figura 3.3; Equação 5)



O pirofosfato inorgânico (PPi) serve de substrato para a ATP sulfurilase que produz uma molécula de ATP (Equação 6).



Essa molécula de ATP é utilizada pela Luciferase para converter a D-Luciferina em oxiluciferina com emissão de um pico de luz que é capturado por uma câmera CCD (*charge-coupled device*) e convertido em pico no pirograma. O sinal fluorescente é gerado proporcionalmente à quantidade de nucleotídeo incorporado (Equação 7 e 8).



Ao final a enzima Apirase remove os nucleotídeos não incorporados e ATPs não utilizados e/ou em excesso (Equação 9 e 10).



O sequenciamento pode ser realizado de forma aleatória (método de sequenciamento por *shotgun*) ou a partir de amplicons gerados em uma reação de PCR (ex: amplicons da região rRNA 16S). O sequenciamento massivo, de forma paralela e sem a necessidade de clonagem ocorre devido à utilização de microesferas magnéticas (*beads*) que permitem a imobilização de uma única molécula de DNA a esferas de 28 nm. O processo de imobilização ocorre devido à ligação de adaptadores A – B nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos ou amplicons de DNA. O adaptador B possui uma molécula de biotina ligada a extremidade 5', enquanto, as microesferas possuem uma molécula de estreptavidina acoplada a sua superfície. Dessa forma, a imobilização do fragmento de DNA dupla-fita nas microesferas ocorre pela reação biotina-estreptavidina (termicamente estável). O adaptador A serve como sítio de anelamento do iniciador para a reação do PCR em emulsão e sequenciamento (Margulies *et al.*, 2005).

Na etapa seguinte, ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA ligada as microesferas (com NaOH), isolando apenas DNA fita simples. O DNA fita simples ligado à esfera é amplificado através da PCR em emulsão (Ghadessy, *et al.*, 2001; Dressman, *et al.*, 2003). As esferas são compartimentalizadas em uma micela devido à emulsão de óleo em solução aquosa. Cada micela funciona como um microrreator onde ocorrerá a reação de PCR. Ao final dessa etapa, têm-se milhões de fragmentos idênticos ligados em uma única microesfera. Novamente, ocorre a desnaturação dos fragmentos de DNA acoplados a microesfera e adição de primer para a reação de sequenciamento. As microesferas contendo os DNA-fita simples a ser sequenciados são depositadas em *slide* de fibra ótica contendo aproximadamente 1,6 milhões de poços com diâmetro suficiente para alojar uma única microesfera.

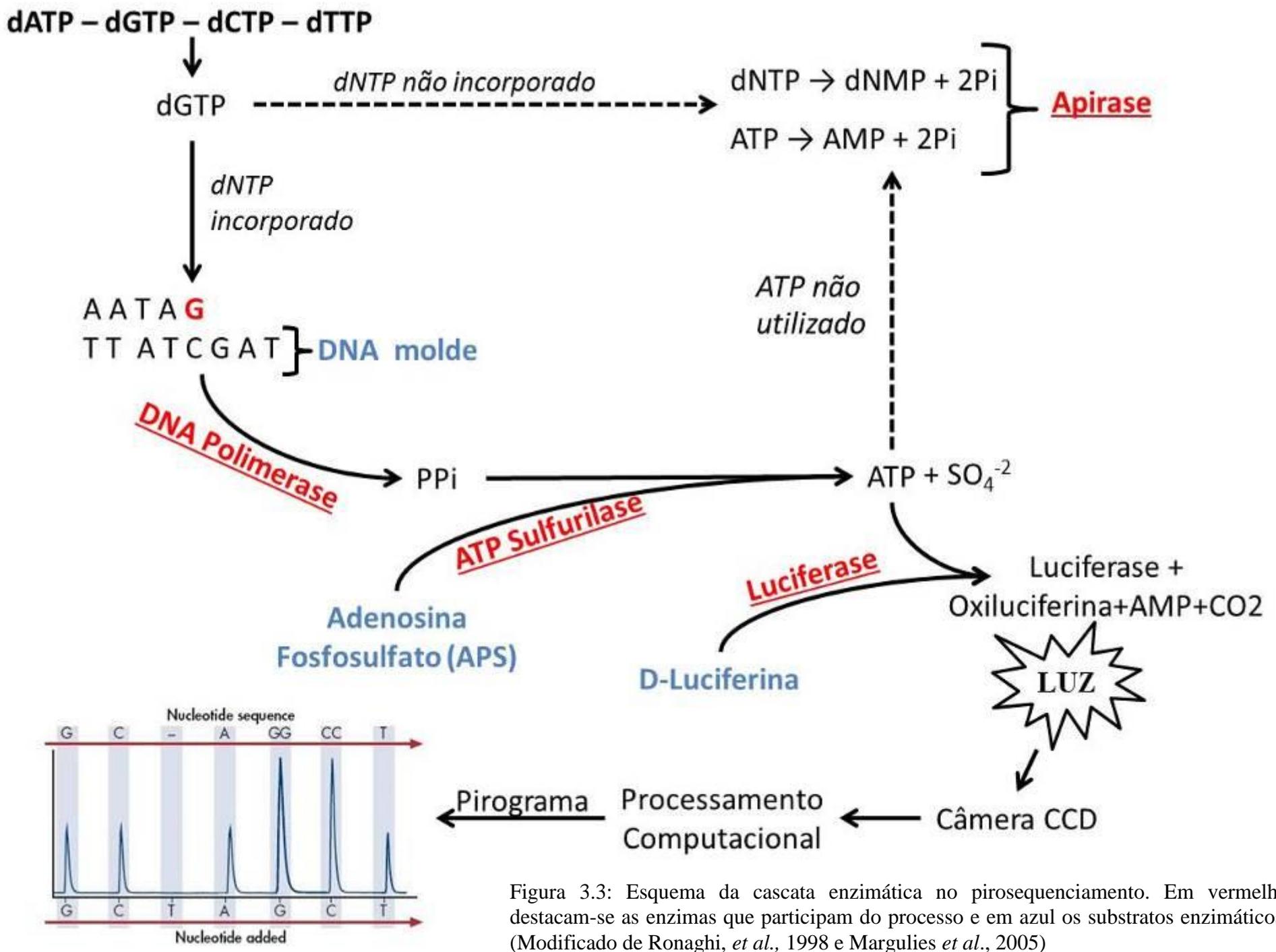


Figura 3.3: Esquema da cascata enzimática no pirosequenciamento. Em vermelho destacam-se as enzimas que participam do processo e em azul os substratos enzimáticos. (Modificado de Ronaghi, *et al.*, 1998 e Margulies *et al.*, 2005)

3.5.2.2 Ion Torrent

A plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) da empresa Life Technologies é uma estratégia diferente de sequenciamento e vem despertando interesse dentro e fora do meio acadêmico. Essa plataforma corresponde ao primeiro sequenciador NGS que não é baseado no princípio de emissão e detecção de luz. A sequência de nucleotídeos é determinada pela variação de potencial do meio reacional em função da liberação de um íon de hidrogênio durante a incorporação de um nucleotídeo (Sakurai e Husimi, 1992). O uso de circuitos integrados para medir as mudanças de pH para identificar a incorporação de bases nitrogenadas, elimina a necessidade de caros sistemas de detecção de luz, reduzindo, substancialmente os custos envolvidos. Dessa forma, segundo Glenn *et al.* (2011) e Rothberg *et al.* (2011), as vantagens de utilizar essa plataforma estão no baixo custo e tempo de sequenciamento (menos de 2h).

Os procedimentos e métodos envolvidos com a preparação de amostras são os mesmos aplicados na plataforma 454 – Pirosequenciamento, porém o processo de identificação é muito simples e não utiliza cascatas enzimáticas e detecção por luz. O sequenciamento em Ion Torrent utiliza um chip que contém uma malha com cerca de 1,2 milhão de poços e sensores que permitem o sequenciamento de forma massiva e paralela. Dessa forma, cada poço apresenta sensores que detectam alterações no potencial redox transformando o sinal químico em sinal digital (Rothberg *et al.*, 2011).

3.6 Diversidade microbiana em reatores aplicados na degradação do LAS

As principais abordagens encontradas na literatura para o estudo da diversidade microbiana associada à remoção do LAS são de métodos independentes de cultivo, uma vez que é necessária uma diversidade de microrganismos para completa degradação de LAS em condição anaeróbia. Dentre as principais técnicas destaca-se o FISH, DGGE e sequenciamento do gene rRNA 16S. Todavia, há relatos de estudo da remoção de LAS em culturas enriquecidas (Denger e Cook, 1999; Almendariz *et al.*, 2001).

Lobner *et al.* (2005) analisaram a degradação anaeróbia do LAS em reator UASB (termofílico e mesofílico) e o impacto do surfactante na comunidade microbiana por meio de FISH. A concentração de LAS afluyente foi de 10 mg/L. Os autores observaram que após mais de 200 dias de operação ocorreu migração da microbiota ativa (domínio *Archaea* e *Bacteria*)

para o interior do grânulo em relação ao reator controle (sem LAS), tanto, para o reator mesofílico, como termofílico.

Okada *et al.* (2013) observaram em reator UASB mesofílico com 14 mg/L de LAS afluente, baixa variação da proporção do domínio *Archaea* e *Bacteria* após a adição do surfactante. No inóculo a proporção foi de 63% e 37% para o domínio *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente. Essa mesma proporção foi mantida após a adição do LAS; ou seja, de 62% e 38% para o domínio *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente.

Em relação ao DGGE observou-se a sua aplicação na caracterização da comunidade microbiana em reatores anaeróbios ao longo do tempo e/ou em diferentes condições experimentais (Duarte *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010; Okada *et al.*, 2013). Essa técnica vem sendo uma ferramenta importante para caracterização de comunidades complexas. Dentre os principais resultados obtidos destaca-se a maior susceptibilidade do domínio *Archaea* quando da adição do LAS (14 mg/L) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (Duarte *et al.*, 2007). Todavia, esse mesmo comportamento não foi observado de forma tão acentuada em reatores UASB (Okada *et al.*, 2013). Provavelmente, o grânulo agiu como uma estrutura protetora, evitando maiores modificações da comunidade microbiana. Segundo Almendariz *et al.* (2001), as bactérias acidogênicas são responsáveis pela degradação da molécula de LAS, enquanto arqueias metanogênicas são mais sensíveis ao LAS e não participam diretamente do processo de degradação. Nesse sentido, populações pertencentes ao domínio *Bacteria* sofrem significativas modificações, uma vez que apresentam papel central na degradação de LAS.

Em relação ao sequenciamento de DNA a partir de bandas de DGGE e/ou amplicons da região do gene rRNA 16S, nota-se predominância dos seguintes filos: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Synergistetes*, *Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia* (Duarte *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2010a; Duarte *et al.*, 2010b; Oliveira *et al.*, 2010 e Delforno *et al.*, 2012). A predominância desses filos deve-se ao elevado número de espécies encontradas que representam elevada diversidade genética, permitindo assim a manutenção em diversas condições ambientais.

Em relação aos gêneros encontrados há ampla diversidade, uma vez que, as condições físicas e químicas impostas na operação dos reatores anaeróbios refletem na comunidade microbiana. Destaca-se que os principais grupos microbianos são anaeróbios ou anaeróbios facultativos, enquanto, pequena porção refere-se a organismos aeróbios (Tabela 3.4). Em geral bactérias aeróbias são identificadas na região do separador de fase (reatores UASB,

EGSB e RALF), que são mais susceptíveis a re-oxigenação durante a operação desses sistemas.

Por meio da análise dos resultados encontrados na literatura permitiu-se inferir que não há uma distinção dos gêneros identificados em relação à fonte de LAS [Ág. Lavanderia – Okada (2012) e Braga (2014); Sabão em pó – Carosia *et al.* (2014); LAS Padrão – Delforno *et al.* (2014), Oliveira *et al.* (2010) e Duarte *et al.* (2010)]. O mesmo é observado em função do tipo de reator (Tabela 3.4).

Dentre os gêneros com crescimento anaeróbio facultativo, destacam-se *Clostridium* e *Aeromonas*, com capacidade metabólica de dessulfonação (Hsu *et al.*, 1990 e Jimenez *et al.*, 1991), uma das etapas da completa degradação da molécula de LAS. Dentre os gêneros anaeróbios, destacam-se *Geobacter*, *Holophaga*, *Sporomusa* e *Synergistes*. Apenas *Synergistes* pode realizar a β -oxidação (Kumar *et al.*, 2010). Os demais gêneros estão relacionados com a degradação de compostos aromáticos (fenol, tolueno, benzaldeído, benzoatos entre outros). Além desses, outros dois gêneros (*Zooglea* e *Pseudomonas*) crescem em condição aeróbia. *Pseudomonas* está relacionada com todas as etapas de remoção da molécula de LAS, ou seja, β/ω – oxidação e dessulfonação (Brenner *et al.*, 2005). Além disso, Jimenez *et al.* (1991) e Almendariz *et al.* (2001) relataram a capacidade desse microrganismos na degradação do LAS. Em relação a *Zooglea*, Okada (2012) observou abundância relativa acima de 20 % na biomassa no separador de fase de reator UASB alimentado com água de lavanderia. Segundo o autor, grande parte da remoção de LAS foi de responsabilidade desse gênero.

Finalizando, nota-se que os trabalhos envolvidos com a degradação de LAS em reatores biológicos empregaram ou o sequenciamento Sanger (Oliveira *et al.*, 2010; Delforno *et al.*, 2012; Carosia *et al.*, 2014) considerado de primeira geração ou mais recentemente o sequenciamento de segunda geração via plataforma 454-Pirosequenciamento (Okada, 2012; Braga, 2014). Todavia, cabe ressaltar que o presente trabalho foi o pioneiro na aplicação do sequenciamento de terceira geração via plataforma Ion Torrent.

Tabela 3.4: Gêneros relacionados com a degradação de LAS.

Condição/Gênero		Okada* (2012)	Braga** (2014)	Carosia <i>et al.</i> ** (2014)	Oliveira <i>et al.</i> ** (2010)	Delforno <i>et al.</i> *** (2012)	Duarte <i>et al.</i> **** (2010)
Aeróbia	<i>Acinetobacter</i>	■					
	<i>Comamonas</i>	■			■		■
	<i>Gemmatimonas</i>	■	■		■		
	<i>Hydrogenophaga</i>	■					
	<i>Parvibaculum</i>	■					
	<i>Pseudomonas</i>	■			■		■
	<i>Stenotrophomonas</i>	■				■	
	<i>Zoogloea</i>	■	■			■	
Anaeróbia	<i>Desulfovibrio</i>	■		■			■
	<i>Holophaga</i>	■	■				■
	<i>Sporomusa</i>	■		■		■	■
	<i>Synergistes</i>	■	■				■
	<i>Syntrophomonas</i>	■					
	<i>Syntrophus</i>					■	■
	<i>Desulfobulbus</i>	■	■			■	
	<i>Desulfovirga</i>	■					
	<i>Geobacter</i>	■	■	■		■	
<i>Syntrophorhabdus</i>							
Anaeróbia facultativa	<i>Aeromonas</i>	■	■		■	■	
	<i>Clostridium</i>	■	■	■	■	■	
	<i>Dechloromonas</i>	■			■	■	
Fonte de LAS		Ág. Lavanderia		Sabão em pó		LAS Padrão Sigma	

* UASB; ** RALF; *** EGSB, **** RAHLF

4 Material e Métodos

4.1 Meio Sintético

A alimentação em alguns reatores teve como base o meio mineral modificado (Angelidaki *et al.*, 1990), descrito na Tabela 4.1, solução de vitaminas (Tabela 4.2) (Touzel & Albagnac, 1983), bicarbonato de sódio e co-substratos (extrato de levedura, metanol e etanol).

Tabela 4.1: Meio Mineral Modificado*

Componentes (mg/L)**	Componentes (mg/L)**	Componentes (mg/L)**	Componentes (mg/L)**
NH ₄ Cl	1.000	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,05
NaCl	100	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,05
MgCl ₂ .6H ₂ O	25	AlCl ₃	0,05
CaCl ₂ .2H ₂ O	50	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,05
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	400	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,092
FeCl ₂ .4H ₂ O	2	EDTA	0,5
H ₃ BO ₃	0,05	HCl concentrado	1 mL/L
ZnCl ₂	0,05	Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,1
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,038		

*Modificação da concentração de MgCl₂

**q.s.p 1000 mL de água destilada

Fonte: Angelidaki *et al.*, 1990

Tabela 4.2: Solução de Vitaminas

Componentes	(g/L)**
Biotina	0,002
Ácido fólico	0,002
Tiamina	0,005
Riboflavina	0,005
Ácido Nicotínico	0,005
Pantotenato de cálcio	0,005
Piridoxina	0,01
Vitamina B12	0,0001
Ácido Lipóico	0,005
Ácido p-aminobenzóico	0,005

**q.s.p 1000 mL de água destilada anaeróbia

Fonte: Touzel e Albagnac, 1983.

4.2 Água Residuária de Lavanderia Comercial

A água residuária de lavanderia comercial foi coletada em uma lavanderia situada na cidade de São Carlos – SP. Era coletada apenas a água do primeiro enxague em frasco de poliuretano de alta densidade de 10 ou 20 litros. Os frascos eram armazenados em geladeira a 4° C por três ou quatro semanas. Antes de ser utilizada, essa água, era diluída com o intuito de obter a concentração desejada de LAS nas etapas de operação dos reatores.

Conforme informações dos funcionários dois insumos eram utilizados durante o processo de lavagem: **(I)** LAS, tensoativo não iônico, neutralizantes, alcalinizantes (hidróxido de sódio), sequestrantes, coadjuvantes e branqueador óptico e veículo, e **(II)** metabissulfito de sódio, sulfato de sódio anidro, sequestrantes, agente redutor anti-cloro e veículo alcalino.

4.3 Alquilbenzeno Linear Sulfonado – LAS (Padrão)

O surfactante aniônico adicionado ao meio sintético foi o alquilbenzeno linear sulfonado (Sigma-Aldrich, CAS 25155-30-0), também conhecido como LAS comercial, com pureza de 99 %. Tal composto contém quatro homólogos com 10 – 13 átomos de carbono na cadeia alquílica. Esse composto foi utilizado nos reatores em que não foi acrescentado água residuária de lavanderia comercial.

4.4 Inóculo

O inóculo em todos os reatores foi proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dakar S/A, Tietê/SP). Para a inoculação, o lodo granulado foi lavado com água destilada para a retirada de impurezas advindas do sistema de tratamento e, logo em seguida, adicionado aos reatores.

4.5 Descrição do Reator

4.5.1 EGSB - *Expanded Granular Sludge Bed*

Os reatores foram confeccionados em acrílico, com volume útil de 1,4 L, altura de 1,0 m e diâmetro de 0,04 m. A velocidade ascensional foi constante (4 m/h) com recirculação do efluente. Além disso, um dispositivo na extremidade superior foi utilizado para garantir a separação entre as fases sólida, líquida e gasosa, e um distribuidor de vazão na base.

Ao longo do leito dos reatores foram instalados seis pontos de amostragem e um no separador de fase (Figura 4.1). Durante a operação os reatores foram mantidos em condição mesofílica, a 30 ± 1 °C, em câmara climatizada.

Com o intuito de garantir a anaerobiose do EGSB, dois procedimentos foram adotados: primeiro, a utilização de um selo hídrico e segundo, a utilização de um sifão na saída do sistema o que evitou a entrada de oxigênio pela mangueira do efluente.

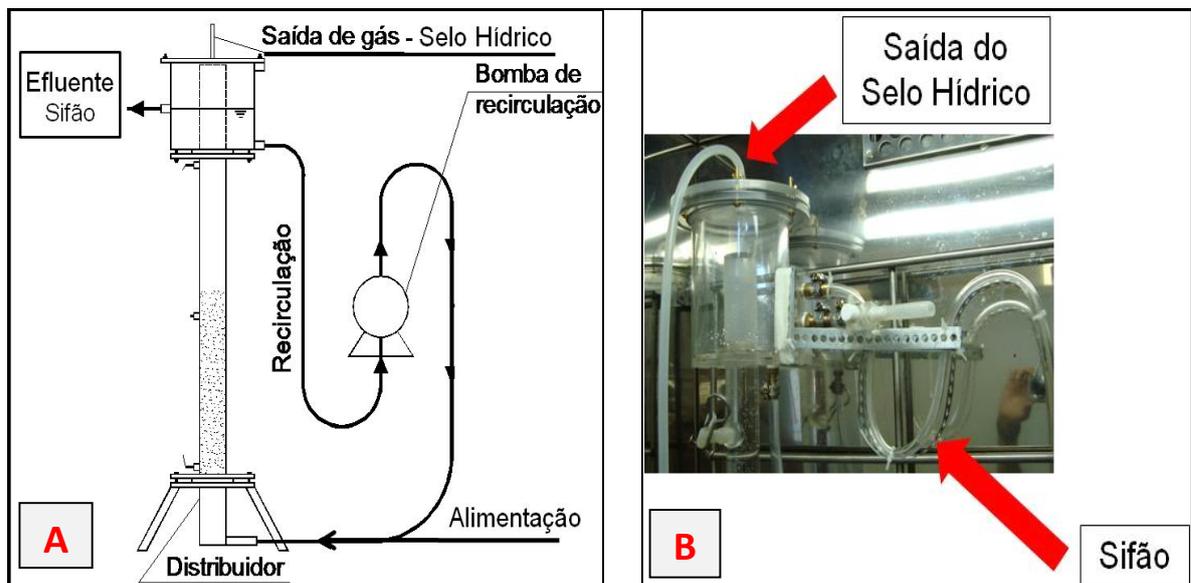


Figura 4.1: Detalhes do reator EGSB: (A) esquema do reator, (B) detalhe do selo hídrico e sifão.

4.6 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas

Análises físico-químicas de monitoramento do reator e caracterização da água de lavandaria foram realizadas seguindo as frequências e parâmetros apresentados na

Tabela 4.3. Análises de demanda química de oxigênio (DQO), pH (potencial hidrogeniônico), sólidos totais voláteis, sulfato e sulfeto foram realizadas de acordo com APHA (2005). A determinação da alcalinidade foi realizada de acordo com a metodologia de Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley (1986).

Os ácidos voláteis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Penteadó *et al.* (2013). Por meio dessa metodologia determinam-se os seguintes ácidos: Capróico, Valérico, Isovalérico, Butírico, Isobutírico, Propiônico, Acético, Fórmico, Láctico, Succínico, Málico e Cítrico.

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.

A extração de LAS adsorvido foi realizada apenas ao final das etapas de operação dos reatores, segundo a metodologia de Duarte (2006). Devido às características adsorptivas do LAS e com o objetivo de fechar o balanço de massa desse surfactante foi realizada extração de LAS adsorvido na biomassa do leite e no sólido presente na região do separador de fase em duplicata.

O balanço de massa de LAS foi realizado com base nas fórmulas abaixo:

$$\text{LAS removido} = \text{LAS}_{\text{afl}} - \text{LAS}_{\text{efl}}$$

$$\text{LAS degradado} = \text{LAS}_{\text{afl}} - (\text{LAS}_{\text{efl}} + \text{LAS}_{\text{ads}})$$

Sendo:

LAS removido = massa de LAS removida por processos biológicos e físicos

LAS degradado = massa de LAS removida apenas por processos biológicos

LAS_{afl} = massa de LAS afluyente

LAS_{efl} = massa de LAS efluente

LAS_{ads} = massa de LAS adsorvido

Tabela 4.3: Análises físico-químicas.

Parâmetro	Método	Frequência	Referencia
Monitoramento do Reator			
Ácidos voláteis (mg/L)	Cromatográfico HPLC	2X semana	Penteadó <i>et al.</i> (2013)
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	Titulométrico	2X semana	Ripley <i>et al.</i> (1986)
DQO bruta (mg/L)	Espectrofotométrico	2X semana	APHA (2005)
LAS (mg/L)	Cromatográfico HPLC	2X semana	Duarte <i>et al.</i> (2006)
pH (unidade)	Potenciométrico	2X semana	APHA (2005)
Sólidos Totais	Gravimétrico	1X semana	APHA (2005)
Sulfato (mg/L)	Cromatografia de Íons	2X semana	△
Sulfeto (mg/L)	Espectrofotométrico	2X semana	APHA (2005)
Vazão (mL/h)	Volumétrico	diariamente	-
Caracterização da Ág. de Lavanderia			

Ácidos voláteis (mg/L)	Cromatográfico HPLC	-	Penteado <i>et al.</i> (2013)
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	Titulométrico	-	Ripley <i>et al.</i> (1986)
DQO bruta (mg/L)	Espectrofotométrico	-	APHA (2005)
LAS (mg/L)	Cromatográfico HPLC	-	Duarte <i>et al.</i> (2006)
pH (unidade)	Potenciométrico	-	APHA (2005)
Sólidos Totais	Gravimétrico	-	APHA (2005)
Sulfeto (mg/L)	Espectrofotométrico	-	APHA (2005)
Cloreto	Cromatografia de Íons	-	△
Fluoreto (mg/L)	Cromatografia de Íons	-	△
Fosfato (mg/L)	Cromatografia de Íons	-	△
Nitrato (mg N/L)	Cromatografia de Íons	-	△
Amônia (mg/L)	Cromatografia de Íons	-	△
Sulfato (mg/L)	Cromatografia de Íons	-	△
NTK (mg N/L)	Titulométrico	-	APHA (2005)

△ Dionex ICS-5000 com IonPAC AS23 (4mm), eluente Na₂CO₃/NaHCO₃ (1ml/min)

4.6.1 Determinação de Fe(II) e Ferro Total

Para o Ferro tem-se dois estados de oxidação, Fe(III) e Fe(II) que são estáveis sob condições aeróbias e anaeróbias, respectivamente. O método utilizado para quantificação do Ferro foi proposto por Stooke (1970), no qual emprega Ferrozina (monosodium salt hydrate of 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-pp-disulfonic acid) que reage com o Fe(II) formando um complexo magenta. A absorção máxima ocorre em 562 nm com pH entre 4,0 e 9,0 (Stooke, 1970; Viollier, 2000)

As determinações de Fe(II) efluente foram realizadas duas vezes por semana. Previamente, a determinação espectrofotométrica, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração de acordo com García Balboa *et al.* (2011). Tal procedimento consistiu em adicionar 1 mL de HCl 0,5 M em tubos de vidro, seguido pela adição de 1 mL de amostra e aguardar por no mínimo 10 minutos, como tempo de reação. Ressalta-se que o procedimento de coleta de amostra foi realizado em anaerobiose, com a utilização de uma seringa. Com o intuito de evitar qualquer re-oxigenação da amostra a ponta da agulha ficava totalmente submersa na solução de HCl 0,5 M, no momento da transferência da amostra para o frasco contendo o ácido.

O procedimento de extração foi realizado em função de alguns problemas:

- pH acima de 4,0 o Fe(II) não coexiste na presença de oxigênio. Portanto, a adição de HCl 0,5 M facilita a manipulação da amostra.
- a maioria do Fe(II) produzido em pH neutro encontra-se na forma sólida, complicando sua quantificação (Lovley & Phillips 1986a; Lovley 1991).

Após o procedimento de extração, adicionava-se ferrozina em volume conhecido da amostra de extração. Em geral, adicionava-se 70 μL de amostra em 400 μL de ferrozina, mais 3.930 μL de H_2O ultrapura, aguardava-se 10 minutos para a leitura em 562 nm.

A determinação de Ferro Total seguiu os mesmos procedimentos e frequências descritas acima. Todavia, adicionava-se Hidroxilamina 1,4 M, que atua como agente redutor, ou seja, todo o Fe(III) era reduzido a Fe(II), tornando passível a determinação com Ferrozina (Lovley *et al.*, 1987; Straub *et al.*, 1996).

4.6.2 Granulometria

Os grânulos foram distribuídos sobre uma placa de Petri tomando cuidado com o espaçamento entre eles, evitando deixá-los muito próximos. Previamente, a captura da imagem foi colocada uma régua graduada junto à placa de Petri que serviu de referência para o *software*. Utilizou-se o *software* Image-Pro Plus 4.5 para o tratamento das imagens, contagem e medição do diâmetro médio dos grânulos, segundo a metodologia adaptada de Alphenaar *et al.* (1993). Os dados foram exportados para o OriginPro 8 para tratamento estatístico.

4.7 Análises Microbiológicas

4.7.1 Estocagem de Amostra e Extração de DNA

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

O DNA genômico foi extraído baseado na metodologia descrita por Griffiths *et al.* (2000) modificada. Para tanto foi utilizado fenol tamponado com Tris e clorofórmio. A seguir segue o protocolo detalhado. 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 outro eppendorf 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 cloroformio na mesma proporção do sobrenadante retirado). Por fim, aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para outro eppendorf e a amostra de DNA foi armazenada a -20°C.

4.7.2 PCR-DGGE

Para o DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) do domínio *Bacteria* foi utilizado o set primer 968FGC – 1401R (Nubel *et al.*, 1996). O programa para a PCR (termociclador Eppendorf AG - 22331 Hamburg) foi de pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos; com 10 ciclos de desnaturação a 95° C por 30 segundos; anelamento a 56° C por 40 segundos; extensão a 72° C por 1 min.; e 25 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos; anelamento a 55° C por 45 segundos; extensão a 72° C por 1 min.; extensão final a 72° C por 5 minutos; resfriamento a 4° C. Para o DGGE do domínio *Archaea* foi utilizado o *set primer* 1100FGC – 1400R (Kudo *et al.*, 1997). O programa para a PCR (termociclador Eppendorf AG - 22331 Hamburg) foi de pré-desnaturação a 94 °C por 5 minutos; com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min.; anelamento a 55°C por 1min.; extensão a 72°C por 1 min.; extensão final a 72°C por 7minutos; resfriamento a 4°C.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (massa/volume) em TAE 1X, com gradiente linear de desnaturante (ureia e formamida) variando de 45 a 65%. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 75 V e temperatura de 60 °C, durante 16 h. A imagem do gel foi capturada em equipamento *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) com iluminação UV. O perfil de DGGE foi analisado no *software* Bionumerics 2.5. O coeficiente de similaridade e dendrograma foram determinados usando o coeficiente de Jaccard e algoritmo UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*), respectivamente.

4.7.3 Sequenciamento Massivo

Para o sequenciamento massivo do gene rRNA 16S foram utilizadas duas plataformas distintas: a Plataforma 454-Pirosequenciamento e a Plataforma Ion Torrent. Em um primeiro momento foi utilizado a Plataforma 454, todavia, devido os custos envolvidos, tamanho do fragmento sequenciado e número de sequências por amostra

essa plataforma foi substituída pela Plataforma Ion Torrent. Todavia, a qualidade das bases sequenciadas na Plataforma 454 (qualidade Phred > 25) foi melhor que na plataforma Ion Torrent (qualidade Phred > 20), tal resultado deveu-se as características intrínsecas de cada sequenciador.

4.7.3.1 Sequenciamento gene rRNA 16S – Plataforma 454

O sequenciamento por meio da plataforma 454-Pirosequenciamento foi realizado no Instituto de Agrobiotecnologia Rosario (IDEAR em Rosario, Argentina) utilizando o equipamento 454 Genome Sequencer FLX (Roche). Para tanto, foram enviadas amostras de DNA genômico purificado em concentração mínima de 10 ng/μL e pureza OD260/280 de no mínimo 1,8. 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). A região V4 do gene rRNA 16S foi amplificada utilizando os primers 563F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') e 802R (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') previsto para se ligar a 94,6% de todos os genes 16S e gerando um fragmento de 239 pb (RDP's Pyrosequencing Pipeline: <http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp>).

4.7.3.2 Sequenciamento gene rRNA 16S – Plataforma Ion Torrent

O sequenciamento por meio da plataforma Ion Torrent foi realizado na empresa de biotecnologia GenOne Biotechnologies com sede na cidade do Rio de Janeiro. Para tanto, as amostras foram enviadas nas mesmas características que o sequenciamento pela plataforma 454-Pirosequenciamento. Ou seja, concentração mínima de 10 ng/μL e pureza OD260/280 de no mínimo 1,8. 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>).

4.7.3.3 Análise das Sequências

As sequências obtidas tanto na plataforma 454 como na Ion Torrent foram analisadas utilizando 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 (FASTAQC; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

O processamento inicial das sequências foi praticamente igual para ambas às plataformas, com exceção na Plataforma 454 (qualidade Phred de 25) e na Plataforma Ion Torrent (qualidade Phred de 20; Tabela 4.8 - Etapa I). Utilizou-se em ambas as plataformas a ferramenta DECIPHER para a remoção de chimeras (Etapa II) e o software INFERNAL (*INFERENCE of RNA ALignment*; Etapa III) para alinhamento das sequências.

A determinação de OTUs (*operation taxonomic units*) foi realizada de forma distinta em cada plataforma devido ao limite de processamento do servidor utilizado. Na Plataforma 454 foi utilizado o software "*complete linkage clustering*". Para a Plataforma Ion Torrent além do software "*complete linkage clustering*" foi utilizado o software "*mcClust complete linkage clustering*" como complemento (Etapa IV). Ressalta-se que 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 e de diversidade 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*, Etapa IV-a).

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 (Tabela 4.5). 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.

Para as análises dos índices de diversidade (alfa e beta) foram utilizados os resultados gerados na Etapa IV-Determinação de OTUs (97 % de similaridade) que inclui OTUs com sequências únicas (Singletons). Enquanto, para a classificação taxonômica (Etapa VII) 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 adotados foram de 80 % para gênero que resulta em uma porcentagem de 95,7 % de sequências corretamente classificadas para esse nível taxonômico para a região V4 do gene rRNA 16S. Enquanto, o limite de confiança para os demais níveis taxonômicos foi de 50%.

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*. As sequências foram depositadas com número de projeto PRJEB4790.

Tabela 4.4: Etapas da análise das sequências obtidas nas plataformas 454 e Ion Torrent.

Etapas da Análise		Propósito	Plataforma 454	Plataforma Ion Torrent	Referência
I	Processamento Inicial	Filtragem de qualidade e tamanho das sequências.	*sequências menores que 200 pares de bases; *coeficiente de qualidade menor que 25; *homopolímeros maiores que 6 e bases ambíguas foram removidas. https://pyro.cme.msu.edu/init/form.spr	*sequências menores que 200 pares de bases; *coeficiente de qualidade menor que 20; *homopolímeros maiores que 6 e bases ambíguas foram removidas. https://pyro.cme.msu.edu/init/form.spr	Cole <i>et al.</i> , 2014
II	Remoção de Chimeras	Remoção de sequências que são produtos híbridos que podem ser falsamente interpretados como novos organismos, inflando assim a diversidade.	Software utilizado DECIPHER Version 1.8.0 (2013-10-15) http://decipher.cee.wisc.edu/		Wright <i>et al.</i> , 2012
III	Alinhamento	Comparação de duas ou mais sequências como requisito para descobrir informações funcional, estrutural e evolucionária.	Ferramenta "secondary structure aware Infernal aligner" https://pyro.cme.msu.edu/aligner/form.spr		Nawrocki, E.P., Eddy, S.R., 2007.
IV	Determinação de OTUs Clustering	Agrupamento de sequências em função da porcentagem de similaridade ente elas.	Ferramenta "Complete Linkage Clustering". A porcentagem de similaridade utilizado foi de 97%. https://pyro.cme.msu.edu/cluster/form.spr *	Ferramentas: RDP mcClust complete linkage clustering e "complete linkage clustering". A porcentagem de similaridade utilizada foi de 97%. http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/cluster/form.spr	Cole <i>et al.</i> , 2014*; Fish <i>et al.</i> , 2013
IV-a	Curvas de Rarefação	Análise da cobertura e esforço amostral da diversidade nas amostras	Ferramenta utilizada: "Rarefaction" https://pyro.cme.msu.edu/rarefaction/form.spr		Cole <i>et al.</i> , 2014
IV-b	Medidas de Diversidade (alfa e beta)	<u>Alfa</u> : medidas de diversidade intra-amostral. <u>Beta</u> : medidas de diversidade inter-amostral.	Software: PAST		Hammer <i>et al.</i> , 2001
V	Sequências Representativas	Selecionar a sequência representativa de cada OTU.	Ferramenta: "Representative Sequence"		Cole <i>et al.</i> , 2014
VI	Remoção de Singletons	OTUs com uma única sequência podem representar erros (Dickie, 2010) e dessa forma foram retiradas.	Excel 2010		-
VII	Classificação Taxonômica	Classificação das sequências representativas de cada OTU.	Ferramenta utilizada: RDP-Classifer. Adotou-se o limite de confiança de 80% para gênero e 50% para os demais níveis taxonômicos. http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp		Cole <i>et al.</i> , 2014
VIII	Depósito das Sequências	Disponibilizar as sequências (brutas) em um banco de dados internacional.	European Nucleotide Archive. http://www.ebi.ac.uk		-

Tabela 4.5: Parâmetros de alfa-diversidade.

Parâmetros		Observações
<p>Diversidade: refere-se tanto ao número (riqueza) de diferentes espécies biológicas quanto à abundância relativa (equitabilidade) dessas espécies.</p>	ÍNDICES DE DIVERSIDADE	<p><i>Dominância</i></p> <p>Valores variam de 0 - 1. 0 indica a presença equânime de todos os táxons e 1 indica o domínio de um táxon na comunidade microbiana.</p>
		<p><i>Shannon</i></p> <p>Valores variam de 0 - ∞. Fortemente influenciada pela riqueza. Quanto maior o índice, maior o número de táxons na comunidade microbiana.</p>
		<p><i>Simpson (1-D)</i></p> <p>Valores variam de 0 - 1. Fortemente influenciada pela equitabilidade. Quanto maior o valor, maior a diversidade.</p>
<p>Riqueza: refere-se ao número total de espécies em um ambiente.</p>	ESTIMADORES DE RIQUEZA	<p><i>Chao1</i></p> <p>Estima a riqueza total utilizando o número de espécies representadas por apenas um indivíduo nas amostras (singletons), e o número de espécies com apenas dois indivíduos nas amostras (doubletons).</p>
		<p><i>Rarefação</i></p> <p>Estimativa do número de OTUs em função do número de sequencias. Indica se a amostragem realizada foi suficiente para atingir o número de espécies total da comunidade.</p>

4.8 Procedimento Experimental

A seguir serão detalhados os procedimentos experimentais das hipóteses elaboradas. Por meio da Figura 4.2 e Figura 4.3 é possível observar o delineamento experimental de cada hipótese elaborada.

	Hipótese	Alimentação	Condições Experimentais	Parâmetros Experimentais
Hipótese A	Um reator EGSB com biomassa adaptada ao alquilbenzeno linear sulfonado, terá maior estabilidade e maior eficiência de remoção (DQO, LAS), no tratamento de água residuária de lavanderia comercial.	Meio Sintético LAS Padrão (Etapa I) Meio Sintético Ag. Lavanderia (Etapa II e Etapa I).	<u>EGSB-BA (biomassa adaptada)</u>	DQO, LAS, Sulfato, Sulfeto, Ácidos Voláteis, LAS, pH, Alcalinidade, Granulometria e Série de Sólidos. DGGE (todas as etapas). Sequenciamento gene rRNA 16S Plataforma 454 (EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I).
			Etapa I DQO 755±102 mg/L, TDH 38 h e LAS (Padrão) 13,1±2,4 mg/L. Etapa II DQO 813±75 mg/L, TDH 39 h e LAS (Ag. Lav.) 11,2±5,3 mg/L.	
Hipótese B	A alimentação de um reator EGSB apenas com água residuária de lavanderia comercial e bicarbonato de sódio, é suficiente para manter a estabilidade do sistema e remoções satisfatórias de DQO/LAS.	Meio Sintético (Etapa I) Ag. Lavanderia + bicarbonato de sódio (Etapa II e III).	<u>EGSB-BNA (biomassa não adaptada)</u>	Sequenciamento gene rRNA 16S Plataforma 454 (EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I).
			Etapa I DQO 815±73 mg/L, TDH 39 h e LAS (Ag. Lav.) 11,5±5,4 mg/L.	
			<u>EGSB-Ag. Lav</u>	
			Etapa I DQO 755±277 mg/L, TDH 38 h Etapa II DQO 221±81 mg/L, TDH 38 h e LAS (Ag. Lav.) 12,3±3,2 mg/L. Etapa III DQO 237±114 mg/L, TDH 39 h e LAS (Ag. Lav.) 28,8±6,4 mg/L.	DQO, LAS, Sulfato, Sulfeto, Ácidos Voláteis, LAS, pH, Alcalinidade e Série de Sólidos. DGGE (todas as etapas). Sequenciamento gene rRNA 16S Plataforma Ion Torrent (Etapas II e III).

Figura 4.2: Hipóteses elaboradas e fluxogramas experimentais dos reatores não suplementados com Ferro.

	Hipótese	Alimentação	Condições Experimentais	Parâmetros Experimentais
Hipótese C	A disponibilidade de Ferro III, como receptor final de elétrons, resulta em maiores eficiências de remoção do alquilbenzeno linear sulfonado (LAS Padrão) em reator EGSB.	Meio Sintético; Bicarbonato de Sódio; EDTA-Fe(III); LAS Padrão	EGSB-Fe Etapa I DQO 1109±398 mg/L, TDH 36 h Fe III 7276 ± 2525 uMol/L e LAS (Padrão) 16,4 ± 6,8 mg/L	DQO, LAS, Sulfeto, Ácidos Voláteis, LAS, pH, Alcalinidade, Sólidos, Ferro II e Ferro Total. Sequenciamento gene rRNA 16S Plataforma Ion Torrent .
Hipótese D	A disponibilidade de Ferro III, como receptor final de elétrons, resulta em maiores eficiências de remoção do alquilbenzeno linear sulfonado (presente em água de lavanderia) em reator EGSB.	Bicarbonato de Sódio; EDTA-Fe(III); Ag. Lavanderia	EGSB-Fe-Ag.Lav. Etapa I DQO 399±113 mg/L, TDH 40 h Fe III 3624 ± 1131 uMol/L e LAS (Ag.Lav.) 24,5 ± 8,9 mg/L	DQO, LAS, Sulfeto, Ácidos Voláteis, LAS, pH, Alcalinidade, Sólidos, Ferro II e Ferro Total. Sequenciamento gene rRNA 16S Plataforma Ion Torrent .

Figura 4.3: Hipóteses elaboradas e fluxogramas experimentais dos reatores suplementados com Ferro III.

4.8.1 Hipótese A - Avaliação da adaptação da biomassa no tratamento de água residuária de lavanderia comercial

Para avaliar o efeito da adaptação da biomassa ao LAS no tratamento de água residuária de lavanderia comercial (Hipótese A - Figura 4.2) foram utilizados dois reatores EGSB descritos no item 4.5.1, seguindo os parâmetros operacionais detalhados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Parâmetros Operacionais. Avaliação da Adaptação da Biomassa

	EGSB-Biomassa Adaptada		EGSB-Biomassa Não Adaptada
	Etapa I	Etapa II	Etapa I
Biomassa inicial			
ST (g/L)	8,5		
STV (g/L)	7,1		
STF (g/L)	1,5		
Alimentação			
Etanol (mg DQO/L)	250	270	270
Metanol (mg DQO/L)	250	270	270
Extrato de Levedura (mg DQO/L)	250	270	270
Carga Orgânica Específica Aplicada (mg DQO/g STV.d)	71±13	77±16	77±16
Bicarbonato de Sódio (g/L)	0,4	0,4	0,4
Vitaminas ^o	+	+	+
Meio Mineral Modificado [■]	+	+	+
LAS			
Afluente (mg/L)	13,2±2,3 [▲]	11,2±5,3 [□]	11,5±5,4 [□]
Carga de LAS Específica (mg/gSTV.d)	1,2±0,2	1,0±0,7	0,9±0,3
Vazão de Recirculação (L/h)	5,0	5,0	5,0
Vazão de Alimentação (L/h)	0,037	0,036	0,036
TDH (dias)	38±4	39±4	39±4
Duração (d)	218	173	197

o Tabela 4.2 ■ Tabela 4.1 ▲ Adicionado LAS Padrão Sigma-Aldrich

□ Adicionado água de lavanderia em função da concentração de LAS

Dessa forma, durante a execução da Etapa I do EGSB-BA (biomassa adaptada) objetivou-se expor a biomassa ao LAS Padrão Sigma-Aldrich por longo período de tempo (218 dias), procedendo-se após isso a Etapa II com adição de água residuária de lavanderia comercial. Durante a operação do EGSB-BNA (biomassa não adaptada), não realizou-se período de adaptação da biomassa ao LAS Padrão, iniciando-se a operação desse reator diretamente com água residuária de lavanderia comercial.

Ao final de cada etapa, em ambos os reatores, foram realizadas análises de granulometria (item 4.6.2) e série de sólidos da biomassa do reator. Além disso, ao final

de cada etapa adicionou-se resazurina (0,1 %) para avaliar o potencial redox ao longo do reator (anaeróbia estrita = incolor, anaeróbia facultativa = coloração rosa, aeróbia = coloração azul) de acordo com Gusmão (2005).

O balanço de massa de LAS foi realizado ao final de cada etapa de operação. Para tanto, foram retiradas amostras tanto do separador de fase como da manta de lodo para extração de LAS adsorvido (Duarte *et al.*, 2008).

A caracterização microbiana foi realizada tanto por PCR-DGGE quanto por sequenciamento massivo do gene rRNA 16S. A PCR-DGGE foi realizada a partir de amostras retiradas ao final de cada etapa de operação. Por outro lado, o sequenciamento massivo por meio da Plataforma 454-Pirosequenciamento foi realizado com amostras provenientes da manta de lodo da Etapa II do EGSB-BA e da manta de lodo da Etapa I do EGSB-BNA. Detalhes da PCR-DGGE e sequenciamento estão descritos no ítem 4.7.2 e ítem 4.7.3, respectivamente.

4.8.2 Hipótese B - Avaliação do tratamento de água residuária de lavanderia comercial sem adição de meio sintético

Por meio da operação de reator EGSB-Ag.Lav. objetivou-se à remoção do LAS de água residuária de lavanderia comercial sem suplementação na alimentação (vitaminas, co-substratos, solução de macro e micronutrientes - Figura 4.2 - Hipótese B).

Para tanto, o reator foi operado por 26 dias apenas com meio sintético (Etapa I) para reativação microbiana, uma vez que o lodo granulado encontrava-se sob refrigeração (4° C) antes da inoculação no reator. Após 26 dias, deu-se início a Etapa II, sendo substituído o meio sintético por água residuária de lavanderia mais bicarbonato de sódio, observando-se a concentração de $12,3 \pm 3,2$ mg/L de LAS (Tabela 4.7). Diante dos resultados obtidos na Etapa II, optou-se por aumentar a concentração de LAS afluente para $28,8 \pm 6,5$ mg/L caracterizando a Etapa III, com duração de 158 dias. A partir dos resultados obtidos na Hipótese A (Figura 4.2) não foi realizada adaptação da biomassa.

Tabela 4.7: Parâmetros Operacionais. Avaliação da remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial sem adição de macro/micro nutrientes, vitaminas e co-substratos (metanol, etanol e extrato de levedura)

	Etapa		
	I	II	III
Biomassa inicial			
ST (g/L)		8,5	
STV (g/L)		6,9	
STF (g/L)		1,6	
Alimentação			
Etanol (mg DQO/L)	250	-	-
Metanol (mg DQO/L)	250	-	-
Extrato de Levedura (mg DQO/L)	250	-	-
Vitaminas ^o	+	-	-
Meio Mineral Modificado [■]	+	-	-
Água Residuária de Lavanderia (mg DQO/L)	-	221 ± 81	237 ± 114
Carga Orgânica Específica Aplicada (mg DQO/g STV.d)	69 ± 9	21 ± 9	21 ± 11
Bicarbonato de Sódio (g/L)	0,4	0,4	0,4
LAS [□]			
Afluente (mg/L)	-	12,3 ± 3,2	28,8 ± 6,5
Carga de LAS Específica (mg LAS.gSTV ⁻¹ .d ⁻¹)	-	1,0 ± 0,3	2,7 ± 0,7
Vazão de Recirculação (L/h)	5,0	5,0	5,0
Vazão de Alimentação (L/h)	0,037	0,037	0,036
TDH (horas)	38 ± 5	38 ± 4	39 ± 5
Duração (dias)	26	65	158

o Tabela 4.2

■ Tabela 4.1

□ Adicionado água de lavanderia em função da concentração de LAS

A análise da comunidade microbiana por PCR-DGGE para o domínio *Bacteria* foi realizada de duas formas: (i) para a primeira, objetivou-se comparar a comunidade microbiana do inóculo e ao final das Etapas II e III do reator. Para tanto, foram retiradas amostras homogeneias da manta de lodo (Etapa II e III) e do separador de fase (Etapa II e III). Para a segunda forma (ii) objetivou-se avaliar o padrão da comunidade microbiana em diferentes pontos de amostragens da manta de lodo e do separador de fase, permitindo assim verificar uma possível estratificação microbiana ao longo do reator. Essa análise do perfil microbiano ao longo do reator (ii) foi realizada apenas ao final da Etapa III. Para tanto, foram retiradas amostras do distribuidor de vazão (P1), três da manta de lodo (P2, P3 e P4) e uma do separador de fase (P5; Figura 4.4). Os detalhes da PCR-DGGE podem ser visualizados no Ítem 4.7.2.

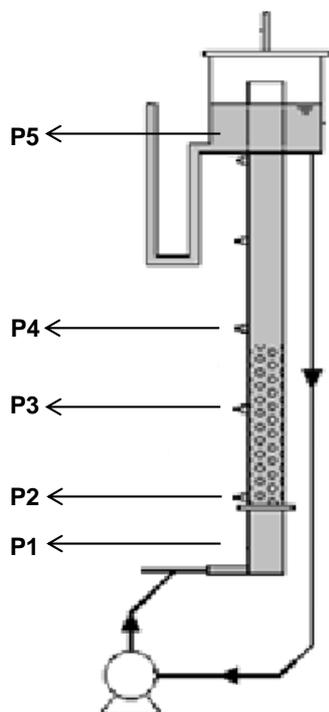


Figura 4.4: Pontos de coleta de amostras para a PCR-DGGE da Etapa III do EGSB-Ag.Lav.

Para a caracterização filogenética do domínio *Bacteria* foram retiradas amostras homogenias do separador de fase e manta de lodo ao final das Etapas II e III do EGSB-Ag.Lav. As quatro amostras foram sequenciadas por meio da plataforma Ion Torrent Chip 318 modo 400 pb. Detalhes sobre o sequenciamento podem ser obtidos no Ítem 4.7.3.2.

O balanço de massa de LAS foi realizado apenas ao final da Etapa III. Para tanto, foram retiradas amostras tanto do separador de fase como da manta de lodo para extração de LAS adsorvido. Nos últimos dias de cada etapa adicionou-se resazurina como indicador do potencial redox ao longo do reator, semelhante ao procedimento descrito anteriormente.

4.8.3 Hipótese C - Avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS padrão em reator EGSB

Para avaliar o efeito da suplementação de Fe(III) na degradação do LAS Padrão em EGSB (Hipótese C – Figura 4.3) foi utilizado um reator EGSB como descrito no Ítem 4.5.1, com os parâmetros operacionais detalhados na Tabela 4.8. Ressalta-se que esse reator teve condições similares ao EGSB-BA Etapa I (Hipótese A) com exceção a suplementação com Fe(III).

Tabela 4.8: Condições operacionais para avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS Padrão em reator EGSB.

Etapa I	
Biomassa inicial	
ST (g/L)	8,5
STV (g/L)	6,9
STF (g/L)	1,6
Alimentação	
Etanol (mg DQO/L)	250
Metanol (mg DQO/L)	250
Extrato de Levedura (mg DQO/L)	250
Vitaminas [○]	+
Meio Mineral Modificado [■]	+
Carga Orgânica Específica Aplicada (mg DQO/g STV.d)	107 ± 42
Bicarbonato de Sódio (g/L)	0,8
LAS [▲]	
Afluente (mg/L)	16,4 ± 6,8
Carga de LAS específica (mg LAS.gSTV ⁻¹ .d ⁻¹)	1,5 ± 0,7
Fe(III) Total (μMol/L) [♦]	
Afluente	7.276 ± 2.525
Vazão de Recirculação (L/h)	5,0
Vazão de Alimentação (L/h)	0,039
TDH (horas)	36 ± 7
Duração (dias)	127

○ Tabela 4.2 ■ Tabela 4.1 ▲ Adicionado LAS Padrão Sigma-Aldrich
 ♦ Adicionado na forma de EDTA-Fe(III)

A operação do reator EGSB-Fe consistiu em etapa única com adição de 7.276 μMol/L (~0,41gFe/L) e 16,4 ± 6,8 mg/L de LAS Padrão. A manutenção da concentração de Fe(III) na alimentação de aproximadamente 0,41gFe/L foi em função da porcentagem de redução do Fe(III). A concentração de bicarbonato de sódio (0,8 mg/L) usada nesse sistema foi duas vezes maior que aquelas utilizadas no reatores da Hipótese A e B. Tal fato, deveu-se a liberação de íons H⁺ durante o processo de redução do Fe(III) acidificando o meio.

A caracterização microbiana foi realizada por meio de sequenciamento massivo (Plataforma Ion Torrent Chip 318 modo 400bp) do gene rRNA 16S para o domínio *Bacteria* ao final da Etapa I. Para tanto, foi retirado uma amostra homogenia de todo o reator. Ao final da etapa foi realizado o balanço de massa de LAS.

4.8.4 Hipótese D - Avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS presente em água residuária de lavanderia em reator EGSB

Para avaliar o efeito da suplementação de Fe(III) na degradação do LAS presente em água residuária de lavanderia em reator EGSB (Hipótese D - Figura 4.3) foi utilizado um EGSB como descrito no Ítem 4.5.1, com os parâmetros operacionais detalhados na Tabela 4.9. Ressalta-se que a operação deste reator foi similar ao EGSB-Ag.Lav Etapa III com exceção da suplementação com Fe(III).

Tabela 4.9: Condições operacionais para avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS presente em água residuária de lavanderia.

	Etapa I
Biomassa inicial	
ST (g/L)	8,5
STV (g/L)	6,9
STF (g/L)	1,6
Alimentação	
Água Residuária de Lavanderia (mg DQO/L)	399 ± 113
Carga Orgânica Específica (mg DQO/g STV.d)	34 ± 16
Bicarbonato de Sódio (g/L)	0,8
LAS [□]	
Afluente (mg/L)	24,4 ± 8,9
Carga de LAS Específica Aplicada (mg LAS.gSTV ⁻¹ .d ⁻¹)	2,2 ± 0,9
Fe(III) Total (μMol/L) [♦]	
Afluente	3624 ± 1131
Vazão de Recirculação (L/h)	
	5,0
Vazão de Alimentação (L/h)	
	0,035
TDH (horas)	
	40 ± 5
Duração (dias)	
	78

□ Adicionado água de lavanderia em função da concentração de LAS

♦ Adicionado na forma de EDTA-Fe(III)

Na operação do EGSB-Fe-Ag.Lav. manteve-se DQO afluente de 399 mg/L; ou seja, ligeiramente superior aquela da Etapa III do EGSB-Ag.Lav (237 mg/L), ainda que com concentração de LAS afluente menor (24,4 mgLAS/L) em relação a operação do EGSB-Ag.Lav Etapa III (28,8 mgLAS/L). A concentração de Fe(III) total foi de 3.624 μMol/L, que correspondeu a 49 % a menos que os valores utilizados no EGSB-Fe. Essa diferença deveu-se ao baixo percentual de redução de ferro obtido durante a operação desse reator.

Assim como no EGSB-Fe a caracterização microbiana foi realizada por meio de sequenciamento massivo (Plataforma Ion Torrent Chip 318 modo 400bp) do gene rRNA 16S para o domínio *Bacteria* ao final da Etapa I. Para tanto, foi retirado uma amostra homogenia de todo o reator. Ao final dos 78 dias de operação foram retiradas amostras para extração de LAS adsorvido na biomassa do reator de acordo com Duarte *et al.* (2008) e análise de sólidos presentes dentro do reator.

5 Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados que foram divididos da seguinte maneira: *(i)* caracterização da água de lavanderia, *(ii)* avaliação da adaptação da biomassa ao LAS no tratamento de água residuária de lavanderia (Figura 4.2 - **Hipótese A**), *(iii)* avaliação do tratamento de água residuária de lavanderia comercial sem adição de meio sintético (Figura 4.2 - **Hipótese B**), *(iv)* avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS padrão e do LAS em água residuária de lavanderia (Figura 4.3 - **Hipótese C e D**) e *(v)* comparação dos resultados obtidos nas diferentes hipóteses.

5.1 Caracterização da Água de Lavanderia

Os resultados da caracterização da água de lavanderia foram divididos em função das hipóteses elaboradas. Apenas durante a avaliação da hipótese A (sete caracterizações), hipótese B (sete caracterizações) e hipótese D (três caracterizações) foram utilizadas água residuária de lavanderia na alimentação dos reatores (Figura 4.2 e Figura 4.3).

A concentração mínima de LAS obtida foi de 50 mg/L (Hipótese B) e a máxima de 310 mg/L (Hipótese A) com médias variando de 172 a 181 mg/L (Tabela 5.1). Okada (2012) coletou 16 amostras do mesmo estabelecimento comercial e observou valor mínimo de 90 e máximo de 350 mgLAS/L (216 ± 77 mgLAS/L). Por outro lado, Braga e Varesche (2014) verificaram para água residuária de outro estabelecimento de 12 a 1.024 mgLAS/L, com média de 164 ± 248 mg/L. Essa amplitude de valores, provavelmente, foi devido ao procedimento de dosagem de detergente na lavanderia (manual ou automático) e a concentração utilizada em função da quantidade de roupa.

Observou-se 800 a 2.665 mg/L de DQO bruta com média de 1.582 a 1.603 mg/L. Seo *et al.*, (2001), e Okada (2012) e Braga e Varesche (2014), observaram valores de DQO de 900-5.200 mg/L; 488-2.847 mg/L e 415-4.474 mg/L, respectivamente. Aproximadamente 23 % (hipótese A), 28 % (hipótese B) e 35 % (hipótese D) da DQO quantificada foram em função dos ácidos orgânicos voláteis detectados. A porcentagem restante deveu-se ao material fibroso presentes nas amostras e demais compostos orgânicos não detectados pelo método cromatográfico empregado.

Tabela 5.1: Resultados das caracterizações da água de lavanderia.

Parâmetro	Hipótese A*				Hipótese B*				Hipótese D**			
	Valor mín.	Valor máx.	Média	Desvio	Valor mín.	Valor máx.	Média	Desvio	Valor mín.	Valor máx.	Média	Desvio
LAS (mg/L)	74	311	181	82	50	202	119	53	97	285	172	99
DQO (mg/L)	800	2.665	1.603	692	905	2.163	1.582	455	1.393	2.043	1.682	331
AOV (mg Hac/L)	61	1.183	346	427	105	1.469	413	520	90	1.235	551	795
AOV (mg DQO/L)	65	1.266	370	457	112	1.572	442	556	96	1.322	590	851
Ác. Láctico	11,0	235,9	95,8	92,9	32,1	543,1	168,6	174,8	11,0	210,9	86,9	108,3
Ác. Málico	7,9	372,5	85,1	142,6	10,6	889,3	153,6	326,7	7,9	746,4	302,3	508,4
Ác. Isobutírico	2,2	149,9	32,0	57,9	2,4	19,8	7,9	6,7	5,1	12,8	10,1	4,3
Ác. Propiônico	3,3	226,3	48,4	87,4	3,7	29,9	11,9	10,1	7,7	19,3	15,3	6,5
Alcalinidade (mgCaCO3/L)												
Parcial	27,4	762,6	398,9	256,1	77,9	368,6	258,3	106,3	27,4	372,6	239,6	185,8
Total	97,6	883,7	488,6	279,0	126,6	471,4	346,1	120,3	97,6	442,3	320,0	192,9
pH	9,7	11,2	10,4	0,6	9,6	10,7	9,9	0,4	9,4	9,7	9,6	0,1
Cloreto	32,6	150,4	89,2	42,2	4,5	369,0	118,0	129,5	52,1	233,9	173,0	171,3
Fluoreto (mg/L)	ND	93,9	26,8	42,3	ND	37,2	18,0	14,7	ND	66,6	22,2	38,4
Fosfato (mg/L)	ND	293,0	196,4	135,6	ND	ND	-	-	ND	280,0	140,0	198,0
NTK (mg N/L)	23,0	43,0	32,3	7,7	23,8	71,0	50,3	18,9	29,0	63,0	44,0	17,4
Nitrato (mg N/L)	ND	1.369,7	359,9	674,0	ND	10,4	1,5	3,9	ND	10,4	5,2	7,4
Amônia (mg/L)	1,1	9,3	5,4	3,9	ND	4,6	1,8	2,0	ND	3,2	1,6	2,2
Sulfato (mg/L)	411,0	2.233,7	1.115,3	668,2	144,0	1.032,0	614,7	312,1	437,0	856,0	608,9	226,5
Sólidos (g/L)												
SST	0,072	0,200	0,118	0,053	0,110	0,635	0,212	0,188	0,082	0,168	0,120	0,044
SSF	ND	0,037	0,024	0,013	ND	0,325	0,088	0,107	ND	0,055	0,028	0,028
SSV	0,044	0,180	0,094	0,054	0,055	0,310	0,125	0,088	0,055	0,138	0,092	0,042
ST	1,231	8,226	4,534	2,828	1,277	3,946	2,653	0,911	1,037	3,863	2,760	1,367
STF	0,348	5,828	2,902	2,227	0,448	2,274	1,452	0,761	1,198	1,988	1,607	0,396
STV	0,033	2,398	1,632	0,863	0,731	1,696	1,200	0,313	0,039	2,229	1,153	1,098

*sete amostras; **três amostras; ND - Não detectado

Em relação aos ácidos orgânicos voláteis observou-se a presença constante dos ácidos láctico, málico, isobutírico e propiônico. Com exceção na hipótese D, o ácido láctico foi o que apresentou maiores concentrações com valores oscilando entre 11,0-543,1 mg/L e médias entre 95,8 - 168,6 mg/L. Segundo Narayanan *et al.* (2004), o ácido láctico faz parte da composição de alguns detergentes e, dessa forma, presente de forma constante nas caracterizações. Esse mesmo aspecto também foi observado por Okada (2012), no qual obteve 144 ± 88 mg/L de ácido láctico. Por outro lado, Braga e Varesche (2014) verificaram o predomínio de ácido butírico ($121,6 \pm 140,6$ mg/L) e $92,2 \pm 103,4$ mg/L de ácido láctico. Além do ácido láctico verificou-se também ácido málico, cujo valor mínimo foi de 7,9 mg/L (hipótese A) e máximo de 889,3 mg/L (hipótese B).

Observou-se valores de pH entre 9,4 a 11,2, ou seja, faixa de pH alcalina; com médias superiores a 9,6. Provavelmente, tais valores foram devido à presença de neutralizantes e alcalinizantes (hidróxido de sódio) na composição da água residuária de lavanderia. Por outro lado, Braga e Varesche (2014), não observaram pH maiores que 6,8 e mínimo de 3,3 (média de $5,6 \pm 0,9$), ou seja, faixa de pH ácido. Tal diferença, provavelmente, foi relacionada à utilização de produtos distintos, uma vez que, há detergentes alcalinos e ácidos disponíveis no mercado.

Dentre os principais íons detectados por meio da cromatográfica iônica destaca-se o sulfato com valores mínimos de 144,0 mg/L e máximos de 2.233,7 mg/L. Alta concentração de sulfato em água residuária de lavanderia já foi reportada por Okada (2012), cujo valor máximo observado foi de 1.530 mg/L. Por outro lado, Braga e Varesche (2014) observaram concentrações de sulfato que não ultrapassaram 102 mg/L ($21,0 \pm 19,1$ mg/L). Em relação ao íon fosfato, este foi detectado apenas nas caracterizações analíticas referente à água de lavanderia da hipótese A ($196,4 \pm 135,6$ mg/L) e hipótese D ($140,0 \pm 198,0$ mg/L)

Os valores de NTK (Nitrogênio Total Kjeldahl) ficaram próximos nas caracterizações, com valor mínimo de 23,0 mgN/L e máximo de 71,0 mgN/L. Obteve-se médias em torno de 32,3 a 50,3 mgN/L. Braga e Varesche (2014) e Okada (2012) obtiveram 32 ± 26 mg/L e 40 ± 21 mg/L, respectivamente. Na série de sólidos verificou-se baixa variação de SST, cujas médias observadas foram entre 0,12 – 0,21 g/L. Por outro lado, observou-se médias de ST entre 2,65 a 4,53 g/L, provavelmente, devido a presença de fibras de roupas que desprendem durante o processo de lavagem.

Detectou-se fluoreto entre 18,0 – 26,8 mg/L. Em relação ao nitrato, observou-se concentração 1,5 - 359,9 mg/L, os maiores valores foram obtidos na caracterização analítica referente à água de lavanderia da hipótese A.

5.2 Hipótese A - Avaliação da adaptação da biomassa no tratamento de água residuária de lavanderia comercial

5.2.1 Operação dos Reatores

O reator EGSB-BA (biomassa adaptada) foi operado por 391 dias, dos quais foram divididos em 218 dias para a Etapa I com LAS Padrão e 173 dias para Etapa II com água residuária de lavanderia comercial. O reator EGSB-BNA (biomassa não adaptada) foi operado por 197 dias em etapa única com água residuária de lavanderia comercial (Item 4.2). Os parâmetros operacionais podem ser visualizados na Tabela 4.6.

Aplicou-se 71 ± 13 até 77 ± 16 mgDQO/gVS.d de carga orgânica específica (COE) aos reatores em todas as etapas. Destaca-se a proximidade dos valores em virtude do controle diário do TDH e da concentração dos co-substratos afluente (etanol, metanol e extrato de levedura). Observou-se remoção elevada de DQO (>90%) e DQO residual efluente de 61 ± 24 mg/L (EGSB-BA - Etapa I) até 84 ± 34 mg/L (EGSB-BNA – Etapa I; Tabela 5.2). Elevadas remoções de DQO (>95%) em condições similares (14 mgLAS/L e 800 mgDQO/L afluente) já foram reportadas por Delforno *et al.* (2012) em reator EGSB. Ressalta-se que não se observou alteração dos valores de remoção de DQO devido a adição de água residuária de lavanderia comercial.

A carga de LAS específica (CLE) aplicada nas etapas de operação de ambos os reatores foram similares ($1,2 \pm 0,2$ mg/gVS.d – EGSB-BA Etapa I; $1,0 \pm 0,7$ mg/gVS.d – EGSB-BA Etapa II e $0,9 \pm 0,3$ mg/gVS.d – EGSB-BNA Etapa I). A remoção de LAS obtida para o EGSB-BA Etapa I foi de $63 \pm 10\%$. Delforno *et al.* (2012) obtiveram remoção similar; ou seja, de $69 \pm 8\%$ em reator EGSB com carga de LAS Padrão de 1,5 mg/gVS.d. No EGSB-BA Etapa II a remoção média de LAS foi de $76 \pm 18\%$; ou seja, notou-se diferença significativa ($p < 0.05$, ANOVA seguido teste Tukey) na remoção de LAS entre a Etapa I (LAS Padrão) e Etapa II (ág. residuária de lavanderia diluída) do EGSB-BA. A remoção de LAS foi maior na etapa com água residuária de lavanderia comercial do que com LAS Padrão. Provavelmente, a presença de sequestrantes pode

ter favorecido os mecanismos de adsorção do LAS no lodo granulado afetando a microbiota e contribuindo para essa diferença.

Tabela 5.2: Resultados dos reatores EGSB-BA e EGSB-BNA.

Parâmetros	EGSB – BA		EGSB - BNA
	Etapa I	Etapa II	Etapa I
DQO (mg/L)			
Afluente	755 ± 102	813 ± 75	815 ± 73
Efluente	61 ± 24	72 ± 26	84 ± 34
Remoção (%)	92 ± 3	91 ± 3	90 ± 4
Carga Orgânica Específica Aplicada (mgDQO/gVS.d)	71 ± 13	77 ± 16	77 ± 16
LAS (mg/L)	<i>LAS Padrão</i>	<i>Ag. Lav.</i>	<i>Ag. Lav.</i>
Afluente	13,2 ± 2,3	11,2 ± 5,3	11,5 ± 5,4
Efluente	4,8 ± 1,6	2,4 ± 1,7	2,1 ± 1,8
Remoção (%)	63,5 ± 10,3	76,4 ± 18,1	78,6 ± 16,7
Carga Específica Aplicada (mg/gVS.d)	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,7	0,9 ± 0,3
Remoção Específica (mg/gVS.d)	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,7	0,7 ± 0,3
Alcalinidade Parcial (mg CaCO₃/L)			
Afluente	238 ± 24	293 ± 39	297 ± 49
Efluente	268 ± 34	347 ± 62	347 ± 74
Alcalinidade Total (mg CaCO₃/L)			
Afluente	315 ± 26	407 ± 49	413 ± 59
Efluente	367 ± 48	473 ± 88	478 ± 101
pH			
Afluente	7,4 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2
Efluente	7,0 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,1
Sulfeto			
Efluente (mg/L)	-	3,69 ± 3,88	3,22 ± 3,86
Sulfato (mg S/L)			
Afluente	-	17,4 ± 11,9	17,4 ± 11,9
Efluente	-	2,1 ± 3,8	2,8 ± 7,6
Remoção (%)	-	84,9 ± 17,0	88,0 ± 25,0
AOV (mg HAc/L)			
Efluente	11,4 ± 13,5	3,2 ± 4,9	7,2 ± 13,6
*Biomassa - ML (g/L)			
Sólidos Totais		8,23	5,72
Sólidos Totais Voláteis		6,73	4,37
*Biomassa – SF (g/L)			
Sólidos Totais		1,49	0,46
Sólidos Totais Voláteis		1,24	0,30
Duração (dias)	218	173	197

*biomassa presente dentro do reator ao final da operação

ML - manta de lodo

SF - separador de fase

AOV – ácidos orgânicos voláteis

Como observado por Braga e Varesche (2014) e Carosia *et al.* (2014), a água de lavanderia apresenta na sua constituição básica sequestrantes como EDTA e Heptanoato de Sódio. Tais compostos têm a função de complexar íons responsáveis pela dureza da água, principalmente íons cálcio e magnésio. Dessa forma, atuam na estabilidade do processo, potencializando o sistema conservante (componentes bacteriostáticos), uma vez que a retirada desses íons dificulta o crescimento de bactérias. Todavia, como detalhado por Westall *et al.* (1999) os íons de cálcio e magnésio têm influência na adsorção do LAS. A presença desses íons pode favorecer a adsorção de LAS em virtude da redução da repulsão eletrostática entre as partes iônicas do surfactante e partículas de lodo (Westall *et al.* 1999). Com base no balanço de massa, a quantidade de LAS adsorvido foi de 203 mg de LAS e 118 mg de LAS para EGSB-BA Etapa I e EGSB-BA Etapa II, respectivamente. Ressalta-se que o balanço de massa da Etapa I e Etapa II desse reator foi realizado após 218 dias e 391 dias, respectivamente. Ou seja, mesmo para a biomassa da Etapa II com um tempo de exposição bem maior, a quantidade de LAS adsorvido foi menor. Dessa forma, a ausência desses sequestrantes pode ter contribuído para maior adsorção de LAS no EGSB-BA Etapa I em relação ao EGSB-BA Etapa II.

Essa maior adsorção do LAS ao lodo granulado pode ter exposto a biomassa a uma condição de maior stress. Além disso, a partir da análise de granulometria observou-se menor diâmetro no EGSB-BA Etapa I ($3,63 \pm 0,75$ mm), enquanto para EGSB-BA Etapa II foi de $4,22 \pm 0,59$ mm; ou seja, maior que a biomassa usada como inóculo ($4,05 \pm 0,79$ mm).

Outro ponto que deve ser ressaltado é a presença do sulfato afluyente apenas no EGSB-BA Etapa II que pode atuar como um receptor final de elétrons contribuindo para a remoção de DQO. Segundo, Okada *et al.* (2013), baixa DQO residual pode favorecer a remoção de LAS. Entretanto, a rota sulfetogênica teve uma baixa contribuição para a remoção da DQO total (< 5% de toda a DQO adicionada) e, provavelmente, não suportaria a diferença da remoção do LAS referente as etapas I e II do EGSB-BA. No EGSB-BA Etapa II observou-se $17,4 \pm 11,9$ mgS/L de sulfato, com redução de $84,9 \pm 17,0\%$. Segundo Lens *et al.* (1998), a relação teórica entre DQO/Sulfato é de 0,67, dessa forma, a redução do sulfato afluyente representaria um consumo de apenas 33 mg/L de DQO, ou seja, um valor muito baixo.

Okada (2012) também observou maior remoção de LAS em água residuária de lavanderia em UASB. Para tanto, o referido autor operou dois reatores UASB (0,65 L de volume útil) um com água de lavanderia comercial (carga de LAS 5,3 mg/gSTV.d) e outro com LAS padrão (carga de LAS 5,5 mg/gSTV.d), ambos com TDH de 35 horas. Nessas condições foi obtida remoção de 65% e 35% de LAS, respectivamente. Segundo Okada (2012), provavelmente, a maior remoção na presença de água residuária foi devido à grande variedade de co-substratos (12 ácidos orgânicos voláteis detectados), principalmente, ácido láctico. Esse ácido orgânico pode atuar como co-substrato para microrganismos com *Desulfovibrio* sp., que sabidamente participam da desulfonação da molécula de LAS (COOK et al., 1998). No presente trabalho, como detalhado na Tabela 5.1 foi detectado 96 mg/L de ácido láctico na água residuária de lavanderia e de 8 a 14 mg/L no afluente do EGSB.

Em relação ao EGSB-BNA Etapa I obteve-se remoção de LAS de $79\pm 17\%$, ou seja, similar ao valor obtido na Etapa II para o reator EGSB-BA ($76\pm 18\%$), ambos alimentados com água de lavanderia comercial com carga de LAS afluente de $1,0\pm 0,7$ mg/gVS.d e $0,9\pm 0,3$ mg/gVS.d, respectivamente. Portanto, notou-se que a exposição prévia da biomassa ao LAS Padrão não acarretou em efeito positivo na remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial. O principal fator que pode ter contribuído para esse resultado é a alta riqueza microbiana do inóculo utilizado. Hirasawa *et al.* (2008) verificaram que o lodo granulado de UASB de abatedouro de aves contém elevada riqueza que permite resposta metabólica frente a diversas condições afluente. Além disso, Lee et al. (1995) e Goudar *et al.* (1999) afirmaram que para a completa degradação da molécula de LAS e de forma rápida é necessário um consórcio microbiano.

A análise da variação temporal da concentração de LAS afluente e efluente para os reatores pode ser visualizada na Figura 5.1. Notou-se que após 70º dia de operação (EGSB-BA Etapa I) ocorreu estabilidade da concentração de LAS efluente (4,5-5,0 mg/L), portanto, exaustão dos sítios de adsorção e estabilidade da concentração de LAS efluente. Após 225º dia de operação iniciou-se a Etapa II do EGSB-BA com adição de água de lavanderia comercial ($11,2 \pm 5,3$ mgLAS/L). A adição da água residuária resultou em ligeiro aumento inicial da concentração de LAS efluente (4,5 mg/L) estabilizando em $2,4 \pm 1,7$ mg/L. Por outro lado, no EGSB-BNA Etapa I, notou-se aumento da concentração de LAS efluente, apenas 12 dias após a adição de água de

lavanderia comercial (2,5mg/L). A partir do 80º dia de operação a concentração de LAS afluente foi 8,0 mg/L. Essa redução resultou em diminuição da concentração de LAS efluente em 2,8 mg/L para valor inferior a 2,0 mg/L. Todavia, a partir do 140º dia de operação, observou-se valores de LAS afluente acima de 11 mg/L, entretanto, a concentração de LAS efluente manteve-se em 2 mg/L.

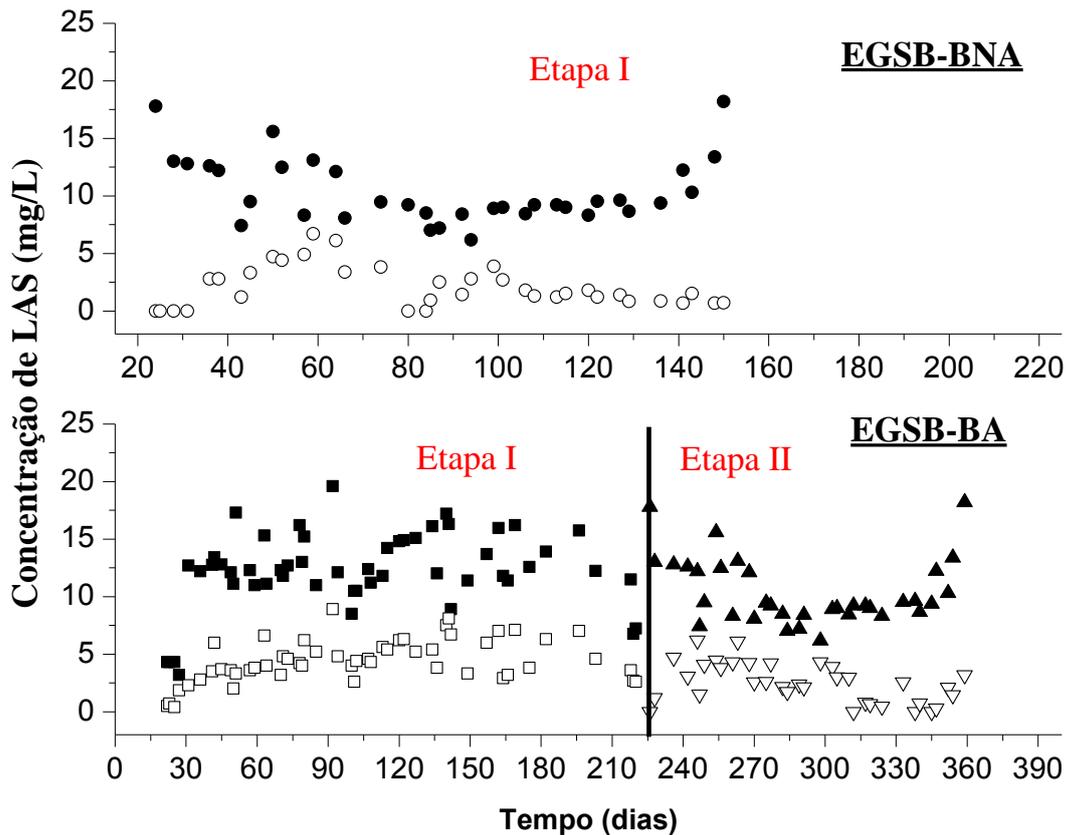


Figura 5.1: Variação temporal da concentração de LAS: (●■▲) Afluente e (○□△) Efluente.

Especificamente, em relação à concentração de LAS efluente do EGSB-BA Etapa I, notou-se aumento da concentração de LAS ao longo do tempo. Verificou-se que após o 40º dia de operação ocorreu exaustão dos sítios de adsorção. Portanto, a remoção de LAS, em período anterior a esse teve a participação majoritária de processos físicos, tais como, adsorção. Segundo HERA (*Human and Environmental Risk Assessment, 2010*), a remoção de LAS pode ocorrer pela combinação de três processos: precipitação, biodegradação e adsorção. A principal forma de remoção é a degradação microbiana, geralmente em torno de 80 % (Painter & Zabel, 1989);

precipitação e adsorção em sólidos suspensos podem representar de 30 a 70% (Berna *et al.*, 2007).

Na Figura 5.2 encontram-se gráficos *Box-plot* da distribuição da concentração de LAS afluente e efluente, assim como, da porcentagem de remoção do surfactante. Ressalta-se que foi observada baixa heterogeneidade com desvio padrão maior dos dados da concentração de LAS afluente para as etapas em que foi utilizada água residuária de lavanderia comercial (EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I). Notou-se que os valores mínimos obtidos foram de 7 mgLAS/L, com exceção no EGSB-BA Etapa I com valor de 4 mgLAS/L. Em relação aos valores máximos observou-se 19 mgLAS/L e 30 mgLAS/L para EGSB-BA Etapa I e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente.

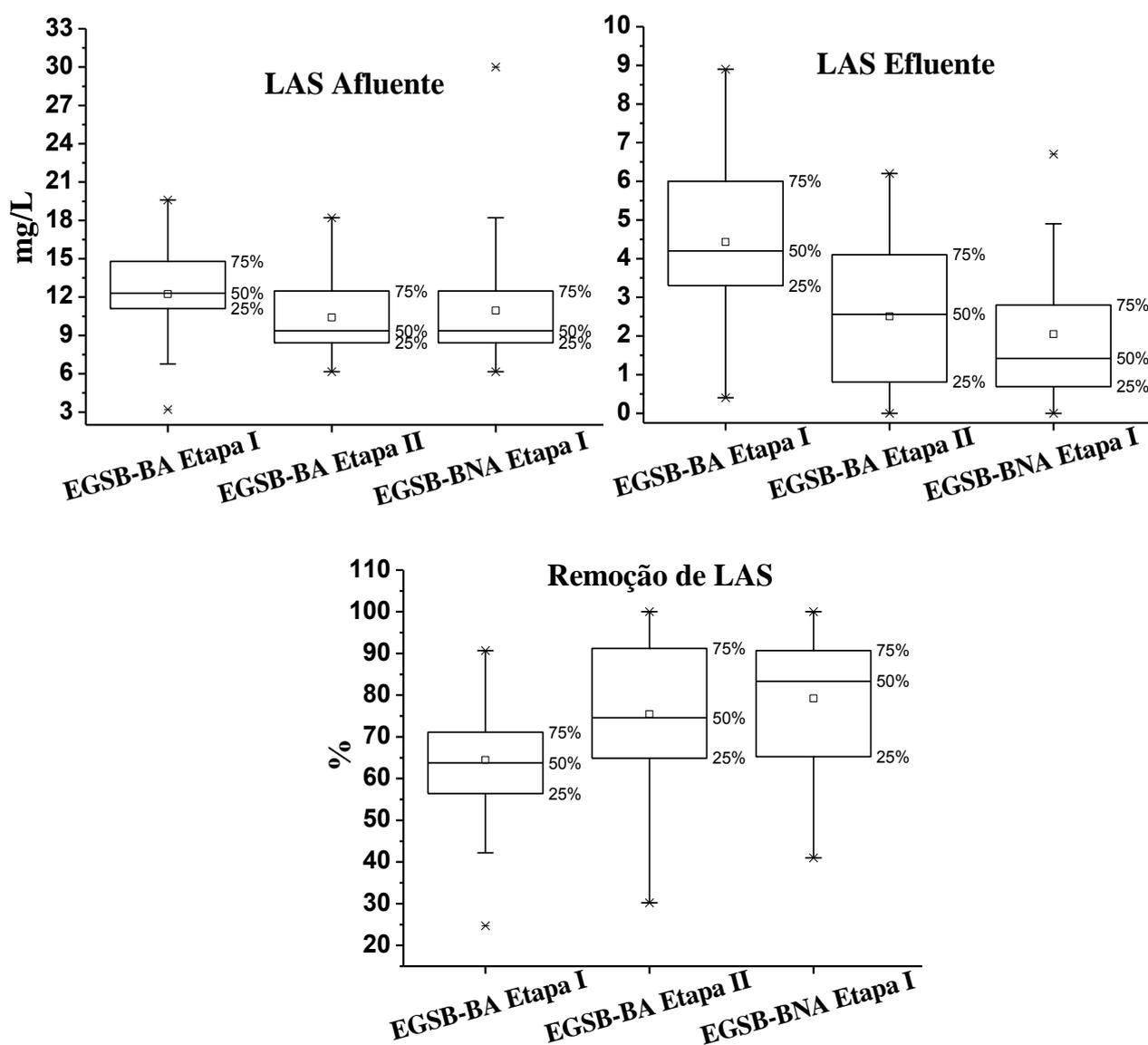


Figura 5.2: *Box-Plot* da porcentagem de remoção de LAS e da concentração de LAS afluente e efluente. EGSB-BA Etapa I (53 amostras) e EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I (35 amostras).

Em relação à concentração de LAS efluente a menor heterogeneidade dos dados foi obtida no EGSB-BNA Etapa I. Os valores não ultrapassaram 9 mg/L (EGSB-BA Etapa I). Por outro lado, observou-se para o EGSB-BA Etapa I maior homogeneidade em relação à porcentagem de remoção de LAS; ou seja de 40-90%.

O balanço de massa de LAS foi realizado de forma parcial (ao final da Etapa I – apenas para a Etapa com LAS Padrão) e final (ao final da Etapa II – residual de LAS padrão mais LAS da água de lavanderia) para o EGSB-BA. Enquanto, para o EGSB-BNA foi realizado ao final da Etapa I (Tabela 5.3). No EGSB-BA foram adicionados 3.830 mg de LAS durante 369 dias. No EGSB-BNA foram adicionados 1.313 mg LAS durante 135 dias.

Tabela 5.3: Balanço de massa de LAS do EGSB-BA e EGSB-BNA.

	EGSB-BA				EGSB-BNA	
	Etapa I		Etapa II		Etapa I	
	mg LAS	%	mg LAS	%	mg LAS	%
Adicionado no reator	2313	-	1516	-	1313	-
Recuperado no Efluente	820	35%	287	19%	239	18%
Degradação Biológica	1289	56%	1111	73%	1025	78%
Adsorvido Manta de Lodo	174	8%	66	4%	44	3%
Adsorvido Separador de Fase	29	1%	52	3%	9	1%

A parcela de LAS relacionada à degradação biológica foi de 56 % para o EGSB-BA Etapa I, 73 % para o EGSB-BA Etapa II e 78 % para o EGSB-BNA Etapa I (Figura 5.3). Notou-se que a parcela de LAS adsorvido no EGSB-BNA Etapa I foi menor (4%), enquanto, para aqueles com biomassa adaptada os valores obtidos foram acima de 7%.

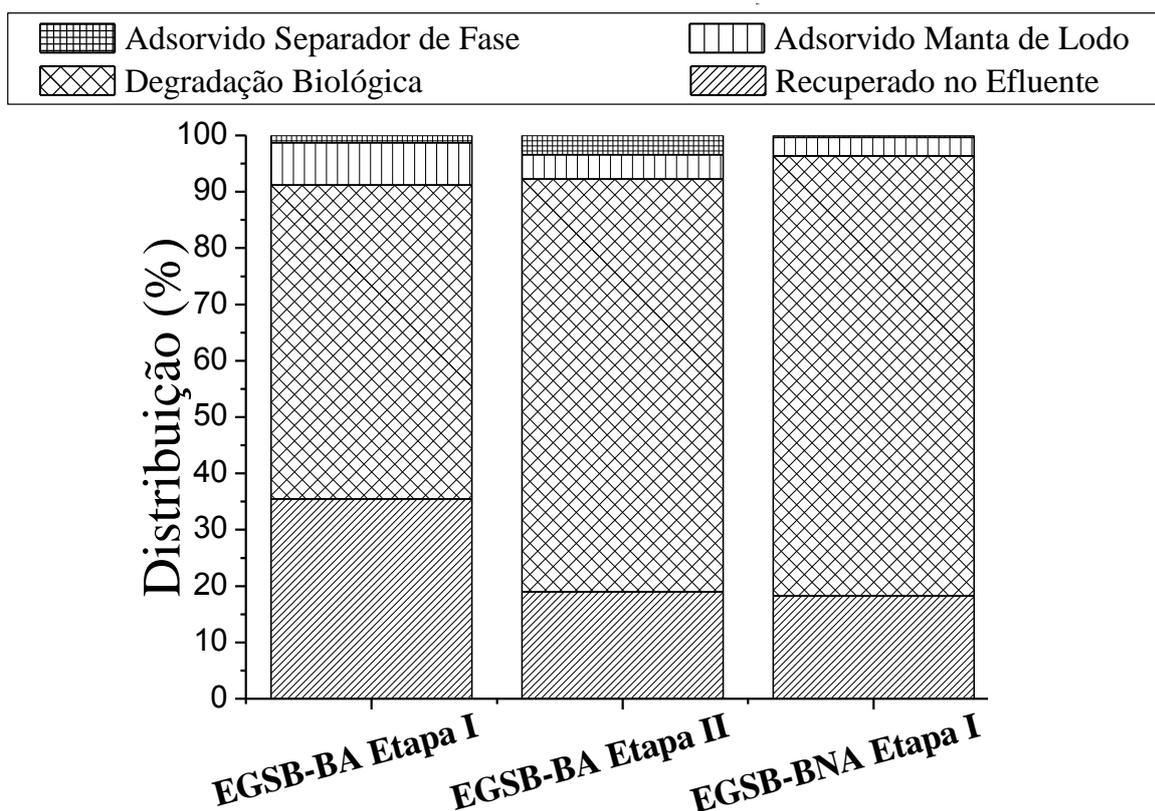


Figura 5.3: Distribuição do destino final de LAS.

Em relação à alcalinidade (parcial e total) e pH, notou-se pouca variação para as etapas do EGSB-BA e EGSB-BNA. Por outro lado, observou-se para sulfeto e sulfato variação de 3,22 – 3,69 mg/L e 2,1 - 2,8 mg/L, respectivamente para esses sistemas.

Quanto aos ácidos orgânicos voláteis efluente notou-se baixa concentração entre os reatores, com valores não superiores a 35 mg/L (ácido propiônico – EGSB-BA Etapa II). Os principais ácidos detectados foram propiônico e isobutírico em EGSB-BA Etapa I e propiônico em EGSB-BA Etapa II, todos com concentração não superior a 4 mg/L. Assim como na Etapa II do EGSB-BA em EGSB-BNA Etapa I foi detectado apenas ácido propiônico (não superior a 5 mg/L; Figura 5.4).

A recalcitrância de ácido isobutírico (EGSB-BA-Etapa I) pode estar relacionada a sua estrutura ramificada resultando em menor degradação, em relação aos ácidos não-ramificados (butírico, valérico, acético, propiônico, capróico) (Wang *et al.*, 1999). Além disso, Jiang *et al.* (2007) e Zhang *et al.* (2009) relataram a recalcitrância dos ácidos isovalérico e isobutírico na presença de LAS. Em relação ao ácido propiônico, Angelidaki *et al.* (2004) observaram inibição de 100% dos microrganismos

consumidores desse composto na presença de 50 mgLAS/L, portanto, justifica-se sua presença no efluente em concentração média de 5 mg/L.

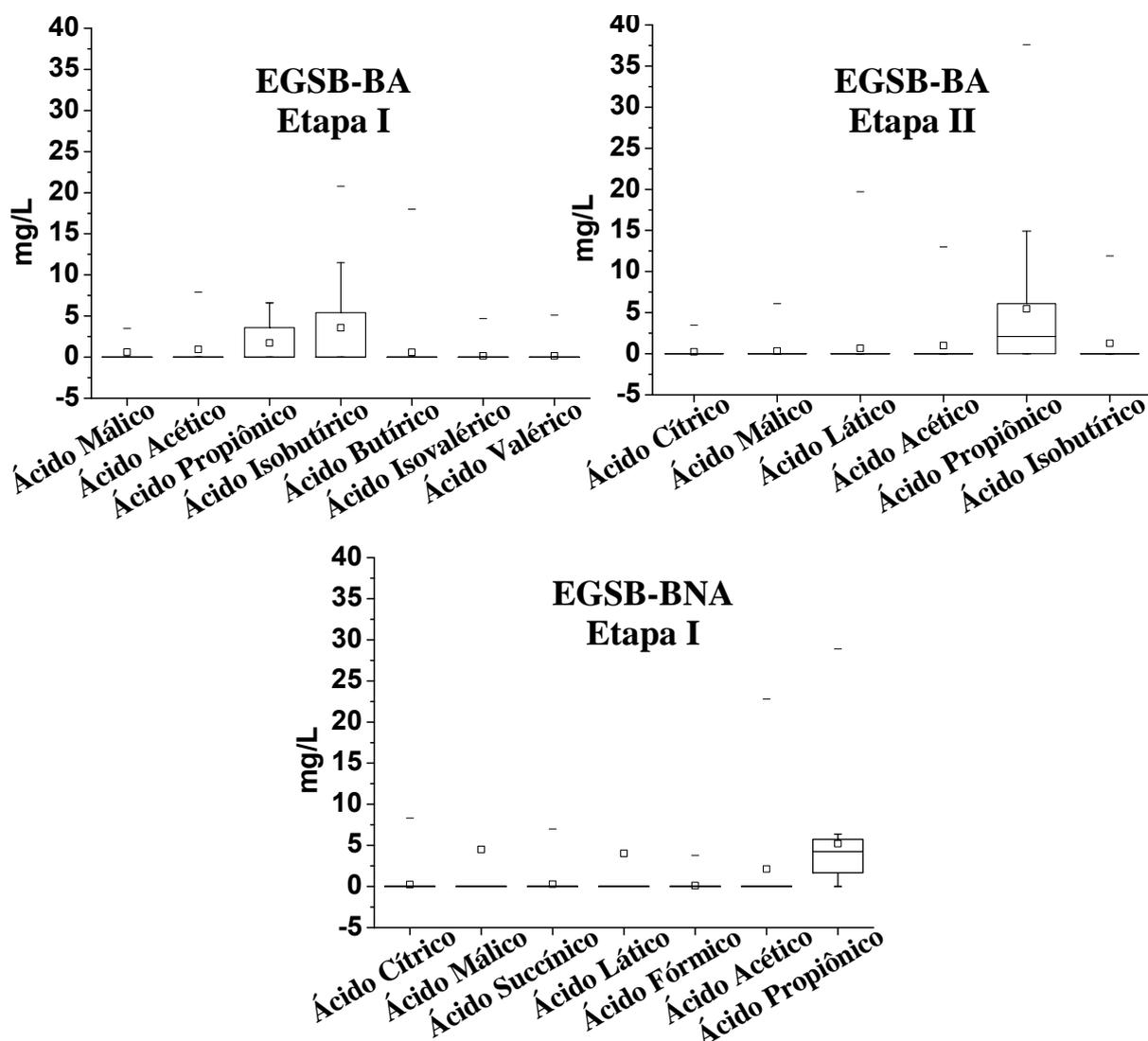


Figura 5.4: *Box-Plot* de ácidos orgânicos voláteis efluente do EGSB-BA e EGSB-BNA. (35 amostras)

Notou-se diferença significativa em relação ao tamanho dos grânulos entre as etapas do EGSB-BA e EGSB-BNA e, inóculo ($p < 0.05$, ANOVA seguido teste Tukey). Os valores encontrados foram os seguintes: $4,05 \pm 0,79$ mm; $3,63 \pm 0,75$ mm; $4,22 \pm 0,59$ mm e $3,90 \pm 0,63$ mm para Inóculo, EGSB-BA Etapa I, EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente (Figura 5.5).

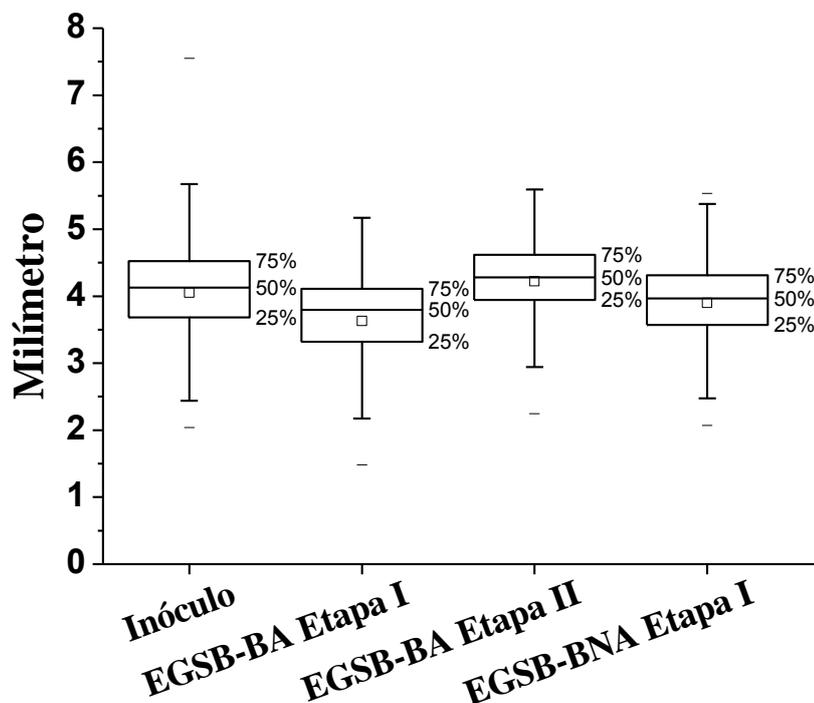


Figura 5.5: *Box-Plot* do diâmetro médio dos grânulos. EGSB-BA e EGSB-BNA.

Observou-se a menor granulometria no EGSB-BA Etapa I (3,63mm) com LAS padrão ($1,2 \pm 0,2$ mg/gVS.d). Tais valores foram similares aos obtidos por Delforno *et al.* (2012), ou seja, 3,60 mm, a partir de amostra de EGSB com carga de LAS Padrão de 1,0 mgLAS/gST.d. Por meio da análise dos dados de granulometria e adsorção de LAS notou-se que a maior adsorção (174 mgLAS) e a menor granulometria ($3,63 \pm 0,75$ mm) foram obtidas em EGSB-BA Etapa I (Tabela 5.3).

Segundo Daffonchio *et al.* (1995), agregados microbianos, como os grânulos, são derivados de interações hidrofóbicas e hidrofílicas, e o efeito de quebra da tensão superficial dos surfactantes desestabiliza essas interações resultando em perda de biomassa e diminuição do diâmetro dos grânulos. Dessa forma, essa perturbação nas interações hidrofóbicas e hidrofílicas associado ao cisalhamento dos grânulos acarretou em maior concentração de sólidos na região do separador de fase (1,49 gST ao final da operação do EGSB-BA) em relação ao EGSB-BNA (0,46 gST/L). O longo período de operação de 391 e 197 dias para EGSB-BA e EGSB-BNA, respectivamente, também, pode ter corroborado para a maior concentração de sólidos no separador de fase.

A partir da análise de imagem dos grânulos (Figura 5.6) e informações obtidas durante o procedimento granulométrico notou-se que os grânulos retirados do EGSB-BNA Etapa I eram pouco consistentes. Este fato não foi observado nas demais amostras. Observou-se também que a consistência dos grânulos do inóculo foi semelhante àquela obtida para biomassa da manta de lodo do EGSB-BA Etapa II.

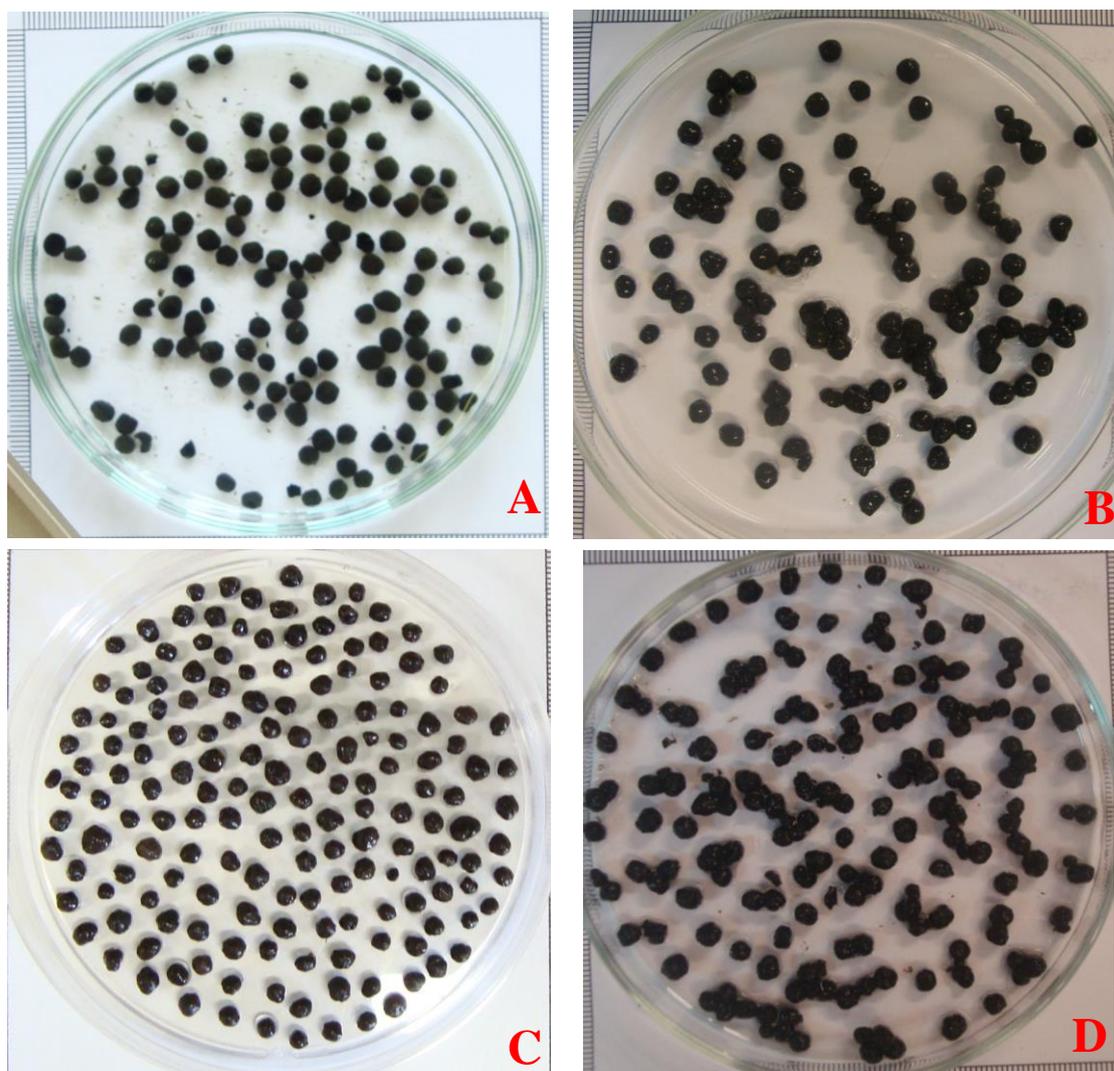


Figura 5.6: Grânulos do (A) EGSB-BA Etapa I, (B) EGSB-BA Etapa II, (C) Inóculo e (D) EGSB-BNA Etapa I.

A baixa consistência dos grânulos da manta de lodo do EGSB-BNA Etapa I (quebradiço) corroborou para maior diferença entre sólidos inicial e final do reator (Inicial: 8,54 gST/L e Final: 6,18 gST/L). Enquanto, no EGSB-BA notou-se aumento dos ST da manta de lodo, após 391 dias de operação, cujos valores foram de 8,54 gST/L e 9,77 gST/L, respectivamente, na fase inicial e final de operação. Adotaram-se os valores de sólidos inicial e final da manta de lodo, uma vez que os sólidos suspensos efluente do EGSB-BA e EGSB-BNA foram muito baixos.

Portanto, supondo que 2,36 gST/L (diferença entre a concentração de sólidos totais do início e fim do EGSB-BNA) saiu do sistema como sólidos suspensos efluente, com 19,9 mg/gST de LAS adsorvido (adsorção obtida na biomassa do separador de fase). Desse modo, obteve-se 66 mgLAS adsorvido, por conseguinte, 5% da quantidade total de LAS adicionada (1.313 mgLAS), ou seja, valor relativamente baixo. Dessa

forma, optou-se por não computar esses valores para o cálculo do balanço de massa final.

5.2.2 *Caracterização Microbiana*

Com o intuito de facilitar a análise de *cluster* do DGGE para domínio *Bacteria* e *Archaea*, dividiram-se os dendogramas entre as amostras apenas do EGSB-BA (separador de fase e manta de lodo), amostras retiradas durante as fases com água de lavanderia (EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I) e todas as amostras agrupadas (Figura 5.9).

Para o domínio *Bacteria* e amostras apenas do EGSB-BA (Figura 5.9 – b), verificou-se menor alteração das populações entre a biomassa do separador de fases dos EGSBs; ou seja, 64% de similaridade entre EGSB-BA Etapa I SF e EGSB-BA II SF. Por outro lado, verificou-se para a biomassa proveniente da manta de lodo coeficiente de similaridade abaixo de 50% (EGSB-BA I ML e EGSB-BA II ML). As menores similaridades foram obtidas para o Inóculo em relação a biomassa da Etapa II (adição de água de lavanderia – 52%) e Separador de Fases da Etapa I (64%). Observou-se biomassa planctônica no separador de fases e ausência de grânulos como estrutura protetora da organização estrutural das populações sintróficas fermentativas-metanogênicas. Sob tais condições, provavelmente, a microbiota dessa região ficou mais susceptível às condições impostas de alimentação do reator. Ressalta-se que a maior quantidade de LAS adsorvido foi obtida na biomassa do separador de fases ($19,6 \pm 2,6$ mgLAS/gST para EGSB-BA Etapa I; $34,8$ mgLAS/gST para EGSB-BA Etapa II). Provavelmente, essa possibilidade contribuiu para as modificações das populações de bactérias e arqueias nessa região do reator. Além disso, a elevada complexidade de compostos da água residuária de lavanderia pode ter agido como meio seletivo resultando na diferença do coeficiente de similaridade entre as biomassas da manta de lodo.

Em relação ao perfil de bandas do DGGE para o domínio *Archaea* das amostras do EGSB-BA (Figura 5.7 – b) verificou-se maior amplitude do coeficiente de similaridade (36 – 88%). A maior similaridade (88%) foi verificada para a biomassa do separador de fases e manta de lodo da Etapa II ($11,2 \pm 5,3$ mg/L de LAS-Água de Lavanderia). Por outro lado, a menor similaridade observou-se para biomassa do EGSB-BA Etapa I Separador de Fases (36%) em relação às demais amostras.

Para o domínio *Bacteria* e biomassa do EGSB-BA e EGSB-BNA apenas com água de lavanderia (Figura 5.7 – c), verificou-se coeficiente de similaridade de 32% em relação ao Inóculo e demais amostras. Dessa forma, notou-se que a adição de água residuária e demais condições impostas ao reator resultaram em modificações acentuadas nas populações de bactérias. O maior coeficiente de similaridade, 68%, foi obtido para biomassa da etapa com água residuária para o EGSB-BA Etapa II Manta de Lodo e EGSB-BNA Etapa I Manta de Lodo. Esse mesmo padrão foi observado no DGGE para o domínio *Archaea*, com coeficiente de similaridade de 40% do inóculo em relação às demais biomassas, menos para aquela do EGSB-BNA Etapa I Separador de Fases (Figura 5.8 – c).

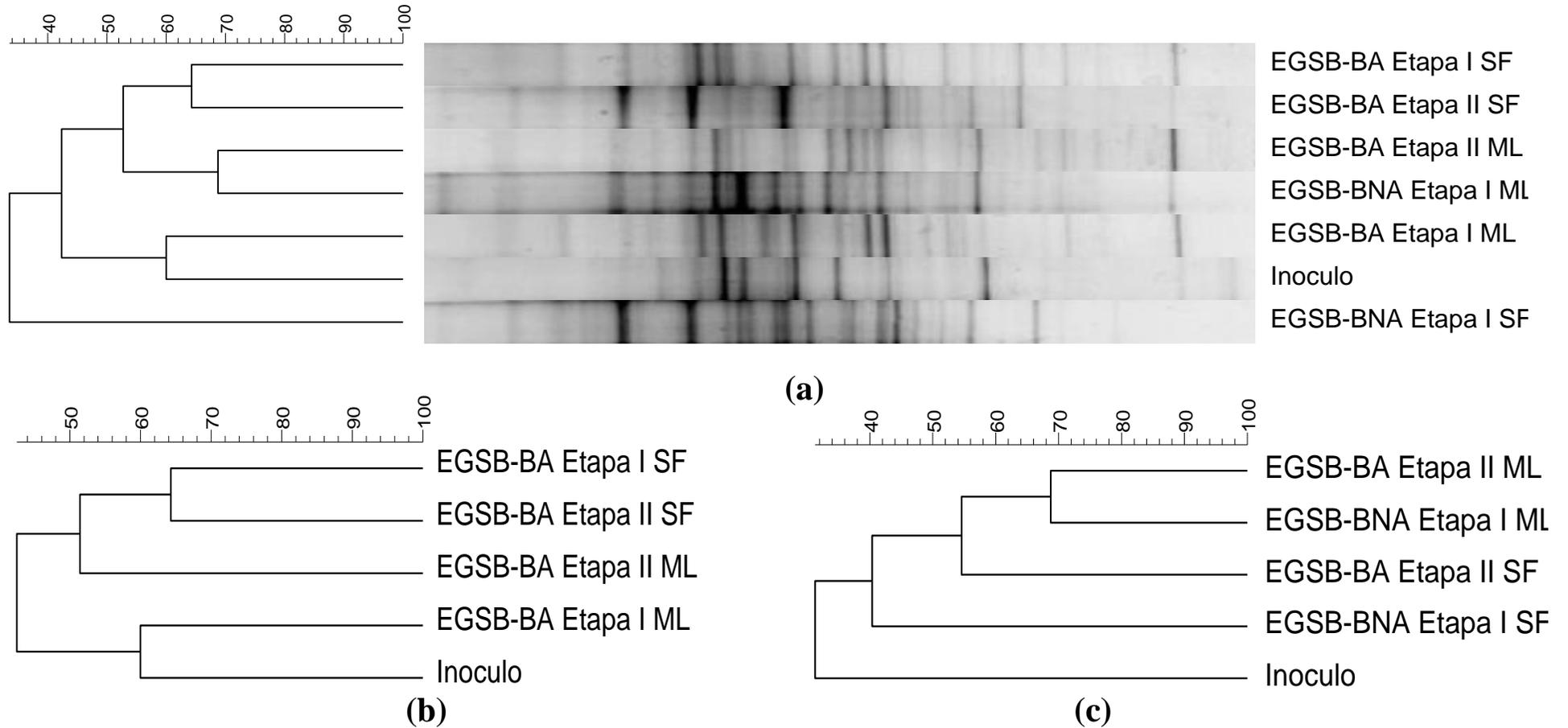


Figura 5.7: Análise de Cluster (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do RNAr 16S para o domínio *Bacteria*. **(a)** Amostras do EGSB-BA e EGSB-BNA, **(b)** Amostras do EGSB-BA e **(c)** Amostras do EGSB-BA e EGSB-BNA apenas com água de lavanderia.

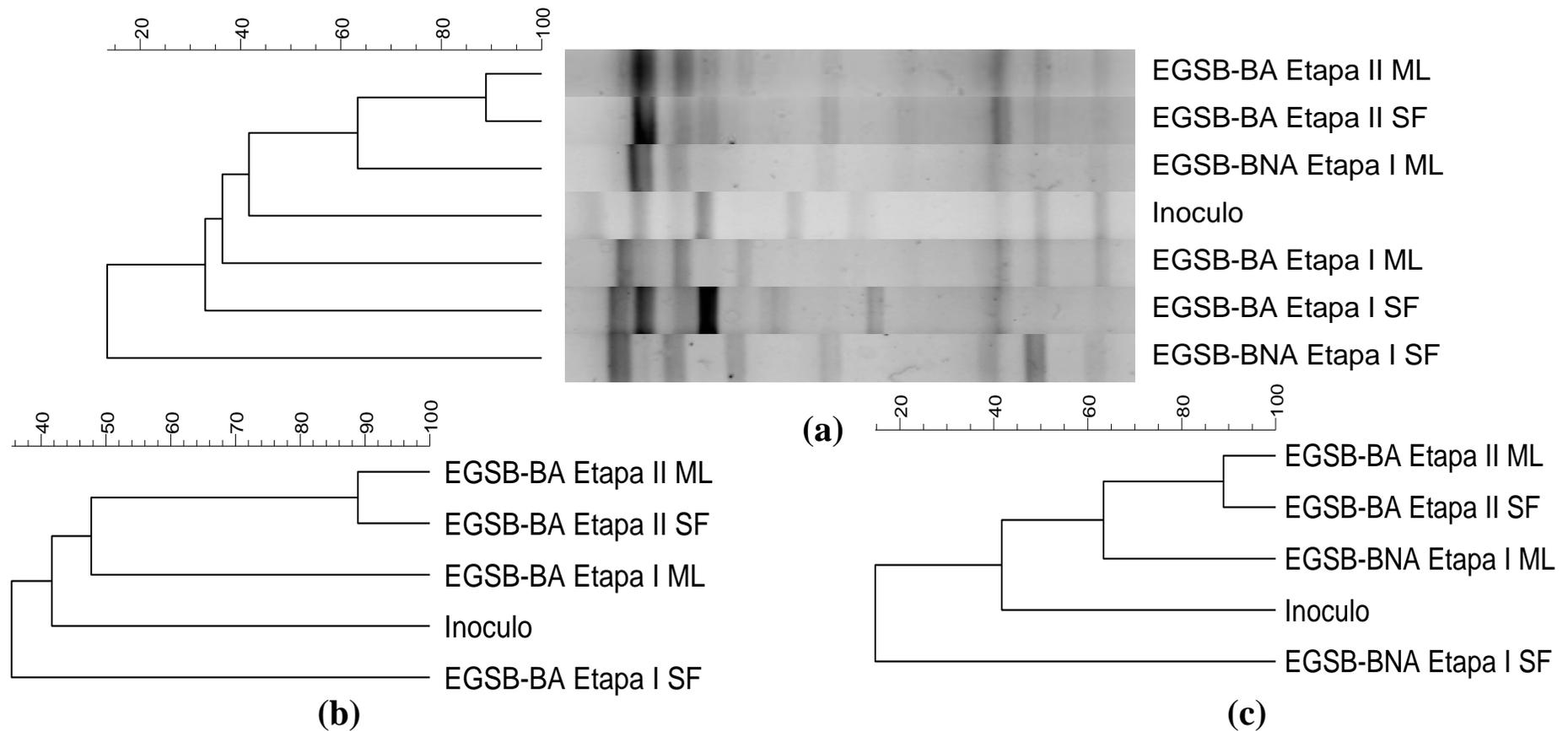


Figura 5.8: Análise de Cluster (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do RNAr 16S para o domínio Archaea. (a) Amostras do EGSB-BA e EGSB-BNA, (b) Amostras do EGSB-BA e (c) Amostras do EGSB-BA e EGSB-BNA apenas com água de lavanderia.

Por meio do Pirosequenciamento de duas amostras (EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I) obteve-se o total de 9.603 sequências. Durante o processo de filtragem em função de iniciador, qualidade das bases ($Q_{phred} > 25$), presença de bases ambíguas e chimeras foram descartadas 1.956 sequências (Tabela 5.4). Ressalta-se que foram excluídas 77 e 192 chimeras das amostras do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente. O tamanho médio das bases após o processo de filtragem foi de 225 ± 1 pb com valor mínimo de 222 pb e máximo de 235 pb (Apêndice - Figura 10.1 e p.194). A média obtida para os fragmentos foi próxima ao tamanho do fragmento esperado em função dos iniciadores empregados; ou seja, de 239 pb.

Em relação à determinação das OTUs para similaridade de 97%, foi obtido 650 OTUs, das quais 382 e 505 foram referentes a biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente (Tabela 5.4). Observou-se 150 e 193 OTUs com única sequência (*Singletons*) para biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente. Conforme detalhado no item 4.7.3.3, as *singletons* foram removidas para a classificação taxonômica, todavia, foram mantidas na determinação dos índices de diversidade. Após o processo de remoção de *singletons* restaram 232 OTUs e 312 referentes a biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente.

Tabela 5.4: Resultados de Pirosequenciamento.

	EGSB-BA Etapa II	EGSB-BNA Etapa I
Cobertura - Fórmula de Good (%)	94,0%	96,2%
Total de sequências (dados brutos)	3.161	6.442
Total de sequências (dados filtrados)	2.521	5.126
Tamanho Médio (pb)	225 ± 1	225 ± 1
Total de OTUs	382	505
Singletons	150	193
Total de OTUs (classificação taxonômica)	232	312
Estimadores de Riqueza		
Chao1	544 ± 74	749 ± 92
Rarefação	382 ± 20	505 ± 19
Índices de Diversidade		
Shannon (H)	$4,92 \pm 0,11$	$4,56 \pm 0,16$
Simpson (1-D)	$0,98 \pm 0,01$	$0,96 \pm 0,01$
Dominância	$0,02 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$

Em relação ao cálculo da cobertura do Pirosequenciamento foi utilizada a fórmula de *Good*, por meio da qual estima-se a proporção da comunidade microbiana amplificada, além disso, pode ser descrita como a probabilidade de novas sequências

pertenceram a OTUs já definidas. Para tanto, observou-se 94% para EGSB-BA Etapa II e 96% para EGSB-BNA Etapa I; indicativo da elevada cobertura da comunidade microbiana nas duas amostras.

Por meio da análise das curvas de rarefação (Figura 5.9) notou-se que para coeficiente de diversidade de 97 % (nível de espécie) ambas foram ascendentes e que não atingiram um platô. Portanto, mesmo com o elevado número de sequências obtidas (3.161 para EGSB-BA Etapa II e 6.442 para EGSB-BNA Etapa I), estas não foram suficientes para amostrar completamente a riqueza de filotipos da comunidade microbiana. Todavia, quando analisou-se as curvas de rarefação com 80 % de similaridade (nível de filo) notou-se saturação com tendência na formação de platô em ambas as amostras. Desse modo, pode-se afirmar que para nível taxonômico de filo o esforço amostral foi mais eficiente.

Em relação aos estimadores de riqueza (Chao1 e Rarefação), notou-se maior riqueza para a amostra EGSB-BNA Etapa I (rarefação e Chao1 de 505 e 749, respectivamente) em relação à amostra EGSB-BA Etapa II (rarefação e Chao1 de 382 e 544, respectivamente; Tabela 5.4).

Atribuiu-se a maior estimativa de riqueza para a amostra EGSB-BNA Etapa I ao menor tempo de operação desse reator (197 dias) em relação ao EGSB-BA Etapa II (391 dias). Provavelmente, o elevado tempo de operação, principalmente, da Etapa I EGSB-BA com $13,2 \pm 2,3$ mg/L de LAS-Padrão por 218 dias, representou forte pressão seletiva para a microbiota da manta de lodo. Tais resultados corroboram com os valores de remoção de LAS em EGSB-BA Etapa II ($76 \pm 18\%$) e EGSB-BNA Etapa I ($79 \pm 17\%$), ambos alimentados com água de lavanderia; por conseguinte, não acarretando efeito positivo na remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial.

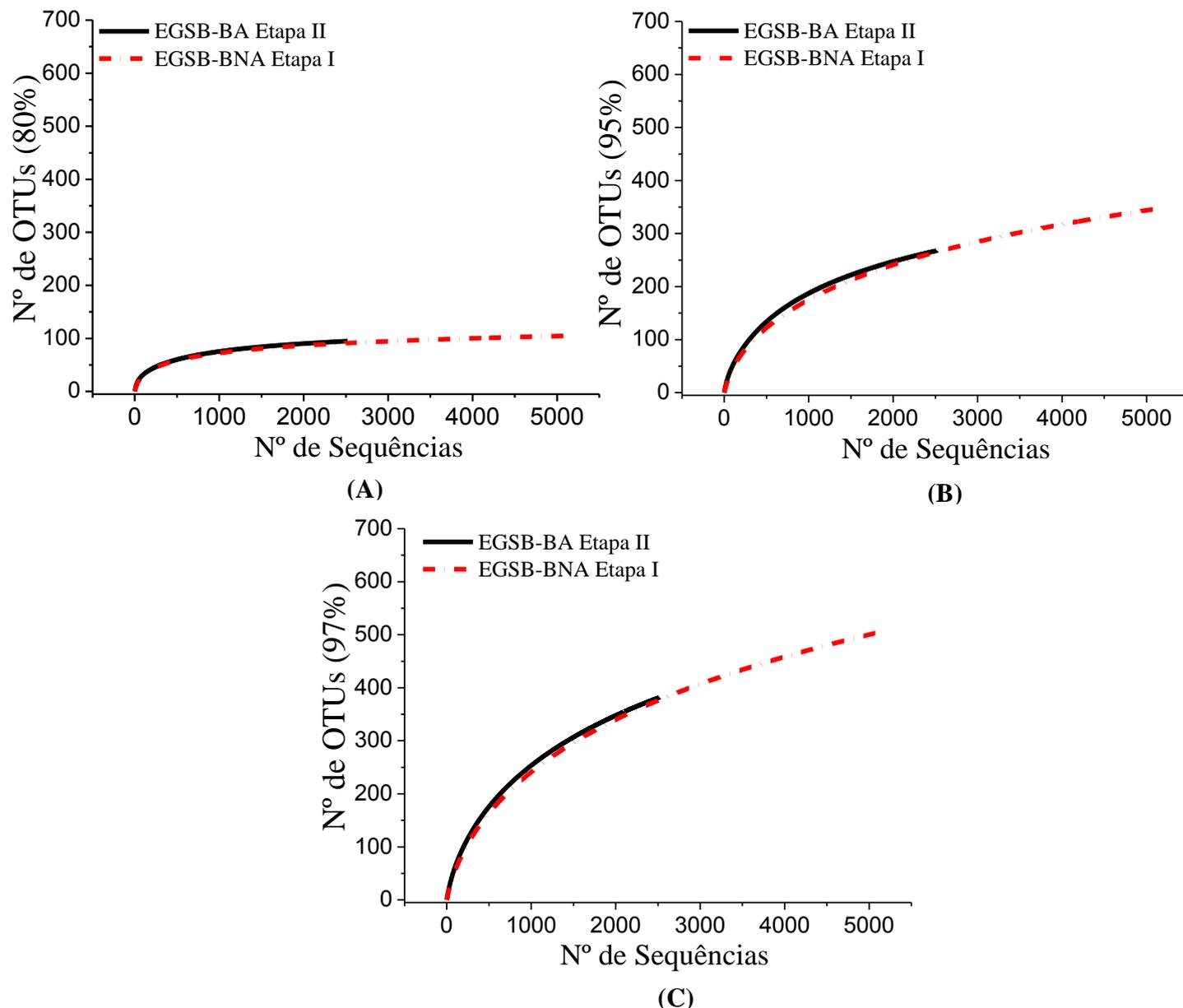


Figura 5.9: Curvas de rarefação definidas para diferentes percentagens de similaridade. **(A)** 80% de similaridade para nível de Filo; **(B)** 95 % para nível de gênero e **(C)** 97 % para o nível de espécie.

Em relação ao índice de dominância foram observados valores abaixo de 0,05 (valores variam de 0 a 1) que é indicativo de distribuição equânime nas amostras. Para a biomassa proveniente do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I observou-se $0,02 \pm 0,01$ e $0,04 \pm 0,01$, respectivamente. Por meio de análise comparativa dessas biomassas notou-se maior presença de táxons dominantes em EGSB-BNA Etapa I em relação aquela do EGSB-BA Etapa II. A partir dos dados da classificação taxonômica observou-se que o gênero mais abundante foi *Desulfobulbus*.

Em relação ao índice de Shannon e Simpson (1-D) observou-se pouca variação entre as amostras. Para o índice de Shannon verificou-se valores acima de 4,5; portanto, alta diversidade. Tais resultados são semelhantes ao obtido por Okada (2012), cujos valores obtidos foram entre 4,9 e 6,0 por meio do Pirosequenciamento de amostras de UASB usado no tratamento de água residuária de lavanderia comercial (12mg/L de LAS). Para o índice de Simpson os valores obtidos foram de 0,98 (EGSB-BA Etapa II) e 0,96 (EGSB-BNA Etapa I), portanto, elevada diversidade das biomassas. Todavia, esse índice é fortemente influenciado pela equitabilidade, enquanto, o índice de Shannon é influenciado pela riqueza. Dessa forma, os valores obtidos em relação ao índice de dominância são corroborados pelos valores obtidos no índice de Shannon e Simpson, uma vez que a presença de uma espécie dominante na amostragem (EGSB-BNA Etapa I de 0,04 e EGSB-BA Etapa II de 0,02) resultou em diminuição dos valores do índice de Shannon e Simpson.

Por meio do uso da ferramenta *RDP-Classifer* obteve-se a classificação taxonômica das sequências representativas de cada OTU. Ressalta-se que para níveis taxonômicos variando de Filo até Família foi utilizado limite de confiança de 50% (*RDP-Confidence Threshold*). Em relação ao nível taxonômico de gênero foi utilizado limite de confiança de 80%. Dessa forma, 56,6 % das sequências do EGSB-BA Etapa II e 77,4 % das sequências do EGSB-BNA Etapa I foram classificadas até Filo (Tabela 5.5). Todavia, para nível taxonômico relacionado a gênero foram classificadas apenas 10,5% e 35,1% das sequências do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente.

Tabela 5.5: Abundância relativa de OTUs e sequências classificadas em cada amostra.

Limite de Confiança		EGSB-BA Etapa II		EGSB-BNA Etapa I	
		Nº OTUs	Sequências	Nº OTUs	Sequências
50%	Filo	149	56,6%	207	77,4%
50%	Classe	124	46,2%	169	67,2%
50%	Ordem	119	45,6%	157	52,4%
50%	Família	97	35,1%	126	52,1%
80%	Gênero	31	10,5%	48	35,1%

Total de Sequências EGSB-BA Etapa II = 2.371

Total de Sequências EGSB-BNA Etapa I = 4.933

Total de OTUs EGSB-BA Etapa II = 232

Total de OTUs EGSB-BNA Etapa I = 312

Os filos mais abundantes foram Proteobacteria (15-35 %), Firmicutes (12-17 %), Synergistetes (4-7 %), Verrucomicrobia (4-7%) e Chloroflexi (5-6 %; Figura 5.10 e Tabela 10.1). Resultados semelhantes foram obtidos por Okada (2012) para reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de lavanderia comercial. Para tanto, o autor obteve as maiores abundâncias relativas para os filos Firmicutes (30-40%), Chloroflexi (7-18%) e Proteobacteria (6-20%) em biomassa da manta de lodo do UASB e, Proteobacteria (70-80%), Acidobacteria (5-10%) e Chloroflexi (2-10%) para biomassa da região do separador de fases. Ao todo, o autor supracitado obteve 21 filos identificados. Por outro lado, Delforno *et al.* (2012) a partir de sequenciamento Sanger de biomassa da manta de lodo do EGSB usado na remoção de LAS-Padrão (12 mg/L) obtiveram maior proporção do filo Firmicutes (39%), seguido por Proteobacteria (19%) e Synergistetes (17%).

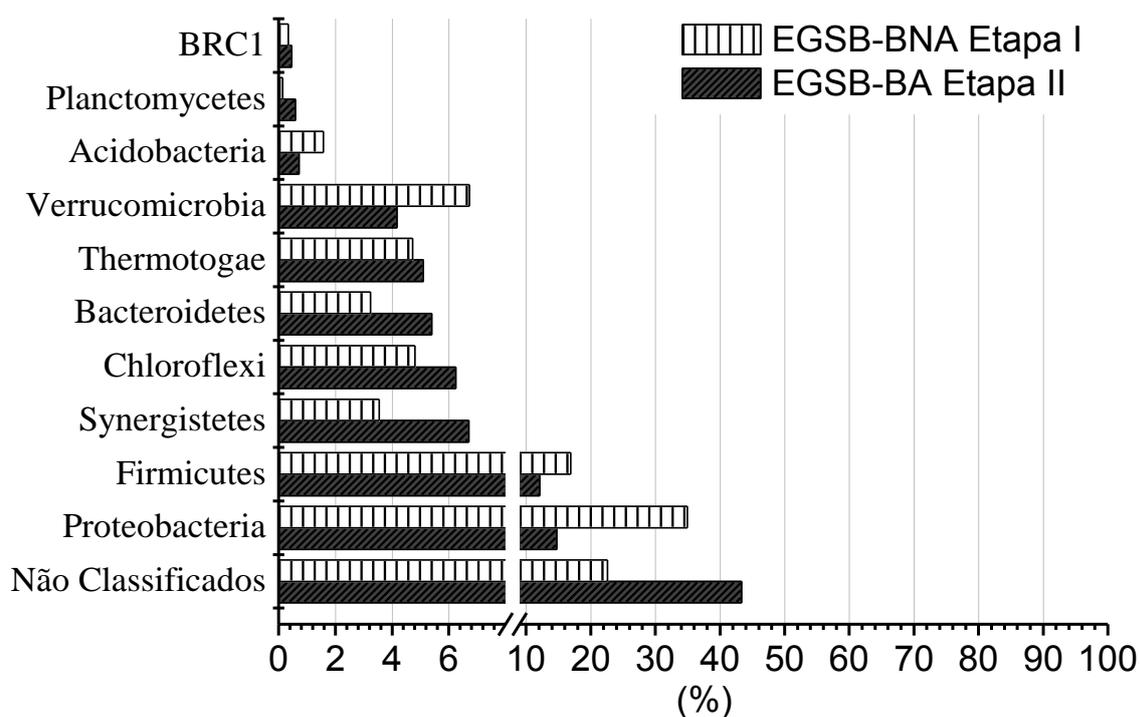


Figura 5.10: Abundância relativa de filos para biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I.

Ao todo foram identificados 17 e 21 gêneros para a biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente. Obteve-se para a biomassa do EGSB-BA Etapa II os seguinte gêneros mais abundantes: *Syntrophorhabdus* (3,63 % das sequências incluídas em 6 OTUs), *Desulfobulbus* (2,49% das sequências incluídas em 3 OTUs) e *Smithella* (0,97% das sequências incluídas em 5 OTUs). Todavia, para

biomassa do EGBA-BNA Etapa I observou-se predominância de *Desulfobulbus* (27,43% das sequências incluídas em 11 OTUs). Esse resultado foi corroborado pelo índice de dominância, por meio do qual verificou-se a presença de um táxon dominante nesta amostragem (Tabela 5.6). Além de *Desulfobulbus*, notou-se a predominância de *Syntrophorhabdus* (1,95% das sequências incluídas em 7 OTUs) e *Holophaga* (1,32% das sequências incluídas em 3 OTUs).

Tabela 5.6: Abundância relativa de sequências e número de OTUs de gêneros nas amostras EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I.

Gêneros	EGSB-BA Etapa II		EGSB-BNA Etapa I		Condição de Crescimento
	% de Sequências	Nº de OTUs	% de Sequências	Nº de OTUs	
<i>Gallicola</i>	-	-	0,04%	1	
<i>Gemmatimonas</i>	-	-	0,04%	1	
<i>Parvibaculum</i>	0,17%	1	-	-	Aeróbia
<i>Phenylobacterium</i>	0,46%	1	-	-	
<i>Saccharofermentans</i>	0,13%	1	-	-	
Sub-Total	0,76%	3	0,08%	2	-
<i>Sulfuricurvum</i>	0,17%	1	0,39%	4	Aeróbia Facultativa
<i>Acetoanaerobium</i>	0,08%	1	0,06%	1	
<i>Acetobacterium</i>	-	-	0,08%	1	
<i>Desulfobulbus</i>	2,49%	3	27,43%	11	
<i>Desulfomicrobium</i>	-	-	0,08%	1	
<i>Desulfomonile</i>	0,08%	1	-	-	
<i>Gp18</i>	-	-	0,04%	1	
<i>Holophaga</i>	0,08%	1	1,32%	3	
<i>Leptolinea</i>	0,21%	1	0,06%	1	
<i>Longilinea</i>	0,30%	1	0,12%	1	
<i>Methanolinea</i>	-	-	0,04%	1	
<i>Methanoregula</i>	0,08%	1	0,10%	1	Anaeróbia
<i>Syntrophorhabdus</i>	3,63%	6	1,95%	7	
<i>Opitutus</i>	-	-	0,08%	1	
<i>Pseudoramibacter</i>	-	-	0,39%	1	
<i>Smithella</i>	0,97%	5	1,26%	5	
<i>Sporomusa</i>	0,55%	2	0,26%	2	
<i>Subdivision3</i>	0,63%	2	1,20%	2	
<i>Subdivision5</i>	-	-	0,06%	1	
<i>Synergistes</i>	0,25%	1	-	-	
<i>Syntrophobacter</i>	0,17%	2	0,16%	1	
Sub-Total	9,53%	27	34,68%	42	-
Não Classificados	89,54%	201	64,85%	264	
TOTAL	100%	232	100%	312	-

Total de Sequências EGSB-BA Etapa II = 2.371

Total de Sequências EGSB-BNA Etapa I = 4.933

Limite de Confiança = 80%

A partir da análise bibliográfica das condições de crescimento de cada gênero notou-se que 85% (EGSB-BA Etapa II) e 95% (EGSB-BNA Etapa I) das sequências classificadas foram relacionadas à microrganismos de crescimento em condições

anaeróbias (Figura 5.11). Enquanto, a porcentagem restante foi relacionada a microrganismos aeróbios estritos (7-9%), facultativos (7-9%) e outros (1-2%). Tal fato corrobora com o modo de operação do reator, no qual se procurou evitar ao máximo a entrada de oxigênio, por meio da manutenção de selo hídrico na saída de gás do reator e um sifão na saída do efluente.

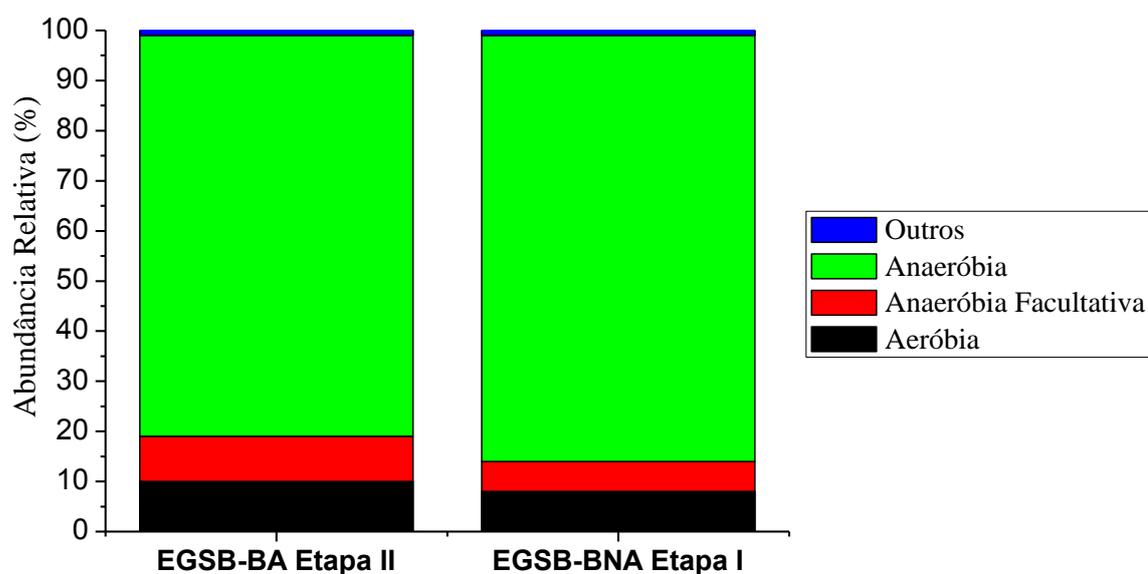


Figura 5.11: Distribuição da condição de crescimento dos gêneros em função do número de seqüências.

Para os gêneros relacionados com a condição aeróbia destaca-se a presença de *Gallicola* (0,04% das seqüências do EGSB-BNA Etapa I e ausente no EGSB-BA Etapa II). Tal constatação pode ser relacionada com a origem do inóculo proveniente de UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, uma vez que este gênero foi isolado de fezes de galinha (Vos *et al.*, 2009). *Phenylobacterium* (0,46% das seqüências EGSB-BA Etapa II e ausente no EGSB-BNA Etapa I) estão relacionadas com a capacidade de degradar compostos aromáticos (fenilalanina) e já foi identificado em trabalhos com a degradação de LAS (Brenner *et al.*, 2005; Sanchez-Peinado *et al.* 2010).

Para os gêneros relacionados com a condição anaeróbia destaca-se *Desulfobulbus* (2,49% das seqüências EGSB-BA Etapa II e 27,43% das seqüências do EGSB-BNA Etapa I), que assim como *Desulfomicrobium*, *Desulfomonile* e *Syntrophobacter* estão relacionados com a redução de compostos de enxofre, tais como, sulfato ou tiosulfato a sulfeto (Brenner *et al.*, 2005; Vos *et al.*, 2009). Destaca-se a

elevada concentração de sulfato na água de lavanderia (Tabela 5.1; $1.115,3 \pm 668,2$ mg/L), sulfato afluente ($52,2 \pm 35,7$ mg/L de ambos os reatores) e sulfeto efluente (aproximadamente 3,5 mg/L). A diferença na abundância relativa de *Desulfobulbus* pode estar relacionada à estratégia de operação de cada reator. O EGSB-BA foi operado durante 218 dias, sem fonte extra de enxofre (sulfato/tiosulfato). É possível afirmar, portanto, pressão seletiva na comunidade microbiana, com diminuição das bactérias relacionadas com a redução de compostos de enxofre. Todavia, para o EGSB-BNA Etapa I foi feita alimentação com água residuária de lavanderia com elevadas concentrações de sulfato afluente.

Além dos gêneros relacionados com a redução de sulfato e tiosulfato notou-se a presença de *Longilinea* (0,30% no EGSB-BA Etapa II e 0,12% no EGSB-BNA Etapa I). Esse gênero corresponde a bactérias filamentosas, Gram-negativas não formadoras de endósporos que são comumente observadas na superfície de grânulos de reatores anaeróbios usado no tratamento de água residuária contendo carboidratos.

Observou-se que 7% do total de sequências do EGSB-BA Etapa II e 31% do total de sequências do EGSB-BNA Etapa I foram relacionadas com a degradação de compostos aromáticos e/ou que já foram descritos em estudos com LAS (Tabela 5.7). A presença de diversos gêneros (10) relacionados com a degradação de LAS corrobora com a necessidade de consórcio microbiano para a degradação de compostos recalcitrantes. Okada (2012) obteve 32 gêneros de reator UASB usado no tratamento de água residuária de lavanderia comercial. Enquanto, Delforno *et al.* (2012) identificaram 6 gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos em amostras provenientes de reator EGSB alimentado com LAS-Padrão a partir de sequenciamento Sanger.

Tabela 5.7: Abundância relativa de sequências e Número de OTUs de Gêneros relacionados com a degradação de LAS e outros compostos aromáticos em biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I.

Gêneros	EGSB-BA Etapa II		EGSB-BNA Etapa I	
	% de Sequências	Nº de OTUs	% de Sequências	Nº de OTUs
* <i>Acetobacterium</i>	-	-	0,08%	1
* <i>Desulfobulbus</i>	2,49%	3	27,43%	11
<i>Desulfomicrobium</i>	-	-	0,08%	1
<i>Desulfomonile</i>	0,08%	1	-	-
<i>Gemmatimonas</i>	-	-	0,04%	1
<i>Holophaga</i>	0,08%	1	1,32%	3
<i>Parvibaculum</i>	0,17%	1	-	-
<i>Sporomusa</i>	0,55%	2	0,26%	2
<i>Synergistes</i>	0,25%	1	-	-
* <i>Syntrophorhabdus</i>	3,63%	6	1,95%	7
Total	7%	29	31%	43

Total de Sequências EGSB-BA Etapa II = 2371

Total de Sequências EGSB-BNA Etapa I = 4933

Total de OTUs EGSB-BA Etapa II = 232

Total de OTUs EGSB-BNA Etapa I = 312

Limite de Confiança = 80%

*Degradação de outros compostos aromáticos

Dentre os gêneros relacionados com a degradação de LAS observou-se que dois deles requerem condição aeróbia, ou seja, *Gemmatimonas* (0,04% das sequências EGSB-BNA Etapa I e ausente no EGSB-BA Etapa II) e *Parvibaculum I* (0,17% das sequências no EGSB-BA Etapa II e ausente no EGSB-BNA Etapa I). *Gemmatimonas* pertencem ao Filo Gemmatimonadetes, Família Gemmatimonadaceae e são bacilos gram negativos que possuem vias enzimáticas capaz de degradar benzoato (Krieg et al., 2010). *Parvibaculum* pertence ao Filo Proteobacteria, Família Rhodobiaceae e são bacilos gram negativos com capacidade de realizar reações de β e ω -oxidação e, portanto, iniciar o catabolismo da molécula de LAS. (Schleheck et al., 2004b). Segundo Schörberl, (1989), em condição aeróbia a rota de degradação de LAS está relacionada com reações de β e ω -oxidação da cadeia alquílica, com formação de sulfofenil carboxilatos (SPC), seguida da quebra do anel aromático e dessulfonação.

Além disso, *Synergistes* (0,25% das sequências EGSB-BA Etapa II e ausente no EGSB-BNA Etapa I) é capaz de realizar ω -oxidação, entretanto, em condição anaeróbia. Este gênero pertence ao Filo Synergistetes, Família Synergistaceae já foi

descrito na literatura como sendo capaz de degradar DHP (dihidroxipiridina) (Allison et al., 1992; Kumar et al., 2010).

Holophaga (0,08% das sequências no EGSB-BA Etapa II e 1,32% no EGSB-BNA Etapa I) pertence ao Filo Acidobacteria, Família Holophagaceae com capacidade de fermentar trimetoxibenzoatos e trihidroxibenzenos em acetato (Krieg et al., 2010). Além disso, espécies pertencentes a família Holophagaceae estão relacionadas com a redução de ferro III.

Sporomusa (0,55% das sequências no EGSB-BA Etapa II e 0,26% no EGSB-BNA Etapa I) pertencente ao Filo Firmicutes, Família Veillonellaceae são bactérias anaeróbias, homoacetogênicas, Gram negativas e formadoras de endósporos. Realizam reações de metoxilação de compostos aromáticos (Breznak et al., 1988) e são capazes de degradar trimetoxibenzoatos (Vos et al., 2009).

Em relação à *Syntrophorhabdus* (3,63% das sequências no EGSB-BA Etapa II e 1,95% no EGSB-BNA Etapa I), um dos mais abundantes e pertencente ao Filo Proteobacteria, Família Syntrophobacteraceae são bactérias anaeróbias obrigatórias que não apresentam motilidade e não utilizam compostos de enxofre e ferro como receptor final de elétrons. Tais bactérias são capazes de oxidar compostos como benzoato, com destaque para a *Syntrophorhabdus aromaticivorans* sp. com elevada eficiência na degradação de compostos aromáticos em sintrofismo com metanogênicas hidrogenotróficas (Qiu et al., 2008).

5.2.3 Considerações Parciais

Em relação ao proposto para a Hipótese A, a adaptação da biomassa ao LAS Padrão, não corroborou para o aumento da remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial. Os valores de remoção de LAS, em água residuária de lavanderia, obtidos foram de $76,4 \pm 18,1$ % (Etapa II para EGSB-BA) e $78,6 \pm 16,7$ % (Etapa I para EGSB-BNA). Fatores como elevada diversidade da microbiota do inóculo e o longo período de operação da Etapa I EGSB-BA provavelmente contribuíram para este resultado. Desse modo, recomenda-se uso direto de água residuária de lavanderia comercial para esse tipo de reator, sem prévia adaptação da biomassa ao composto padrão.

Por meio dos resultados obtidos nas Etapas I e II do EGSB-BA notou-se que maior remoção de LAS foi obtida em água de lavanderia (EGSB-BA Etapa II

76,4±18,1%) em relação à condição com LAS Padrão (EGSB-BA Etapa I 63,5±10,3%). Provavelmente, a presença de outros compostos orgânicos, tais como, sequestrantes podem ter alterado os mecanismos de adsorção do LAS ao lodo granulado, por conseguinte, alterando a microbiota.

Em relação ao DGGE notou-se maior amplitude para o coeficiente de similaridade do domínio *Archaea* (18-84%). Para a amostra do EGSB-BNA Etapa I SF verificou-se maior diferença nas populações em relação às demais amostras. Para o domínio *Bacteria* observou-se coeficiente de similaridade entre 36-70%. Para biomassa da manta de lodo na fase com água de lavanderia (EGSB-BA Etapa II ML e EGSB-BNA Etapa I ML) observou-se similaridade de 66%. Dessa forma notou-se que as condições impostas na operação do reator EGSB-BA e BNA resultaram em modificações das populações de microrganismos.

Em relação às análises de Pirosequenciamento notou-se diversidade de gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos e da molécula de LAS, representando 7% e 31% do total de sequências da biomassa do EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente. Os seguintes gêneros podem ser destacados: *Acetobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonile*, *Gemmatimonas*, *Holophaga*, *Parvibaculum*, *Sporomusa*, *Synergistes* e *Syntrophorhabdus*. Notou-se, a partir da análise dos índices de Dominância, a presença de um táxon dominante na biomassa do EGSB-BNA Etapa I, relacionado ao *Desulfobulbus* (27,43% das sequências e 11 OTUs). Enquanto, para biomassa do EGSB-BA Etapa II notou-se dominância de *Syntrophorhabdus* (3,63% das sequências e 6 OTUs).

5.3 Hipótese B - Avaliação do tratamento de água residuária de lavanderia comercial sem adição de meio sintético

5.3.1 Operação do Reator

O reator EGSB-Ag.Lav. foi operado em três etapas. A Etapa I consistiu na reativação dos microrganismos, uma vez que o lodo granulado era mantido sob refrigeração. Para tanto, o reator foi alimentado com meio sintético que consistiu em meio mineral modificado, solução de vitaminas, co-substratos (extrato de levedura, metanol e etanol) e bicarbonato de sódio. Na Etapa II e III, houve substituição do meio sintético por água residuária de lavanderia diluída para $12,0 \pm 3,0$ e $28,8 \pm 6,4$ mg/L de LAS, respectivamente. Os parâmetros operacionais podem ser visualizados na Tabela 4.7.

A carga orgânica específica (COE) na Etapa I foi de 69 ± 9 mgDQO/gVS.d com DQO afluente de 755 ± 277 mg/L e remoção de 89 ± 19 % (Tabela 5.8).

Na Etapa II a COE aplicada foi de 21 ± 9 mgDQO/gVS.d, ou seja, redução de 70 % em relação a COE da etapa anterior. A DQO afluente não ultrapassou 400 mg/L, com média de 232 ± 79 mg/L. Ressalta-se que essa DQO foi relacionada aos ácidos orgânicos voláteis e surfactantes, assim como a material fibroso e compostos recalcitrantes presentes na água residuária, ou seja, nem toda a DQO quantificada era facilmente degradada. Dessa forma, obteve-se remoção de DQO de 59 ± 14 %. Na Etapa III, mesmo com a menor diluição da água residuária (maior concentração de LAS afluente), a carga orgânica específica foi de 21 ± 11 mgDQO/gVS.d com concentração de DQO de 224 ± 115 mg/L afluente. A remoção obtida nessa etapa foi de 51 ± 17 %.

Os valores de pH efluente foram diferentes entre a Etapa I ($6,9 \pm 0,2$), Etapa II ($7,7 \pm 0,4$) e Etapa III ($7,8 \pm 0,4$), provavelmente, a maior carga orgânica aplicada na primeira condição resultou em maior produção de ácidos orgânicos voláteis e, conseqüentemente, redução do pH. Em relação ao pH afluente observou-se valores próximos de 7,5.

Tabela 5.8: Resultados dos parâmetros analisados em EGSB-Ág. Lav.

Parâmetros	EGSB - Ag. Lav.		
	Etapa I	Etapa II	Etapa III
DQO (mg/L)			
Afluentes	755 ± 277	221 ± 81	237 ± 114
Efluentes	90 ± 40	81 ± 30	123 ± 76
Remoção (%)	89 ± 19	61 ± 15	48 ± 19
Carga Orgânica Específica Aplicada (mgDQO/gVS.d)	69 ± 9	21 ± 9	21 ± 11
LAS (mg/L)	-	<i>Ag. Lav.</i>	<i>Ag. Lav.</i>
Afluentes	-	12,0 ± 3,0	28,8 ± 6,4
Efluentes	-	0,9 ± 1,2	12,2 ± 7,7
Remoção (%)	-	92,9 ± 10,3	58,6 ± 25,8
Carga Específica Aplicada (mg/gVS.d)	-	1,0 ± 0,3	2,7 ± 0,7
Remoção Específica (mg/gVS.d)	-	0,9 ± 0,3	1,6 ± 0,8
Alcalinidade Parcial (mg CaCO₃/L)			
Afluentes	282 ± 22	210 ± 56	264 ± 53
Efluentes	246 ± 63	250 ± 70	349 ± 87
Alcalinidade Total (mg CaCO₃/L)			
Afluentes	376 ± 34	285 ± 73	356 ± 68
Efluentes	339 ± 82	340 ± 97	468 ± 114
AOV (mg HAc/L)			
Afluentes	-	42 ± 31	65 ± 36
Efluentes	-	10 ± 10	25 ± 27
pH			
Afluentes	7,5 ± 0,1	7,7 ± 0,2	8,1 ± 0,4
Efluentes	6,9 ± 0,2	7,6 ± 0,4	7,8 ± 0,3
Sulfato (mg S /L)			
Afluentes	-	24,8 ± 10,4	49,7 ± 18,2
Efluentes	-	20,4 ± 20,1	26,5 ± 18,9
Redução (%)	-	63,6 ± 31,7	62,6 ± 26,6
Sulfato Efluentes	-	1,7 ± 2,5	22,0 ± 28,8
*Biomassa Final – ML (g/L)			
Sólidos Totais		6,20	
Sólidos Totais Voláteis		2,00	
*Biomassa Final – SF (g/L)			
Sólidos Totais		1,22	
Sólidos Totais Voláteis		0,56	
Sólidos no Efluentes (g/L)			
Sólidos Totais	-	0,014 ± 0,020	0,029 ± 0,063
Sólidos Totais Voláteis	-	0,005 ± 0,003	0,004 ± 0,002
Duração	26	65	114
TDH	39 ± 5	39 ± 4	39 ± 5

*biomassa presente dentro do reator ao final da operação

ML - manta de lodo; **SF** - separador de fase

AOV – ácidos orgânicos voláteis

Aplicou-se carga de LAS específica (CLE) na Etapa II de $1,0 \pm 0,3$ mg.gVS⁻¹.d⁻¹, sendo obtida remoção de $92,9 \pm 10,3$ %. Comparando-se esse resultado com aquele do EGSB-BA Etapa II ($1,0 \pm 0,7$ mgLAS/gVS.d) e EGSB-BNA Etapa I ($0,9 \pm 0,3$ mgLAS/gVS.d), ambos alimentados com água residuária de lavanderia e CLE

semelhantes, observou-se aumento de 15 - 17 % na remoção do LAS. Portanto, a adição de meio sintético não foi necessária para a remoção de LAS em água residuária de lavanderia. Provavelmente, dentre todos os constituintes do meio sintético a fonte de carbono e, conseqüentemente, a COE foi o parâmetro chave para obter elevada remoção do surfactante. Nesse sentido, Okada *et al.* (2013), em UASB, observaram maiores remoções de LAS Padrão (76 %) em meio sintético para COE de $30 \pm 1 \text{ mg.gVS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, enquanto para COE de $70 - 180 \text{ mg.gVS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ as remoções observadas foram de 37 - 53 %.

Na Etapa III, aplicou-se CLE de $2,7 \pm 0,7 \text{ mg.gVS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e obteve-se remoção de $57,4 \pm 26,6 \%$. Dessa forma, com aumento da concentração de LAS afluyente (Etapa II - $12,0 \pm 3,0 \text{ mg/L}$ para a Etapa III - $28,8 \pm 6,5 \text{ mg/L}$) notou-se diminuição de 30 % na remoção de LAS. Diante dessa diminuição da remoção, a principal hipótese elaborada foi a seguinte: o aumento da concentração de LAS afluyente (redução da diluição da água residuária com água de abastecimento) resultou em aumento da toxicidade, tanto do LAS, como de outros componentes tóxicos e recalcitrantes desta água residuária, por conseguinte, prejudicando a microbiota. Esse argumento foi corroborado pela diminuição da remoção de DQO em 13 % (Etapa II - $61 \pm 15 \%$ e Etapa III - $48 \pm 19 \%$) e diminuição dos estimadores de riqueza Chao1 e Rarefação, tanto para amostras do separador de fases, quanto da manta de lodo. Ressalta-se que essa diminuição da remoção de DQO ocorreu mesmo com COE semelhantes entre as etapas (Etapa II - $21 \pm 9 \text{ mg.gVS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e Etapa III - $21 \pm 11 \text{ mg.gVS}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Acrescentando-se a este possível aumento da toxicidade à microbiota foi também observada uma possível relação entre aumento da concentração de H_2S efluente e diminuição da remoção do surfactante.

Observou-se durante a Etapa II remoção de LAS superior a 70 % e valores não superiores a 10 mg/L de sulfeto efluente. Entretanto, com o início da Etapa III (91º dia de operação) foi observado aumento de sulfeto efluente para concentrações acima de 20 mg/L. Entre o 90º e 150º dias de operação notou-se diminuição da remoção de LAS; ou seja, $55 \pm 14 \%$ para 20 mg/L de sulfeto efluente.

Entre 150º e 195º dias de operação notou-se aumento da remoção de LAS ($90 \pm 12 \%$) de forma abrupta para baixa concentração de sulfeto efluente. Possivelmente, ocorreu oxigenação do reator na região do separador de fase em virtude de problemas no selo hídrico, que resultou em aumento da remoção de LAS e diminuição de sulfeto efluente. Além do aumento da porcentagem de remoção de LAS

notou-se aumento da remoção de DQO nesse período (62 ± 11 %) com os maiores picos de remoção ($> 75\%$).

Após o 195º dia de operação, o selo hídrico foi modificado resultando em diminuição gradativa da porcentagem de remoção de LAS e aumento gradativo da concentração de sulfeto efluente. A média de remoção de LAS foi de 36 ± 19 %. Ressalta-se que baixas oscilações foram observadas para a concentração de LAS afluente durante a Etapa III. Portanto, provavelmente, o aumento da concentração de sulfeto efluente contribuiu para a diminuição da remoção de LAS.

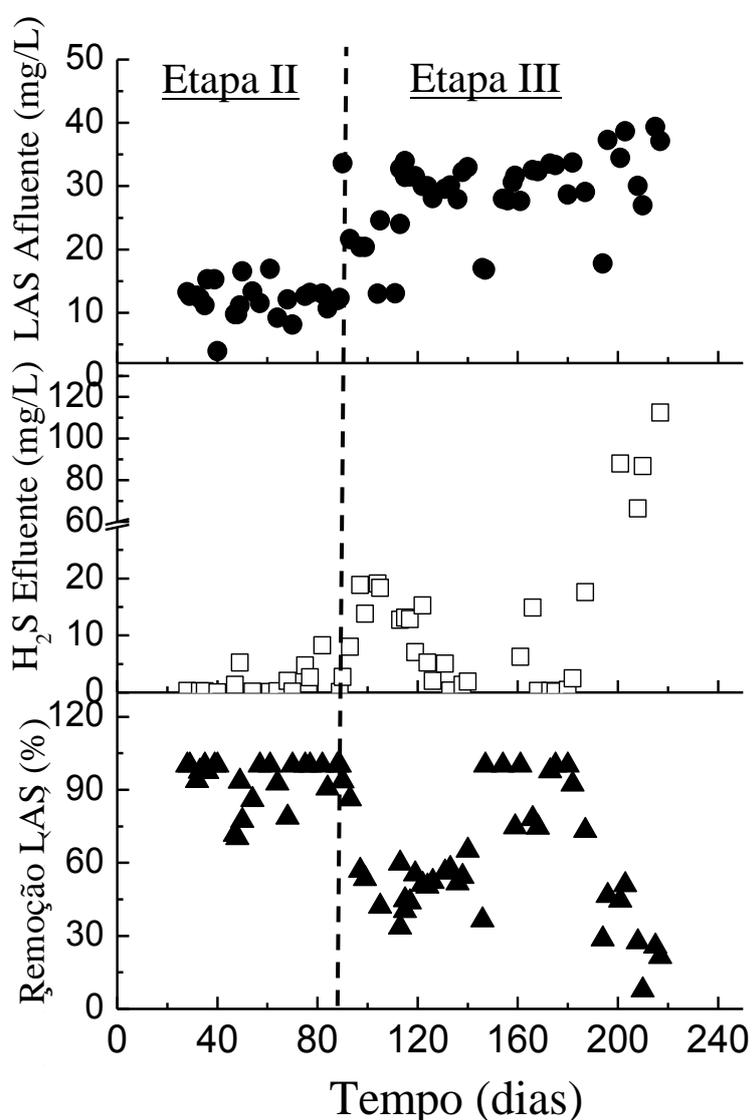


Figura 5.12: Variação temporal da porcentagem de remoção de LAS (\blacktriangle), sulfeto (\square) e LAS afluente (\bullet).

Ressalta-se que os valores obtidos durante a Etapa III referente a distribuição da concentração de LAS afluente e efluente, assim como, da porcentagem de remoção do surfactante estão discriminados em função dos eventos ocorridos durante a operação. Baixa variação foi observada para concentração do surfactante afluente na Etapa II e maior amplitude para os valores obtidos na Etapa III (Figura 5.13).

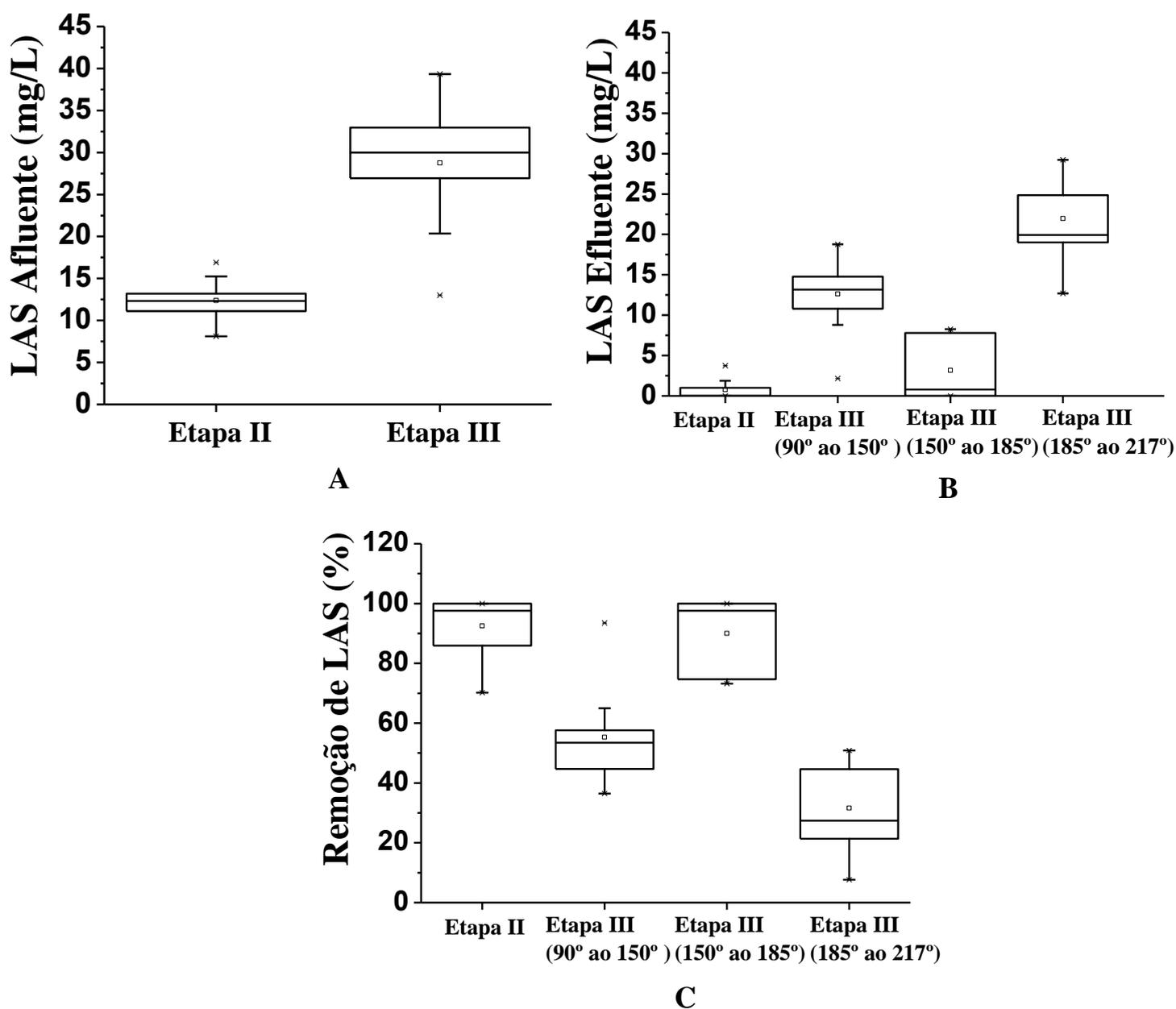


Figura 5.13: *Box-Plot* da concentração de LAS afluente (A), efluente (B) e porcentagem de remoção de LAS (C). Etapa II (24 amostras), Etapa III 90° ao 150° (21 amostras), Etapa III 150° ao 185° (12 amostras) e Etapa III 185° ao 217° (7 amostras).

Em relação à porcentagem de remoção de LAS notou-se maior homogeneidade dos dados na Etapa III (90° ao 150° dia de operação) com duração de 60 dias. No período de oxigenação (Etapa III - 150° ao 185° dia de operação) verificou-se 60 a 100% de remoção de LAS. Por outro lado, na Etapa III (185° ao 217°), caracterizada pelo aumento da concentração de sulfeto efluente, a porcentagem de remoção de LAS observada foi de 36 ± 19 % e oscilação entre 10 % e 50 %.

Em relação à concentração de sólidos totais efluente notou-se mudança acentuada entre a Etapa II ($0,014 \pm 0,02$ g/L) e Etapa III ($0,031 \pm 0,062$ g/L), provavelmente, devido a maior concentração de LAS e demais compostos da água de lavanderia. A perda de sólidos efluente em reatores com alta vazão de recirculação aplicados ao tratamento de LAS foi reportado previamente por Oliveira *et al.* (2010) e Delforno *et al.* (2012).

O balanço de massa de LAS foi realizado ao final da operação do reator, ou seja, ao final de 223 dias de operação. No total foram adicionados 4.460 mg de LAS no reator. A parcela de LAS relacionada à degradação biológica foi de 52 % (Tabela 5.9 e Figura 5.14). Ressalta-se que a parcela de LAS adsorvido foi de 7 % na manta de lodo e 2 % na biomassa do separador de fases.

Tabela 5.9: Balanço de massa de LAS do reator EGSB-Ag.Lav.

	EGSB-Ag.Lav.	
	mg LAS	%
Adicionado no reator	4.460	-
Recuperado no Efluente	1.753	39
Degradação Biológica	2.335	52
Adsorvido Manta de Lodo	292	7
Adsorvido Separador de Fase	79	2

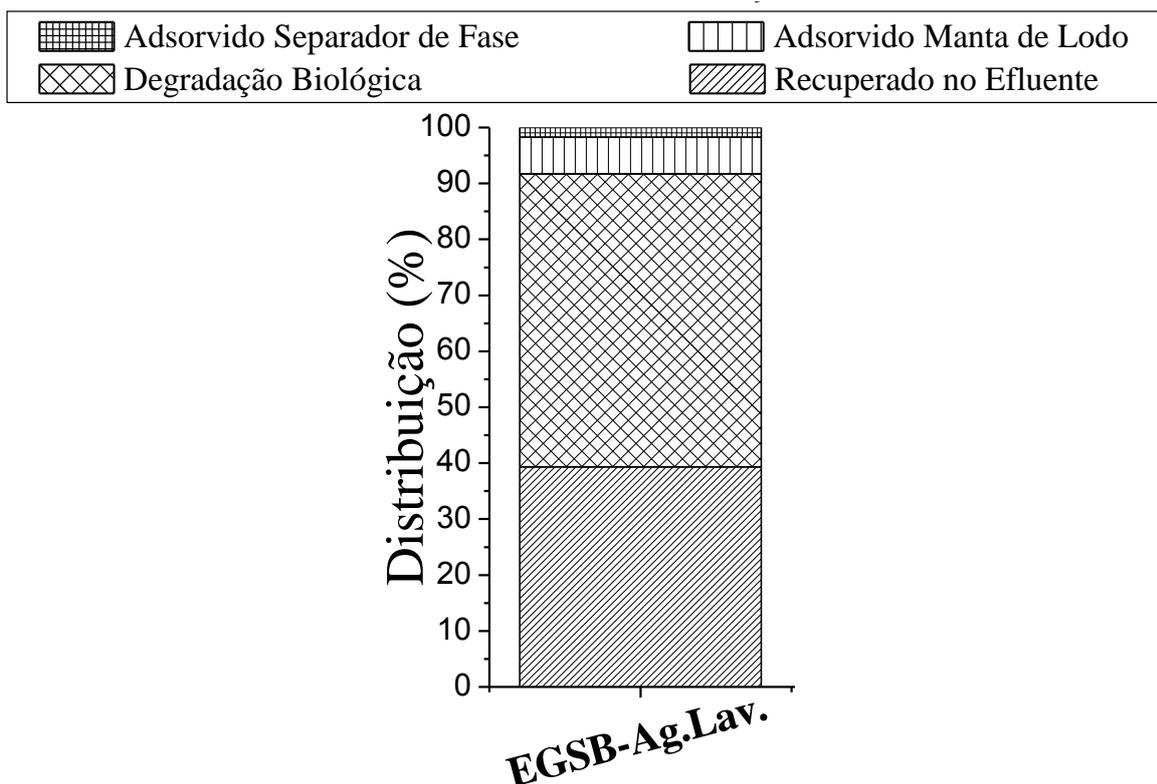


Figura 5.14: Distribuição do destino final de LAS em EGSB-Ag.Lav.

5.3.2 Caracterização Microbiana

Em relação ao perfil de bandas do DGGE para a biomassa retirada ao longo do reator (Figura 5.15 A e C) verificou-se modificações nas populações de bactérias, em função do local de amostragem. Ressalta-se que o reator é considerado de mistura completa (alta relação vazão de recirculação/vazão de alimentação), ou seja, não há diferenciação em relação a distribuição de nutrientes ao longo do reator (Seghezzo *et al.*, 1998). Contudo, notou-se estratificação em relação ao tamanho dos grânulos. Dessa forma, grânulos maiores e mais densos foram observados na base do reator e, grânulos cisalhados e com menor densidade foram observados na região superior da manta de lodo. No separador de fases e distribuidor de vazão (ponto 1) não foram encontrados grânulos, mas, apenas biomassa floculenta aderida ao acrílico (Figura 5.16).

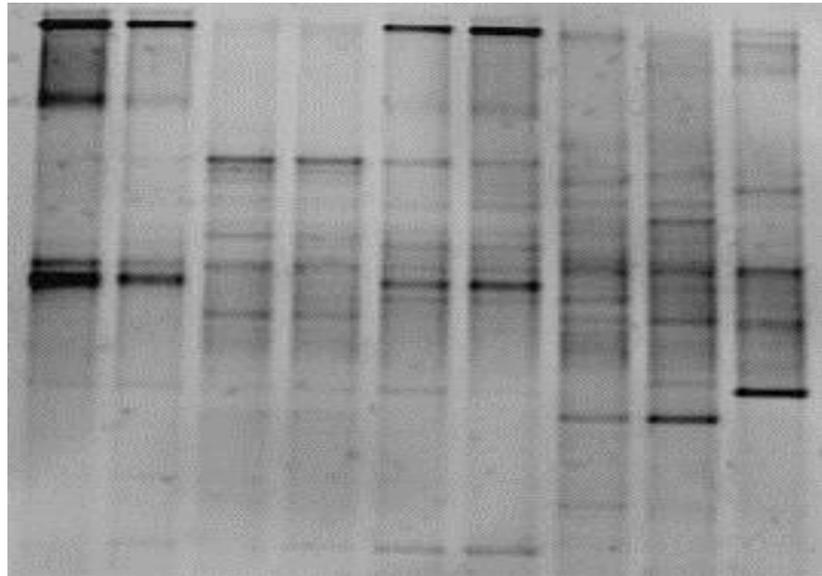
Dessa forma, verificou-se 78 % de similaridade entre a biomassa do Ponto 4, com aquela do separador de fase, ambas sem estrutura granulada. Verificou-se 73 % de similaridade entre as populações do Ponto 2 e Ponto 3, com estrutura na forma de

grânulos bem definidos. Verificou-se coeficiente de similaridade de apenas 30 % entre esses dois grupos; ou seja, biomassa com estrutura na forma de grânulos (Ponto 2 e 3) e floculenta (SF Etapa III e Ponto 4).

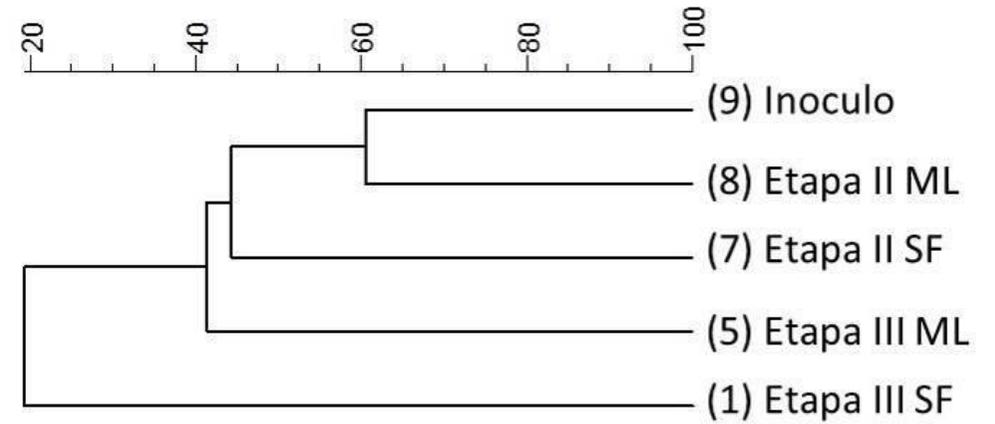
Notou-se para a biomassa da região do separador de fases (SF Etapa III) e aquela do Ponto 4 os menores coeficientes de similaridade ($< 34\%$), quando comparados com a biomassa proveniente do Inóculo. Provavelmente, nessas regiões ocorreram as maiores modificações em relação à biomassa original. Segundo McHugh et al. (2003), uma das principais vantagens do arranjo microbiano na forma de grânulos refere-se a defesa coletiva em relação aos compostos tóxicos e otimização da sobrevivência das populações microbianas. Portanto, a ausência da estrutura granulada resulta em maior susceptibilidade da microbiota as variações ambientais.

Verificou-se menor coeficiente de similaridade ($< 20\%$) em relação ao DGGE da biomassa do EGSB das Etapas com água residuária de lavanderia (Etapa II – 12 mgLAS/L e Etapa III – 29 mgLAS/L; Figura 5.15 A e B) em relação àquela do SF Etapa III. O maior coeficiente de similaridade foi de 60%, entre o Inóculo e biomassa da manta de lodo Etapa II. A grande amplitude dos valores de similaridade, provavelmente, foi devido a menor diluição de água de lavanderia adicionada na alimentação do reator durante a Etapa III.

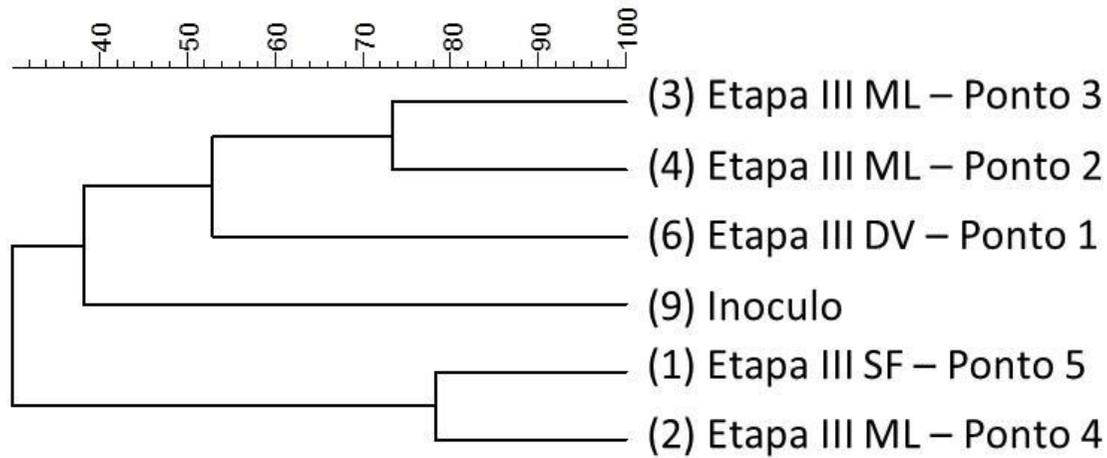
112 (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)



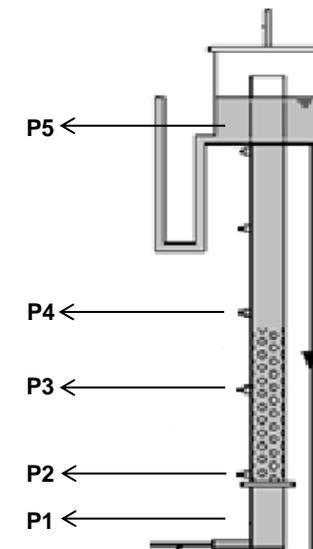
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 5.15: Análise de *cluster* (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE do gene RNAr 16S para o domínio *Bacteria*. (A) Foto do gel de DGGE. (B) Biomassa da Etapa II (12mgLAS/L) e Etapa III (29mgLAS/L). (C) Biomassa obtida ao longo do reator durante a Etapa III. (D) Distribuição espacial de pontos de amonstragens em EGSB. ML – manta de lodo; SF – separador de fases e DV – distribuidor de vazão.

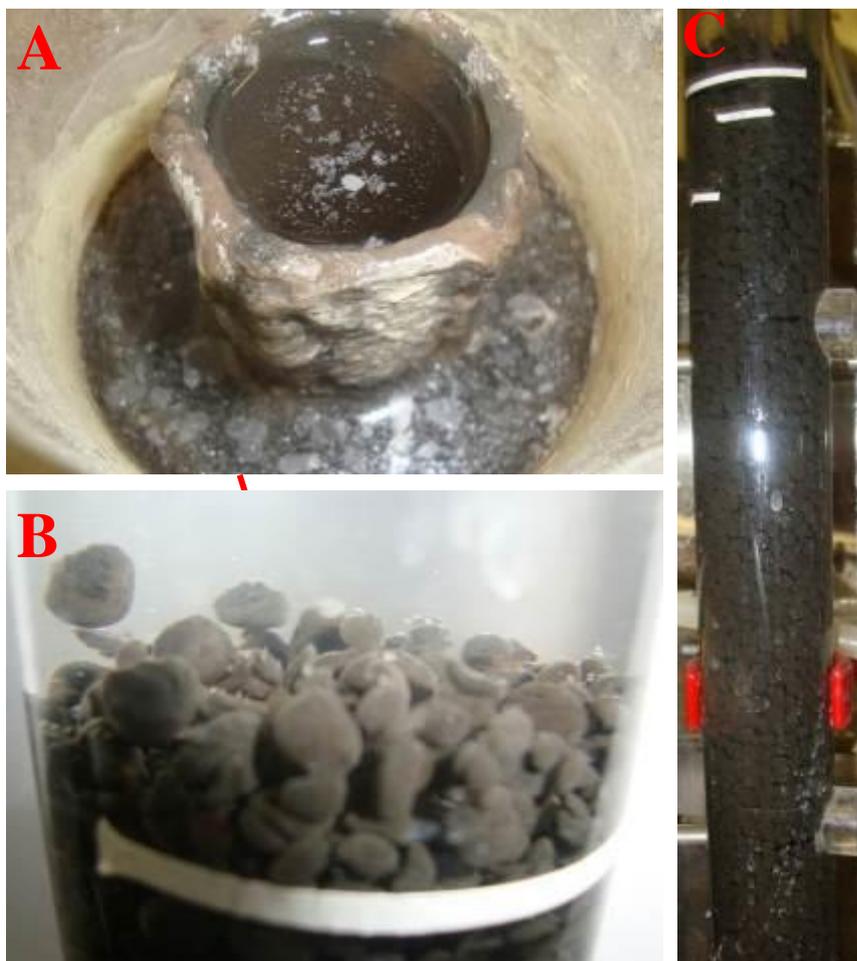


Figura 5.16: (A) Biomassa do separador de Fases; (B) Região superior da manta de lodo (grânulos cisalhados) e (C) Manta de lodo completa.

Por meio do sequenciamento massivo na plataforma Ion Torrent foram obtidas 396.818 seqüências do gene rRNA 16S da biomassa da manta de lodo e separador de fases para as Etapas II e III do EGSB-Ag.Lav. (4 amostras). Durante o processamento das seqüências, foram removidas 216.998 seqüências em função da qualidade das bases ($Q_{\text{phred}} > 20$), presença de bases ambíguas, chimeras e tamanho menor que 200 pb. Dessa forma, foram descartadas 56,6 % das seqüências (Tabela 5.10). Grande parte das seqüências foram removidas devido a formação de um dímero entre os primers *forward* e *reverse*, resultando em fragmento de aproximadamente 35 pb (Apêndice Figura 10.2 p. 195). Em algumas amostras (Etapa II e III do SF) a quantidade de fragmentos de 35 pb superou em números o fragmento esperado de aproximadamente 360 pb (Apêndice Figura 10.2 p. 195). Após o processamento a média do fragmento sequenciado foi de 313-329 pb (Apêndice Figura 10.3; p.196).

Obteve-se 3.498 – 7.277 de OTUs, dos quais 36 – 46 % corresponderam a singletons. O maior valor de singleton obtido foi para a biomassa da Etapa II ML (3.320), enquanto, o menor valor foi para aquela da Etapa II SF (1.384).

Tabela 5.10: Resultados do sequenciamento das amostras do EGSB Ag. Lav. (Hipótese B) pela plataforma Ion Torrent.

	Etapa II		Etapa III	
	<i>Manta de Lodo</i>	<i>Separador de Fase</i>	<i>Manta de Lodo</i>	<i>Separador de Fase</i>
Cobertura - Fórmula de Good	95%	96%	96%	96%
Total de sequências (dados brutos)	140.686	96.442	81.282	78.408
Total de sequências (dados filtrados)	63.957	44.330	40.273	31.260
Tamanho Médio (pb)	329 ± 44	313 ± 47	327 ± 45	316 ± 42
Total de OTUs	7.277	4.955	4.254	3.489
Singletons	3.320	1.798	1.571	1.384
Total de OTUs (classificação taxonômica)	3.957	3.157	2.683	2.105
Estimadores de Riqueza				
Chao1	6.214 ± 523	4.732 ± 1.125	4.256 ± 1.331	3.072 ± 1.833
Rarefação	4.623 ± 602	3.613 ± 832	3.164 ± 998	2.268 ± 1.269
Índices de Diversidade				
Shannon (H)	6,24 ± 0,56	6,90 ± 0,16	6,45 ± 0,42	6,10 ± 0,61
Simpson (1-D)	0,99 ± 0,01	1,00 ± 0,0002	0,99 ± 0,002	0,99 ± 0,002
Dominância	0,01 ± 0,01	0,003 ± 0,0002	0,006 ± 0,00	0,007 ± 0,002

Por meio da análise de cobertura (fórmula de Good) verificou-se que 95-96% 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 toda a diversidade da biomassa do EGSB Ag. Lav . Notou-se estabilização a partir de 10.000 sequências (Figura 5.17 A). Por outro lado, verificou-se, por meio das curvas de rarefação para 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 5.17 B e C). Dessa forma, os níveis taxonômicos de gênero e espécie, só poderiam ser completamente acessados com o aumento do esforço amostral.

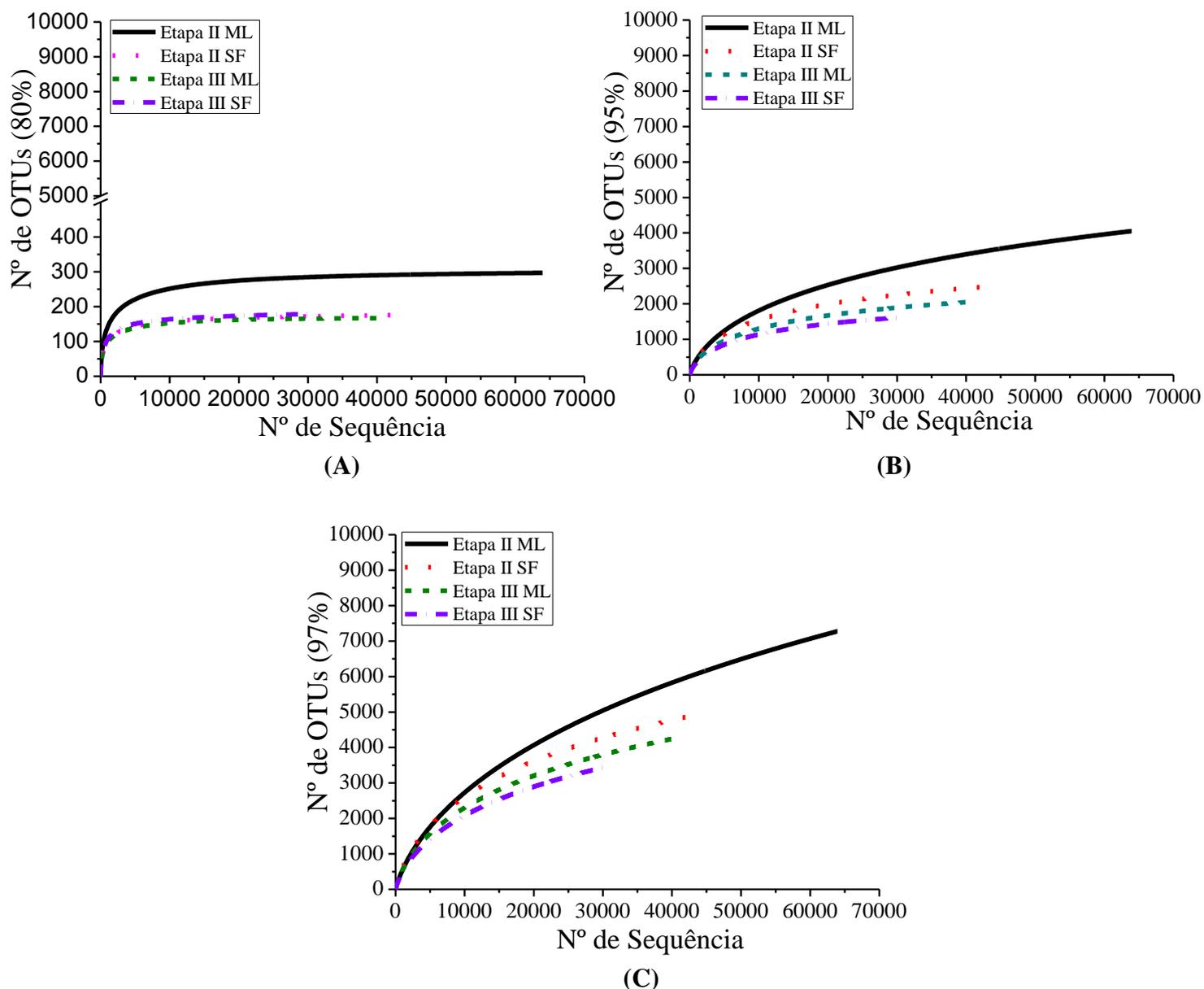


Figura 5.17: Curvas de rarefação definidas para diferentes percentagens de similaridade. (A) 80% de similaridade para nível de Filo; (B) 95 % para nível de gênero e (C) 97 % para o nível de espécie.

Em relação aos estimadores de riqueza Chao1 e Rarefação foram obtidos valores variando de 3.072-6.214 e 2.268-4.623, respectivamente. Por meio dessas possibilidades obteve-se maior estimador de riqueza (6.214 e 4.623) para a biomassa da Etapa II ML, enquanto, para aquela da Etapa III SF verificou-se menores valores (3.078 - 2.268). Ressalta-se que os maiores valores de Chao1 e Rarefação foram obtidos para biomassa da Etapa II com CLE de $1,0 \pm 0,3$ mg/gVS.d, enquanto, os menores valores (colocar valores) foram obtidos para biomassa da Etapa III com CLE de $2,7 \pm 0,7$ mg/gVS.d.

Provavelmente, ocorreu inibição do LAS sobre a microbiota. Resultados semelhantes foram obtidos em DGGE (Figura 5.15 B, p.112) com maiores alterações das populações para a biomassa da Etapa III.

Em relação aos índices de diversidade foram obtidos valores de Shannon acima de 6,0 para todas as amostras, portanto, relacionado com elevada diversidade. Além disso, observou-se valores de Simpson (1-D) muito próximos de 1 o que indicou elevada diversidade e distribuição pouco equânime. Destaca-se que para a biomassa da Etapa II ML verificou-se maior riqueza e um dos menores valores de índice de diversidade (Shannon). A análise desse aspecto está relacionada com a presença de muitas espécies raras e menor regularidade em abundância de espécies. Tal observação foi corroborada pela presença de maior número de singletons entre todas as amostras (3.320).

Para a comparação das quatro amostras foi utilizado o índice de Bray-Curtis. Para tanto, observou-se que as biomassas agruparam em função das etapas de operação do reator (Figura 5.18). Observou-se para a biomassa da Etapa II (SF e ML) e Etapa III (SF e ML) 25 % e 45 % de similaridade, respectivamente. Notou-se que com o tempo de operação dos reatores houve aumento da similaridade entre as biomassas de regiões distintas do reator. Como o cisalhamento dos grânulos é algo contínuo e, que tanto a biomassa da ML como do SF era submetidas às mesmas condições nutricionais, é coerente que aumentasse a semelhança da biomassa entre essas duas regiões com o passar do tempo. Inicialmente, pouca biomassa era observada na região do separador de fase (Etapa II SF) o que contribuiu para maior diferença em relação a biomassa da manta de lodo (Etapa II ML). Além disso, observou-se apenas 10 % de similaridade entre a biomassa da Etapa II e Etapa III, consequência do aumento da concentração de LAS e tempo de operação do reator.

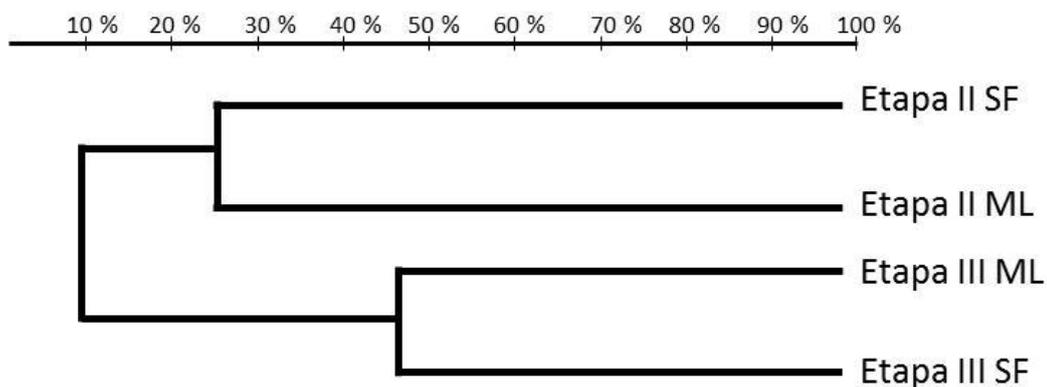


Figura 5.18: Dendrograma baseado no índice de Bray-Curtis para amostras do EGSB-Ag.Lav.

Por meio da distribuição das OTUs em diagrama de Venn, notou-se que 22 % dos gêneros identificados estiveram presentes nas quatro amostras e representaram 61 % de todas as sequências (Figura 5.19). Entre 5 a 11 % dos gêneros foram exclusivos de cada amostra, todavia, representando apenas 1 % do total de sequências obtidas.

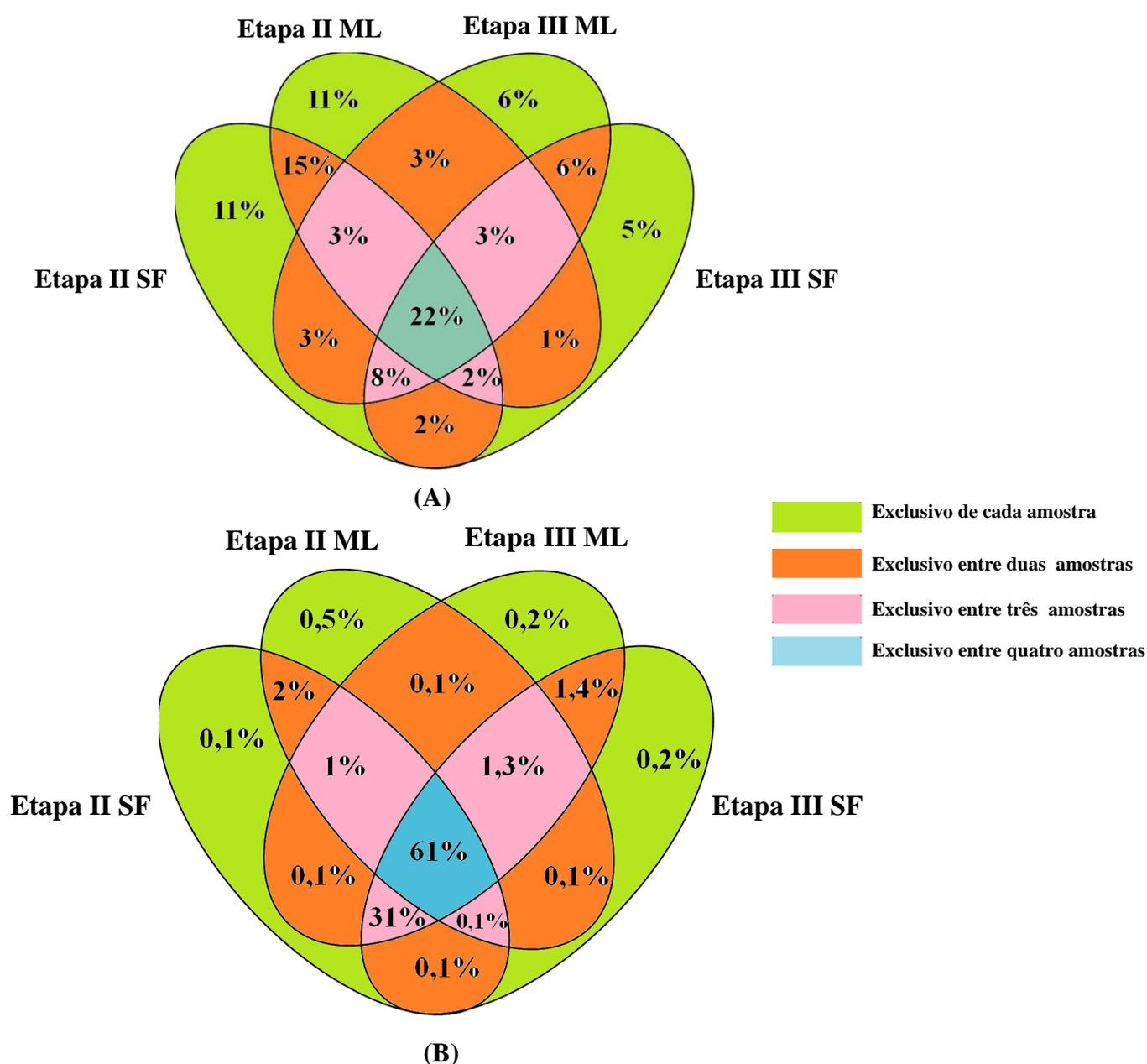


Figura 5.19: Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função das OTUs (A) e em função do número de sequências (B) nas quatro amostras do EGSB-Ag.Lav.

Em análise comparativa das biomassas da Etapa II verificou-se que 41 % dos gêneros foram similares e representaram 64 % das sequências. Valores semelhantes foram obtidos para biomassa da Etapa III com 38 % dos gêneros semelhantes, todavia, representando 95 % das sequências. Em relação às biomassas da ML e aquelas do SF obteve-se entre 31-34 % de gêneros semelhantes e 63-92 % para o total de sequências, respectivamente. Dessa forma, concluiu-se que a grande maioria das sequências e dos gêneros identificados estavam presentes em todas as amostras do EGSB. Esse resultado refletiu a homogeneidade qualitativa dos dados e o esforço amostral.

Na classificação taxonômica observou-se que acima de 95 % das sequências foram classificadas até filo. Em relação ao gênero observou-se classificação entre 16-75 % das sequências (Tabela 5.11). Essa diminuição do número de sequências não classificadas ao nível de gênero deveu-se ao aumento do fragmento sequenciado. Na análise por meio do Pirosequenciamento e Ion sequenciamento obteve-se tamanho de fragmento de 225 pb e acima de 300 pb, respectivamente.

Tabela 5.11: Número de OTUs e abundância relativa de sequências classificadas em cada amostra.

Limite de Confiança	Nível Taxonômico	Etapa II		Etapa II		Etapa III		Etapa III	
		<i>Manta de Lodo</i>		<i>Separador de Fase</i>		<i>Manta de Lodo</i>		<i>Separador de Fase</i>	
		Nº OTUs	Sequências	Nº OTUs	Sequências	Nº OTUs	Sequências	Nº OTUs	Sequências
50%	Filo	3.668	97,5%	2.984	94,7%	2.461	95,5%	2.015	98,2%
50%	Classe	3.209	90,0%	2.858	92,1%	2.354	92,6%	1.970	97,2%
50%	Ordem	3.071	88,5%	2.728	87,0%	2.254	91,1%	1.895	95,8%
50%	Família	2.680	49,6%	2.540	80,5%	2.165	90,1%	1.817	94,6%
80%	Gênero	932	16,1%	1.080	30,3%	1.268	56,4%	1.174	74,8%
Nº Total	-	3.957	60.637	3.157	42.532	2683	38.702	2.105	29.876

Dentre os principais filios identificados destaca-se *Proteobacteria* cujos valores obtidos foram acima de 20 % (abundância relativa), alcançando nas amostras Etapa III (ML e SF) valores entre 65-70 %, respectivamente (Figura 5.20; Apêndice Tabela 10.2). Destaca-se que esse filo, é considerado um dos maiores do domínio *Bacteria* com mais de duzentos gêneros. A diversidade de gêneros reflete em ampla diversidade metabólica e desse modo permitiu a manutenção desses gêneros nos mais diversos habitats. Com exceção da amostra da Etapa II ML em que o filo *Bacteroidetes* foi superior ao *Proteobacteria*, nas demais amostras verificou-se que o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante. No filo *Bacteroidetes* estão incluídas bactérias capazes de crescer em ampla

variedade de substratos, ou seja, são metabolicamente muito diferentes entre si. São microrganismos quimio-organotróficos encontrados no solo, água doce, ambiente marinho e sedimentos. (Brenner *et al.*, 2005)

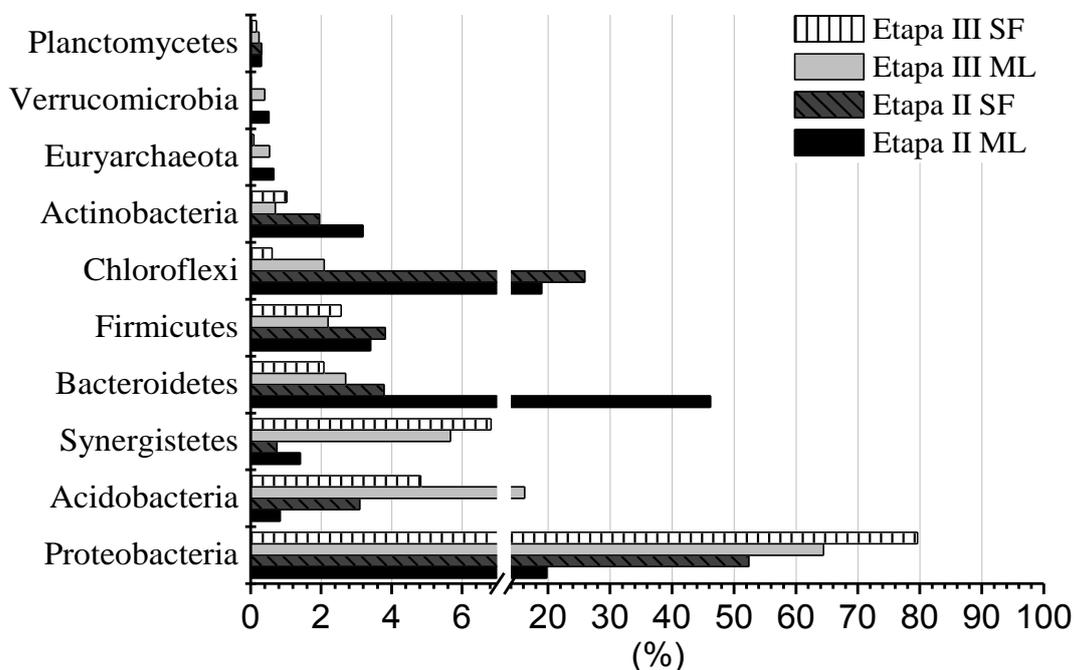


Figura 5.20: Abundância relativa de filo nas amostras do EGSB-Ag.Lav Etapa II e Etapa III.

Além disso, verificou-se também para a biomassa da Etapa III (SF e ML) representantes pertencentes a Synergistetes (6-7%) e Acidobacteria (4-16 %). Enquanto, para a Etapa II observou-se representantes incluídos nos filas Chloroflexi (19-26 %) e Firmicutes (3-4 %).

Os 20 gêneros mais abundantes excluindo os não-classificados representaram em abundância relativa 99 % (Etapa II ML), 84 % (Etapa II SF), 93 % (Etapa III ML) e 95 % (Etapa III SF). Não excluindo as sequências não-classificadas os valores foram 15 % (Etapa II ML), 24 % (Etapa II SF), 50 % (Etapa III ML) e 71 % (Etapa III SF).

Gêneros, tais como *Geobacter*, *Syntrophobacter*, *Smithella*, *Phenylobacterium* e *Legionella* foram observados nas quatro amostras (Figura 5.21). Desses cinco gêneros, apenas *Geobacter* foi relacionada diretamente com a degradação do LAS e/ou seus intermediários, basicamente pelo fato de utilizar compostos aromáticos como tolueno e benzeno como fonte de carbono. São anaeróbias estritas e possuem capacidade metabólica de fazer beta-oxidação, um dos passos, para a degradação da molécula de LAS (Brenner *et al.*, 2005).

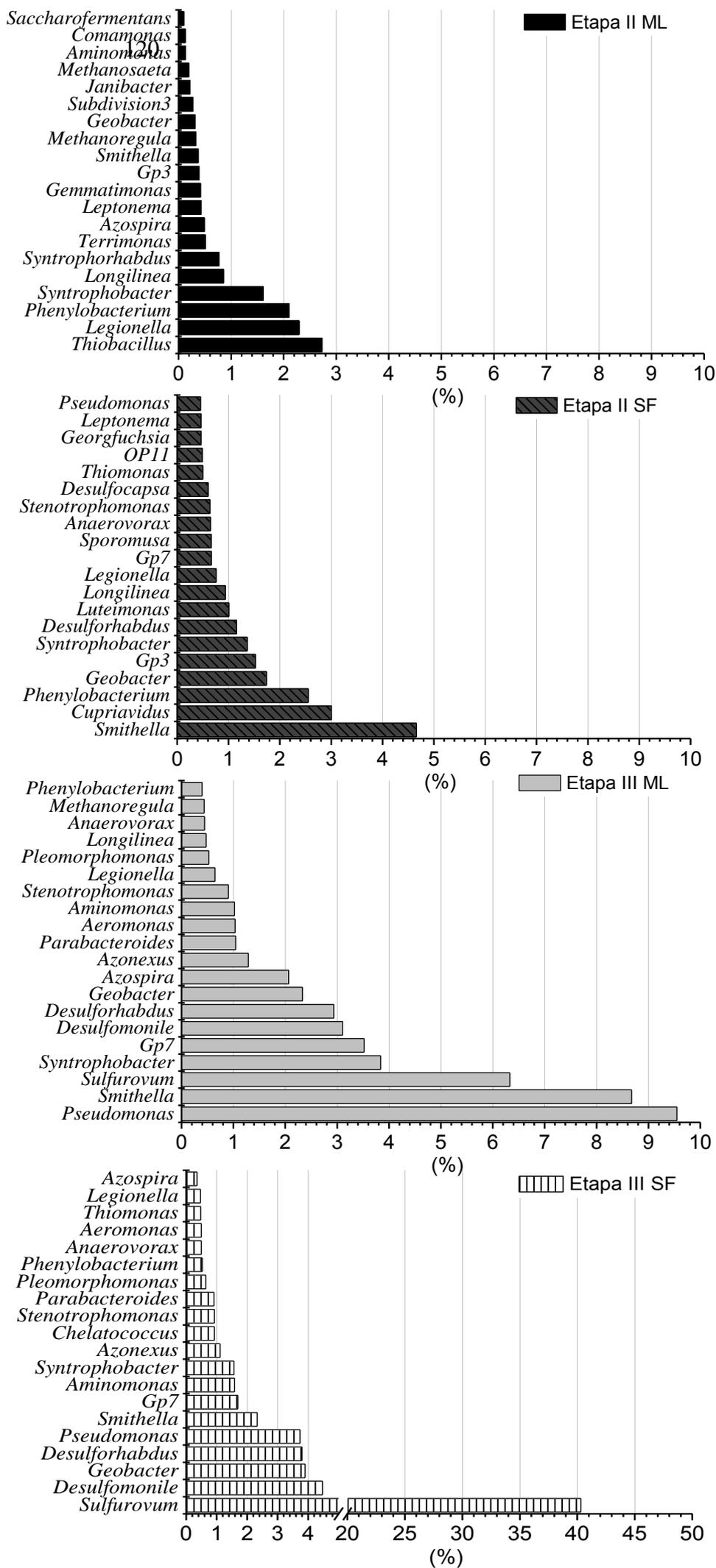


Figura 5.21: Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes nas amostras do EGSB-Ag.Lav Etapa II e Etapa III. Gêneros sublinhados estão em comum nas 4 amostras entre os mais abundantes.

Syntrophobacter e *Smithella* são bactérias anaeróbias estritas e constantemente encontradas em ambientes com LAS (Delforno et al., 2014; Delforno et al., 2012; Duarte et al., 2010a), todavia, não relacionados com a degradação do surfactante. *Syntrophobacter* está relacionada diretamente com a redução de sulfato. Esse aspecto é justificado devido a elevada concentração de sulfato na água de lavanderia (Tabela 5.1 e p.76). Por outro lado, *Smithella* está relacionada à sintrofia com microrganismo hidrogenotróficos (Brenner et al., 2005). Em relação a *Legionella* e *Phenylobacterium*, ambas, são aeróbias sendo apenas o segundo gênero relacionado com a degradação de compostos aromáticos em geral (Garrity et al., 1980; Brenner et al., 2005). Observou-se para esses gêneros abundância relativa abaixo de 2,5 % em todas as amostras.

Dentre os gêneros mais abundantes observou-se 5 % relacionados com o ciclo do enxofre para biomassa da Etapa II ML e Etapa II SF, todavia, 16 % e 55 % para biomassa da Etapa III ML e Etapa III SF, respectivamente. Esses gêneros são os seguintes: *Desulfocapsa*, *Desulfomonile*, *Desulforhabdus*, *Geobacter*, *Sulfurovum*, *Syntrophobacter*, *Thiobacillus* e *Thiomonas*. Dentre esses, somente *Thiobacillus* cresce em condições de microaerofilia os demais, sendo os demais anaeróbios estritos. *Geobacter* e *Desulfomonile* estão relacionados com a degradação de LAS e uso do sulfato como receptor final de elétrons. Verificou-se de 6-40 % de abundância relativa de *Sulfurovum* nas amostras da Etapa III ML e SF, respectivamente. Neste gênero estão incluídas bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas, as quais crescem em condições quimiolitototróficas como enxofre elementar ou tiosulfato como doador de elétrons e nitrato ou oxigênio como receptor de elétrons, usam CO₂ como fonte de carbono (Brenner et al., 2005). Notou-se que alta abundância relativa foi encontrada na região do SF onde havia formação de enxofre elementar (biofilme amarelado; Figura 5.16 A; p.113), acúmulo de CO₂ e presença de oxigênio como discutido na variação temporal desta Etapa.

Verificou-se *Pseudomonas* em todas as amostras da Etapa II ML. Representantes deste gênero tem participação direta na degradação da molécula de LAS, uma vez que estão incluídas espécies capazes de degradação de compostos aromáticos, dessulfonação, β e ω -oxidação (Brenner et al., 2005). Jimenez et al. (1991) observaram em consórcio microbiano composto de *Pseudomonas* e *Aeromonas* que o

LAS foi utilizado como única fonte de carbono. *Aeromonas* também foi identificada nas amostras da Etapa II SF (0,02 %) e amostras da Etapa III ML (1,03 %) e SF (0,49 %).

Notou-se que 6 %, 8 %, 15 % e 9 % da abundância relativa da biomassa da Etapa II ML, Etapa II SF, Etapa III ML e Etapa III SF foram relacionadas com microrganismos aeróbios. Por outro lado, 5 %, 12 %, 30 % e 60 % da biomassa da Etapa II ML, Etapa II SF, Etapa III ML e Etapa III SF foram relacionados com microrganismos anaeróbios.

Em relação a gêneros pertencentes ao domínio *Archaea* identificou-se *Methanolinea*, *Methanoregula* e *Methanosaeta*, todos encontrados exclusivamente em amostras da manta de lodo. *Methanoregula* e *Methanolinea* foram identificados em ambas as amostras (Etapa II e III) da manta de lodo cuja abundância relativa observada foi de 0,02-0,44 %. Por outro lado, *Methanosaeta* foi identificado exclusivamente na biomassa da Etapa II ML (0,19 %). Conforme observado por Garcia-Morales *et al.* (2001) microrganismos metanogênicos (IC₅₀ de 6,3 mgLAS/L) apresentam maior susceptibilidade ao LAS do que organismos acidogênicos (IC₅₀ de 18,9 mgLAS/L). Dessa forma tendem a migrar para o interior do grânulo (Lobner *et al.*, 2005) uma vez que esse biofilme funciona como estrutura protetora à compostos tóxicos. Portanto, justifica-se a presença de organismos metanogênicos apenas em amostras da ML e, provável ausência na biomassa do SF por não apresentarem a estrutura granular definida.

Observou-se 33 gêneros relacionados com a degradação da molécula de LAS e/ou compostos aromáticos, os quais corresponderam a 2,0- 19,5 % do total das sequências obtidas nas amostras (Tabela 5.12 e Figura 5.22). Dentre essas, destaca-se aquelas pertencentes à Etapa III cuja abundância relativa observada foi de 15,9 % para o separador de fases e 19,6 % para a manta de lodo. Todavia, para as amostras da Etapa II observou-se 2,0 % e 6,1 % de abundância relativa para biomassa da manta de lodo e separador de fases, respectivamente. Obteve-se maior número de sequências para a biomassa da Etapa III. Nessa etapa aumentou-se a CLE para $2,7 \pm 0,7$ mgLAS/gVS.d (Etapa II: $1,0 \pm 0,3$ mgLAS/gVS.d) que resultou na diminuição da remoção de LAS em 30 %. Dessa forma, acreditou-se que as condições impostas na Etapa III favoreceram a manutenção de microrganismos que utilizam compostos aromáticos no seu catabolismo.

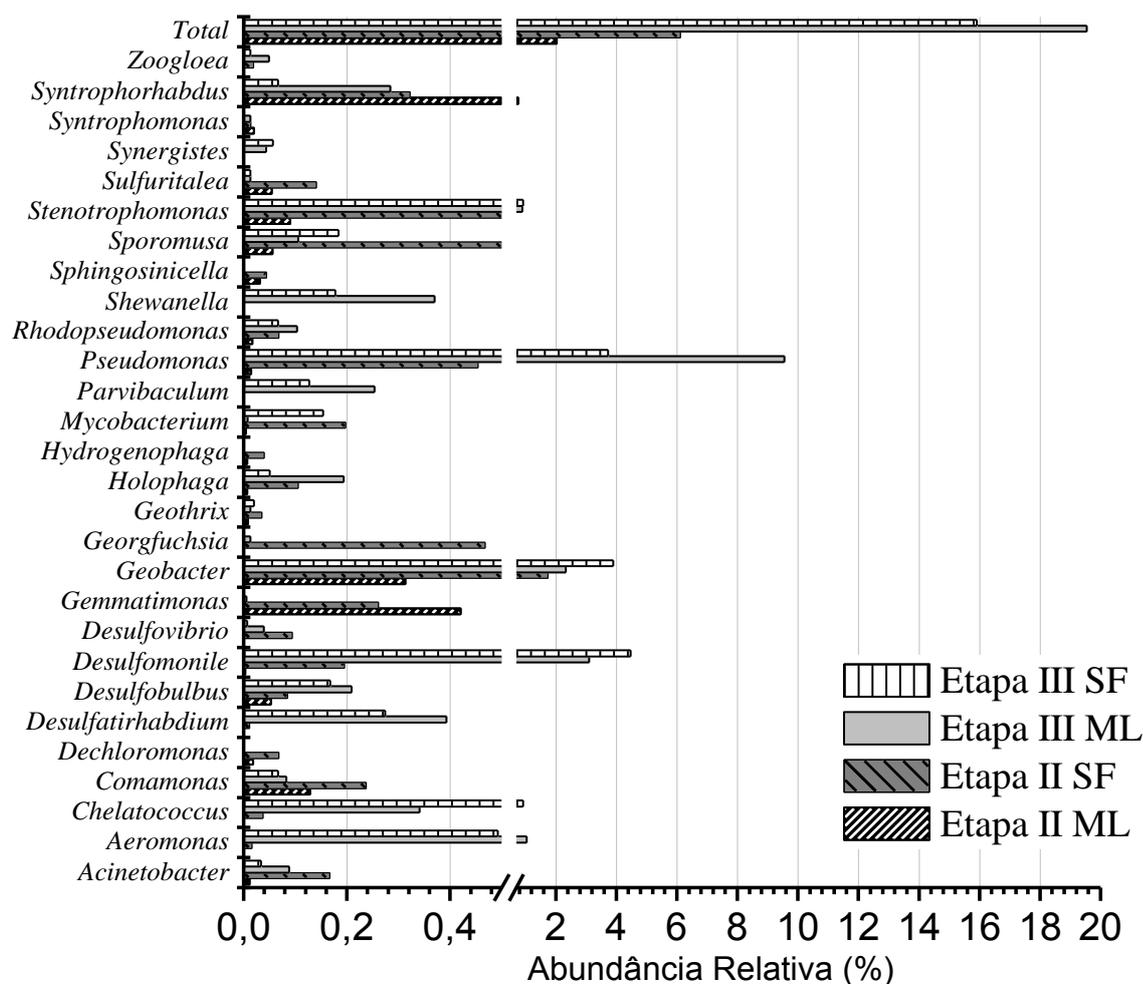


Figura 5.22: Gêneros relacionados com a degradação de LAS e/ou compostos aromáticos.

Dentre todas as sequências analisadas, 0,16-10,79 % foram relacionados aos seguintes gêneros que realizam a dessulfonação do LAS: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Comamonas*, *Desulfovibrio*, *Hydrogenophaga* e *Pseudomonas*. Entre 0,36-12,30 % das sequências obtidas foram relacionadas aos seguintes gêneros com capacidade metabólica para realizar a β -oxidação: *Azorcus*, *Geobacter*, *Parvibaculum*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Synergistes* e *Syntrophomonas* (Brenner *et al.*, 2005). Entre 0,01-9,80 % das sequências obtidas foram relacionadas a dois gêneros (*Pseudomonas* e *Parvibaculum*) com capacidade de metabólica para realizar a ω -oxidação (Brenner *et al.*, 2005). Nota-se que, apenas *Pseudomonas* possui capacidade de realizar β e ω -oxidação, além da dessulfonação (Brenner *et al.*, 2005). Desse modo, a necessidade de consórcio microbiano é fundamental para a mineralização da molécula de LAS (Figura 5.23).

Tabela 5.12: Gêneros relacionados com a degradação de LAS e/ou compostos aromáticos.
Gêneros sublinhados estão presentes em todas as amostras (cont.).

Gênero	Etapa II		Etapa III		Condição	Dessulfonação	β oxidação	ω oxidação	Receptores			Trab. LAS	Referência
	Manta de Lodo	Separador de Fase	Manta de Lodo	Separador de Fase					S	N	Fe		
<u>Acinetobacter</u>	0,01	0,17	0,09	0,03	Aeróbia	+	-	-	-	+	-	+	(Cook et al., 1998); (Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<u>Aeromonas</u>	-	0,02	1,03	0,49	Anaeróbia facultativa	+	-	-	-	+	-	+	(Jimenez et al., 1991); (Denger & Cook, 1999); (Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<u>Chelatococcus</u>	-	0,04	0,34	0,92	Aeróbia obrigatória	-	-	-	-	-	-	+	(Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<u>Comamonas</u>	0,13	0,24	0,08	0,07	Aeróbia	+	-	-	-	+	-	+	(Cook et al., 1998); (Schleheck et al., 2004a); (Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<u>Dechloromonas</u>	0,02	0,07	-	-	Anaeróbia facultativa	-	-	-	-	+	-	+	(Achenbach et al., 2001); (Brenner et al., 2005); (Duarte et al., 2010a); (Okada, 2012)
<u>Desulfatirhabdium</u>	-	0,01	0,39	0,27	Anaeróbia	-	-	-	+	-	-	-	(Brenner et al., 2005)
<u>Desulfobulbus</u>	0,05	0,08	0,21	0,17	Anaeróbia estrita	-	-	-	+	+	-	+	(Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<u>Desulfomonile</u>	0,01	0,20	3,11	4,47	Anaeróbia estrita	-	-	-	+	-	-	+	(Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<u>Desulfovibrio</u>	-	0,09	0,04	0,01	Anaeróbia	+	-	-	+	+	+	+	(Brenner et al., 2005); (Zellner et al., 1989); (Cook et al., 1998); (Duarte et al., 2010a)
<u>Gemmatimonas</u>	0,42	0,26	0,01	-	Aeróbia	-	-	-	-	-	-	+	(Krieg et al., 2010); (Okada, 2012)
<u>Geobacter</u>	0,31	1,74	2,33	3,90	Anaeróbia estrita	-	+	-	+	+	+	+	(Brenner et al., 2005); (Lara-Martín et al., 2007); (Carmona et al., 2009); (Delforno et al., 2012)
<u>Georgfuchsia</u>	-	0,47	0,01	-	Anaeróbia estrita	-	-	-	-	-	+	-	(Weelink et al., 2009)
<u>Geothrix</u>	0,01	0,04	0,01	0,02	Anaeróbia estrita	-	-	-	-	-	+	+	(Krieg et al., 2010); (Okada, 2012)
<u>Holophaga</u>	0,01	0,11	0,19	0,05	Anaeróbia	-	-	-	-	-	-	+	(Liesack et al., 1994); (de Oliveira et al., 2009); (Krieg et al., 2010); (Okada, 2012)
<u>Hydrogenophaga</u>	0,01	0,04	-	-	Aeróbia	+	-	-	-	+	-	+	(Dangmann et al., 1989); (Cook et al., 1998); (Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)

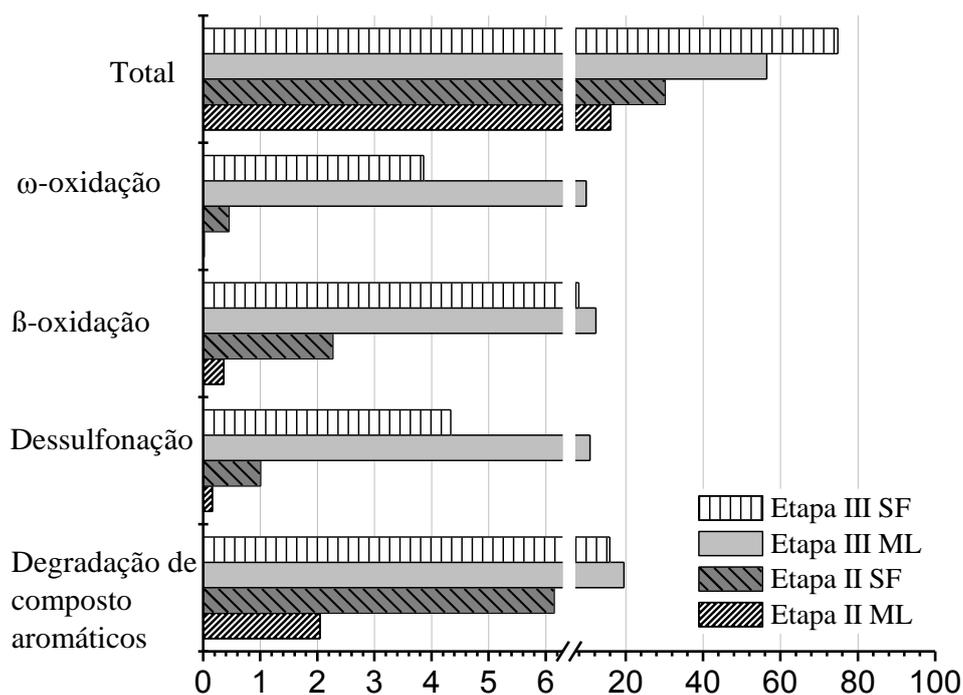


Figura 5.23: Abundância relativa do total de gêneros classificados, relacionados com ω -oxidação, β -oxidação, dessulfonação e degradação de compostos aromáticos.

Dentre os gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos observou-se ligeira predominância de microrganismos anaeróbios (Figura 5.24), principalmente para biomassa da Etapas III ML e SF. Todavia, com exceção da Etapa III ML observou-se predominância de microrganismos aeróbios. Em todas as amostras foram identificados raros microrganismos facultativos com capacidade de degradar compostos aromáticos. Como detalhado na avaliação temporal, durante a Etapa III houve oxigenação do sistema que pode ter favorecido o desenvolvimento de microrganismos aeróbios. Embora, todos os esforços tenham sido realizada para garantir a anaerobiose do sistema baixa difusão de oxigênio pode ter ocorrido pela recirculação.

Por meio da análise dos gêneros identificados verificou-se que a maioria deles foi relacionada com a degradação de compostos aromáticos. Além disso, em relação a receptores de elétrons a maioria foi relacionada a compostos de nitrogênio (nitrificação e desnitrificação), seguido de compostos de enxofre e redução não assimilativa de Ferro. Ressalta-se que durante a caracterização da água de lavanderia alguns desses compostos estavam presentes.

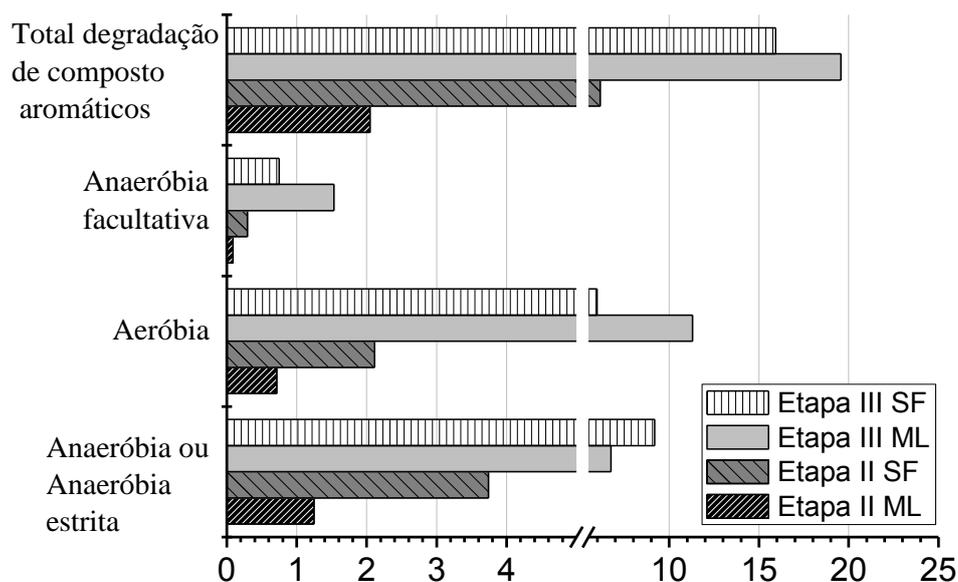


Figura 5.24: Abundância relativa do total de gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos e de crescimento aeróbio, anaeróbio e anaeróbio facultativo.

Acinetobacter, *Comamonas*, *Desulfobulbus*, *Desulfomonile*, *Geobacter*, *Geothrix*, *Holophaga*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Sporomusa*, *Stenotrophomonas*, *Sulfuritalea* e *Syntrophorhabdus* são relacionados com a degradação de compostos aromáticos (Brenner *et al.*, 2005) e foram identificados nas quatro amostras. Tal resultado reforça a existência de núcleo microbiológico em comum entre as quatro amostras, por conseguinte, a participação desses microrganismos no metabolismo do LAS. Ressalta-se que com exceção de *Sulfuritalea*, os demais generos já foram identificados em trabalhos relacionados com a degradação do LAS. Dessa forma estes gêneros serão detalhados a seguir.

➤ *Desulfobulbus*, *Desulfomononile* e *Sulfuritalea* – gêneros relacionados com o ciclo do enxofre, Gram negativo e anaeróbios estritos. Abundância relativa de 0,003- 4,47 % das sequências. *Desulfobulbus* pode utilizar propionato, piruvato e lactato (Brenner *et al.*, 2005). Na água de lavanderia foi detectada elevada concentração de sulfato e ácido láctico. *Sulfuritalea* está relacionada com a oxidação de compostos de enxofre, como tiosulfato; espécie como: *S. hydrogenivorans* utilizam benzoato e ácido láctico como fonte de carbono (Brenner *et al.*, 2005).

➤ *Acitenobacter*, *Comamonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* – são organismos relacionados com o ciclo do nitrogênio e aeróbios. São organismos Gram negativos com exceção de *Mycobacterium* que é Gram positivo.

Representantes desses gêneros utilizam infinidade de ácidos orgânicos voláteis como fonte de carbono, assim como álcoois e compostos aromáticos (Brenner *et al.*, 2005). Apenas *Pseudomonas* realiza β e ω -oxidação. Enquanto a capacidade metabólica de dessulfonação é observada, tanto em *Pseudomonas*, como *Comamonas* (Brenner *et al.*, 2005). Kertesz *et al.*, 1994 relataram que *Pseudomonas putida* realizou a dessulfonação de LAS além de degradar compostos como tolueno, benzoato e hidroxibenzoatos. Por outro lado, *Comamonas* podem degradar PAH (hidrocarboneto aromático policíclico) e sulfobenzoatos (Schleheck *et al.*, 2004a; Brenner *et al.*, 2005).

➤ *Geobacter* e *Geothrix* – são microrganismos relacionados com o ciclo do ferro, anaeróbios estritos e Gram negativos. Além de ferro, *Geobacter* pode utilizar nitrato e enxofre e, realizam a β -oxidação. Muitas espécies desse gênero estão relacionadas com a degradação de benzeno, benzaldeído, fenol com produção de CO₂. Representantes semelhantes a *Geothrix*, também, podem utilizar nitrato com receptor final de elétrons e espécies como *G. fermentans* podem utilizar ácidos orgânicos (acetato e lactato), além de tolueno como fonte de carbono (Carmona *et al.*, 2009; Brenner *et al.*, 2005).

➤ *Holophaga* – são microrganismos anaeróbios e mesofílicos, Gram negativos, e quimioorganotróficos, com capacidade de fermentar trimetoxibenzoatos e trihidroxibenzenos (Liesack *et al.*, 1994).

➤ *Rhodopseudomonas* – são microrganismos anaeróbios facultativos, Gram negativos com capacidade de degradar benzoatos. Além disso, podem realizar β -oxidação (Brenner *et al.*, 2005).

➤ *Sporomusa* - são microrganismos anaeróbios, homoacetogênicas e Gram negativos, com capacidade metabólica de metoxilação de compostos aromáticos e degradação de trimetoxibenzoatos (Vos *et al.*, 2009).

➤ *Syntrophorhabdus* – são microrganismos anaeróbios que realizam oxidação sintrófica de composto aromáticos, como benzoato (Brenner *et al.*, 2005).

5.3.3 Considerações Parciais

Com base na Hipótese B, a alimentação do reator EGBS sem meio sintético e apenas com água residuária de lavanderia, não resultou em instabilidade do sistema e baixas remoções de LAS e DQO. Na realidade os valores de remoção de LAS foram superiores aos reatores suplementados com meio sintético para a mesma CLE. Dessa

forma, a remoção de LAS foi de $92,9 \pm 10,3$ % na Etapa II, enquanto que nos reatores suplementados com meio sintético observou-se entre 15 – 17% a menos (EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I). Desse modo, a adição de meio sintético não foi necessário para a remoção de LAS em água residuária de lavanderia e que, provavelmente, dentre os constituintes do meio sintético a ausência de fonte de carbono (COE) foi favorável para elevada remoção de LAS.

Em relação à Etapa III em que houve aumento da CLE para $2,7 \pm 0,7$ mg.gVS⁻¹.d⁻¹ observou-se diminuição da remoção de LAS para $57,4 \pm 26,6$ %. A principal hipótese foi devido ao aumento da toxicidade do LAS e outros compostos presentes na água de lavanderia que podem ter afetado a microbiota. Esse argumento é corroborado pela diminuição da remoção de DQO em 13 % (Etapa II - 61 ± 15 % e Etapa III - 48 ± 19 %) e diminuição dos estimadores de riqueza Chao1 e Rarefação, tanto para amostras do separador de fase, quanto da manta de lodo.

Embora, o EGSB seja considerado de mistura completa, verificou-se a partir da análise das bandas do DGGE para as amostras retiradas ao longo do reator, modificações nas populações de bactérias, em função do local de amostragem. Dessa forma, biomassa na forma floculenta, sem estrutura granular definida (separador de fase e ponto 4) foram mais similares entre si, em relação aquelas com arranjo na forma de grânulos bem definidos (Ponto 2 e 3).

A partir do sequenciamento massivo do gene rRNA 16S notou-se que de 16-70 % das sequências foram classificadas até gênero. No total foram obtidos 175 gêneros distintos dos quais 33 foram relacionados com a degradação de LAS e/ou compostos aromáticos correspondendo de 2,0 - 19,5 % do total das sequências obtidas nas amostras. As maiores porcentagens foram obtidas na Etapa III (15,9-19,6 %), em que houve aumento da CLE em relação a Etapa II (2,0-6,1 %). Notou-se que o maior número de sequências foram obtidas na Etapa III em que houve aumento da CLE para $2,7 \pm 0,7$ mgLAS/gVS.d (Etapa II: $1,0 \pm 0,3$ mgLAS/gVS.d), embora acompanhado por diminuição de aproximadamente 30 % da remoção de LAS. Dessa forma, acredita-se que as condições impostas na Etapa III favoreceram a manutenção de microrganismos principalmente relacionados com a utilização de compostos aromáticos.

5.4 Hipótese C e D - Reatores Suplementados com Ferro

A seguir serão apresentados os resultados obtidos dos reatores suplementados com Fe(III), bem como, a caracterização filogenética da biomassa desses sistemas e aquela usada como inóculo comum entre eles.

Para avaliar a influencia da suplementação com Fe (III) na degradação de LAS padrão (hipótese C) foi utilizado um EGSB operado em etapa única (EGSB-Fe) por 127 dias. Para tanto, esse reator foi alimentado com meio sintético que consistiu em meio mineral modificado, solução de vitaminas, co-substratos (extrato de levedura, metanol e etanol), bicarbonato de sódio, EDTA-Fe e LAS padrão (Tabela 4.8 e Tabela 5.13). Os parâmetros aplicados nesse reator foram semelhantes aqueles do EGSB-BA Etapa I (Hipótese A), nesse caso, sem suplementação de Fe(III).

Para avaliação da influencia da suplementação com Fe (III) na degradação de LAS em água residuária de lavanderia (Hipótese D) foi utilizado um EGSB-Fe-Ag.Lav operado em etapa única por 78 dias. Para tanto, esse reator foi alimentado apenas com bicarbonato de sódio, água residuária de lavanderia e EDTA-Fe (Tabela 4.9 e Tabela 5.13). Condições semelhantes foram aplicadas ao reator EGSB-Ag.Lav Etapa III (Hipótese B) e, portanto, os resultados foram comparados entre si.

Tabela 5.13: Comparação dos parâmetros operacionais aplicados em reatores suplementados com ferro (EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav) e sem ferro (EGSB-BA Etapa II, Hipótese A) e (EGSB-Ag.Lav Etapa II, Hipótese B)

	EGSB-BA Etapa I	EGSB-Fe	EGSB-Ag.Lav Etapa III	EGSB- Fe-Ag.Lav
Alimentação				
Etanol (mg DQO/L)	250	250	-	-
Metanol (mg DQO/L)	250	250	-	-
Extrato de Levedura (mg DQO/L)	250	250	-	-
Vitaminas [○]	+	+	-	-
Meio Mineral Modificado [■]	+	+	-	-
Água Residuária de Lavanderia (mg DQO/L)	-	-	237 ± 114	399 ± 113
Carga Orgânica Específica Aplicada (mg DQO/g STV.d)	71±13	107 ± 42	21 ± 11	34 ± 16
Bicarbonato de Sódio (g/L)	0,4	0,8	0,4	0,8
LAS				
Afluente (mg/L)	13,2±2,3 [▲]	16,4 ± 6,8 [▲]	28,8 ± 6,5 [□]	24,4 ± 8,9 [□]
Carga de LAS específica (mg LAS.gSTV ⁻¹ .d ⁻¹)	1,2±0,2	1,5 ± 0,7	2,7 ± 0,7	2,2 ± 0,9
Fe(III) Total (µMol/L) [♦]				
Afluente	-	7276 ± 2525	-	3624 ± 1131
TDH (horas)	37,7	36 ± 7	39 ± 5	40 ± 5
Duração (dias)	218	127	158	78

- Tabela 4.2 ■ Tabela 4.1 ▲ Adicionado LAS Padrão Sigma-Aldrich
 □ Adicionado água de lavanderia em função da concentração de LAS
 ♦ Adicionado na forma de EDTA-Fe(III)

A caracterização filogenética da biomassa dos reatores suplementados com Fe(III) foi realizada por meio do sequenciamento da região 16S do rRNA via plataforma Ion Torrent. Para tanto, foram retiradas amostras compostas, contendo biomassa, tanto do separador de fases, como da manta de lodo, ao final de operação do EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav e, uma amostra do lote do inóculo comum entre esses reator.

5.4.1 Hipótese C - Avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS padrão em EGSB

Em reator EGSB-Fe aplicou-se carga orgânica específica (COE) de 108 ± 42 mgDQO/gVS.d e 1.109 ± 398 mg/L de DQO afluente, obtendo-se remoção de 53 ± 22 % (Tabela 5.14). Verificou-se 671 ± 282 mg HAC/L afluente que equivaleu a 718 ± 302 mg DQO/L; ou seja, do total de DQO determinada (1.109 ± 398 mg/L), aproximadamente 65 % correspondeu a álcoois e ácido orgânicos voláteis. Os principais

álcoois observados no afluente foram metanol (209 mg/L) e etanol (160 mg/L). Em relação aos ácidos orgânicos observou-se ácido acético (7,5 mg/L) e ácido propiônico (0,96 mg/L). Por outro lado, observou-se 607 ± 333 mg/L de DQO efluente e 160 ± 382 mgHAc/L. Os ácidos predominantes observados foram ácido acético (23,4 mg/L) e ácido propiônico (4,1 mg/L). Ressalta-se que a alimentação desse reator era suplementada com meio sintético com diferentes fontes de carbono, tais como, extrato de levedura, metanol, etanol e LAS.

Para o EGSB-BA Etapa I (parâmetros operacionais similares) verificou-se 92 ± 3 % de remoção de DQO, para COE de 71 ± 13 mg DQO/g STV.d. Notou-se $11,4 \pm 13,5$ mg HAc/L efluente; ou seja, valor bem menor ao obtido para EGSB-Fe (160 ± 382 mgHAc/L). Provavelmente, a maior carga orgânica (108 ± 42 mgDQO/gVS.d) em EGSB-Fe resultou em maior geração de ácidos orgânicos voláteis, os quais não foram totalmente metabolizados pelos microrganismos.

Obteve-se 7,2 – 7,3 de pH afluente e efluente. O mesmo foi observado para alcalinidade parcial (352 – 458 mg CaCO₃/L) e total (507 – 612 mg CaCO₃/L), cujos valores menores foram obtidos para o efluente.

Tabela 5.14: Resultados dos parâmetros analisados em EGSB-Fe.

Parâmetros	EGSB-Fe Etapa I
DQO	
Afluente (mg/L)	1109 ± 398
Efluente (mg/L)	607 ± 333
Remoção (%)	53 ± 22
Carga Orgânica Específica Aplicada (mgDQO/gVS.d)	108 ± 42
LAS	
Afluente (mg/L)	<i>LAS Padrão</i> 16,4 ± 6,8
Efluente (mg/L)	2,9 ± 2,5
Remoção (%)	84,3 ± 12,6
Carga Específica Aplicada (mg/gVS.d)	1,5 ± 0,7
Remoção Específica (mg/gVS.d)	1,1 ± 0,5
Alcalinidade Parcial (mg CaCO₃/L)	
Afluente	458 ± 64
Efluente	352 ± 95
Alcalinidade Total (mg CaCO₃/L)	
Afluente	612 ± 89
Efluente	507 ± 109
*AOV (mg HAc/L)	
Afluente	671 ± 282
Efluente	160 ± 382
pH	
Afluente	7,3 ± 0,2
Efluente	7,2 ± 0,3
Sulfeto	
	-
**Biomassa Final – ML (g/L)	
Sólidos Totais	7,5
Sólidos Totais Voláteis	4,9
**Biomassa Final – SF (g/L)	
Sólidos Totais	3,8
Sólidos Totais Voláteis	1,9
Ferro Total (µMol/L)	
Afluente	7276 ± 2525
Efluente	6197 ± 1887
Ferro II (µMol/L)	
Afluente	682 ± 901
Efluente	4572 ± 2269
Redução Efluente (%)	64 ± 22
Duração (dias)	
	127
TDH (horas)	
	36 ± 7

*AOV – ácidos orgânicos voláteis

**biomassa presente dentro do reator ao final da operação

ML - manta de lodo; SF - separador de fases

Em relação à concentração de sólidos no início e final da operação notou-se diminuição de 1 g/L de ST na biomassa da manta de lodo. Enquanto, na região do

separador de fases verificou-se acúmulo de 3,8 g/L de ST. Dessa forma, para todo o sistema verificou-se aumento de 32 % dos ST (8,5 g/L – inicial; 11,3 g/L – final). A biomassa inicialmente despreendida da região da manta de lodo ficou depositada no separador de fases.

Verificou-se $16,4 \pm 6,8$ mg/L de LAS afluyente que resultou em carga de LAS específica (CLE) aplicada de $1,5 \pm 0,7$ mg/gVS.d (Figura 5.25). Em relação ao LAS efluente observou-se $2,9 \pm 2,5$ mg/L e valor máximo de 7,5 mg/L. A remoção de LAS observada foi de $84,3 \pm 12,6$ %.

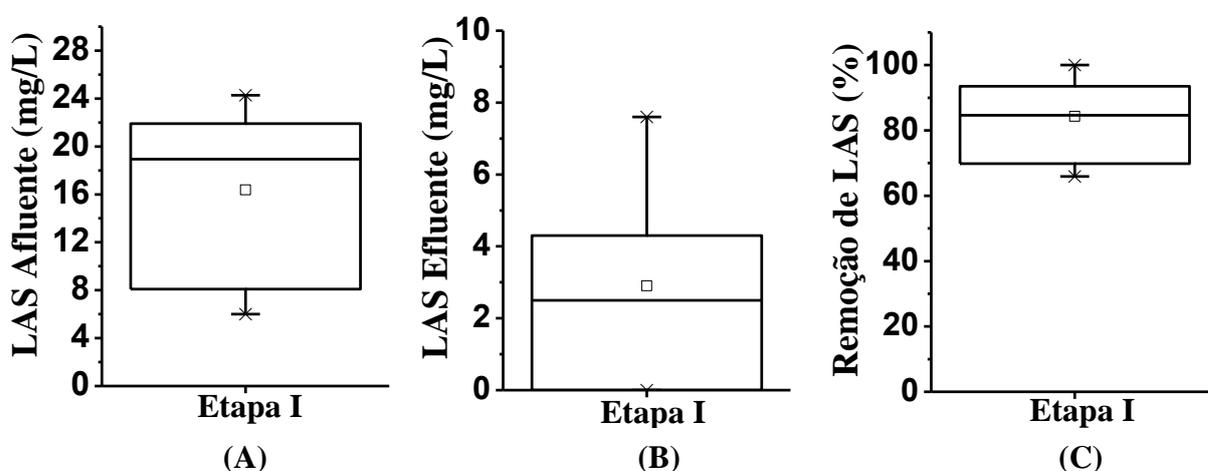


Figura 5.25: *Box-Plot* de LAS afluyente (A), efluente (B) e porcentagem de remoção de LAS (C) da Etapa I (23 amostras).

Ressalta-se que para o reator EGSB-BA Etapa I (Hipótese A; sem suplementação de Fe afluyente) verificou-se remoção de $63,5 \pm 10,3$ % para CLE de $1,2 \pm 0,2$ mg/gVS.d, e $13,2 \pm 2,3$ mg/L de LAS afluyente. Ou seja, comparando-se os resultados de remoção de LAS do EGSB-Fe e EGSB-BA (Etapa I – LAS Padrão) a suplementação com Fe(III) resultou em acréscimo de 20 % nas remoções de LAS para parâmetros operacionais semelhantes (Tabela 5.15). Tais resultados reforçam a hipótese de que a suplementação com Fe(III) contribuiu para o aumento das remoções de LAS Padrão. Além disso, nas análises de biologia molecular verificou-se a predominância de *Geobacter* sp. (17 % de abundância relativa) responsável pela degradação de LAS e redução do Fe(III). Cabe ressaltar que COE do EGSB-Fe foi de 108 ± 42 mgDQO/gVS.d, ou seja, 52 % a mais que aquela aplicada em EGSB-BA Etapa I. Por meio dessa análise é possível inferir que mesmo com COE elevada, a remoção de LAS foi superior, contrariando aquilo previamente reportado por Okada (2012) para UASB e

também para EGSB (Hipótese B) desse trabalho. Todavia, ressalta-se que os reatores operados por Okada (2012) e os reatores operados na avaliação da Hipótese B não foram suplementados com ferro.

Tabela 5.15: Comparação dos resultados EGSB-BA Etapa I e EGSB-Fe.

	EGSB-BA Etapa I	EGSB-Fe
Parâmetros		
Água Residuária de Lavanderia (mg DQO/L)	-	-
Carga Orgânica Específica (mg DQO/g STV.d)	71±13	108 ± 42
Carga de LAS específica (mg LAS.gSTV ⁻¹ .d ⁻¹)	1,2±0,2	1,5 ± 0,7
Fe(III) Total Afluente (µMol/L)	-	7276 ± 2525
Resultados		
Remoção de DQO (%)	92 ± 3	53 ± 22
Remoção de LAS (%)	63,5 ± 10,3	84,3 ± 12,6
Redução de Fe (%)	-	64 ± 22
pH Efluente	7,0 ± 0,1	7,2 ± 0,3
Sulfeto (mg S /L)	-	-
AOV Efluente (mg/L)	11,4 ± 13,5	160 ± 382

As concentrações de Ferro Total afluente e efluente observadas foram de $7.276 \pm 2.525 \mu\text{Mol/L}$ e $6.197 \pm 1.887 \mu\text{Mol/L}$, respectivamente. Sob tal possibilidade é possível inferir que o ferro não ficou retido no sistema e a maioria da redução ocorreu de forma não assimilativa (Figura 5.26); ou seja, o Fe(III) foi utilizado como receptor externo de elétrons para oxidar a matéria orgânica. Para tanto, é necessário o contato do Fe(III) com a membrana celular dos DIRM (dissimilatory iron reduction microbe; Microrganismos que reduzem ferro de forma não-assimilável). Ressalta-se que a recirculação efluente, com alta velocidade ascensional potencializou esse contato e, conseqüentemente, o processo como um todo. Todavia, a alta velocidade ascensional predispõe o sistema à oxigenação. Como detalhado no Item 3.4 e p.36, o ciclo redox do Fe é muito dinâmico, ou seja, o Fe(III) pode reduzir a Fe(II) no interior do reator por via química ou biológica. Em contrapartida, Fe(II) pode novamente ser oxidado a Fe(III), por exemplo, pela oxigenação (O_2) do sistema tornando assim, disponível novamente para a redução química/biológica. Esse processo é diferente do que ocorre com compostos nitrogenados receptores de elétrons que podem ser retirados do sistema na

forma de N_2 ou compostos de enxofre que podem ser retirados do sistema na forma de H_2S .

Em relação ao Ferro II obteve-se $682 \pm 901 \mu\text{Mol/L}$ e $4.572 \pm 2.269 \mu\text{Mol/L}$ para afluente e efluente, respectivamente. O valor de Fe(II) afluente, embora baixo, deveu-se, provavelmente a fermentação do meio sintético do reator, mesmo acondicionado a 10°C . Provavelmente, a fermentação do afluente estava associada com a redução de Ferro (III). Por outro lado, verificou-se valores de Fe(II) efluente superiores. Provavelmente, a redução férrica ocorreu no interior do reator EGSB. A média de redução foi de $64 \pm 22 \%$. Ressalta-se que não havia fonte de sulfato expressiva e, portanto, não foi detectado sulfeto no efluente. A avaliação de sulfeto efluente é necessária para destacar uma possível redução abiótica do Fe(III).

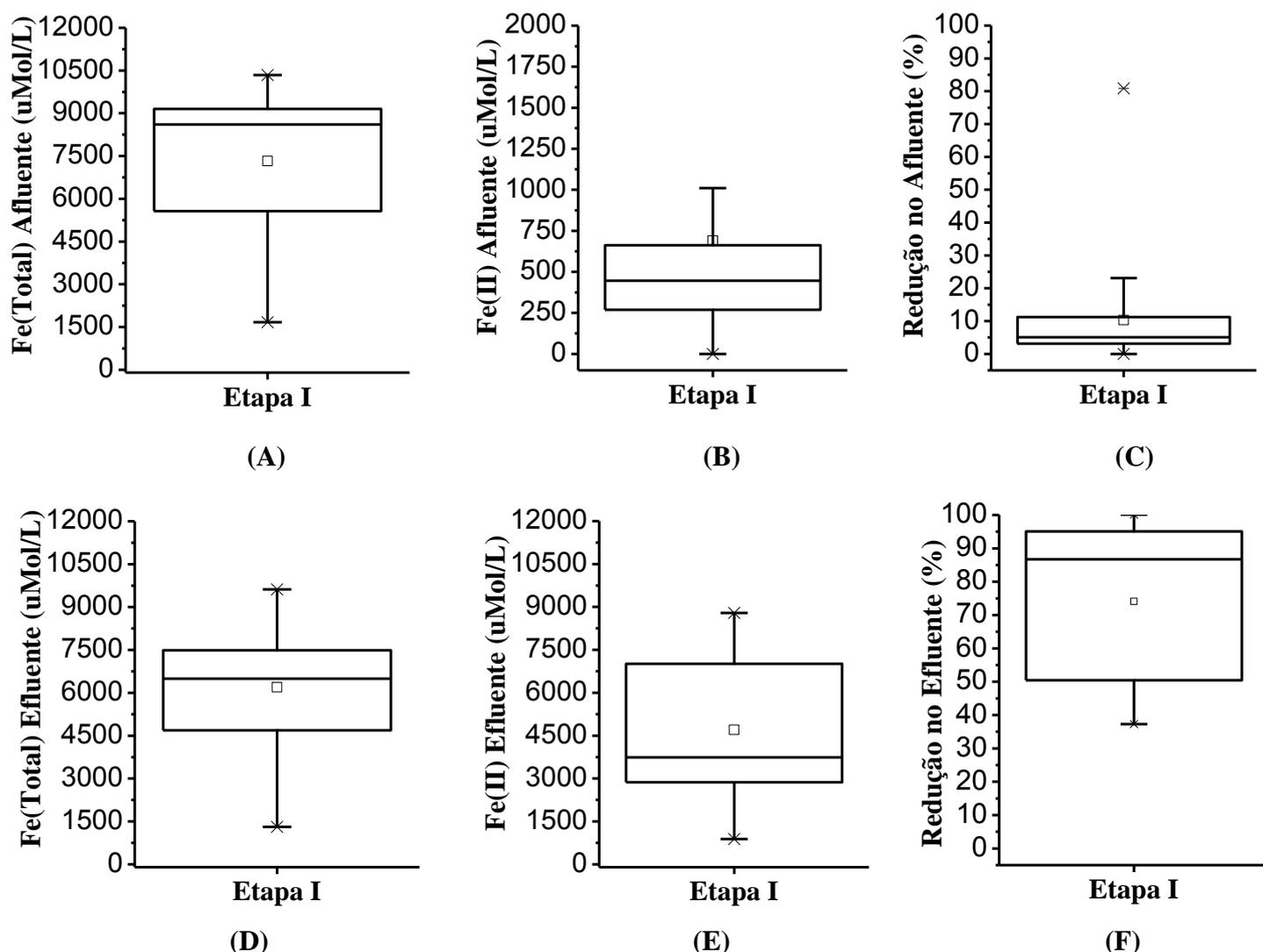


Figura 5.26: *Box-Plot* da concentração de Fe(Total) (A, D), Fe(II) (B, E) e porcentagem de redução (C, F) no afluente e efluente (28 amostras).

Na Figura 5.27 é possível visualizar a variação temporal da relação Fe(II) e Fe(Total) no afluente e efluente, associado com a concentração de LAS afluente e a porcentagem de remoção. Como citado anteriormente, baixa redução férrica foi observada no afluente. Com exceção do 22º dia de operação, em que 80 % do Fe(Total) adicionado foi reduzido no afluente, observou-se que os demais valores não ultrapassaram 20 %.

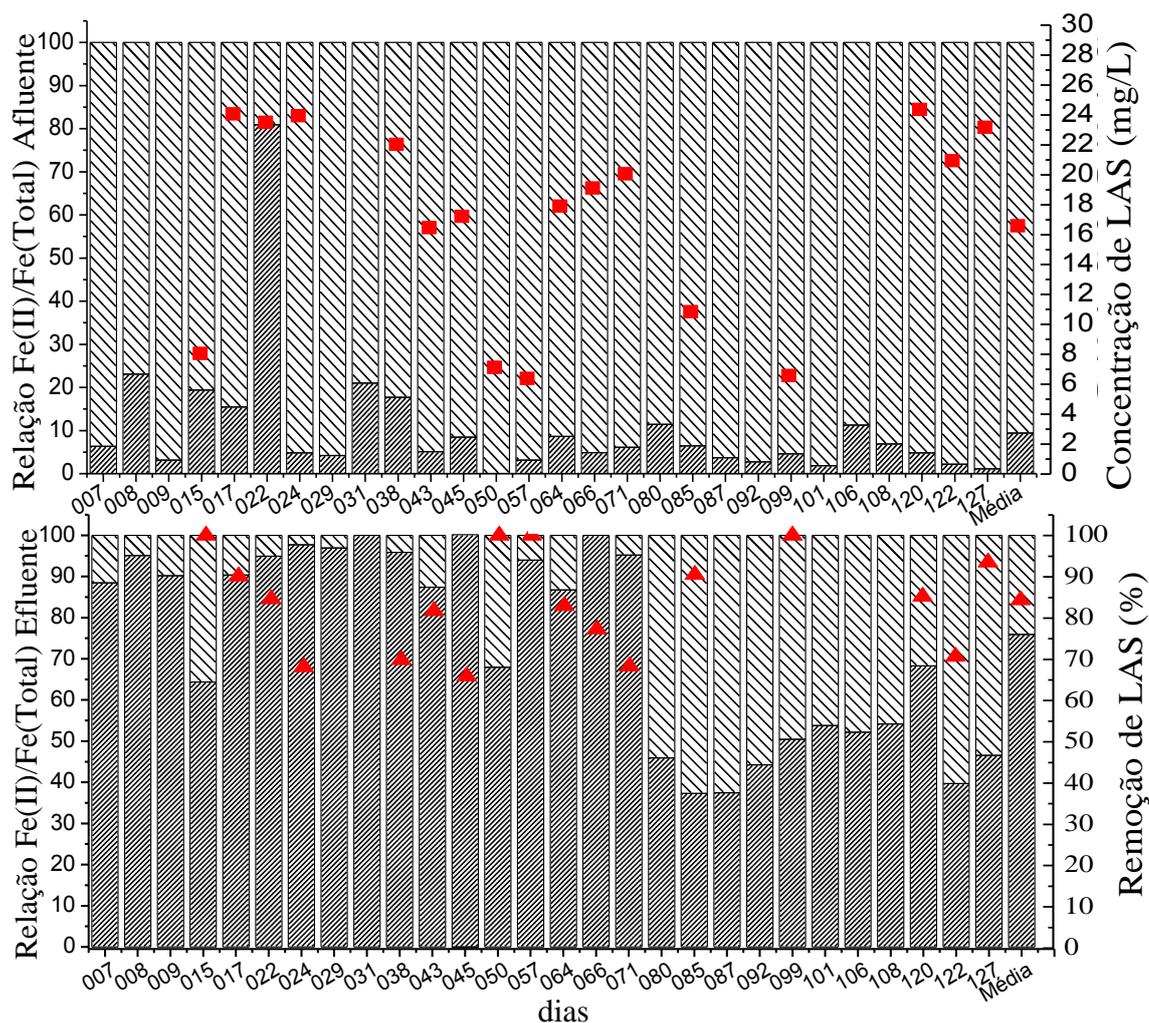


Figura 5.27: Variação temporal da relação Fe(II;  e Fe(Tota ) afluente e efluente. (■) Concentração de LAS afluente e (▲) porcentagem de remoção.

A redução do Fe(III) não pode ser relacionada diretamente com a oxidação do LAS, uma vez que, outros compostos orgânicos podem ser utilizados como doadores de elétrons. Dessa forma, foi possível notar que as maiores remoções de LAS nem sempre estavam associadas com as maiores reduções de Fe(Total). Todavia, notou-se que em

todos os dias (15°, 50°, 57° e 99°) em que o LAS afluyente ficou abaixo de 10 mg/L as remoções foram acima de 90 %.

O balanço de massa de LAS foi realizado ao final da operação do reator, ou seja, ao final de 127 dias de operação. No total foram adicionados 1.468 mg de LAS no reator. A parcela de LAS relacionada à degradação biológica foi de 71 % (Tabela 5.16 e Figura 5.28). Ressalta-se que a parcela de LAS adsorvido foi de 8 % na manta de lodo e 3 % na biomassa do separador de fases.

Tabela 5.16: Balanço de massa de LAS do EGSB-Fe.

	EGSB-Fe	
	mg LAS	%
Adicionado no reator	1.468	-
Recuperado no Efluente	264	18%
Degradação Biológica	1.043	71%
Adsorvido Manta de Lodo	122	8%
Adsorvido Separador de Fase	39	3%

Por outro lado, no EGSB-BA Etapa I foram adicionados 2.313 mg LAS dos quais 56 % foram relacionados à degradação biológica, 8 % adsorvidos na manta de lodo e 1 % na biomassa do separador de fases.

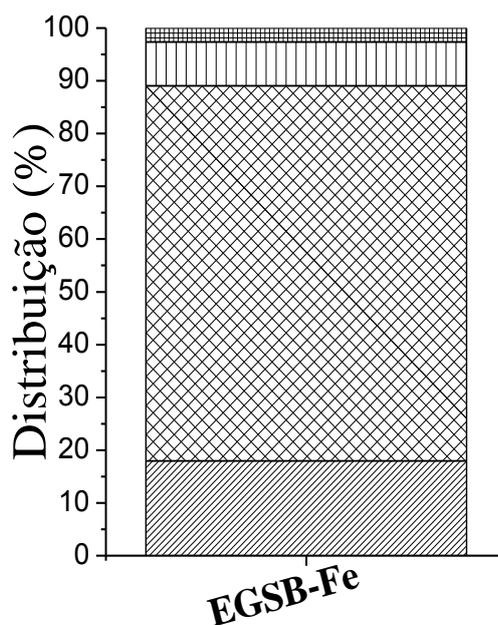


Figura 5.28: Distribuição do destino final de LAS em EGSB-Fe.

5.4.2 Hipótese D - Avaliação da influência da suplementação com Fe(III) na degradação do LAS em água residuária de lavanderia em EGSB

Com detalhado na Tabela 5.13 o EGSB-Fe-Ag.Lav foi alimentado exclusivamente com água residuária de lavanderia comercial acrescido de bicarbonato de sódio e EDTA-Fe. Dessa forma, aplicou-se DQO afluente de 399 ± 160 mg/L que resultou em COE de 34 ± 16 mgDQO/gVS.d (Tabela 5.17). Ressalta-se que essa DQO foi relacionada aos ácidos orgânicos voláteis, material fibroso, LAS e outros composto recalcitrantes da água residuária de lavanderia. Verificou-se os seguintes ácidos orgânicos voláteis: ácido acético ($20,2 \pm 7,7$ mg/L), ácido butírico ($17,3 \pm 0,18$ mg/L) e ácido isovalérico ($11,9 \pm 8,3$ mg/L). Ao todo a concentração de AOV em equivalente em ácido acético foi de 109 ± 33 mg HAc/L no afluente. Verificou-se 177 ± 97 mg/L para DQO efluente e 56 ± 29 % de remoção. Observou-se 61 ± 17 mg HAc/L, com destaque para os ácidos acético ($18,5 \pm 3,5$ mg/L), butírico ($10,7 \pm 8,8$ mg/L) e capróico ($7,8 \pm 3,15$ mg/L).

Em relação aos valores de pH afluente e efluente verificou-se ligeira diferença; ou seja, $7,5 \pm 0,2$ para afluente e $8,0 \pm 0,3$ para efluente. Por outro lado, os resultados de alcalinidade, tanto afluente, como efluente foram semelhantes, sendo $517 - 530$ mg CaCO_3 /L para a alcalinidade parcial e $657 - 698$ mg CaCO_3 /L para a alcalinidade total.

Em relação aos ST da biomassa do reator notou-se aumento global (manta de lodo + biomassa do separador de fases) de 60 % (Inicial – 8,5 g/L; Final – 13,4 g/L), todavia, com diminuição da relação SV/ST. No início da operação do reator essa relação era de 0,81, enquanto no final da operação observou-se 0,53. Ou seja, notou-se manutenção de SV (inicial: 6,9 g/L e final: 7,3 g/L), enquanto, ST aumentou de forma mais acentuada. Destaca-se que a concentração de SV tem relação direta com quantidade de microrganismos no sistema, ao passo que, o aumento de ST pode estar relacionado com o aumento de compostos inorgânicos, como o Ferro.

Tabela 5.17: Resultados dos parâmetros analisados em EGSB-Fe-Ag.Lav.

Parâmetros	EGSB-Fe-Ag.Lav. Etapa I
DQO	
Afluente (mg/L)	399 ± 160
Efluente (mg/L)	177 ± 97
Remoção (%)	56 ± 29
Carga Orgânica Específica Aplicada (mgDQO/gVS.d)	34 ± 16
LAS	<i>Ag. Lav.</i>
Afluente (mg/L)	24,5 ± 8,9
Efluente (mg/L)	2,0 ± 1,7
Remoção (%)	91,2 ± 7,3
Carga Específica Aplicada (mg/gVS.d)	2,2 ± 0,9
Remoção Específica (mg/gVS.d)	1,8 ± 0,9
Alcalinidade Parcial (mg CaCO ₃ /L)	
Afluente	530 ± 78
Efluente	517 ± 77
Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ /L)	
Afluente	689 ± 106
Efluente	657 ± 110
*AOV (mg HAc/L)	
Afluente	109 ± 33
Efluente	61 ± 17
pH	
Afluente	7,5 ± 0,2
Efluente	8,0 ± 0,3
Sulfeto	±
**Biomassa Final – ML (g/L)	
Sólidos Totais	8,8
Sólidos Totais Voláteis	4,8
**Biomassa Final – SF (g/L)	
Sólidos Totais	4,6
Sólidos Totais Voláteis	2,7
Ferro Total (µMol/L)	
Afluente	3624 ± 1131
Efluente	3476 ± 1038
Ferro II (µMol/L)	
Afluente	280 ± 435
Efluente	356 ± 469
Redução Efluente (%)	10 ± 13
Duração (dias)	78
TDH (horas)	40 ± 5

*AOV – ácidos orgânicos voláteis

**biomassa da manta de lodo e separador de fases ao final da operação

ML - manta de lodo; SF - separador de fase

Em relação ao LAS observou-se $24,5 \pm 8,9$ mg/L afluente com valores mínimos e máximos de 10 mg/L e 45 mg/L, respectivamente (Figura 5.29). A CLE média

aplicada foi de $2,2 \pm 0,9$ mg/gVS.d. Verificou-se que no efluente a concentração de LAS não foi superior a 6 mg/L com média de $2,0 \pm 1,7$ mg/L. Os valores de remoção obtidos variaram entre 75-100 %, com média de $91,2 \pm 7,3$ %.

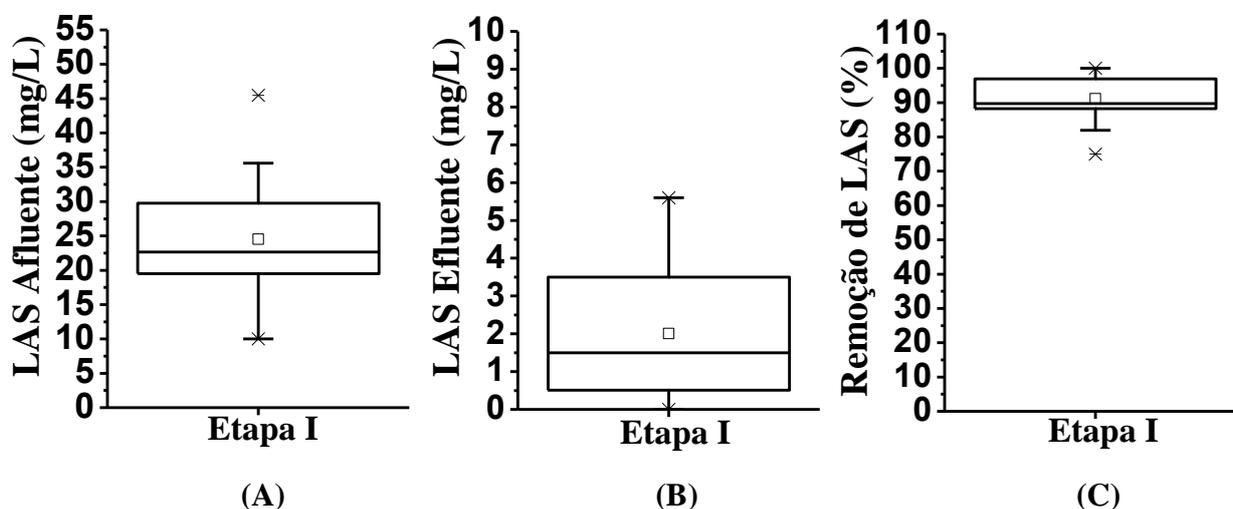


Figura 5.29: *Box-Plot* da concentração de LAS afluente (A), efluente (B) e porcentagem de remoção de LAS (C) da Etapa I (16 amostras) para o reator EGSB-Fe-Ag.Lav.

Em relação à concentração de ferro total verificou-se 3.624 ± 1.131 e 3.476 ± 1.038 $\mu\text{Mol/L}$ no afluente e efluente, respectivamente (Tabela 5.17 e Figura 5.30). Observou-se que esses valores eram 50 % inferior as concentrações aplicadas em EGSB-Fe, uma vez que, a porcentagem de redução em EGSB-Fe-Ag.Lav foi baixa. Em relação à concentração de Fe(II) observou-se 280 ± 435 e 356 ± 469 $\mu\text{Mol/L}$ no afluente e efluente, respectivamente. Sob tais condições obteve-se redução de ferro de 10 ± 13 %, bem abaixo daquela observada em EGSB-Fe (63 ± 31 %). É importante salientar que o EGSB-Fe-Ag.Lav não foi suplementado com macro/micro nutrientes, extrato de levedura, metanol e etanol. Ou seja, a DQO afluente do EGSB-Fe-Ag.Lav correspondeu apenas aos compostos presentes na água de lavanderia.

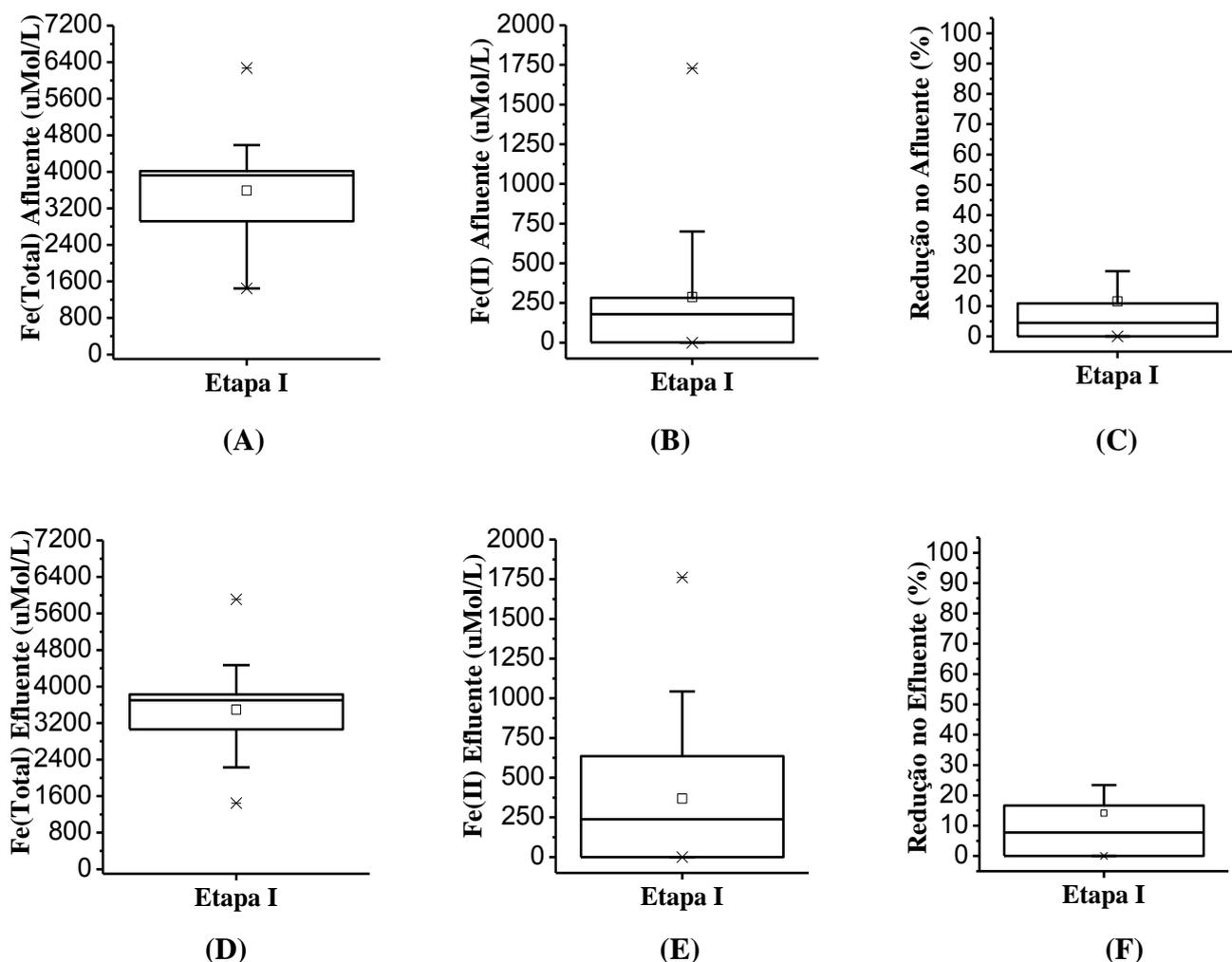


Figura 5.30: Box-Plot da concentração de Fe(Total) (A, D), Fe(II) (B, E) e porcentagem de redução (C, F) afluente e efluente (28 amostras) do EGSB-Fe-Ag.Lav.

Dessa forma, a baixa disponibilidade de compostos orgânicos e/ou a prevalência de compostos recalcitrantes para serem doadores de elétrons na redução férrica, podem ter resultado na baixa redução férrica observada. Além disso, a ausência de macro/micronutrientes pode ter limitado o desenvolvimento de microrganismos redutores de ferro. Essa observação é corroborada pela abundância relativa dos gêneros relacionados com a redução férrica (Ítem 5.4.3 p.145). Enquanto, em EGSB-Fe, 17 % das sequências foram relacionados a *Geobacter* sp., em EGSB-Fe-Ag.Lav foram apenas 5 %. Como observado por Braga e Varesche (2014), faz parte da composição da água de lavanderia outros compostos tóxicos e recalcitrantes, tais como, solventes, fragrâncias, conservantes, produtos desinfetantes, repelentes de insetos e antioxidantes. Dessa forma, a combinação da ausência da suplementação com macro/micronutrientes e compostos orgânicos facilmente degradáveis, e, a presença de compostos recalcitrantes

em água de lavanderia podem ter corroborado para o não favorecimento de microrganismos redutores de ferro.

Por outro lado, quando comparou-se as remoções de LAS em EGSB-Fe-Ag.Lav (suplementado com ferro) e EGSB-Ag.Lav Etapa III (sem suplementação com ferro) com CLE semelhantes verificou-se que a maior média de remoção ocorreu no reator suplementado com ferro (Tabela 5.18). Obteve-se para EGSB-Ag.Lav Etapa III $58,6 \pm 25,8$ % de remoção de LAS, para CLE de $2,7 \pm 0,7$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹. Enquanto, para o EGSB-Fe-Ag.Lav a porcentagem de remoção de LAS obtida foi de $91,2 \pm 7,3$ % para CLE de $2,2 \pm 0,9$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹. Inicialmente, esses resultados podem ser considerados contraditórios, uma vez que, verificou-se para o EGSB-Fe-Ag.Lav baixa redução férrica (<10 %) e, dessa forma, esse aumento de 32,6 % na remoção de LAS não pode ser totalmente atribuído a suplementação com ferro. Porém, ao analisar a CLE dos dois reatores observou-se diferença estatística ($p < 0.05$, ANOVA seguido teste Tukey) e, conseqüentemente, efeitos inibitórios distintos. Além disso, em EGSB-Ag.Lav. foram realizadas duas etapas de operação, a Etapa II (CLE de $1,0 \pm 0,3$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹) com 65 dias de operação para, então, iniciar a Etapa III (CLE de $2,7 \pm 0,7$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹) com duração de 158 dias. Cabe ressaltar que durante a Etapa III houve alguns problemas, tais como, oxigenação do sistema e elevada concentração de sulfeto efluente (Ítem 5.3.1; Figura 5.12).

Tabela 5.18: Comparação dos resultados em EGSB-Ag.Lav Etapa III e EGSB-Fe-Ag.Lav.

	EGSB-Ag.Lav Etapa II	EGSB- Fe-Ag.Lav
Parâmetros		
Água Residuária de Lavanderia (mg DQO/L)	237 ± 114	399 ± 113
Carga Orgânica Específica (mg DQO/g STV.d)	21 ± 11	34 ± 16
Carga de LAS específica (mg LAS.gSTV ⁻¹ .d ⁻¹)	$2,7 \pm 0,7^{\square}$	$2,2 \pm 0,9^{\square}$
Fe(III) Total Afluente (μ Mol/L)	-	3624 ± 1131
Resultados		
Remoção de DQO (%)	48 ± 19	56 ± 29
Remoção de LAS (%)	$58,6 \pm 25,8$	$91,2 \pm 7,3$
Redução de Fe (%)	-	10 ± 13
pH Efluente	$7,8 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,3$
Sulfeto (mg S /L)	$22,0 \pm 28,8$	ND
AOV Efluente (mg/L)	25 ± 27	61 ± 17

\square Adicionado água de lavanderia em função da concentração de LAS

ND-Não detectado

Outro ponto que merece destaque refere-se à relação DQO e LAS afluente nos dois reatores. Observou-se em EGSB-Ag.Lav e EGSB-Fe-Ag.Lav. DQO afluente de 237 ± 114 mg/L de e 399 ± 113 mg/L, respectivamente. Em relação ao LAS afluente observou-se $28,8 \pm 6,5$ mg/L (EGSB-Ag.Lav) e $24,5 \pm 8,9$ mg/L (EGSB-Fe-Ag.Lav). Convertendo a concentração de LAS em DQO tem-se 63 mg/L e 53 mg/L, respectivamente. Ou seja, em EGSB-Ag.Lav. 27 % da DQO foi representado pelo LAS. Enquanto, em EGSB-Fe-Ag.Lav. apenas 13 % da DQO foi representada pelo LAS. Dessa forma, verificou-se para o lote de água residuária utilizado em EGSB-Ag.Lav baixa concentração de AOV.

Finalizando, a suplementação com Fe(III) em EGSB-Fe-Ag.Lav, provavelmente, minimizou os problemas de inibição pelo sulfeto observados em EGSB-Ag.Lav Etapa III (Figura 5.12 p.107). Cabe ressaltar que foi observado para o lote de água de lavanderia utilizado durante a operação do EGSB-Fe-Ag.Lav., 608,9 mg/L de sulfato (~80 mg/L de sulfato afluente com as diluições em função do LAS; Tabela 5.1), todavia, não foi detectado sulfeto efluente. Provavelmente, o sulfeto produzido reagiu com o Fe(III) diminuindo seu potencial de inibição. A utilização de Fe(III) quelado para remoção de sulfeto em biogás já foi reportado anteriormente (Diaz, 1984; Saelee & Bunyakan, 2012).

Em relação ao balanço de massa de LAS em EGSB-Fe-Ag.Lav verificou-se a adição de 3.551 mg de LAS em 78 dias de operação. 249 mg de LAS foram recuperados no efluente e 3 % do total adicionado ficaram adsorvidos na biomassa (63 mgLAS na biomassa da manta de lodo e 40 mgLAS na biomassa do separador de fases). A parcela de LAS relacionada à degradação biológica foi de 90 %, ou seja, 3.198 mgLAS (Tabela 5.19 e Figura 5.31).

Tabela 5.19: Balanço de massa de LAS em EGSB-Fe-Ag.Lav.

	EGSB-Fe-Ag.Lav	
	mg LAS	%
Adicionado no reator	3551	-
Recuperado no Efluente	249	7%
Degradação Biológica	3198	90%
Adsorvido Manta de Lodo	63	2%
Adsorvido Separador de Fase	40	1%

Comparando-se esses dados de LAS com aqueles do EGSB-Ag.Lav observa-se que a parcela de degradação biológica foi 38 % menor. Todavia, ressalta-se que o balanço de massa em EGSB-Ag.Lav foi realizado ao final da operação, ou seja, incluiu, tanto os dados da Etapa II (CLE de $1,0 \pm 0,3$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹ e 65 dias de operação), como da Etapa III (CLE de $2,7 \pm 0,7$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹ e 158 dias de operação).

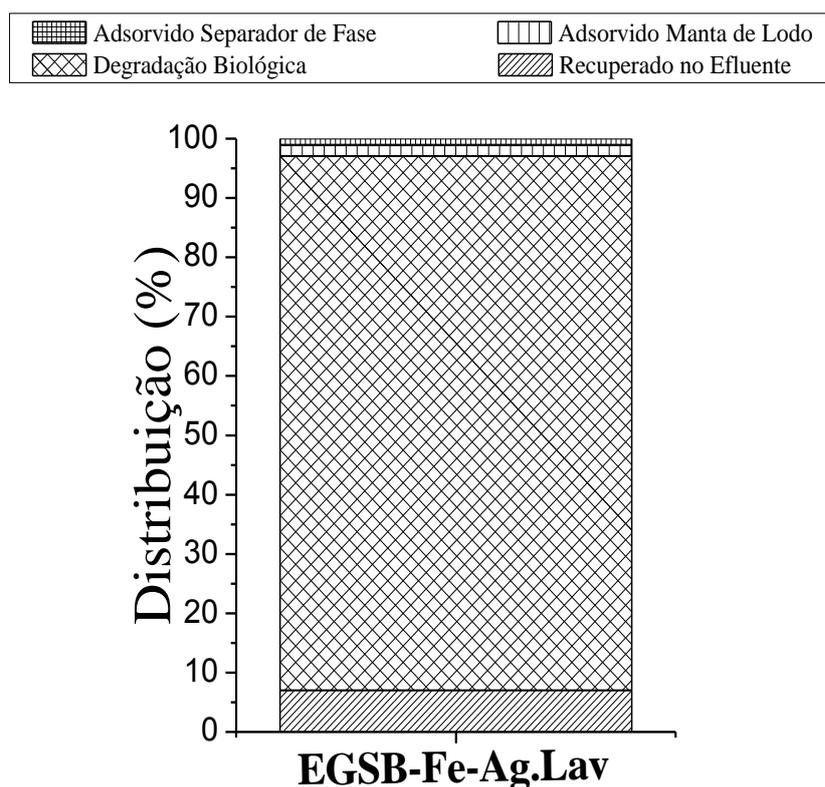


Figura 5.31: Distribuição do destino final de LAS em EGSB-Fe-Ag.Lav.

5.4.3 Caracterização Microbiana

Por meio do sequenciamento massivo via plataforma Ion Torrent foram sequenciadas amostras compostas provenientes do EGSB-Fe-LAS, EGSB-Fe-Ag.Lav e do lote de inóculo comum entre esses reatores. As especificações do sequenciamento podem ser visualizadas no Ítem 4.7.3.2 p. 61. Ao todo foram obtidas 347.777 sequências das quais a grande maioria foram das amostras provenientes dos reatores EGSB, enquanto que 41.787 foram atribuídas ao inóculo (Tabela 5.20). Durante o processamento inicial, 43-52 % das sequências foram removidas em função dos parâmetros detalhadas no Ítem 4.7.3.3 p. 61, tais como, qualidade das bases, presença de bases ambíguas, chimeras e tamanho inferior a 200 pb. Ressalta-se que grande parte das

sequências foram removidas em função da formação de dímeros entre os iniciadores utilizados (Apêndice Figura 10.4 p. 197), assim como foi observado durante o sequenciamento das amostras do EGSB-Ag.Lav (Hipótese B). Após o processamento observou-se 319-330 pb dos fragmentos sequenciados (Apêndice Figura 10.5 p. 198).

Tabela 5.20: Resultados do sequenciamento das amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav. via plataforma Ion Torrent.

	Inóculo	EGSB-Fe	EGSB-Fe-Ag.Lav.
Cobertura - Fórmula de Good	93,3%	96,8%	97,3%
Total de sequências (dados brutos)	41.787	148.042	157.948
Total de sequências (dados filtrados)	22.127	69.645	68.528
Tamanho Médio (pb)	330 ± 47	319 ± 45	323 ± 48
Total de OTUs	3.272	5.791	5.682
Singletons	1.476	2.211	1.867
Total de OTUs (classificação taxonômica)	1.796	3.580	3.815
Estimadores de Riqueza			
Chao1	2.058 ± 1.651	3.243 ± 1.544	4.446 ± 849
Rarefação	1.520 ± 1.127	2.592 ± 1.370	3.684 ± 731
Índices de Diversidade			
Shannon (H)	5,74 ± 0,74	6,16 ± 0,55	6,56 ± 0,31
Simpson (1-D)	0,99 ± 0,004	0,99 ± 0,002	0,99 ± 0,002
Dominância	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002

Ao todo foram obtidos 3.272 – 5.791 OTUs dos quais 32 – 45 % corresponderam a singletons. A maior porcentagem foi para o Inóculo, enquanto que o maior valor em números absolutos foi obtido para biomassa do EGSB-Fe. Ressalta-se que o menor número de OTUs utilizadas para a classificação taxonômica foi da amostra do Inóculo, seguindo do EGSB-Fe-Ag.Lav e EGSB-Fe.

Por meio das análises de cobertura amostral (Formula de Good e Curvas de Rarefação) verificou-se alta cobertura amostral. Segundo a formula de Good, entre 93,3 a 97,3 % da comunidade microbiana foi amplificada. Em relação às curvas de rarefação, para o nível taxonômico de Filo (80% de similaridade), o número de sequências obtido foi satisfatório para acessar toda a diversidade de Filos das amostras. Acima de 5.000 sequências notou-se uma tendência à saturação. Por outro lado, para níveis taxonômicos de gênero (95 % de similaridade) e espécie (97 % de similaridade), essa tendência à saturação ficou menos evidente. Desse modo, para esses dois níveis taxonômicos era

necessário aumento do esforço amostral para acessar completamente toda a diversidade de microrganismos (Figura 5.32).

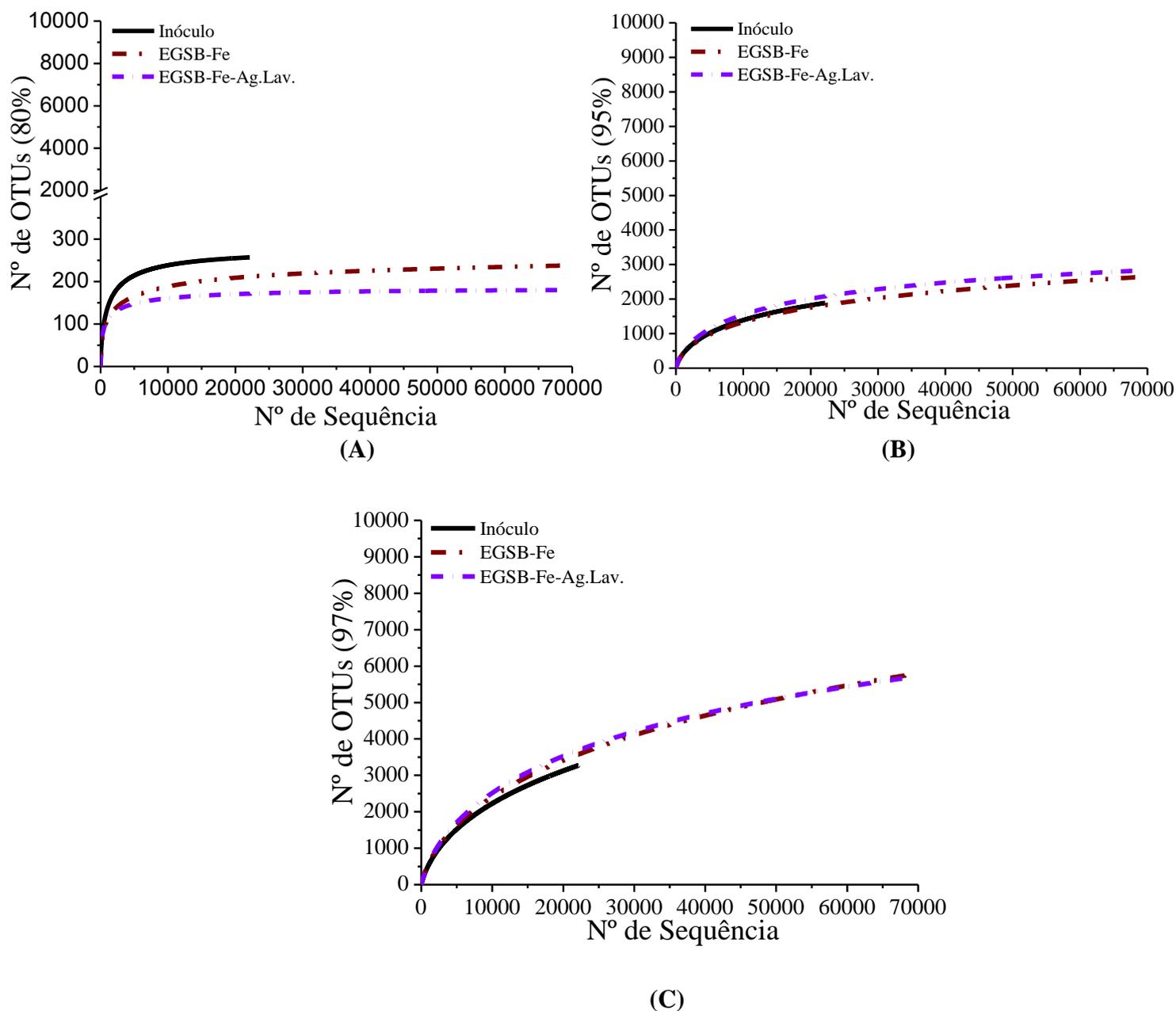


Figura 5.32: Curvas de rarefação definidas para diferentes percentagens de similaridade. (A) 80% de similaridade para nível de Filo; (B) 95 % para nível de gênero e (C) 97 % para o nível de espécie; nas amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Observou-se 2.058-4.446 e 1.520-3.684, respectivamente, para os estimadores de riqueza Chao1 e rarefação. Os menores valores para ambos os parâmetros foram obtidos para biomassa do Inóculo, enquanto, os maiores valores foram obtidos para a biomassa do EGSB-Fe-Ag.Lav. Ressalta-se que para as amostras provenientes dos reatores biológicos obteve-se número muito próximo de sequências filtradas (68.528-69.645), enquanto, para aquela do Inóculo verificou-se número 3 vezes inferior. Mesmo com números muito próximo de sequências entre as amostras provenientes de reator biológicos, para a biomassa do EGSB-Fe-Ag.Lav verificou-se os maiores valores de Chao1 e rarefação.

Em relação ao índice de diversidade (Shannon) observou-se de 5,74-6,56, sendo os maiores valores obtidos para EGSB-Fe-Ag.Lav e o menor para biomassa do Inóculo. Todavia, cabe ressaltar que valores acima de 5,0 são encontrados para biomassa de ambientes com diversidade muito alta, como em solos (Fierer e Jackson, 2006; Faoro *et al.*, 2010). Além disso, a relação número total de OTUs por número de singletons foi maior para o Inóculo (45 %), tais resultados refletem nos índices de diversidade. Comparando com dados da literatura observa-se que Braga (2014) por meio de pirosequenciamento do gene rRNA 16S de amostras provenientes de um reator fluidificado aplicado na degradação do LAS em água residuária de lavanderia comercial obteve índices de Shannon de 3,4 - 4,6. Enquanto que Okada (2012), também por meio de pirosequenciamento do gene rRNA 16S, todavia para amostras provenientes de reator UASB aplicado na degradação de LAS, obteve índices de Shannon de 3,7 - 4,6.

Com o intuito de comparar as três amostras foi utilizado o índice Bray-Curtis. Dessa forma, observou-se baixa similaridade entre as amostras (Figura 5.33). O maior valor obtido foi entre a biomassa do EGSB-Fe-Ag.Lav e Inóculo (20 %) ,enquanto, para a biomassa do EGSB-Fe verificou-se 10 % de similaridade em relação as demais amostras. Ressalta-se que para o EGSB-Fe-Ag.Lav foi aplicada maior CLE ($2,2 \pm 0,9$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹), em relação ao EGSB-Fe ($1,5 \pm 0,7$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹), todavia, com menor tempo de operação, apenas 78 dias contra 127 dias do EGSB-Fe. O tempo de operação tem relação direta com as modificações na comunidade microbiana; ou seja, quanto maior o tempo de operação do reator maior as modificações na estrutura microbiana.

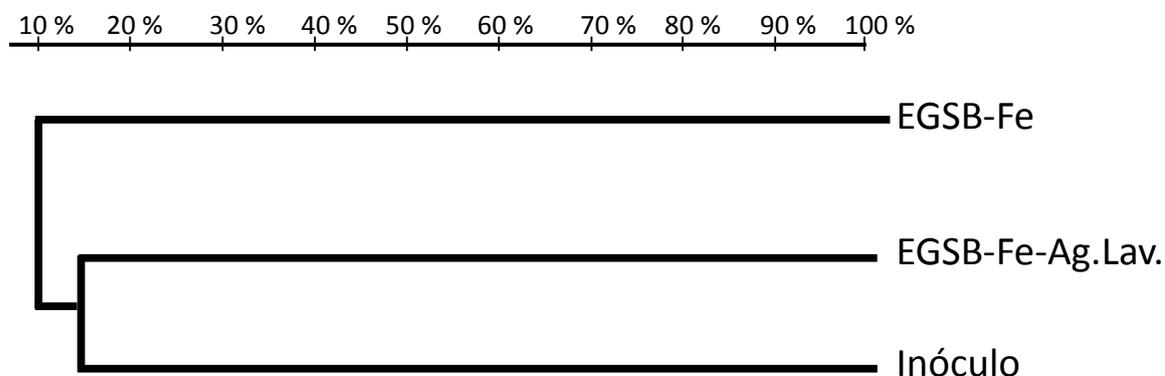


Figura 5.33: Dendrograma baseado no índice de Bray-Curtis para amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Por meio da análise da distribuição das OTUs via diagrama de Venn notou-se que 9,3 % dos gêneros foram identificados nas três amostras, representando 75,9 % das sequências obtidas (Figura 5.34). Por outro lado, 7,6 – 40,7 % dos gêneros foram exclusivos de cada amostra o que representou cerca de 0,2 – 6,2 % das sequências identificadas. A maior porcentagem de gêneros exclusivos foi observada em EGSB-Fe-Ag.Lav (40,7 % , enquanto, para a biomassa do inóculo verificou-se apenas 7,6 %). A baixa proporção de gêneros exclusivos no inóculo era esperada, uma vez que essa biomassa foi utilizada nos reatores EGSB. 9,3 % dos gêneros foram exclusivos entre EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav representando 9,7 % das sequências. Tal resultado corrobora com os valores obtidos no índice Bray-Curtis, em que houve maior similaridade entre a biomassa do Inóculo e aquela do EGSB-Fe-Ag.Lav do que em relação a do EGSB-Fe.

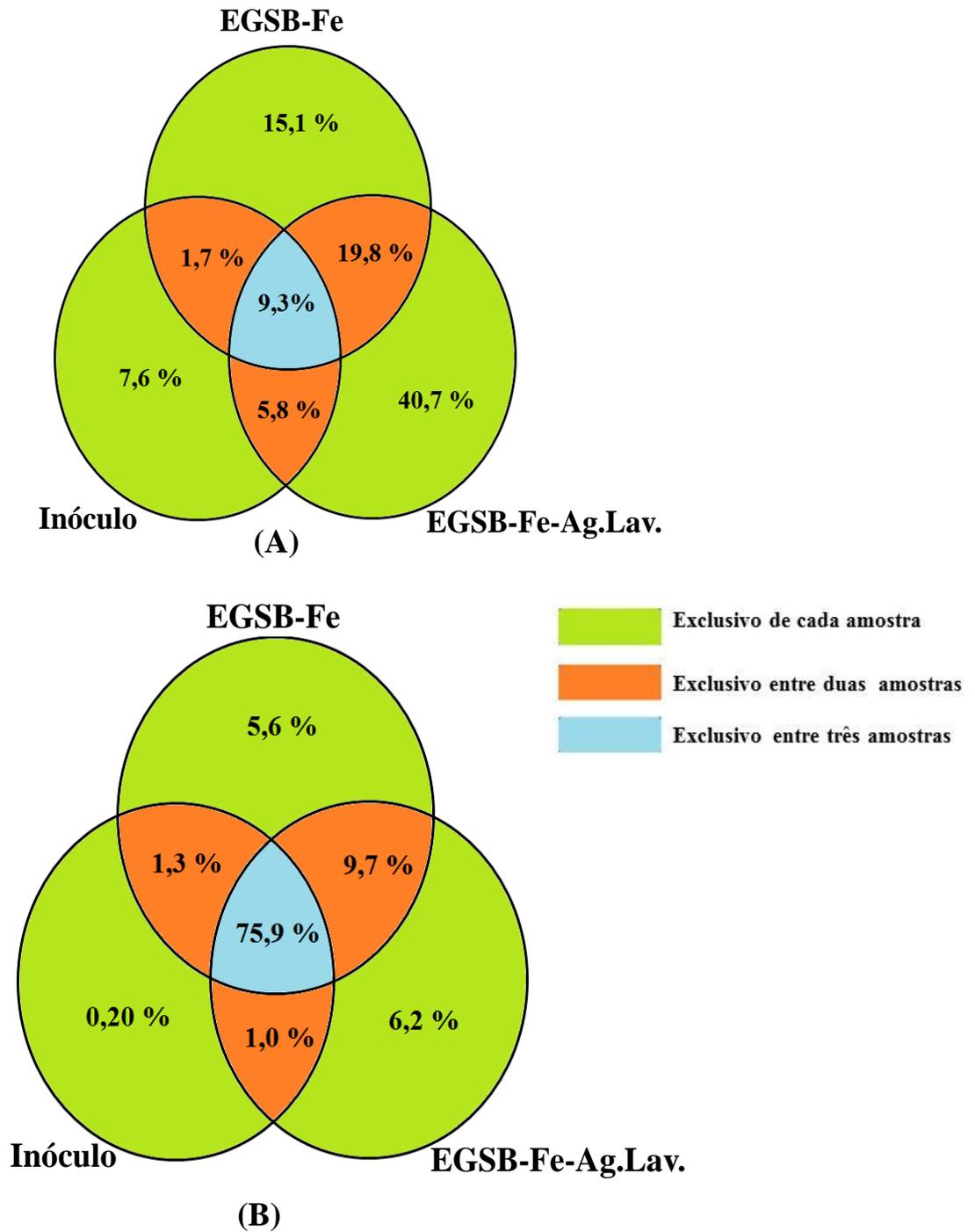


Figura 5.34: Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função das OTUs **(A)** e em função do número de sequências **(B)** na biomassa do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Por meio do uso do *RDP-Classififer*, as sequências representativas de cada OTU foram classificadas quanto a taxonomia. 92,4 – 98,9 % das sequências foram classificadas até filo. Por outro lado, entre 19,0 – 64,4 % das sequências foram classificadas até gênero (Tabela 5.21). Ressalta-se que nos sequenciamento referente ao proposto para Hipótese B obteve-se de 16,1 – 75,8 % para classificação até gênero. Enquanto, em relação às amostras referentes aos experimentos da Hipótese A (plataforma 454) observou-se variação de 10,5 - 35,1 %. Como detalhado anteriormente, o menor número de gêneros não classificados foi relacionado, em grande parte, ao tamanho do fragmento sequenciado (plataforma 454 – 225 pb; plataforma Ion Torrent – 300 pb).

Tabela 5.21: Número de OTUs e abundância relativa de sequências classificadas nas amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Limite de Confiança	Nível Taxonômico	Inóculo		EGSB-Fe		EGSB-Fe-Ag.Lav.			
		Nº OTUs	Sequências	Nº OTUs	Sequências	Nº OTUs	Sequências		
50%	Filo	1.563	92,4%	3.464	98,9%	3.481	95,7%		
50%	Classe	1.423	87,0%	3.390	97,8%	3.164	91,1%		
50%	Ordem	1.322	85,1%	3.348	97,5%	2.777	79,7%		
50%	Família	1.233	81,3%	3.213	95,9%	2.463	60,1%		
80%	Gênero	365	19,0%	2.245	64,4%	1.200	30,1%		
Nº Total		-		1.796	20.651	3.580	67.434	3.815	66.661

Dentre os principais filis encontrados e em comum nas três amostras destaca-se o filo Proteobacteria, cuja abundância relativa obtida foi de 16,6 – 62,5 % (Figura 5.35 e Apêndice Tabela 10.4). Os principais filis observados para biomassa do Inóculo foram Chloroflexi (24,6 %) e Synergistetes (33,9 %). Todavia, verificou-se para biomassa dos 2 EGSB baixa proporção, para representantes desses filis: Chloroflexi (0,35 - 2,23 %) e o Synergistetes (0,18 – 7,58 %). Provavelmente, as condições de operação dos reatores não foram favoráveis para a manutenção e crescimento dessas bactérias pertencentes a esses filis. Observou-se oito filis exclusivos em EGSB-Fe-Ag.Lav., todavia, com somatória da abundância relativa não superior a 7 %. O número total de filis classificados foi: 25 (EGSB-Ag.Lav), 13 (EGSB-Fe) e 16 (Inóculo).

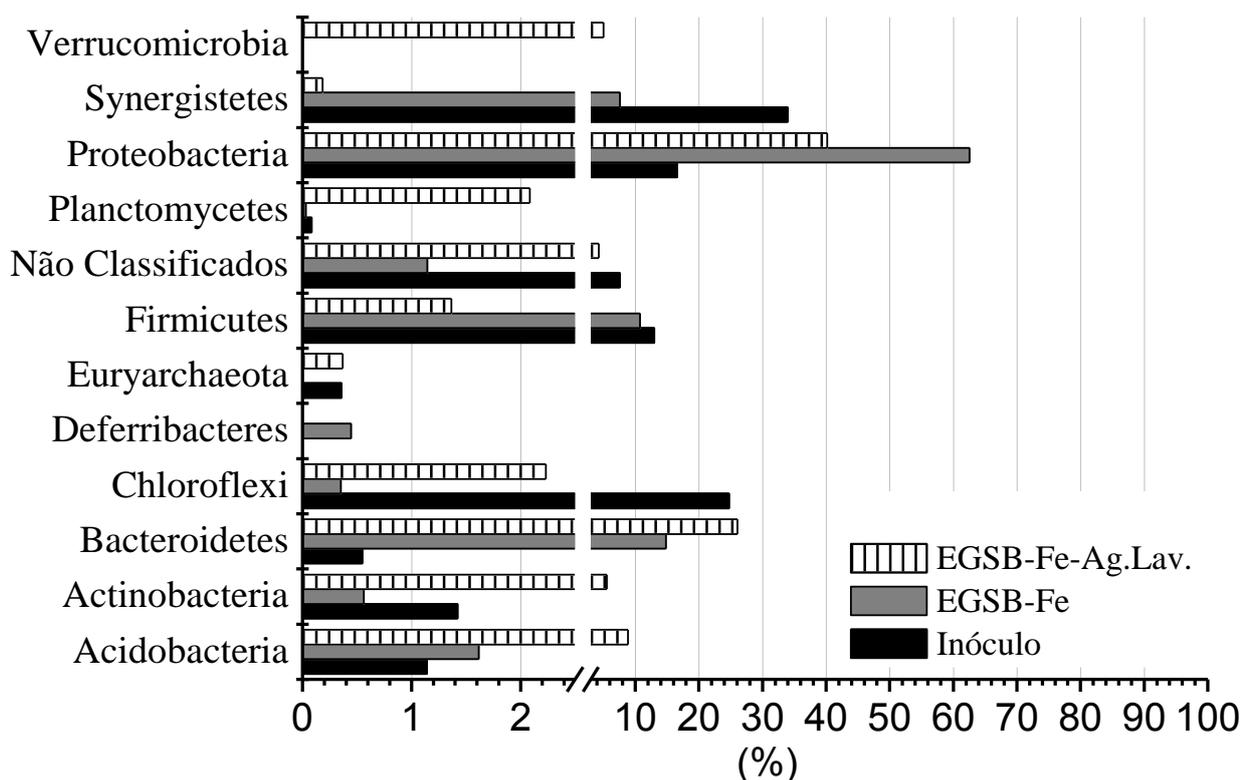


Figura 5.35: Abundância relativa de filos nas biomassas do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Verificou-se que os 20 gêneros mais abundantes excluindo os não-classificados representaram em abundância relativa 98,01 % (inóculo), 94,85 % (EGSB-Fe) e 78,21 % (EGSB-Fe-Ag.Lav.). Não excluindo os não-classificados os valores obtidos foram os seguintes: 18,6 %, 61,08 % e 23,53 % para o inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav, respectivamente. O único gênero identificado nas três amostras foi *Geobacter* sp., cuja abundância relativa observada foi de 0,45 – 17,53 % (Figura 5.36 e ApêndiceFigura 10.5). Ressalta-se que representantes desse gênero estão relacionados com a degradação de LAS e redução do Fe(III). A maior abundância relativa (17,53 %) foi obtida em EGSB-Fe. Nesse caso, o reator foi alimentado com meio sintético, LAS Padrão e EDTA-Fe(III). Por outro lado, em EGSB-Fe-Ag.Lav (sem meio sintético, Ag. Lavanderia e EDTA-Fe(III)) a abundância relativa foi baixa (0,45 %). Ressalta-se que nesse reator verificou-se baixa redução férrica, por outro lado, alta remoção de LAS. A remoção de LAS é otimizada em consórcio microbiano, não sendo exclusiva de único gênero de bactéria.

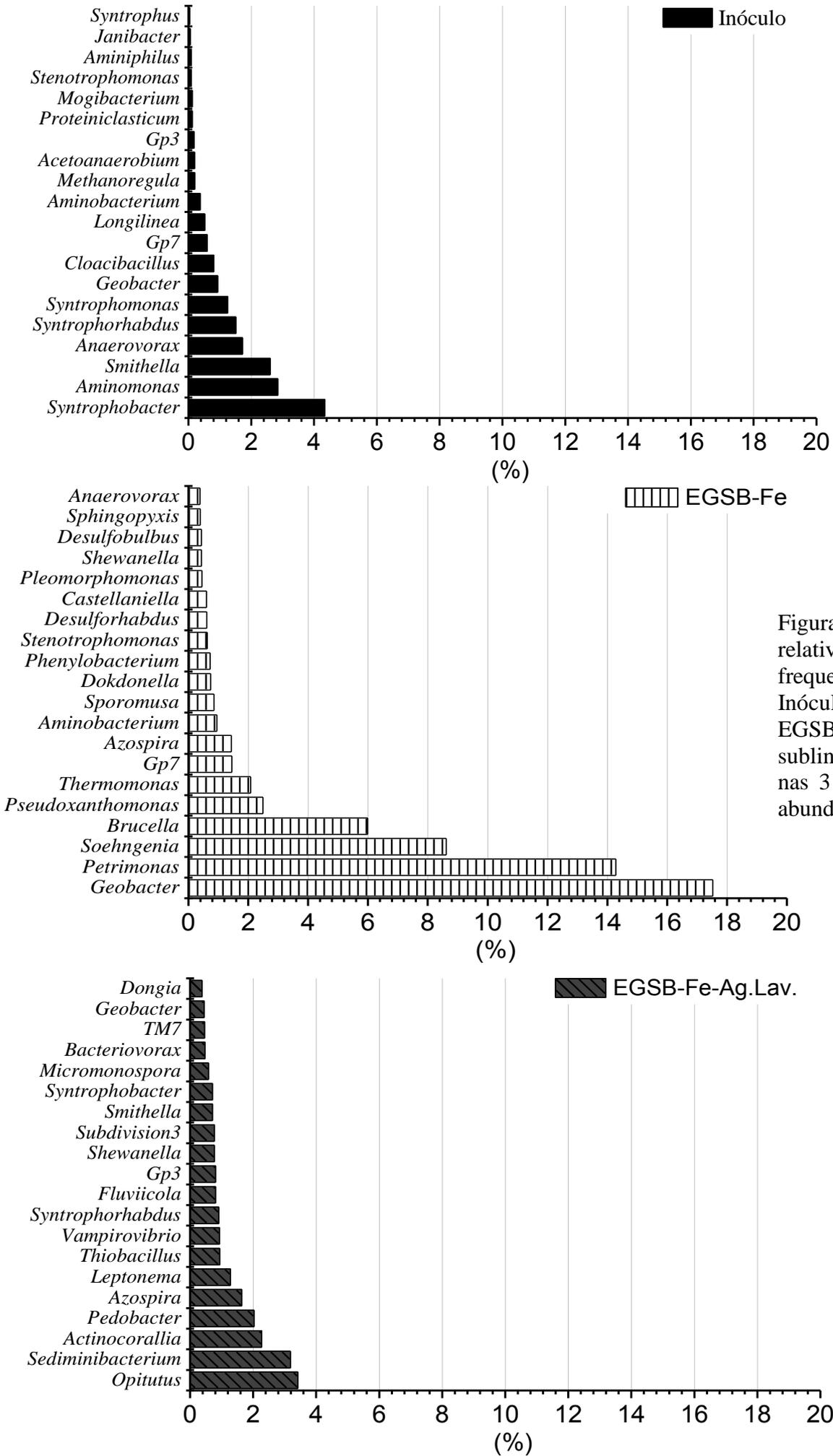


Figura 5.36: Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes nas amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav. Gêneros sublinhados estão em comum nas 3 amostras entre os mais abundantes.

Dentre os gêneros mais abundantes identificados nesse trabalho, apenas dois deles realizam a redução de ferro: *Shewanella* sp. e *Geobacter* sp. *Shewanella* foi identificada apenas na biomassa do EGSB-Fe (0,44 % em abundância relativa) e EGSB-Fe-Ag.Lav (0,77 %). Por outro lado, *Geobacter* sp. como detalhado anteriormente, foi identificado nas três amostras, com 0,93 %, 17,53 % e 0,45 %, no Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav, respectivamente. As bactérias semelhantes a *Shewanella* são Gram negativas, quimiorganotróficas, anaeróbias facultativas e realizam a oxidação de compostos orgânicos acompanhada da redução de vários compostos inorgânicos (NO_3^- ; NO_2^- e Fe_3^+) (Brenner et al., 2005). As bactérias semelhantes a *Geobacter* são Gram negativas, quimiorganotróficas e estritamente anaeróbias (Brenner et al., 2005). Segundo Lovley, (1993) o crescimento dessas bactérias ocorre com Fe(III), como o receptor de elétrons sendo os doadores de elétrons completamente oxidados a dióxido de carbono. Uma série de doadores de elétrons podem ser oxidados, tais como, acetato, benzoato, etanol, lactato, propionato entre outros. Ressalta-se que na alimentação do EGSB-Fe adicionava-se etanol como detalhado no Ítem do 4.8.3 p. 71.

Seis gêneros identificados (*Shewanella*, *Syntrophobacter*, *Geobacter*, *Petrimonas*, *Desulfobulbus* e *Soehngenia*) foram relacionados com o ciclo do enxofre, representando 5,2 %, 41,3 % e 1,9 % da abundância relativa das biomassas do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav, respectivamente. Exceção a *Syntrophobacter*, os demais gêneros foram identificados na biomassa do EGSB-Fe. *Shewanella*, *Syntrophobacter* e *Geobacter* foram identificadas na biomassa do EGSB-Fe-Ag.Lav. Por outro lado, na biomassa do Inóculo foram identificados apenas dois gêneros, *Syntrophobacter* e *Geobacter*.

Ao todo três gêneros no Inóculo foram relacionados à condição aeróbia (*Cloacibacillus*; *Aminobacterium* e *Stenotrophomonas*) representando 1,28 % da abundância relativa. Ressalta-se que *Stenotrophomonas* está relacionada diretamente com a degradação do LAS e/ou seus intermediários (Brenner et al., 2005; LaraMartin et al., 2007). *Cloacibacillus* não está relacionada com a degradação do LAS, mas é constantemente encontrada em reatores biológicos aplicados na remoção desse surfactante (Ganesan et al., 2008).

Em relação à condição anaeróbia, nesta mesma amostra, foram identificados 11 gêneros representando 16,22 % das sequências. 27 % desses gêneros foram relacionados com crescimento em condição anaeróbia e relação direta com a degradação do LAS

e/ou compostos aromáticos (*Syntrophorhabdus*; *Syntrophomonas* e *Geobacter*). 63 % já foram identificados em trabalhos anteriores aplicados na remoção do LAS e 36 % foram relacionados exclusivamente com a degradação de compostos do meio sintético (etanol e metanol) e subprodutos do metabolismo (ácidos orgânicos voláteis).

Por outro lado, 14,7 % das sequências ou 8 gêneros identificados em EGSB-Fe crescem sob condição aeróbia, sendo que apenas *Stenotrophomonas* está relacionado com a degradação de LAS. 42,3 % das sequências ou 6 gêneros identificados crescem sob condição anaeróbia e capazes realizar a degradação do LAS e outros compostos aromáticos (*Geobacter*; *Soehngenia*; *Sporomusa* e *Desulfobulbus*) (Brenner *et al.*, 2005). Os demais gêneros identificados (*Petrimonas* e *Desulforhabdus*) foram relacionados com a degradação de co-substratos ou compostos do meio sintético. Ressalta-se que os gêneros *Petrimonas* e *Desulforhabdus* estão relacionados com o ciclo do enxofre (Brenner *et al.*, 2005; Krieg *et al.*, 2010). 0,44 % dos gêneros identificados foram relacionados com crescimento anaeróbio facultativo, sendo *Shewanella* o único representante.

Em relação à biomassa do EGSB-Fe-Ag.Lav., 12,15 % das sequências foram relacionadas a sete gêneros com crescimento aeróbio e sem relação com a degradação do LAS. Por outro lado apenas 5 gêneros ou 6,2 % das sequências foram relacionadas a microrganismos anaeróbios, sendo dois gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos e/ou LAS (*Geobacter* e *Syntrophorhabdus*) e os demais relacionados com a degradação de co-substratos ou compostos do meio sintético.

Destaca-se que foram identificados 30 gêneros especificamente relacionados com a degradação de LAS e/ou compostos aromáticos, que corresponderam a 3,83 – 29,56 % do total de sequências obtidas nas amostras (Figura 5.37 e Tabela 5.22).

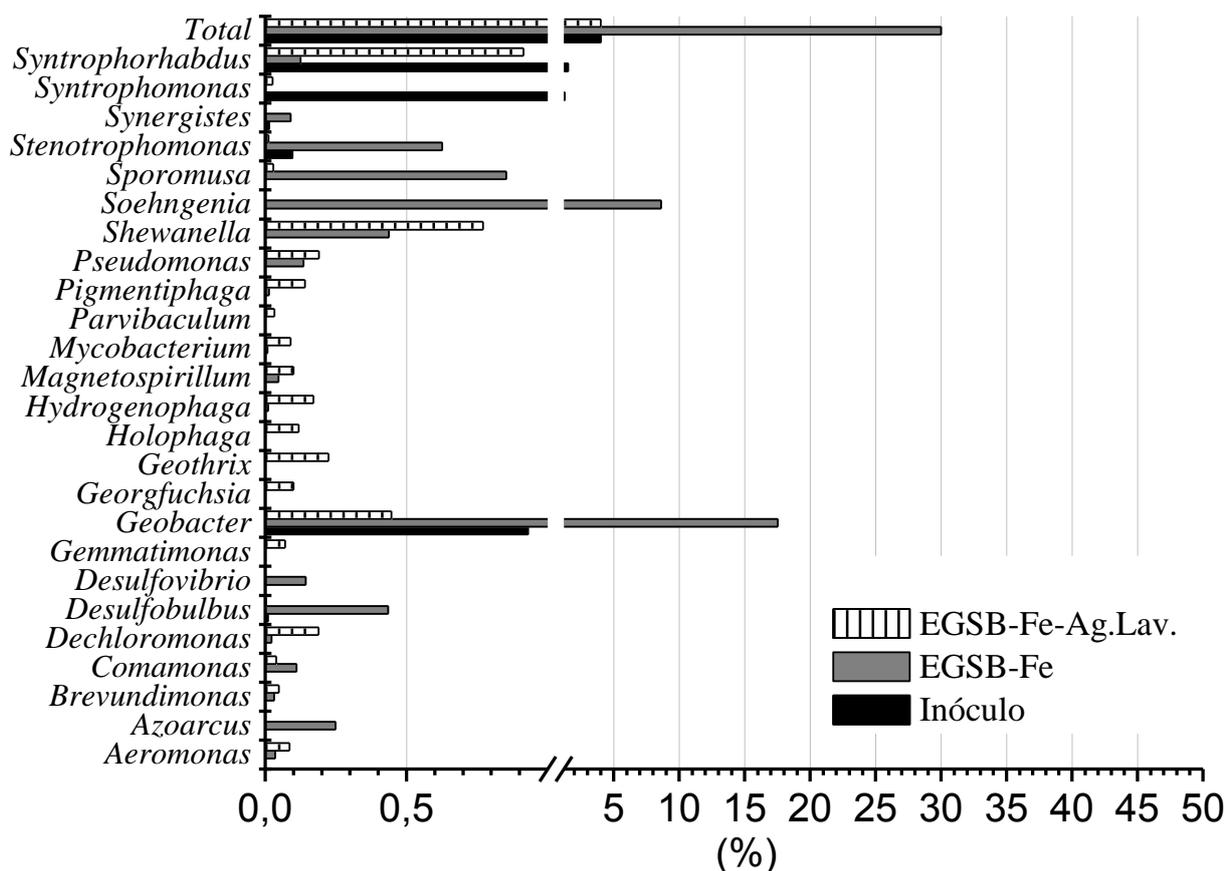


Figura 5.37: Gêneros relacionados com a degradação da molécula de LAS e/ou compostos aromáticos nas amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Verificou-se que a grande maioria dos gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos e/ou LAS estavam ausentes ou em baixa proporção na biomassa do Inóculo. Dessa forma, dos 30 gêneros apenas oito foram identificados no inóculo (27 %). Os demais foram identificados ou no EGSB-Fe (21 gêneros ou 70 %) ou no EGSB-Fe-Ag.Lav (23 gêneros ou 76 %). Desse modo é possível inferir que as condições nutricionais e operacionais dos reatores biológicos foram favoráveis ao crescimento de microrganismos capazes de degradar o LAS e compostos aromáticos. Ressalta-se que em EGSB-Fe-Ag.Lav foi aplicada CLE maior ($2,2 \pm 0,9$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹), em relação ao EGSB-Fe ($1,5 \pm 0,7$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹). Além disso, esses reatores foram alimentados com água residuária de lavanderia e LAS Padrão, respectivamente.

Destacam-se os seguintes gêneros em alta proporção no Inóculo e que não foram favorecidos na biomassa dos reatores: *Syntrophomonas* e *Syntrophorhabdus*. Representantes semelhantes a *Syntrophomonas* são bactérias Gram negativas, capazes de realizar a β -oxidação de lipídeos saturados (McInerney *et al.*, 1981). Tem seu crescimento estimulado pela presença de *Methanospirillum*. Além disso, cabe ressaltar

que carboidratos, compostos proteicos, álcoois e outros compostos orgânicos não estimulam o desenvolvimento do *Syntrophomonas* (Vos et al., 2009). O *Syntrophorhabdus* tem a capacidade de oxidar benzoato (ex: *Syntrophorhabdus aromaticivorans*), principalmente, quando em sintrofismo com metanogênicas hidrogenotróficas (Qiu et al., 2008). A suplementação com Ferro não estimula o crescimento de metanogênicas, uma vez que, há competição pelos mesmos substratos.

Os seguintes gêneros identificados (com abundância relativa de 0,2 – 17,5 %) no reator EGSB-Fe merecem destaque: *Geobacter*, *Soehngenina*, *Sporomusa*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Desulfobulbus* e *Azoarcus*. Exceção a *Stenotrophomonas*, os demais gêneros são anaeróbios estritos. *Geobacter* e *Azoarcus* realizam a β -oxidação, uma das etapas do catabolismo do LAS (Brenner et al., 2005).

Ao contrário do que ocorreu nas amostras do EGSB-Fe, cuja predominância de gêneros foi relacionada a *Geobacter* e *Soehngenina*, com abundâncias relativas acima de 6 %, em EGSB-Fe-Ag.Lav. obteve-se maior número de gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos, todavia, com abundância relativa não superior a 1 %. Ao todo seis gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos foram exclusivos: *Geothrix*, *Holophaga*, *Georgfuchsia*, *Gemmatimonas*, *Parvibaculum* e *Pseudolabrys*. Embora, em baixa proporção o *Georgfuchsia* (0,10 %) está relacionada com a redução de ferro, são: Gram negativos, estritamente anaeróbios e quimiorganotróficos (Weelink et al., 2009).

Tabela 5.22: Gêneros relacionados com a degradação de LAS e/ou compostos aromáticos.

Gêneros sublinhados estão presentes em todas as amostras.

Gênero	Inóculo	EGSB-Fe	EGSB-Fe-Ag.Lav.	Condição	Dessulfonação	β oxidação	ω oxidação	Receptores de Elétrons			Trab. LAS	Referência
								S	N	Fe		
<i>Acinetobacter</i>	-	0,01	0,02	Aeróbia	+	-	-	-	+	-	+	(Cook et al., 1998); (Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<i>Aeromonas</i>	-	0,04	0,09	Anaeróbia facultativa	+	-	-	-	+	-	+	(Jimenez et al., 1991); (Denger & Cook, 1999); (Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<i>Azoarcus</i>	-	0,25	-	Anaeróbia facultativa	-	+	-	-	+	-	+	(Gescher et al., 2002), (Barragán et al., 2004) (Rabus et al., 2005), (Brenner et al., 2005)
<i>Brevundimonas</i>	-	0,03	0,05	Aeróbia	-	-	-	-	-	-	+	(Segers et al., 1994); (Brenner et al., 2005); (Kang et al., 2009)
<i>Comamonas</i>	-	0,11	0,04	Aeróbia	+	-	-	-	+	-	+	(Cook et al., 1998); (Schleheck et al., 2004a); (Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<i>Dechloromonas</i>	-	0,02	0,19	Anaeróbia facultativa	-	-	-	-	+	-	+	(Achenbach et al., 2001); (Brenner et al., 2005); (Duarte et al., 2010a); (Okada, 2012)
<i>Desulfobulbus</i>	0,01	0,43	-	Anaeróbia estrita	-	-	-	+	+	-	+	(Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<i>Desulfomicrobium</i>	0,02	-	-	Anaeróbia	-	-	-	+	-	+	+	(Brenner et al., 2005)
<i>Desulfomonile</i>	0,02	-	-	Anaeróbia estrita	-	-	-	+	-	-	+	(Brenner et al., 2005); (Okada, 2012)
<i>Desulfovibrio</i>	-	0,14	-	Anaeróbia	+	-	-	+	+	+	+	(Brenner et al., 2005); (Zellner et al., 1989); (Cook et al., 1998); (Duarte et al., 2010a)
<i>Gemmatimonas</i>	-	-	0,07	Aeróbia	-	-	-	-	-	-	+	(Krieg et al., 2010); (Okada, 2012)
<i>Geobacter</i>	0,93	17,53	0,45	Anaeróbia estrita	-	+	-	+	+	+	+	(Brenner et al., 2005); (Lara-Martin et al., 2007); (Carmona et al., 2009); (Delforno et al., 2012)
<i>Georgfuchsia</i>	-	-	0,10	Anaeróbia estrita	-	-	-	-	-	+	-	(Weelink et al., 2009)
<i>Geothrix</i>	-	-	0,22	Anaeróbia estrita	-	-	-	-	-	-	+	(Krieg et al., 2010); (Okada, 2012)
<i>Holophaga</i>	-	-	0,12	Anaeróbia	-	-	-	-	-	-	+	(Liesack et al., 1994); (de Oliveira et al., 2009); (Krieg et al., 2010); (Okada, 2012)

Segundo Shörberl (1989) a rota de degradação do LAS, consiste nos seguintes passos: (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). Dessa forma, foram identificados microrganismos com capacidade metabólica de ω -/ β -oxidação e dessulfonação.

Em relação à dessulfonação foram identificados os seguintes gêneros com abundância relativa de 0,51 % (EGSB-Fe-Ag.Lav.), 0,45 % (EGSB-Fe) e ausente no Inóculo: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Comamonas*, *Desulfovibrio*, *Hydrogenophaga* e *Pseudomonas* (Figura 5.37). Ressalta-se que foram os mesmos gêneros identificados na caracterização microbiológica dos reatores referentes a Hipótese B (Figura 5.23 p.126).

Em relação à β -oxidação, foram identificados os seguintes gêneros (0,8-18,0 %): *Azorcus*, *Geobacter*, *Parvibaculum*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Synergistes* e *Syntrophomonas*. Verificou-se que 18% de abundância relativa foi observada em EGSB-Fe devido alta porcentagem de *Geobacter*. Dois gêneros (*Parvibaculum* e *Pseudomonas*) realizam ω -oxidação (Dong *et al.*, 2004; Brenner *et al.*, 2005), cujas abundâncias relativas obtidas foram de 0 – 0,22 %. Ressalta-se que *Pseudomonas* realiza, tanto a ω -/ β -oxidação, como a dessulfonação (Brenner *et al.*, 2005).

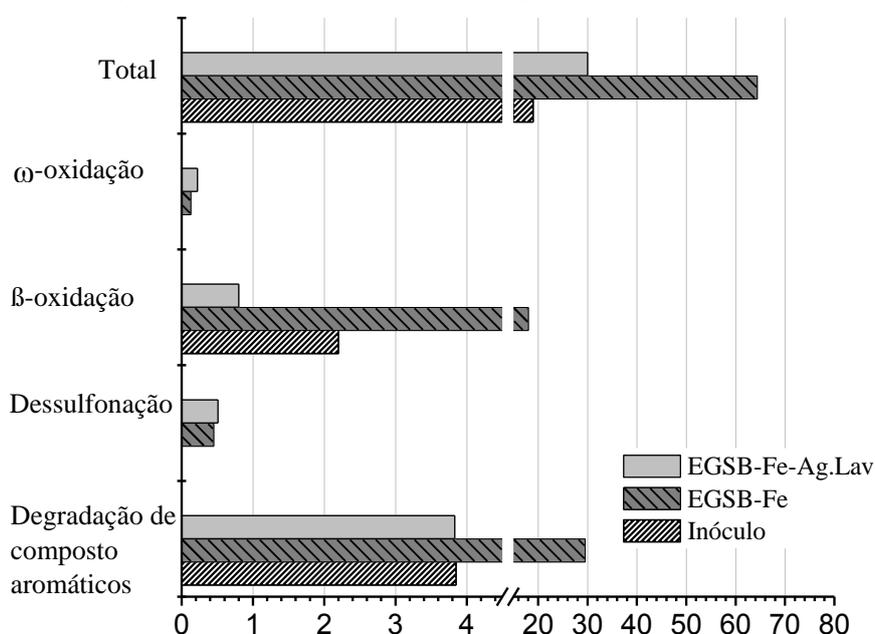


Figura 5.38: Abundância relativa do total de gêneros classificados relacionados com ω -oxidação, β -oxidação, dessulfonação e degradação de compostos aromáticos nas biomassas do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Dentre os gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos a grande maioria está relacionada com microrganismos anaeróbios ou anaeróbios estritos (48 -96 %; Figura 5.39). A menor porcentagem foi encontrada em EGSB-Fe-Ag.Lav, em cuja biomassa também verificou-se proporção similar de microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos (49%).

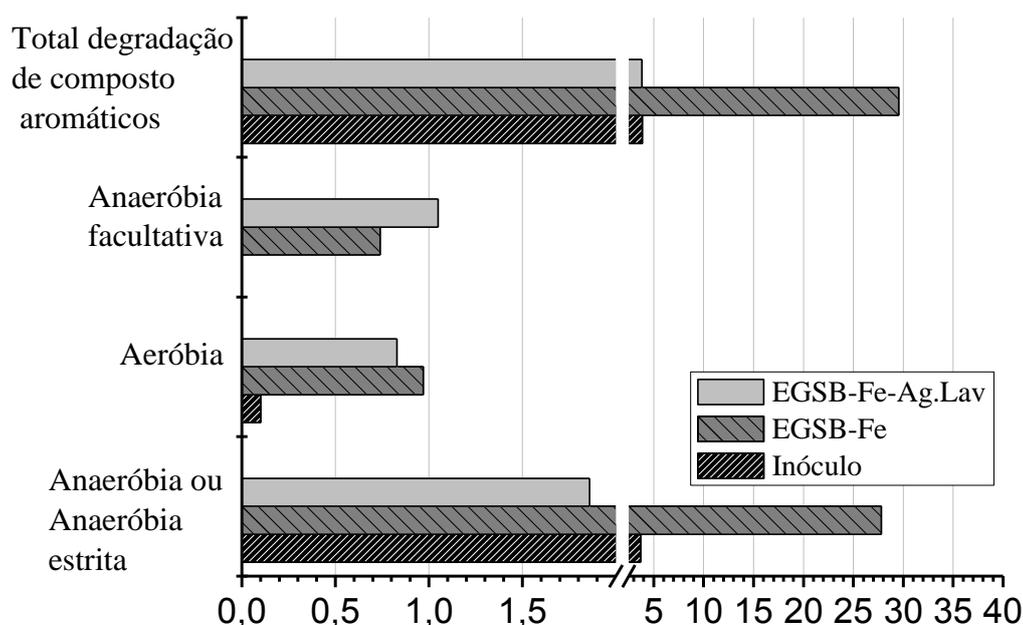


Figura 5.39: Abundância relativa do total de gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos de crescimento aeróbio, anaeróbio e anaeróbio facultativo nas biomassas do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Com exceção de *Georgfuchsia*, os demais gêneros já foram encontrados em trabalhos com LAS. Cabe ressaltar que levando em conta a presença e ausência de gêneros, a grande maioria esteve relacionada com compostos de nitrogênio como receptores de elétrons.

5.4.4 Considerações Parciais

Com base na Hipótese C, a degradação de LAS em reator EGSB foi favorecida por meio da suplementação com Fe(III). Essa observação fica evidente quando compara-se o reator suplementado, EGSB-Fe (CLE $1,5 \pm 0,7$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹) e reator não suplementado, EGSB-BA Etapa I (CLE $1,2 \pm 0,2$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹). As remoções obtidas foram de $84,3 \pm 12,6$ % e $63,5 \pm 10,3$ %, respectivamente. Além disso, por meio do sequenciamento massivo do gene rRNA 16S, observou-se a predominância de *Geobacter* com abundância relativa de 17,53 %. Verificou-se para

identificação filogenética da biomassa do inóculo utilizado nesse reator abundância relativa de 0,45 % de *Geobacter*. Destaca-se que esse gênero é um dos principais redutores de ferro descritos na literatura, com capacidade metabólica de degradar compostos aromáticos (Brenner *et. al.*, 2005). A redução férrica obtida nesse reator foi de 64 ± 22 % para 7.276 ± 2.525 $\mu\text{Mol/L}$ de ferro total afluente. Destaca-se que verificou-se baixas concentrações de sulfeto efluente e, portanto, a grande maioria da redução férrica foi abiótica. Além disso, observou-se que as concentrações de Ferro total efluente obtidas foram similares (6.197 ± 1.887 $\mu\text{Mol/L}$) a concentração afluente, por conseguinte, pode-se afirmar que essa redução foi de forma não assimilativa.

Verificou-se em relação a degradação de LAS em água residuária de lavanderia comercial em EGSB suplementado com Fe(III) (Hipótese D), que embora tenha sido obtido elevada remoção de LAS, essa não foi acompanhada pela redução férrica. Ou seja, verificou-se para esse reator redução férrica de 10 ± 13 % para 3.624 ± 1.131 $\mu\text{Mol/L}$ de Ferro total afluente. Sob tais condições obteve-se $91,2 \pm 7,3$ % de remoção de LAS para CLE de $2,2 \pm 0,9$ $\text{mg LAS.gSTV}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Comparando com o EGSB-Ag.Lav Etapa III que foi operado sem suplementação de Fe(III) afluente e com CLE de $2,7 \pm 0,7$ $\text{mg LAS.gSTV}^{-1}.\text{d}^{-1}$, verificou-se que as remoções de LAS obtidas foram de $58,6 \pm 25,8$ %, ou seja, 32,6 % menor. Provavelmente, essa possibilidade pode ser devido (i) aos problemas de operação encontrados em EGSB-Ag.Lav. Etapa III, tais como, oxigenação e aumento da concentração de sulfeto que resultou em diminuição da remoção de LAS; e (ii) devido a suplementação com Fe(III) em EGSB-Fe-Ag.Lav., a qual minimizou os problemas de inibição pelo sulfeto, uma vez que o sulfeto reage com Fe(III) precipitando ou formando enxofre elementar. Em relação ao sequenciamento do gene rRNA 16S em EGSB-Fe-Ag.Lav. não foi observado a predominância de nenhum gênero.

5.5 Comparação dos resultados em relação as diferentes hipóteses

Buscou-se na elaboração desse capítulo compilar os resultados obtidos relacionados as diferentes hipóteses para facilitar de modo geral a comparação e discussão dos mesmos. Dessa forma, este capítulo foi dividido em operação dos reatores e caracterização microbiana (biologia molecular). No primeiro buscou-se analisar os resultados diante das diferentes condições aplicadas. Enquanto, no segundo buscou-se a

identificação de uma microbiota comum responsável pela degradação da molécula de LAS.

5.5.1 Operação dos reatores

O foco do trabalho foi o tratamento de LAS em água residuária de lavanderia comercial. Isso ficou evidente, uma vez que o LAS Padrão foi utilizado apenas em EGSB-BA-Etapa I e EGSB-Fe-Etapa I, ou seja, apenas duas etapas do total de oito. Nesses casos, aplicou-se cargas orgânicas de 21 ± 9 - 107 ± 42 mg DQO/g STV.d (Tabela 5.23). Cabe ressaltar que as maiores cargas orgânicas foram aplicadas com o uso de meio sintético, em que eram adicionadas fontes de carbono, tais como, etanol, metanol e extrato de levedura. Por outro lado, as menores COE sempre foram associadas com a alimentação exclusiva com água de lavanderia comercial. A COE tem relação direta com a concentração de LAS, uma vez que para obter a concentração de LAS afluyente desejada era necessária a diluição da água de lavanderia. Todavia, verificou-se para cada lote de água residuária características particulares. Por exemplo, em EGSB-Ag.Lav Etapa III com $28,8 \pm 6,5$ mgLAS/L verificou-se COE de 21 ± 11 mg DQO/g STV.d. Enquanto, em EGSB-Ag.Lav Etapa II com $12,3 \pm 3,2$ mgLAS/L foi de COE foi de 21 ± 9 mg DQO/g STV.d, ou seja, valores de COE semelhantes, mesmo com concentrações de LAS diferentes.

Verificou-se pouca oscilação ($11,2 \pm 5,3$ - $16,4 \pm 6,8$ mg/L) para LAS afluyente, principalmente, quando o objetivo era trabalhar com CLE de aproximadamente $1,0$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹. Por outro lado, quando o objetivo foi trabalhar com CLE próximas de $2,0$ mg LAS.gSTV⁻¹.d⁻¹ a concentração de LAS afluyente foi mantida entre $24,4 \pm 8,9$ - $28,8 \pm 6,5$ mg/L. Destaca-se que a concentração de sólidos totais na manta de lodo do reator foi mantida em $\sim 8,0$ g/L.

As remoções de DQO foram afetadas em função da concentração de LAS afluyente nas operações com COE baixas (EGSB-Ag.Lav Etapa II – 61 % e EGSB-Ag.Lav Etapa III – 48 %). Por outro lado, para os reatores operados nos experimentos da hipótese A verificou-se acima de 90 % de remoção, mesmo após a adição de água residuária de lavanderia. Nos reatores operados com suplementação com ferro (EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav) verificou-se remoção de DQO inferior a 60 %.

Em relação à remoção de LAS os maiores valores foram obtidos quando a fonte de LAS era a água residuária (EGSB-BA Etapa II – 76 %; EGSB-BNA-Etapa I – 78 %;

EGSB-Ag.Lav Etapa II – 93 %; EGSB-Ag.Lav Etapa III – 59 %; EGSG-Fe-Ag.Lav Etapa I – 91 %), ao invés de LAS Padrão (EGSB-BA-Etapa I – 63 % e EGSB-Fe-Etapa I – 84 %), mesmo levando em conta as CLE e particularidades de cada operação. Acreditou-se que mudanças nos mecanismos de adsorção do LAS ao lodo granulado podem ter contribuído para essas diferenças.

Exceção ao EGSB-Ag.Lav Etapa I (adaptação do lodo) cuja operação foi de 26 dias, as demais etapas foram realizadas em tempo superior a 60 dias. Ressalta-se a importância de períodos superiores a 60 dias para maior confiabilidade dos resultados, principalmente relacionado ao LAS, o qual por determinado período adsorve na biomassa. Em relação ao TDH os valores aplicados foram entre 36 – 40h.

Tabela 5.23: Resumo dos resultados da operação dos reatores nas diferentes hipóteses.

	Hipótese A			Hipótese B			Hipótese C	Hipótese D
	<i>EGSB-BA</i>		<i>EGSB-BNA</i>	<i>EGSB-Ag.Lav.</i>			<i>EGSB-Fe</i>	<i>EGSB-Fe-Ag.Lav</i>
	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa I</i>
Alimentação								
Meio Sintético	+	+	+	+	-	-	+	-
Água Residuária de Lavanderia	-	+	+	-	+	+	-	+
LAS Padrão	+	-	-	-	-	-	+	-
EDTA-Fe(III)	-	-	-	-	-	-	+	+
Carga Orgânica Específica (mg DQO/g STV.d)	71 ± 13	77 ± 16	77 ± 16	69 ± 9	21 ± 9	21 ± 11	107 ± 42	34 ± 16
LAS Afluente (mg/L)	13,2 ± 2,3	11,2 ± 5,3	11,5 ± 5,4	-	12,3 ± 3,2	28,8 ± 6,5	16,4 ± 6,8	24,4 ± 8,9
Carga de LAS específica (mg LAS.gSTV ⁻¹ .d ⁻¹)	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,7	0,9 ± 0,3	-	1,0 ± 0,3	2,7 ± 0,7	1,5 ± 0,7	2,2 ± 0,9
Fe(III) Total (µMol/L)	-	-	-	-	-	-	7.276 ± 2525	3.624 ± 1131
Resultados								
DQO Afluente (mg/L)	755 ± 102	813 ± 75	815 ± 73	755 ± 277	221 ± 81	237 ± 114	1.109 ± 398	399 ± 160
DQO Efluente (mg/L)	61 ± 24	72 ± 26	84 ± 34	90 ± 40	81 ± 30	123 ± 76	607 ± 333	177 ± 97
Remoção de DQO (%)	92 ± 3	91 ± 3	90 ± 4	89 ± 19	61 ± 15	48 ± 19	53 ± 22	56 ± 29
LAS Efluente (mg/L)	4,8 ± 1,6	2,4 ± 1,7	2,1 ± 1,8	-	0,9 ± 1,2	12,2 ± 7,7	2,9 ± 2,5	2,0 ± 1,7
Remoção de LAS (%)	63,5 ± 10,3	76,4 ± 18,1	78,6 ± 16,7	-	92,9 ± 10,3	58,6 ± 25,8	84,3 ± 12,6	91,2 ± 7,3
Redução de Fe (%)	-	-	-	-	-	-	64 ± 22	10 ± 13
Sulfeto (mg S /L)	-	3,7 ± 3,9	3,22 ± 3,9	-	1,7 ± 2,5	22,0 ± 28,8	-	-
AOV Efluente (mg HAc/L)	11 ± 13	3 ± 4	7 ± 14	-	10 ± 10	25 ± 27	160 ± 382	61 ± 17
Duração (dias)	218	173	197	26	65	158	127	78
TDH (horas)	38 ± 4	39 ± 4	39 ± 4	38 ± 5	38 ± 4	39 ± 5	36 ± 7	40 ± 5

5.5.2 *Caracterização Microbiana*

O sequenciamento do gene rRNA 16S foi realizado em duas plataformas: 454 e Ion Torrent. O número de sequências obtidas, tamanho do fragmento e custo por amostra são as principais diferenças. Ressalta-se que embora os iniciadores fossem diferentes, a região alvo, em ambos os casos, foi a V4. O tamanho médio via plataforma 454 com os iniciadores utilizados neste trabalho foi de 225 pb, enquanto via plataforma Ion Torrent os fragmentos obtidos foram acima de 310 pb (Tabela 5.24).

Ressalta-se que, atualmente, por meio da tecnologia 454 pode-se sequenciar fragmentos próximos a 800 pb, todavia, os iniciadores utilizados neste trabalho foi um fator limitante. Outro ponto que mereceu destaque foi o número de sequências. Para 454 observou-se 3.161 – 6.442 sequências, enquanto, para Ion Torrent obteve-se 41.787 – 157.948 sequências. O número de sequências está relacionado com os custos, enquanto, no 454 eram necessárias várias amostras para dividir o custo de uma corrida, no Ion Torrent isso não foi necessário uma vez que os valores eram mais acessíveis. O maior esforço amostral permitiu acessar táxons pouco abundantes, além da robustez nas análises como um todo.

Em virtude do aumento do número de sequências, o número de OTUs foi de 232-312 nas amostras referente a hipótese A e 1.796-3.957 para aquelas das hipóteses B, C e D. Esse maior número de sequências refletiu em valores maiores de estimadores de riqueza e índices de diversidade. Nas amostras sequenciadas via plataforma 454 e Ion Torrent os índices de Shannon obtido foram de 4,56 - 4,92 e 5,74 – 6,90, respectivamente.

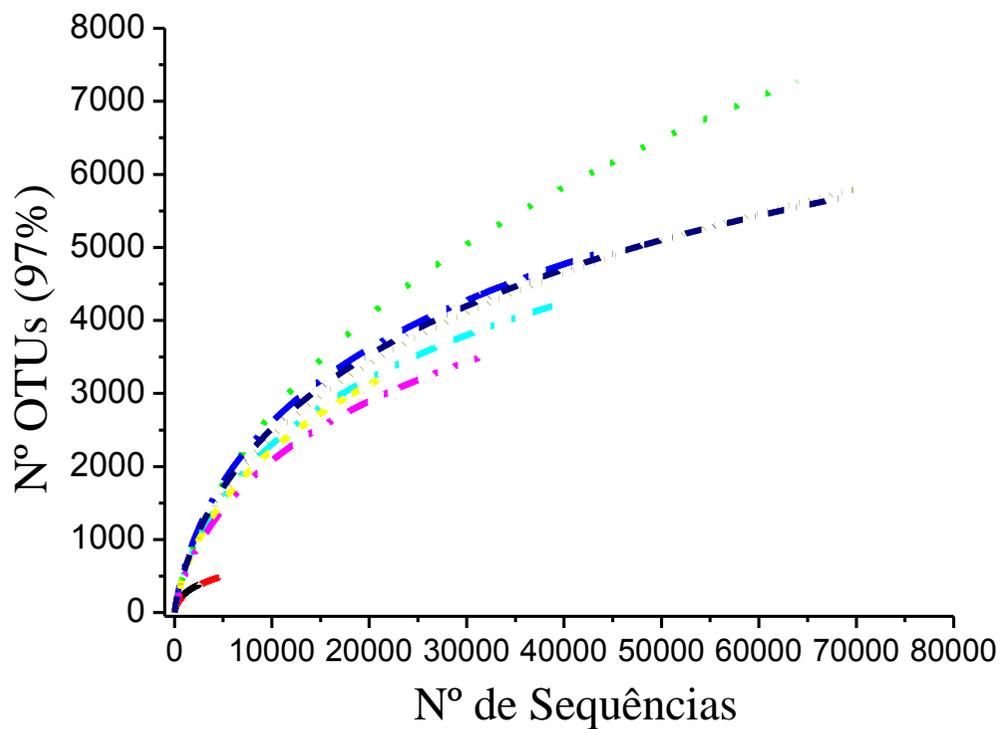
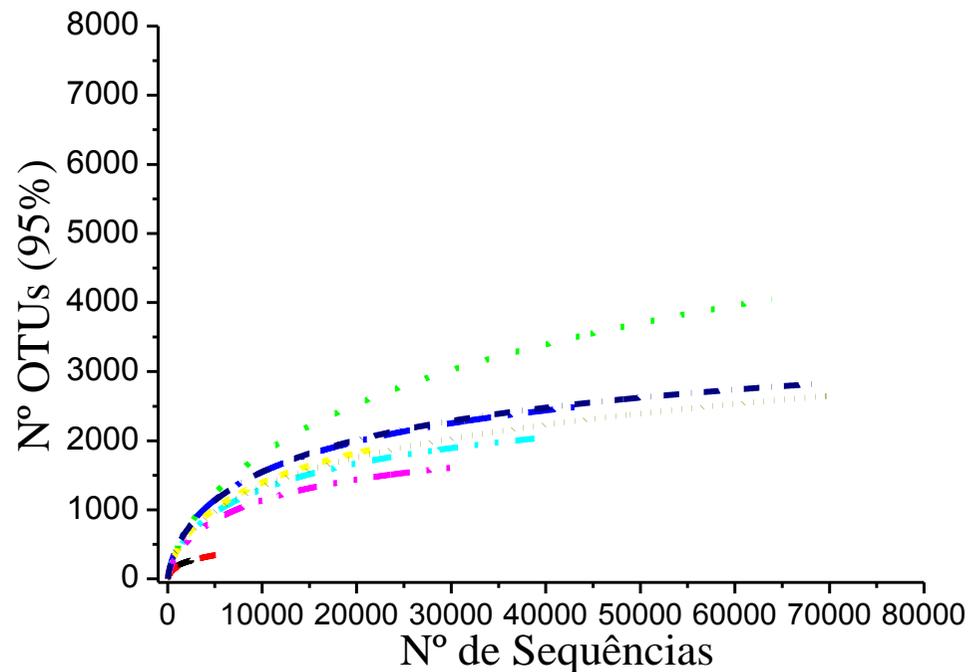
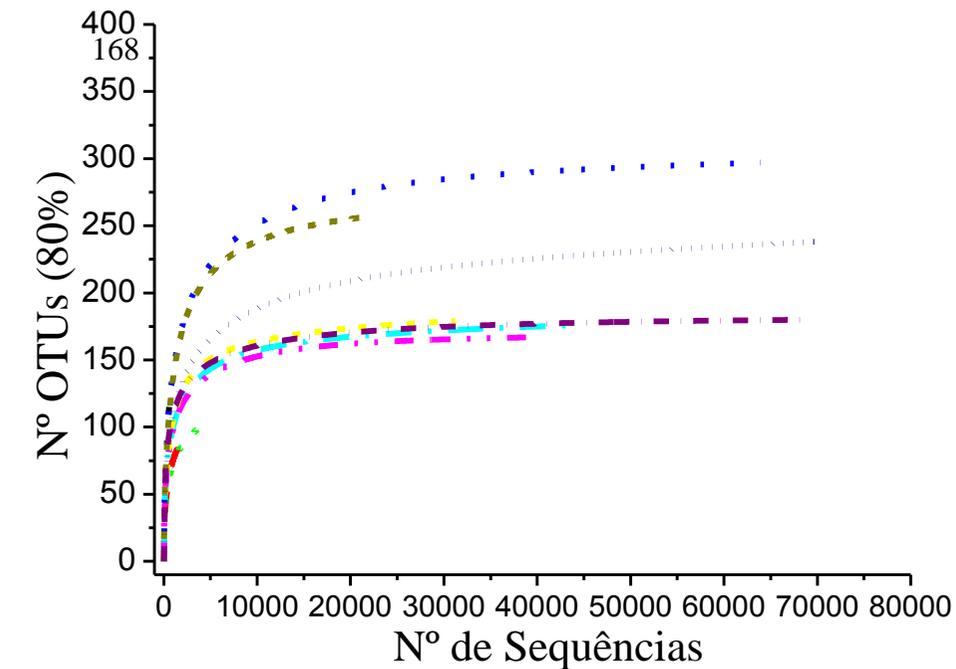
Por meio das curvas de rarefação verificou-se que o esforço amostral favoreceu o acesso a quase todos os filos presentes nas amostras (Figura 5.40). Todavia, para o nível de gênero e espécie o esforço amostral não foi suficiente para acessar toda a diversidade.

Tabela 5.24: Resumo dos resultados do sequenciamento das amostras nas diferentes hipóteses.

	EGSB-BA Etapa II *	EGSB-BNA Etapa I *	EGSB-Ag.Lav Etapa II[▲]		EGSB-Ag.Lav Etapa III[▲]		Inóculo[▲]	EGSB-Fe[▲]	EGSB-Fe Ag.Lav[▲]
	<i>A. Composta</i>	<i>A. Composta</i>	<i>ML</i>	<i>SF</i>	<i>ML</i>	<i>SF</i>	<i>A. Composta</i>	<i>A. Composta</i>	<i>A. Composta</i>
Cobertura - Fórmula de Good (%)	94%	96%	95%	96%	96%	96%	93%	97%	97%
Total de sequências (dados brutos)	3.161	6.442	140.686	96.442	81.282	78.408	41.787	148.042	157.948
Total de sequências (dados filtrados)	2.521	5.126	63.957	44.330	40.273	31.260	22.127	69.645	68.528
Tamanho Médio (pb)	225±1	225±1	329 ± 44	313 ± 47	327 ± 45	316 ± 42	330 ± 47	319 ± 45	323 ± 48
Total de OTUs	382	505	7.277	4.955	4.254	3.489	3.272	5.791	5.682
Singletons	150	193	3.320	1.798	1.571	1.384	1.476	2.211	1.867
Total de OTUs (classificação taxonômica)	232	312	3.957	3.157	2.683	2.105	1.796	3.580	3.815
Estimadores de Riqueza									
Chao1	544 ± 74	749 ± 92	6.214 ± 523	4.732 ± 1.125	4.256 ± 1.331	3.072 ± 1.833	2.058 ± 1.651	3.243 ± 1.544	4.446 ± 849
Rarefação	382 ± 20	505 ± 19	4.623 ± 602	3.613 ± 832	3.164 ± 998	2.268 ± 1.269	1.520 ± 1.127	2.592 ± 1.370	3.684 ± 731
Índices de Diversidade									
Shannon (H)	4,92 ± 0,11	4,56 ± 0,16	6,24 ± 0,56	6,90 ± 0,16	6,45 ± 0,42	6,10 ± 0,61	5,74 ± 0,74	6,16 ± 0,55	6,56 ± 0,31

* Plataforma 454 – Pirosequenciamento

▲ Plataforma Ion Torrent – Chip 318 modo V2 400 pb.



- EGSB-BA Etapa II
- - EGSB-BNA Etapa I
- · EGSB-Ag.Lav. Etapa II ML
- · EGSB-Ag.Lav. Etapa II SF
- · EGSB-Ag.Lav. Etapa III ML
- · EGSB-Ag.Lav. Etapa III SF
- · Inóculo
- · EGSB-Fe
- · EGSB-Fe-Ag.Lav.

Figura 5.40: Curvas de rarefação de todas as amostras sequenciadas neste trabalho. 80 % nível de filo, 95 % nível de gênero e 97 % nível de espécie. Amostras EGSB-BA e EGSB-BNA o sequenciamento foi realizado na plataforma 454 e as demais na plataforma Ion Torrent.

Por meio do uso do *RDP-Classifer* de 10,5 - 74,8 % das sequências foram classificadas. Os maiores valores foram obtidos em EGSB-Ag.Lav Etapa III SF (74,8 %) e EGSB-Fe (64,4 %), cujas biomassas foram identificadas via plataforma Ion Torrent (Tabela 5.25). Enquanto, os menores valores foram obtidos em EGSB-BA Etapa II (10,46 %) e EGSB-Ag.Lav Etapa II ML (16,1 %), a biomassa do primeiro reator foi identificada via plataforma 454 e a biomassa do segundo, via plataforma Ion Torrent.

No total foram obtidos 15, 19 e 20 filós distintos nas amostras referentes a hipótese A, hipótese B e, hipótese C, D e Inóculo, respectivamente. Representantes pertencentes aos seguintes filós foram identificados: Proteobacteria, Bacteroidetes, Synergistetes e Firmicutes. Em relação ao número de gêneros foram obtidos 45, 164 e 171, nas amostras referente a hipótese A, hipótese B e, hipótese C, D e Inóculo, respectivamente.

Total de 37 gêneros foram identificados e relacionados com a degradação de compostos aromáticos e/ou de LAS. Desses 37 gêneros, quatro deles foram identificados em todas as amostras (excluindo o inóculo): *Desulfobulbus*, *Geobacter*, *Syntrophorhabdus* e *Sporomusa*. Além disso, identificou-se outros gêneros na grande maioria das amostras: *Comamonas*, *Holophaga*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Synergistes*. Dessa forma, por serem observados em alta frequência nas amostras, provavelmente, podem ter relação direta com a degradação de LAS. Cabe ressaltar que esses gêneros já foram identificados em trabalhos com LAS (Okada, 2012; Delforno *et al.*, 2012; Delforno *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2009; Braga, 2014) o que reforça a idéia de um núcleo microbiológico comum capaz de degradar o LAS. Analisando especificamente esse núcleo em comum mencionado, com exceção do *Comamonas*, *Mycobacterium* e *Pseudomonas* que são aeróbios, os demais são microrganismos anaeróbios (*Desulfobulbus*; *Sporomusa*; *Holophaga*; *Stenotrophomonas*; *Synergistes*; *Geobacter* e *Syntrophorhabdus*).

Na Figura 5.41 é possível visualizar os valores de abundância relativa em função da condição de crescimento dos gêneros relacionado com a degradação do LAS cujas abundâncias relativas em função do número de sequências encontram-se detalhadas na Tabela 5.25. Em geral, grandes partes dos microrganismos relacionados com a degradação do LAS estão relacionadas com condição de crescimento anaeróbio facultativo ou anaeróbio. Destacam-se a biomassa do inóculo, EGSB-Fe-Ag.Lav e

EGSB-BA Etapa II. A maior porcentagem de organismos aeróbios foi encontrada nas biomassas do SF (separador de fase) do EGSB-Ag.Lav. Etapa II (38 %) e Etapa III (36%). Provavelmente, pela maior facilidade de difusão de oxigênio nessa região do reator.

Tabela 5.25: Abundância relativa dos gêneros relacionados com a degradação de composto aromáticos.

Em negrito encontram-se os gêneros em comum em todas as amostras. (Cont.)

	<i>EGSB-BA</i>	<i>EGSB-BNA</i>	<i>EGSB-Ag.Lav.</i>				Inóculo	<i>EGSB-Fe</i>	<i>EGSB-Fe-Ag.Lav</i>
	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II ML</i>	<i>Etapa II SF</i>	<i>Etapa III ML</i>	<i>Etapa III SF</i>		<i>Etapa I</i>	<i>Etapa I</i>
<i>Acetobacterium</i>	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i>	-	-	0,01	0,17	0,09	0,03	-	-	-
<i>Aeromonas</i>	-	-	-	0,02	1,03	0,49	-	0,04	0,09
<i>Azoarcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-
<i>Brevundimonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,03	0,05
<i>Chelatococcus</i>	-	-	-	0,04	0,34	0,92	-	-	-
<i>Comamonas</i>	-	-	0,13	0,24	0,08	0,07	-	0,11	0,04
<i>Dechloromonas</i>	-	-	0,02	0,07	-	-	-	0,02	0,19
<i>Desulfatirhabdium</i>	-	-	-	0,01	0,39	0,27	-	-	-
<u>Desulfobulbus</u>	2,49	27,43	0,05	0,08	0,21	0,17	0,01	0,43	0,003
<i>Desulfomicrobium</i>	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-
<i>Desulfomonile</i>	0,08	-	0,001	0,20	3,11	4,47	-	-	-
<i>Desulfovibrio</i>	-	-	-	0,09	0,04	0,01	-	0,14	-
<i>Desulfovirga</i>	0,59	0,24	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gemmatimonas</i>	-	0,04	0,42	0,26	0,01	-	-	-	0,07
<u>Geobacter</u>	0,08	0,16	0,31	1,74	2,33	3,90	0,93	17,53	0,45
<i>Georgfuchsia</i>	-	-	-	0,47	0,01	-	-	-	0,10
<i>Geothrix</i>	-	-	0,01	0,04	0,01	0,02	-	-	0,22
<i>Holophaga</i>	0,72	1,50	0,01	0,11	0,19	0,05	-	-	0,12

Cont. Tabela 5.25: Abundância relativa dos gêneros relacionados com a degradação de composto aromáticos.

Em negrito encontram-se os gêneros em comum em todas as amostras.

	<i>EGSB-BA</i>	<i>EGSB-BNA</i>	<i>EGSB-Ag.Lav.</i>				Inóculo	<i>EGSB-Fe</i>	<i>EGSB-Fe-Ag.Lav</i>
	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II ML</i>	<i>Etapa II SF</i>	<i>Etapa III ML</i>	<i>Etapa III SF</i>		<i>Etapa I</i>	<i>Etapa I</i>
<i>Hydrogenophaga</i>	-	-	0,01	0,04	-	-	-	0,01	0,17
<i>Magnetospirillum</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,10
<i>Mycobacterium</i>	-	-	0,001	0,20	0,01	0,15	-	0,01	0,09
<i>Oxobacter</i>	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Parvibaculum</i>	0,17	-	-	-	0,25	0,13	-	-	0,03
<i>Pigmentiphaga</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,01	0,14
<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,01	0,45	9,55	3,74	-	0,13	0,19
<i>Rhodopseudomonas</i>	-	-	0,02	0,07	0,10	0,07	-	-	-
<i>Shewanella</i>	-	-	-	-	0,37	0,18	-	0,44	0,77
<i>Soehngenia</i>	-	-	-	-	-	-	-	8,62	-
<i>Sphingosinicella</i>	-	-	0,03	0,04	-	-	-	-	-
<i>Sporomusa</i>	0,55	0,26	0,06	0,66	0,11	0,18	-	0,85	0,03
<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	0,09	0,64	0,90	0,92	0,10	0,63	0,01
<i>Sulfuritalea</i>	-	-	0,05	0,14	0,01	0,01	-	-	-
<i>Synergistes</i>	3,92	1,78	-	-	0,04	0,06	0,01	0,09	-
<i>Syntrophomonas</i>	-	-	0,02	0,01	0,01	-	1,25	-	0,03
<i>Syntrophorhabdus</i>	6,28	3,10	0,77	0,32	0,28	0,07	1,51	0,12	0,91
<i>Zoogloea</i>	-	-	-	0,02	0,05	0,01	-	-	-
Total	15,01	34,68	2,03	6,12	19,54	15,92	4,00	30,00	4,00
Não Classificado	89,54	64,85	83,90	69,70	43,60	25,20	81,00	35,60	69,90

Por outro lado, verificou-se para os reatores suplementados com ferro gêneros relacionados com a degradação do LAS e crescimento em condições ligeiramente distintas. Em EGSB-Fe-Ag.lav. e EGSB-Fe, 60 % e 40 % dos gêneros foram relacionados com crescimento anaeróbio, respectivamente. A maior proporção de microrganismos aeróbios foi identificada em EGSB-Fe (36 %) contra 25 % em EGSB-Fe-Ag.Lav.

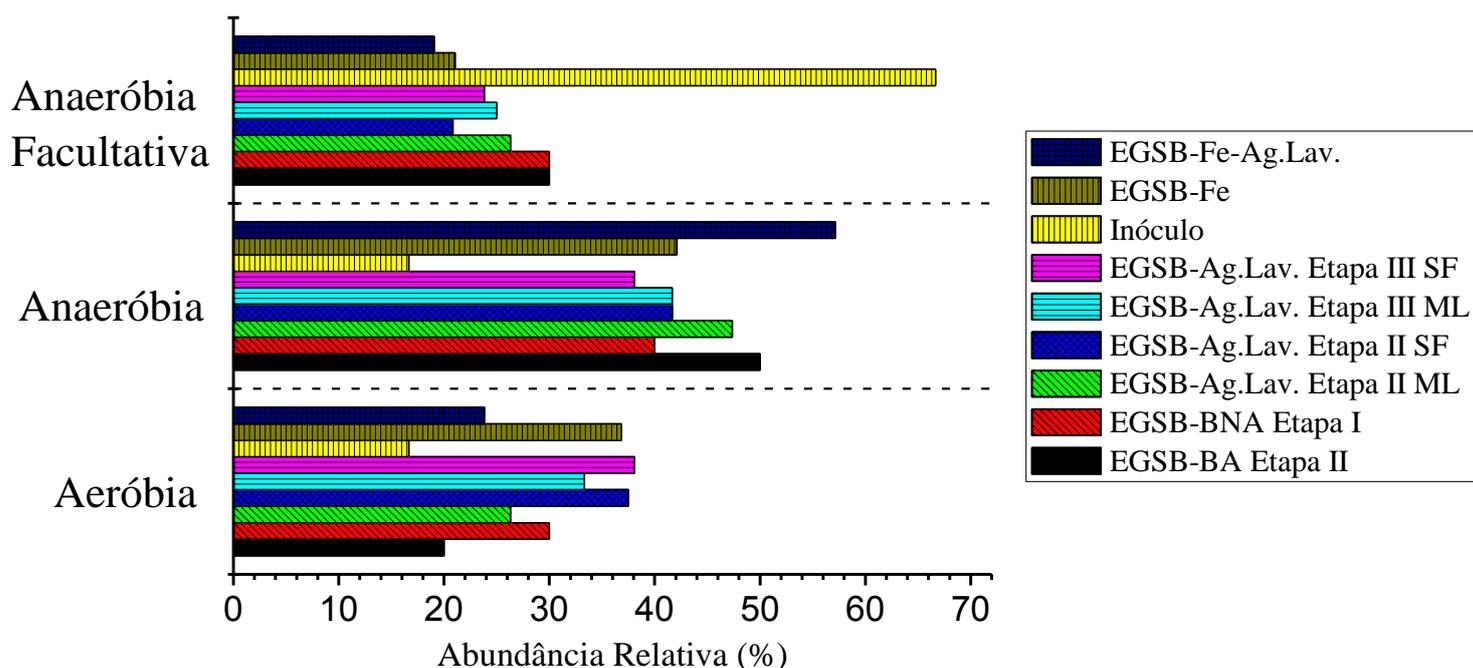


Figura 5.41: Condição de crescimento dos gêneros relacionados com a degradação de compostos aromáticos e/ou LAS para todas as condições de operação do EGSB.

Por meio da construção de árvores filogenéticas buscou-se sanar um dos principais limitantes do uso do *RDP-Classifer* que corresponde a baixa confiabilidade da classificação das sequências ao nível de espécie. Para tanto, foi realizada a aproximação filogenética de algumas OTUs com “espécies tipo” disponíveis no banco de dados do RDP. No total foram construídas três árvores filogenéticas, a primeira relacionada com as amostras da hipótese A (Figura 5.42), a segunda relacionada com as amostras da hipótese B (Figura 5.43) e, por últimos as sequências relacionadas à hipótese C, D e ao inóculo (Figura 5.44).

Dessa forma, *Sporomusa* identificado em quase todas as amostras, provavelmente, correspondeu a única espécie; ou seja, *Sporomusa sphaeroides*. Por outro lado, foi possível verificar por meio das árvores filogenéticas que, provavelmente,

duas ou mais espécies de *Desulfobulbus* estavam presentes, tais como, *Desulfobulbus elongatus* e *Desulfobulbus rhabdoformis*.

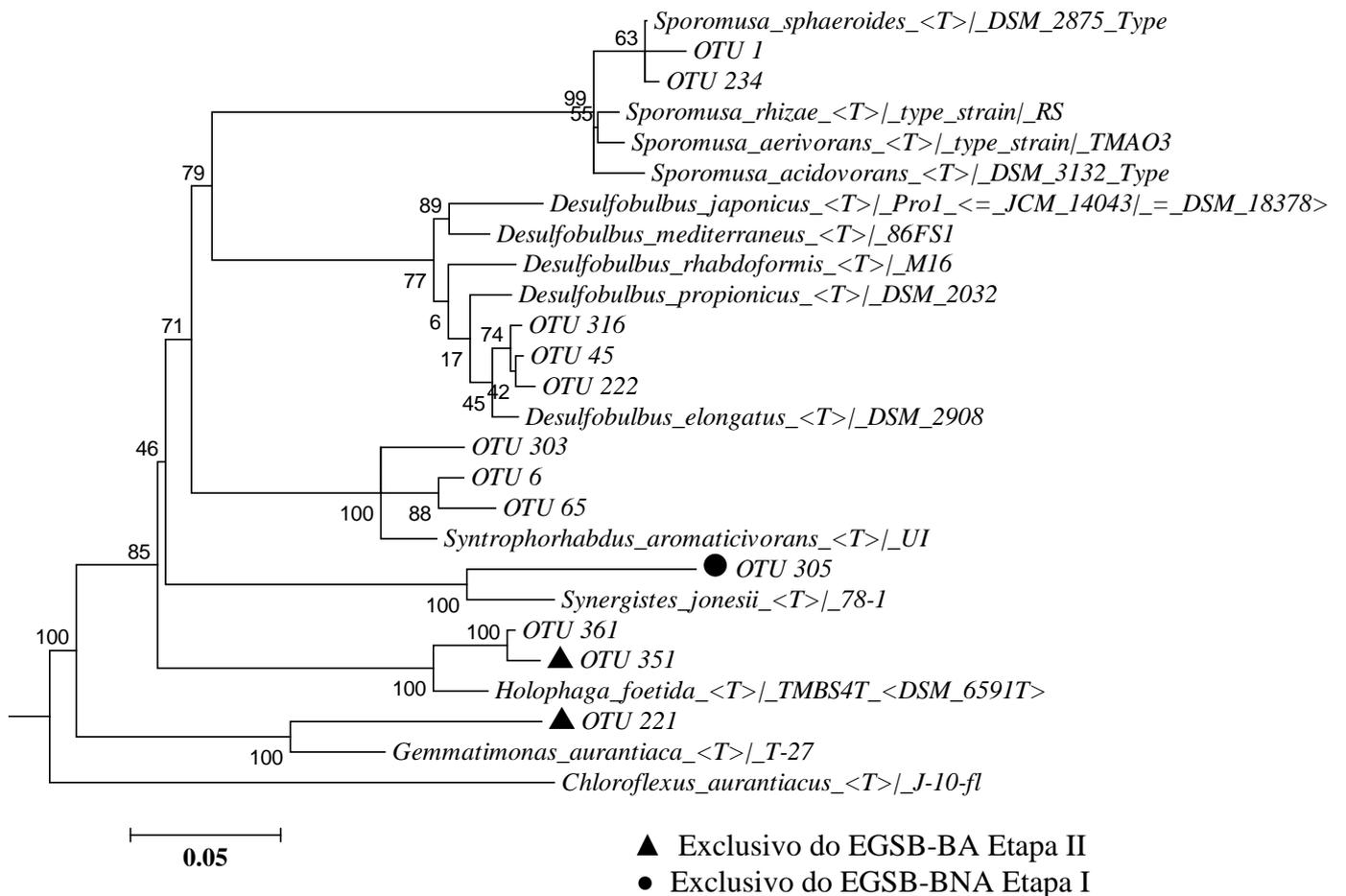


Figura 5.42: Árvore filogenética das principais OTUs relacionadas com a degradação do LAS nas amostras obtidas durante a hipótese A. A barra de escala informa a distância filogenética e *Chloroflexus aurantiacus* foi utilizada com outgroup. <T> significa é uma espécie tipo.

Ressalta-se que no banco de dados foi obtida apenas única espécie tipo pertencente ao gênero *Synergistes* (*Synergistes jonesii*), *Holophaga* (*Holophaga foetida*), *Gemmatimonas* (*Gemmatimonas aurantiaca*) e *Syntrophorhabdus* (*Syntrophorhabdus aromaticivorans*).

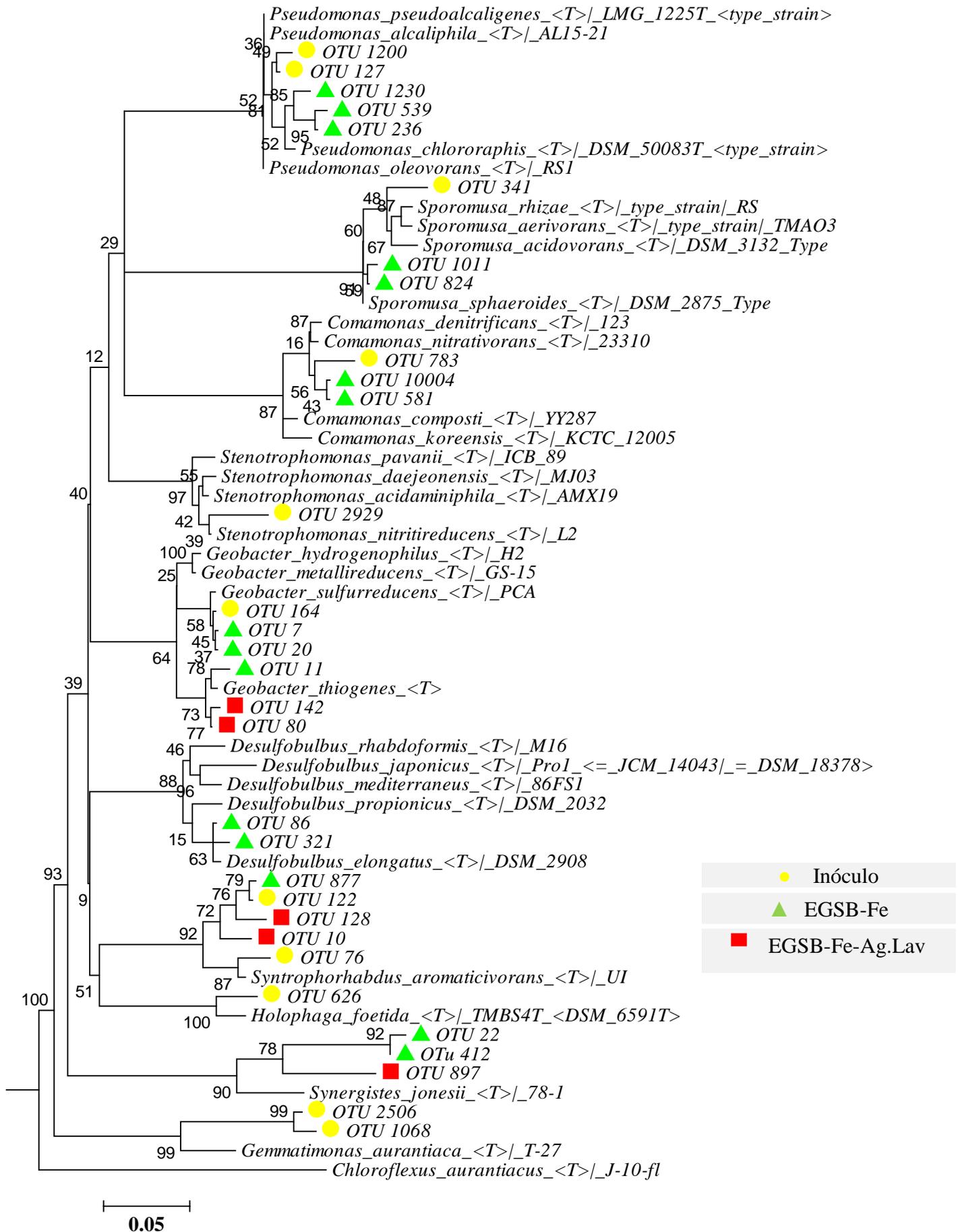


Figura 5.43: Arvore filogenética das principais OTUs relacionadas com a degradação do LAS nas amostras obtidas durante a hipótese B. A barra de escala informa a distância filogenética e *Chloroflexus aurantiacus* foi utilizada com outgroup. <T> significa é uma espécie tipo.

Verificou-se para as diversas OTUs relacionadas a *Geobacter* aproximação filogenética a duas espécies (*Geobacter thiogenes* e *Geobacter sulfurreducens*). Ressalta-se que em EGSB-Fe verificou-se elevada abundância relativa ao gênero *Geobacter* e, provavelmente, as duas espécies citadas estavam presentes. A principal diferença entre essas duas espécies refere-se a capacidade de utilizar distintos doadores de elétrons. Enquanto, representantes semelhantes a *G. thiogenes* possuem a capacidade de utilizar acetato, benzoato, etanol, propionato, benzaldeído, fenol entre outros, aqueles semelhantes a *G. sulfurreducens* utilizam número limitado de doadores de elétrons (acetato e H₂) (Brenner *et al.*, 2005).

Em relação a *Pseudomonas*, as OTUs obtidas referente as hipóteses B, C, D e inóculo foram relacionadas a *Pseudomonas chlororaphis*. Cabe ressaltar que todas as espécies pertencentes a *Pseudomonas* possuem capacidade metabólica de dessulfonação e β/ω -oxidação, como mencionado anteriormente. Em relação a *Comamonas*, as OTUs referentes à Hipótese C, D e inóculo (Figura 5.44) foram relacionadas à *Comamonas denitrificans*.

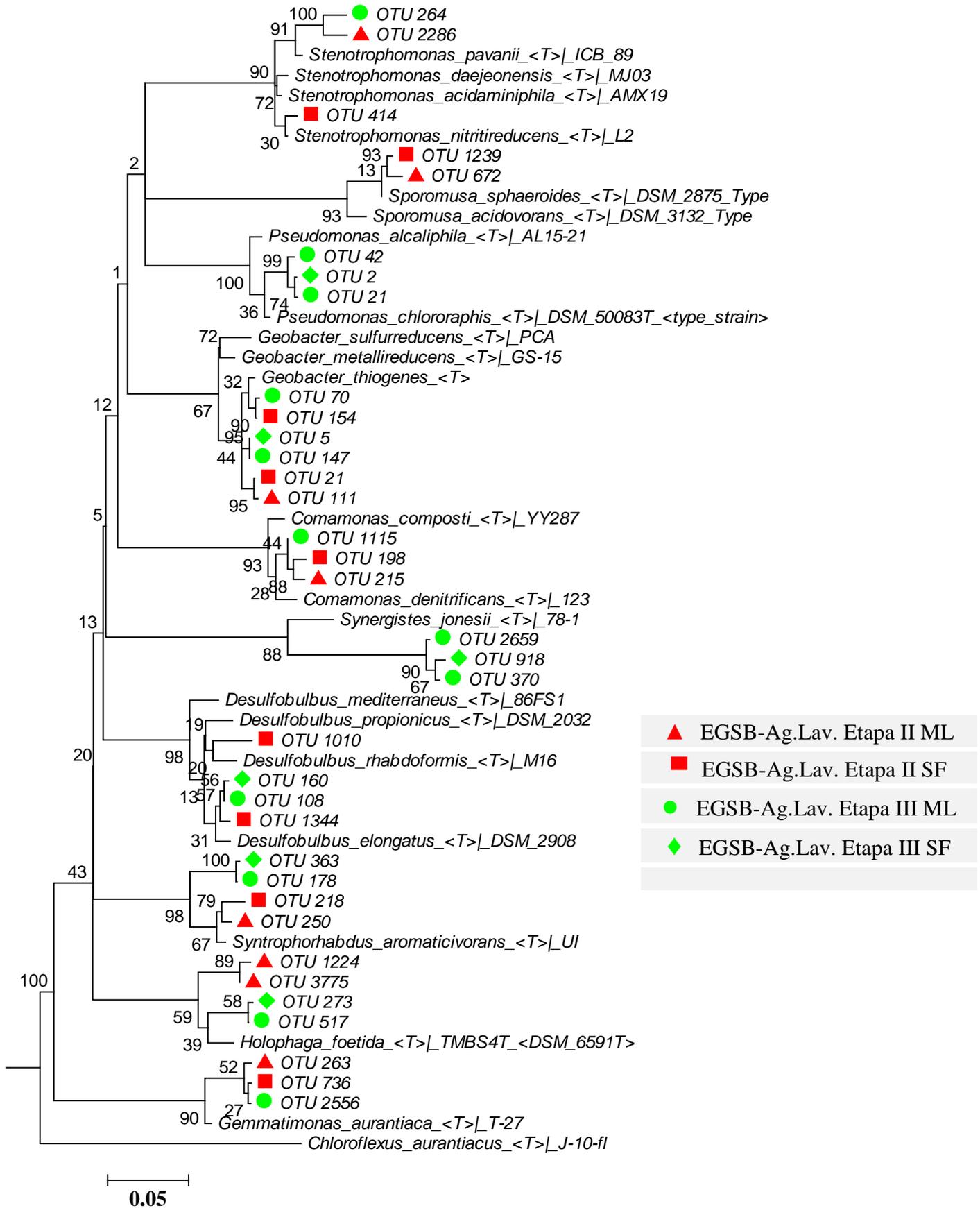


Figura 5.44: Arvore filogenética das principais OTUs relacionadas com a degradação do LAS nas amostras obtidas durante a hipótese C, D e inóculo. A barra de escala informa a distância filogenética e *Chloroflexus aurantiacus* foi utilizada com outgroup. <T> significa é uma espécie tipo.

6 Considerações Finais

Hipótese A: Um reator EGSB com biomassa adaptada ao alquilbenzeno linear sulfonado, terá maior estabilidade e maior eficiência de remoção (DQO e LAS), no tratamento de água residuária de lavanderia comercial em comparação com um sistema com biomassa adaptada.

- **Hipótese refutada** – Por meio da análise dos resultados verificou-se que a adaptação prévia da biomassa ao LAS Padrão não resultou em maior estabilidade e maior eficiência de remoção de DQO e LAS em água residuária de lavanderia comercial. Mais especificamente foi possível concluir que:
- Os resultados para a remoção de LAS em água residuária no reator com biomassa adaptada (EGSB-BA Etapa II) foi semelhante ao reator com biomassa não adaptada (EGSB-BNA).
 - Por meio da análise das Etapas I e II do EGSB-BA notou-se que maior remoção de LAS foi obtida em água de lavanderia (EGSB-BA Etapa II) em relação à condição com LAS Padrão (EGSB-BA Etapa I).
 - Por meio do pirosequenciamento, 7% e 31% do total de sequências das amostras EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I, respectivamente, foram relacionados com a degradação de compostos aromáticos e da molécula de LAS. Ao todo foram obtidos 10 gêneros distintos.

Hipótese B: A alimentação de um reator EGSB apenas com água residuária de lavanderia comercial e agente tamponante (bicarbonato de sódio), é suficiente para manter a estabilidade do sistema e remoções satisfatórias de DQO e LAS.

- **Hipótese aceita** – Por meio da análise dos resultados verificou-se que a alimentação do EGSB sem meio sintético e apenas com água residuária de lavanderia, não resultou em instabilidade do sistema e baixas remoções de LAS e DQO, quando comparado com EGSB com carga semelhante e suplementado com meio sintético. Mais especificamente foi possível concluir que:
- A média de remoção de LAS no reator não suplementado com meio sintético (EGSB-Ag.Lav. Etapa II) foi maior em relação aos reatores suplementados com meio sintético (EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I).

- O aumento da carga de LAS resultou em aumento da concentração de sulfeto efluente e, conseqüentemente, redução da remoção de LAS.
- Por meio do DGGE notou-se estratificação microbiana ao longo do reator, provavelmente, em função do tamanho do grânulo.
- Por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S, foi obtido 175 gêneros dos quais 33 foram relacionados com a degradação do LAS e/ ou compostos aromáticos. No total os gêneros relacionados com a degradação do LAS corresponderam a 2,0 - 19,5 % do total das sequências obtidas.

Hipótese C: A disponibilidade de Ferro III, como receptor final de elétrons, resulta em maiores eficiências de remoção do alquilbenzeno linear sulfonado (LAS Padrão) em reator EGSB.

➤ **Hipótese aceita** – A suplementação com Fe(III) favoreceu a remoção do LAS.

Mais especificamente foi possível concluir que:

- Notou-se um aumento da remoção de LAS quando comparado com um reator não suplementado (EGSB-BA Etapa I).
- A redução férrica ocorreu de forma não assimilativa, uma vez que os valores de Fe(Total) afluente e efluente foram similares.
- A redução férrica foi predominantemente biótica, uma vez que as concentrações de sulfeto efluente foram baixas.
- Por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S, notou-se enriquecimento de *Geobacter* com 17,53 % da abundância relativa. Enquanto, no inóculo a abundância relativa desse gênero foi de apenas 0,45 %.

Hipótese D: A disponibilidade de Ferro III, como receptor final de elétrons, resultou em maiores eficiências de remoção do alquilbenzeno linear sulfonado (presente em água de lavanderia) em reator EGSB.

- **Hipótese refutada** – Por meio das análises dos resultados verificou-se que embora tenha sido obtida elevada remoção de LAS, essa remoção não foi acompanhada pela redução férrica. Todavia, a suplementação com Fe(III), provavelmente, minimizou os problema de inibição do sulfeto observados em EGSB-Ag.Lav Etapa III.
- Não houve enriquecimento de *Geobacter*, portanto a suplementação com meio sintético foi essencial para o favorecimento desse gênero.
- A alta remoção de LAS obtida não foi acompanhada pela redução férrica

Para finalizar, a comparação da caracterização microbiana (sequenciamento do gene rRNA 16S) nas diferentes hipóteses permitiu definir uma microbiota em comum que provavelmente foi responsável pela degradação do LAS. Os microrganismos são os seguintes: *Desulfobulbus*, *Geobacter*, *Syntrophorhabdus*, *Sporomusa*, *Comamonas*, *Holophaga*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Synergistes*. Em geral, grande parte dos organismos relacionados com a degradação do LAS foi relacionada com condição de crescimento anaeróbio facultativo ou anaeróbio. Por outro lado, a maior porcentagem de organismos aeróbios foi encontrada nas amostras do SF (separador de fases) em EGSB-Ag.Lav. Etapa II (38 %) e Etapa III (36%). Além disso, cabe ressaltar os ganhos tecnológicos obtidos como: ausência de suplementação com meio sintético afluente e a não necessidade de adaptação da biomassa para a remoção do LAS em água residuária de lavanderia comercial. Esses ganhos tecnológicos representam em última análise diminuição de custos e, dessa forma, aumento da viabilidade do processo.

7 Conclusões

- Não foi necessária a adaptação da biomassa e a suplementação com meio sintético para o tratamento de LAS em água residuária de lavanderia comercial.
- Suplementação com Fe(III) resultou em aumento da remoção de LAS, desde que associado ao meio sintético.
- Houve estratificação microbiana ao longo do reator.
- Por meio do sequenciamento massivo foi possível a definição de um núcleo microbiológico comum, com 10 gêneros.

8 Sugestões

- Aumento de escala do reator para a avaliação da remoção de LAS em água de lavanderia sem suplementação de Fe(III) afluente.
- Recuperação do Fe(III) por meio da reoxigenação e reintrodução no sistema.
- Modificação do separador de fase do EGSB com o intuito de minimizar a retenção de sólidos nessa região.
- Estudo da microbiota presente em reatores biológicos por meio de uma abordagem metagenômica. Tal abordagem abrirá novas perspectivas sobre quais microrganismos participam da degradação da molécula de LAS, quais enzimas são responsáveis pelo seu catabolismo e possíveis rotas metabólicas envolvidas nesse processo. Além de fornecer informações sobre a diversidade e potencial biotecnológico dessa microbiota.
- Estudo da aplicação de novas plataformas de sequenciamento (Illumina) visando a diminuição dos custos e aumento da cobertura amostral. Associado a essa nova aplicação, tem-se os desafios computacionais que representam uma barreira a ser superada.

9 Bibliografia

- Abboud, M.M., Kheifat, K.M., Batarseh, M., Tarawneh, K.A., Al-Mustafa, A., Al-Madadhah, M., 2007. Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzenesulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pantoea agglomerans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 432-439.
- Achenbach, L.A., Michaelidou, U., Bruce, R.A., Fryman, J., Coates, J.D., 2001. *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 527-533.
- Allison, M.J., Mayberry, W.R., McSweeney, C.S., Stahl, D.A., 1992. *Synergistes jonesii*, gen. nov., sp. nov.: A Rumen Bacterium That Degrades Toxic Pyridinediols. *Syst Appl Microbiol*, 15, 522-529.
- Almendariz, F.J., Meraz, M., Soberon, G., Monroy, O., 2001. Degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugmented with a *Pseudomonas aeruginosa* (M113) strain. *Water Science and Technology*, 44, 183-188.
- Alphenaar, P.A., Visser, A., Lettinga, G., 1993. THE EFFECT OF LIQUID UPWARD VELOCITY AND HYDRAULIC RETENTION TIME ON GRANULATION IN UASB REACTORS TREATING WASTE-WATER WITH A HIGH SULFATE CONTENT. *Bioresour Technol*, 43, 249-258.
- Angelidaki, I., Petersen, S.P., Ahring, B.K., 1990. Effects of lipids on thermophilic anaerobic-digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Appl Microbiol Biotechnol*, 33, 469-472.
- Angelidaki, I., Torang, L., Waul, C.M., Schmidt, J.E., 2004. Anaerobic bioprocessing of sewage sludge, focusing on degradation of linear alkylbenzene sulfonates (LAS). *Water Science and Technology*, 49, 115-122.
- APHA, AWWA, WPCF. 2005. *Standard Methods for the Examination of water and wastewater. 21 ed.* American Public Health Association, Washington, DC.
- Arvin, E., Jensen, B.K., Gundersen, A.T., 1989. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl Environ Microbiol*, 55, 3221-3225.
- Beilen, J.B., Wubbolts, M.G., Witholt, B., 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*, 5, 161-174.
- Berna, J.L., Cossani, G., Hager, C.D., Rehman, N., Lopez, L., Schowonek, D., Steber, J., Taeger, K., Wind, T., 2007. Anaerobic biodegradation of surfactants - Scientific review. *Tenside Surfactants Detergents*, 44, 312-+.
- Braga, J.K. 2014. Caracterização microbiana e degradação de surfactante aniônico em reator anaeróbico de leito fluidificado com água residuária de lavanderia. in: *Escola de Engenharia de São Carlos*, Vol. Doutorado, Universidade de São Paulo. São Carlos.
- Braga, J.K., Varesche, M.B.A., 2014. Commercial Laundry Water Characterisation. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5, 8-16.
- Braga, J.K., Varesche, M.B.A. 2011. Commercial laundry water characterization for anaerobic treatment in fluidized bed reactor. in: *X Oficina e Seminário Latino Americano de Digestão Anaeróbia (DAAL)*. Ouro Preto, MG.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed.* Springer, New York.

- Breznak, J., 2006. The Genus *Sporomusa*. in: *Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, KH, Stackebrandt, E (Eds) The Prokaryotes, third ed Springer, New York*, 991-1001.
- Carmona, M., Zamorro, M.T., Blazquez, B., Durante-Rodriguez, G., Juarez, J.F., Valderrama, J.A., Barragan, M.J.L., Garcia, J.L., Diaz, E., 2009. Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73, 71-+.
- 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. *Bioresour Technol*.
- Coates, J.D., Achenbach, L.A., 2004. Microbial perchlorate reduction: Rocket-fuelled metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 569-580.
- 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., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 42, D633-D642.
- CONAMA. 2005. Resolução CONAMA no. 357. in: 53, (Ed.) CONAMA, Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, pp. 58-63.
- Cook, A.M., Laue, H., Junker, F., 1998. Microbial desulfonation. *FEMS Microbiol Rev*, 22, 399-419.
- Costa, J.C., Abreu, A.A., Ferreira, E.C., Alves, M.M., 2007. Quantitative image analysis as a diagnostic tool for monitoring structural changes of anaerobic granular sludge during detergent shock loads. *Biotechnol Bioeng*, 98, 60-68.
- Daffonchio, D., Thaveesri, J., Verstraete, W., 1995. Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors. *Appl Environ Microbiol*, 61, 3676-3680.
- Daims, H., Wagner, M., 2007. Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75, 237-248.
- Damiano, E.S.G., Silva, E.L. 2005. Tratamento da vinhaça em reator anaeróbico de leito fluidificado. in: *Anais do IV Seminário do Projeto Temático: Desenvolvimento, análise, aprimoramento e otimização de reatores anaeróbicos para tratamento de águas residuárias*. São Carlos, pp. 235-244.
- Dangmann, E., Stolz, A., Kuhm, A.E., Hammer, A., Feigel, B., Noisommit-Rizzi, N., Rizzi, M., Reuss, M., Knackmuss, H.J., 1989. Degradation of 4-aminobenzenesulfonate by a two-species bacterial coculture. *Biodegradation*, 7, 223-229.
- de Oliveira, L.L., Costa, R.B., Okada, D.Y., Vich, D.V., Duarte, I.C.S., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2010b. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials (vol 101, pg 5112, 2010). *Bioresour Technol*, 101, 7687-7687.
- de Oliveira, L.L., Duarte, I.C.S., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2009. Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. *J Environ Manage*, 90, 1261-1268.
- Delforno, T.P., Moura, A.G.L., Okada, D.Y., Varesche, M.B.A., 2014. Effect of biomass adaptation to the degradation of anionic surfactants in laundry wastewater using EGSB reactors. *Bioresour Technol*, 154, 114-121.

- Delforno, T.P., Okada, D.Y., Polizel, J., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2012. Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. *Bioresour Technol*, 107, 103-109.
- Denger, K., Cook, A.M., 1999. Note: Linear alkylbenzenesulphonate (LAS) bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulphur. *J Appl Microbiol*, 86, 165-168.
- Diaz, Z. 1984. Method of removing hydrogen sulfide from gases utilizing a stabilized chelate solution, Google Patents.
- Dickie, I.A., 2010. Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. *New Phytol*, 188, 916-918.
- Dillalo, R., Albertson, O.E., 1961. Volatile acids by direct titration. *Journal WPCF*, 33, 356-365.
- Dong, W., Eichhorn, P., Radajewski, S., Schleheck, D., Denger, K., Knepper, T.P., Murrell, J.C., Cook, A.M., 2004. *Parvibaculum lavamentivorans* converts linear alkylbenzenesulphonate surfactant to sulphophenylcarboxylates, alpha,beta-unsaturated sulphophenylcarboxylates and sulphophenyldicarboxylates, which are degraded in communities. *J Appl Microbiol*, 96, 630-640.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 2003. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 8817-8822.
- Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Buzzini, A.P., Adorno, M.A.T., Varesche, M.B.A., 2006. Development of a method by HPLC to determine LAS and its application in anaerobic reactors. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 1360-1367.
- Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Mayor, M.S., Okada, D.Y., Varesche, M.B.A., 2010a. Degradation of detergent (linear alkylbenzene sulfonate) in an anaerobic stirred sequencing-batch reactor containing granular biomass. *Int Biodeterior Biodegrad*, 64, 129-134.
- Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Saavedra, N.K., Fantinatti-Garboggini, F., Menezes, C.B.A., Oliveira, V.M., Varesche, M.B.A., 2010b. Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in a horizontal anaerobic immobilized biomass reactor. *Bioresour Technol*, 101, 606-612.
- Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Saavedra, N.K.D., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.M., Varesche, M.B.A., 2008. Evaluation of the microbial diversity in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor treating linear alkylbenzene sulfonate. *Biodegradation*, 19, 375-385.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. 2006. *The Prokaryotes*. 3 ed. Springer, New York.
- Elsgaard, L., Petersen, S.O., Deboz, K., 2001. Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 1. Short-term effects on soil microbiology. *Environ Toxicol Chem*, 20, 1656-1663.
- Elshahed, M.S., Bhupathiraju, V.K., Wofford, N.Q., Nanny, M.A., McInerney, M.J., 2001. Metabolism of Benzoate, Cyclohex-1-ene Carboxylate, and Cyclohexane Carboxylate by "Syntrophus aciditrophicus" Strain SB in Syntrophic Association with H₂-Using Microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1728-1738.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Res*, 8, 186-194.

- Fahrback, M., Kuever, J., Meinke, R., Kaempfer, P., Hollender, J., 2006. *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp nov., a 17 beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 1547-1552.
- Faoro, H., Alves, A.C., Souza, E.M., Rigo, L.U., Cruz, L.M., Al-Janabi, S.M., Monteiro, R.A., Baura, V.A., Pedrosa, F.O., 2010. Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. *Appl Environ Microbiol*, 76, 4744-4749.
- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 626-631.
- Fish, J.A., Chai, B., Wang, Q., Sun, Y., Brown, C.T., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2013. FunGene: the Functional Gene Pipeline and Repository. *Frontiers in Microbiology*, 4.
- Friedler, E., Alfiya, Y., 2010. Physicochemical treatment of office and public buildings greywater. *Water Science and Technology*, 62, 2357-2363.
- Fu, B., Liao, X.Y., Liang, R., Ding, L.L., Xu, K., Ren, H.Q., 2011. COD removal from expanded granular sludge bed effluent using a moving bed biofilm reactor and their microbial community analysis. *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 915-923.
- Fu, M., Alexander, M., 1995. Use of surfactants and slurring to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43, 551-558.
- Fuentes, M., Aguirre, P.A., Scenna, N.J. 2009. Heterogeneous Anaerobic Biofilm Reactor Models Application to UASB, EGSB and AFB Reactors. In: *10th International Symposium on Process Systems Engineering: Part A*, (Ed.) R.M.d.C.A.O.B.E.C. deBritoAlves, Vol. 27, pp. 297-302.
- Fuentes, M., Scenna, N.J., Aguirre, P.A., 2011. A coupling model for EGSB bioreactors: Hydrodynamics and anaerobic digestion processes. *Chemical Engineering and Processing*, 50, 316-324.
- Ganesan, A., Chaussonnerie, S., Tarrade, A., Dauga, C., Bouchez, T., Pelletier, E., Le Paslier, D., Sghir, A., 2008. *Cloacibacillus evryensis* gen. nov., sp nov., a novel asaccharolytic, mesophilic, amino-acid-degrading bacterium within the phylum 'Synergistetes', isolated from an anaerobic sludge digester. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 2003-2012.
- Garcia-Balboa, C., Vicente, M.S., Blazquez, M.L., Gonzalez, F., Munoz, J.A., Ballester, A., 2011. Iron Speciation in Dissimilatory Fe(III)-reducing Cultures. *Geomicrobiol J*, 28, 371-379.
- Garcia-Morales, J.L., Nebot, E., Romero, L.I., Sales, D., 2001. Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by linear alkylbenzene-sulfonate (LAS). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 15, 13-19.
- Garcia, M.T., Campos, E., Dalmau, M., Illan, P., Sanchez-Leal, J., 2006. Inhibition of biogas production by alkyl benzene sulfonates (LAS) in a screening test for anaerobic biodegradability. *Biodegradation*, 17, 39-46.
- Garcia, M.T., Campos, E., Ribosa, I., Latorre, A., Sanchez-Leal, J., 2005. Anaerobic digestion of linear alkyl benzene sulfonates: Biodegradation kinetics and metabolite analysis. *Chemosphere*, 60, 1636-1643.
- Ge, J., Qu, J., Lei, P., Liu, H., 2004. New bipolar electrocoagulation–electroflotation process for the treatment of laundry wastewater. *Separation and Purification Technology*, 36, 33-39.

- Ghadessy, F.J., Ong, J.L., Holliger, P., 2001. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 4552-4557.
- GILBERT, W., MAXAM, A., 1973. The Nucleotide Sequence of the lac Operator. *Proc Nat Acad Sci*, 70, 3581-3584.
- Glenn, T.C., 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11, 759-769.
- Goudar, C., Strevett, K., Grego, J., 1999. Competitive substrate biodegradation during surfactant-enhanced remediation. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, 125, 1142-1148.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J., 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol*, 66, 5488-5491.
- Hamady, M., Knight, R., 2009a. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res*, 19, 1141-1152.
- Hamady, M., Walker, J., Harris, J., Gold, N., Knight, R., 2008. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat Methods*, 235-237.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01htm, 4.
- Harwood, C.S., Gibson, J., 1988. Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol*, 54, 712-717.
- Heising, S., Richter, L., Ludwig, W., Schink, B., 1999. *Chlorobium ferrooxidans* sp nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in coculture with a "Geospirillum" sp strain. *Arch Microbiol*, 172, 116-124.
- Heising, S., Schink, B., 1998. Phototrophic oxidation of ferrous iron by a *Rhodomicrobium vanniellii* strain. *Microbiology-Uk*, 144, 2263-2269.
- HERA. 2007. Human and environmental risk assesment on ingredients of European household cleaning products-linear alkylbenzene sulphonate, LAS - Linear Alkylbenzene sulphonate.
- Hery, M., Singer, A.C., Kumaresan, D., Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Prosser, J.I., Thompson, I.P., Murrell, J.C., 2008. Effect of earthworms on the community structure of active methanotrophic bacteria in a landfill cover soil. *Isme Journal*, 2, 92-104.
- Hwu, C.S., van Lier, J.B., Lettinga, G., 1998. Physicochemical and biological performance of expanded granular sludge bed reactors treating long-chain fatty acids. *Process Biochem*, 33, 75-81.
- Jensen, J., Smith, S.R., Krogh, P.H., Versteeg, D.J., Temara, A., 2007. European risk assessment of LAS in agricultural soil revisited: Species sensitivity distribution and risk estimates. *Chemosphere*, 69, 880-892.
- Jiang, S., Chen, Y.G., Zhou, Q., Gu, G.W., 2007. Biological short-chain fatty acids (SCFAs) production from waste-activated sludge affected by surfactant. *Water Res*, 41, 3112-3120.
- Jimenez, L., Breen, A., Thomas, N., Federle, T.W., Saylor, G.S., 1991. Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a 4-member aerobic bacterial consortium. *Appl Environ Microbiol*, 57, 1566-1569.

- Kämpfer, P., Lodders, N., Falsen, E., 2011. *Hydrotalea flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera Chitinophaga, Sediminibacterium, Lacibacter, Flaviumibacter, Flavisolibacter, Niabella, Niastella, Segetibacter, Parasegetibacter, Terrimonas, Ferruginibacter, Filimonas and Hydrotalea to the family Chitinophagaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61, 518-523.
- Kato, M.T., Field, J.A., Versteeg, P., Lettinga, G., 1994. FEASIBILITY OF EXPANDED GRANULAR SLUDGE BED REACTORS FOR THE ANAEROBIC TREATMENT OF LOW-STRENGTH SOLUBLE WASTEWATERS. *Biotechnol Bioeng*, 44, 469-479.
- Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W., Whitman, W.B. 2010. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. Springer, New York.
- Kristiansen, I.B., de Jonge, H., Nornberg, P., Mather-Christensen, O., Elsgaard, L., 2003. Sorption of linear alkylbenzene sulfonate to soil components and effects on microbial iron reduction. *Environ Toxicol Chem*, 22, 1221-1228.
- Kudo, Y., Nakajima, T., Miyaki, T., Oyaizu, H., 1997. Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiol Ecol*, 22, 39-48.
- Kumar, A.G., Kirubakaran, R., Nagesh, N., Parrado Rubio, J., Sekaran, G., 2010. Influence of fermentation metabolites on redox potential in anaerobic digestion of proteinaceous solid wastes by *Synergistes* sp. *Eng Life Sci*, 10, 368-373.
- Lack, J.G., Chaudhuri, S.K., Kelly, S.D., Kemner, K.M., O'Connor, S.M., Coates, J.D., 2002. Immobilization of radionuclides and heavy metals through anaerobic bio-oxidation of Fe(II). *Appl Environ Microbiol*, 68, 2704-2710.
- Lander, E.S., Consortium, I.H.G.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chisoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- Lara-Martin, P.A., Gomez-Parra, A., Kochling, T., Sanz, J.L., Amils, R., Gonzalez-Mazo, E., 2007. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonates in coastal marine sediments. *Environ Sci Technol*, 41, 3573-3579.
- Lara-Martin, P.A., Gomez-Parra, A., Sanz, J.L., Gonzalez-Mazo, E., 2010. Anaerobic Degradation Pathway of Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) in Sulfate-Reducing Marine Sediments. *Environ Sci Technol*, 44, 1670-1676.

- Larson, R.J., 1990. STRUCTURE-ACTIVITY-RELATIONSHIPS FOR BIODEGRADATION OF LINEAR ALKYL BENZENESULFONATES. *Environ Sci Technol*, 24, 1241-1246.
- Lee, C., Russell, N.J., White, G.F., 1995. Modeling the kinetics of biodegradation of anionic surfactants by biofilm bacteria from polluted riverine sites - a comparison of 5 classes of surfactant at 3 sites. *Water Res*, 29, 2491-2497.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., Gordon, J.I., 2008. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*, 320, 1647-1651.
- Liesack, W., Bak, F., Kreft, J.U., Stackebrandt, E., 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch Microbiol*, 162, 85-90.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., Knight, R., 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res*, 35, e120.
- Lobner, T., Torang, L., Batstone, D.J., Schmidt, J.E., Angelidaki, I., 2005. Effects of process stability on anaerobic biodegradation of LAS in UASB reactors. *Biotechnol Bioeng*, 89, 759-765.
- Loman, N.J., Misra, R.V., Dallman, T.J., Constantinidou, C., Gharbia, S.E., Wain, J., Pallen, M.J., 2012. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*, 30, 434-439.
- Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Goodwin, S., 1993. GEOBACTER-METALLIREDUCTENS GEN-NOV SP-NOV, A MICROORGANISM CAPABLE OF COUPLING THE COMPLETE OXIDATION OF ORGANIC-COMPOUNDS TO THE REDUCTION OF IRON AND OTHER METALS. *Arch Microbiol*, 159, 336-344.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., 1986. AVAILABILITY OF FERRIC IRON FOR MICROBIAL REDUCTION IN BOTTOM SEDIMENTS OF THE FRESH-WATER TIDAL POTOMAC RIVER. *Appl Environ Microbiol*, 52, 751-757.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., 1988. NOVEL MODE OF MICROBIAL ENERGY-METABOLISM - ORGANIC-CARBON OXIDATION COUPLED TO DISSIMILATORY REDUCTION OF IRON OR MANGANESE. *Appl Environ Microbiol*, 54, 1472-1480.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., Lonergan, D.J., 1991. ENZYMATIC VERSUS NONENZYMATIC MECHANISMS FOR FE(III) REDUCTION IN AQUATIC SEDIMENTS. *Environ Sci Technol*, 25, 1062-1067.
- Lovley, D.R., Stolz, J.F., Nord, G.L., Phillips, E.J.P., 1987. ANAEROBIC PRODUCTION OF MAGNETITE BY A DISSIMILATORY IRON-REDUCING MICROORGANISM. *Nature*, 330, 252-254.
- Lovley, D.R., Woodward, J.C., Chapelle, F.H., 1994. STIMULATED ANOXIC BIODEGRADATION OF AROMATIC-HYDROCARBONS USING FE(III) LIGANDS. *Nature*, 370, 128-131.
- Madingan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. 13 ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R.,

- Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376-380.
- Martinez-Pascual, E., Jimenez, N., Vidal-Gavilan, G., Vinas, M., Solanas, A.M., 2010. Chemical and microbial community analysis during aerobic biostimulation assays of non-sulfonated alkyl-benzene-contaminated groundwater. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88, 985-995.
- Maruyama, T., Park, H.D., Ozawa, K., Tanaka, Y., Sumino, T., Hamana, K., Hiraishi, A., Kato, K., 2006. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 85-89.
- Matthies, C., Evers, S., Ludwig, W., Schink, B., 2000. *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 1591-1594.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B., Costerton, J.W., 1981. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 41, 1029-1039.
- Meckenstock, R.U., Mouttaki, H., 2011. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol*, 22, 406-414.
- Mogensen, A.S., Ahring, B.K., 2002. Formation of metabolites during biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in an upflow anaerobic sludge bed reactor under thermophilic conditions. *Biotechnol Bioeng*, 77, 483-488.
- Mogensen, A.S., Haagensen, F., Ahring, B.K. 2001. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Meeting on Organic Soil Contaminants*, Sep 02-05, Copenhagen, Denmark. pp. 706-711.
- Mogensen, A.S., Haagensen, F., Ahring, B.K., 2003. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Environ Toxicol Chem*, 22, 706-711.
- Mosche, M., Meyer, U., 2002. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic digestion: influence of exposure time. *Water Res*, 36, 3253-3260.
- Mungray, A.K., Kumar, P., 2009. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. *Int Biodeterior Biodegrad*, 63, 981-987.
- Muramoto, S., Oki, Y., Nishizaki, H., Aoyama, I., 1989. VARIATION IN SOME ELEMENT CONTENTS OF WATER HYACINTH DUE TO CADMIUM OR NICKEL TREATMENT WITH OR WITHOUT ANIONIC SURFACE-ACTIVE AGENTS. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control*, 24, 925-934.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., Srivastava, A., 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electron J Biotechnol*, 7, 167-178.
- Nawrocki, E.P., Eddy, S.R., 2007. Query-Dependent Banding (QDB) for Faster RNA Similarity Searches. *PLoS Comput Biol*, 3, e56.
- Neefs, J.-M., van de Peer, Y., Hendriks, L., de Wachter, R., 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 18, 2237-2317.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in

- Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*, 178, 5636-43.
- Okada, D.Y. 2012. Degradação de surfactante aniônico em reator UASB com água residuária de lavanderia. in: *Escola de Engenharia de São Carlos*, Vol. Doutorado, Universidade de São Paulo. São Carlos.
- Okada, D.Y., Delforno, T.P., Esteves, A.S., Sakamoto, I.K., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A., 2013. Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate. *Bioresour Technol*, 128, 125-133.
- Oren, A., 2004. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 359, 623-638.
- Painter, H.A., Zabel, T., 1989. The behavior of LAS in sewage treatment. *Tenside Surfactants Detergents*, 26, 108-115.
- Penteadó, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 6137-6145.
- Penteadó, J.C.P., Seoud, O.A.E., Carvalho, L.R.F., 2006. Linear alkylbenzene sulfonates: Chemistry, environmental impact and analysis. *Quimica Nova*, 29, 1038-1046.
- Perrotta, J.A., Harwood, C.S., 1994. Anaerobic Metabolism of Cyclohex-1-Ene-1-Carboxylate, a Proposed Intermediate of Benzoate Degradation, by *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol*, 60, 1775-1782.
- Qiu, Y.-L., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., Sekiguchi, Y., 2008. *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the First Cultured Anaerobe Capable of Degrading Phenol to Acetate in Obligate Syntrophic Associations with a Hydrogenotrophic Methanogen. *Appl Environ Microbiol*, 74, 2051-2058.
- Reddy, C.M., Eglinton, T.I., Hounshell, A., White, H.K., Xu, L., Gaines, R.B., Frysinger, G.S., 2002. The west falmouth oil spill after thirty years: The persistence of petroleum hydrocarbons in marsh Sediments. *Environ Sci Technol*, 36, 4754-4760.
- Richterich, P., 1998. Estimation of Errors in "Raw" DNA Sequences: A Validation Study. *Genome Res*, 8, 251-259.
- Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, L.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, 58, 106-111.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyren, P., 1996. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem*, 242, 84-89.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyren, P., 1998. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science*, 281, 363-365.
- Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J.F., Marran, D., Myers, J.W., Davidson, J.F., Branting, A., Nobile, J.R., Puc, B.P., Light, D., Clark, T.A., Huber, M., Branciforte, J.T., Stoner, I.B., Cawley, S.E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J.A., Namsaraev, E., McKernan, K.J., Williams, A.,

- Roth, G.T., Bustillo, J., 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475, 348-352.
- Saelee, R., Bunyakan, C., 2012. Degradation Kinetics of Fe-EDTA in Hydrogen Sulfide Removal Process. *ISRN Chemical Engineering*, 2012, 8.
- Sakurai, T., Husimi, Y., 1992. Real-time monitoring of DNA polymerase reactions by a micro ISFET pH sensor. *Analytical Chemistry*, 64, 1996-1997.
- Sanchez-Peinado, M.D., Gonzalez-Lopez, J., Martinez-Toledo, M.V., Pozo, C., Rodelas, B., 2010. Influence of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the structure of *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* communities in a soil microcosm. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 779-790.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467.
- Sanz, J.L., Culubret, E., de Ferrer, J., Moreno, A., Berna, J.L., 2003. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biodegradation*, 14, 57-64.
- Schleheck, D., Cook, A.M., 2005. w-Oxygenation of the alkyl sidechain of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) surfactant in *Parvibaculum lavamentivorans*^T. *Arch Microbiol*, 183, 369-377.
- Schleheck, D., Knepper, T.P., Fischer, K., Cook, A.M., 2004a. Mineralization of individual congeners of linear alkylbenzenesulfonate by defined pairs of heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 70, 4053-4063.
- Schleheck, D., Tindall, B.J., Rossello-Mora, R., Cook, A.M., 2004b. *Parvibaculum lavamentivorans* gen. nov., sp. nov., a novel heterotroph that initiates catabolism of linear alkylbenzenesulfonate. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 1489-1497.
- Schörberl, P., 1989. Basics principles of LAS biodegradation. *Tenside Surfactants Detergents*, 26, 86-94.
- Seghezzi, L., Zeeman, G., van Lier, J.B., Hamelers, H.V.M., Lettinga, G., 1998. A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresour Technol*, 65, 175-190.
- Seo, G.T., Lee, T.S., Moon, B.H., Lim, J.H. 2001a. Ultrafiltration combined with ozone for domestic laundry wastewater reclamation and reuse. In: *Membranes in Drinking and Industrial Water Production II*, (Eds.) M. Balaban, J.C. Schippers, Vol. 1, Iwa Publishing. London, pp. 387-392.
- Seo, G.T., Lee, T.S., Moon, B.H., Lim, J.H., 2001b. Ultrafiltration combined with ozone for domestic laundry wastewater reclamation and reuse. *Membranes in Drinking and Industrial Water Production II*, 1, 387-392.
- Sigoillot, J.C., Nguyen, M.H., 1992. Complete oxidation of linear alkylbenzene sulfonate by bacterial communities selected from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*, 58, 1308-1312.
- Šostar-Turk, S., Petrinić, I., Simonič, M., 2005. Laundry wastewater treatment using coagulation and membrane filtration. *Resources, Conservation and Recycling*, 44, 185-196.
- Sravan Kumar, R., Sasi Jyothsna, T.S., Sasikala, C., Seong, C.N., Lim, C.H., Park, S.C., Ramana, C.V., 2010. *Shewanella fodinae* sp. nov., isolated from a coal mine and from a marine lagoon. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 1649-1654.
- Stookey, L.L., 1970. Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem* 42, 779-781.

- Straub, K.L., Benz, M., Schink, B., Widdel, F., 1996. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl Environ Microbiol*, 62, 1458-1460.
- Stumm, W., Sulzberger, B., 1992. THE CYCLING OF IRON IN NATURAL ENVIRONMENTS - CONSIDERATIONS BASED ON LABORATORY STUDIES OF HETEROGENEOUS REDOX PROCESSES. *Geochim Cosmochim Acta*, 56, 3233-3257.
- Touzel, J.P., Albagnac, G., 1983. Isolation and characterization of Methanococcus-mazei strain MC3. *FEMS Microbiol Lett*, 16, 241-245.
- Unz, R.F., Farrah, S.R., 1972. Use of aromatic-compounds for growth and isolation of *Zoogloea*. *Applied Microbiology*, 23, 524-&.
- Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E.L., Lovley, D.R., 1998. Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature*, 395, 65-67.
- Venter, J., Remington, K., Heidelberg, J., Halpern, A., Rusch, D., Eisen, J., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K., Nelson, W., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66 - 74.
- Viollier, E., Inglett, P.W., Hunter, K., Roychoudhury, A.N., Van Cappellen, P., 2000. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Appl Geochem*, 15, 785-790.
- Vos, P.D., Garrity, G., Jones, D., KRIEG, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed.* Springer, New York.
- Wang, C.-T., Chou, W.-L., Kuo, Y.-M., 2009. Removal of COD from laundry wastewater by electrocoagulation/electroflotation. *J Hazard Mater*, 164, 81-86.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, 73, 5261-5267.
- Wang, Q.H., Kuninobu, M., Ogawa, H.I., Kato, Y., 1999. Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass & Bioenergy*, 16, 407-416.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C., 1953. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737-738.
- Weelink, S.A.B., Van Doesburg, W., Saia, F.T., Rijpstra, W.I.C., Röling, W.F.M., Smidt, H., Stams, A.J.M., 2009. 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 Microbiol Ecol*, 70, 575-585.
- Westall, J.C., Chen, H., Zhang, W.J., Brownawell, B.J., 1999. Sorption of linear alkylbenzenesulfonates on sediment materials. *Environ Sci Technol*, 33, 3110-3118.
- Widdel, F., Schnell, S., Heising, S., Ehrenreich, A., Assmus, B., Schink, B., 1993. FERROUS IRON OXIDATION BY ANOXYGENIC PHOTOTROPHIC BACTERIA. *Nature*, 362, 834-836.
- Wright, E.S., Yilmaz, L.S., Noguera, D.R., 2012. DECIPHER, a Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences. *Appl Environ Microbiol*, 78, 717-725.
- Zellner, G., Messner, P., Kneifel, H., Winter, J., 1989. *Desulfovibrio simplex* spec. nov., a new sulfate-reducing bacterium from a sour whey digester. *Arch Microbiol*, 152, 329-334.

- Zhang, C., Anderson, A.J., 2012. Utilization of pyrene and benzoate in *Mycobacterium* isolate KMS is regulated differentially by catabolite repression. *J Basic Microbiol*, n/a-n/a.
- Zhang, P., Chen, Y.G., Huang, T.Y., Zhou, Q., 2009. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation in the presence of SDBS in semi-continuous flow reactors: Effect of solids retention time and temperature. *Chem Eng J*, 148, 348-353.
- Zhang, T., Gannon, S.M., Nevin, K.P., Franks, A.E., Lovley, D.R., 2010. Stimulating the anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons in contaminated sediments by providing an electrode as the electron acceptor. *Environ Microbiol*, 12, 1011-1020.

10 Apêndice

10.1 Figuras

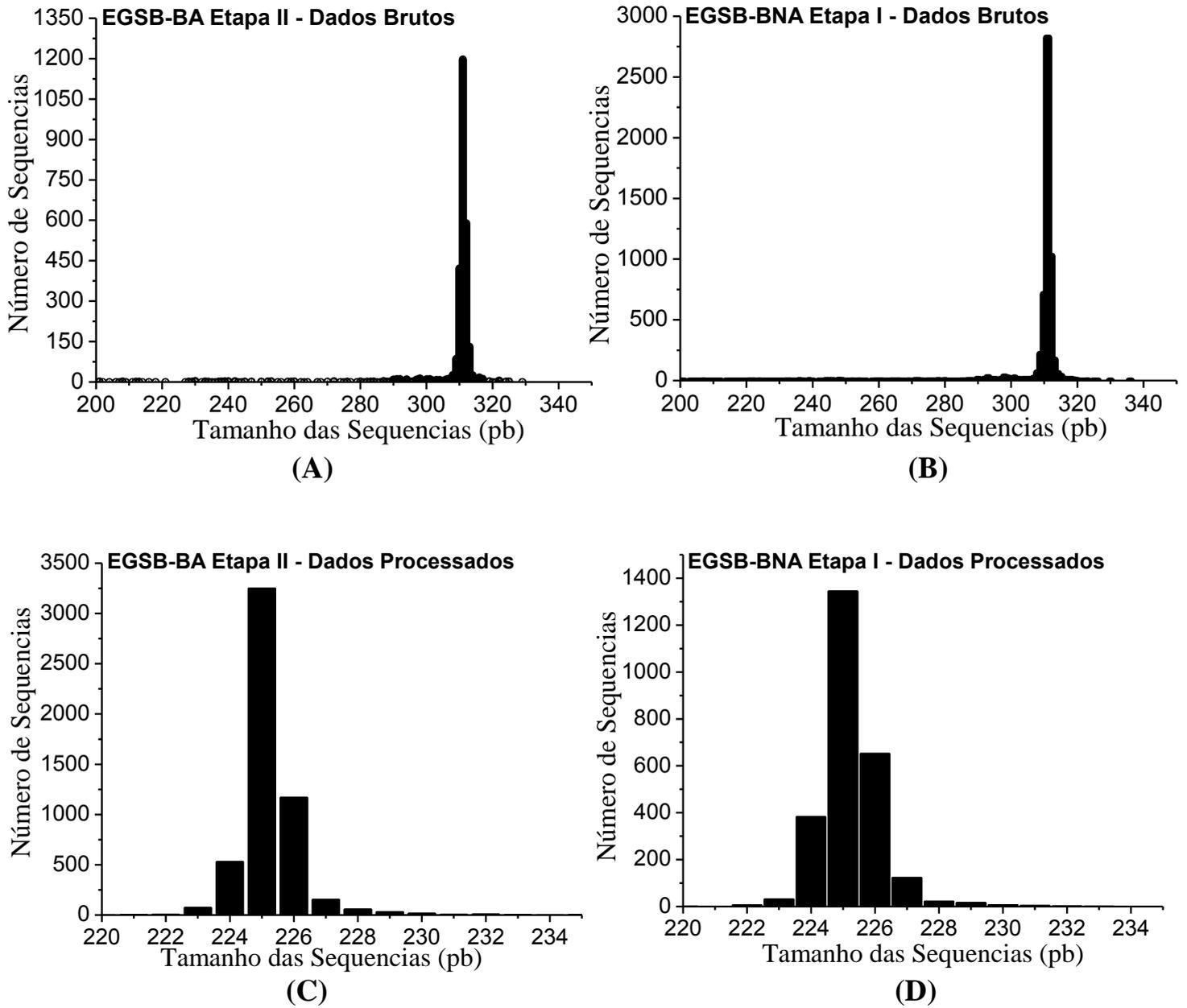


Figura 10.1 Distribuição do tamanho das seqüências para as amostras EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I. (A) e (B) dados brutos; (C) e (D) dados processados.

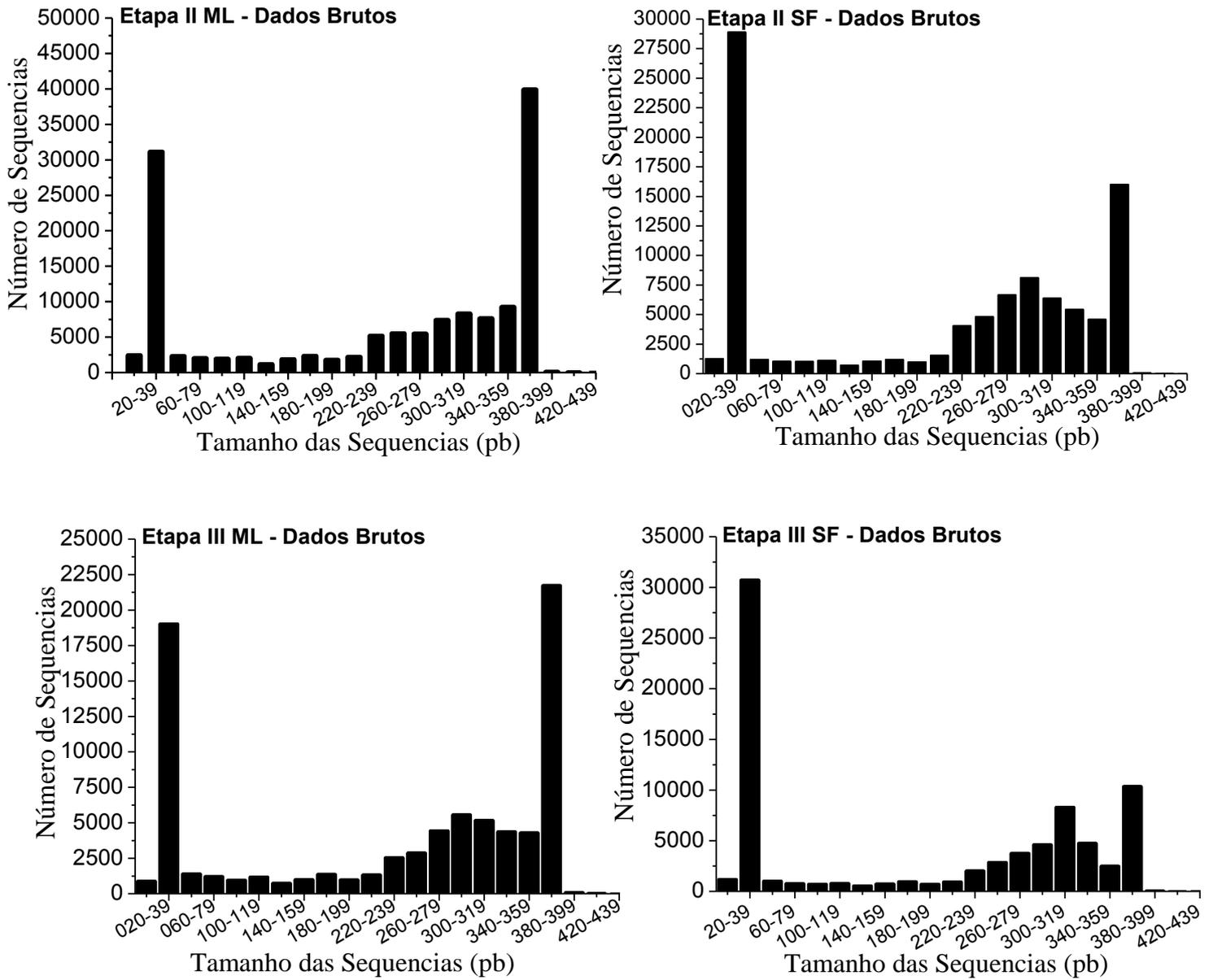


Figura 10.2: Distribuição do tamanho das seqüências nos dados brutos para as amostras do EGSB Ag.Lav.

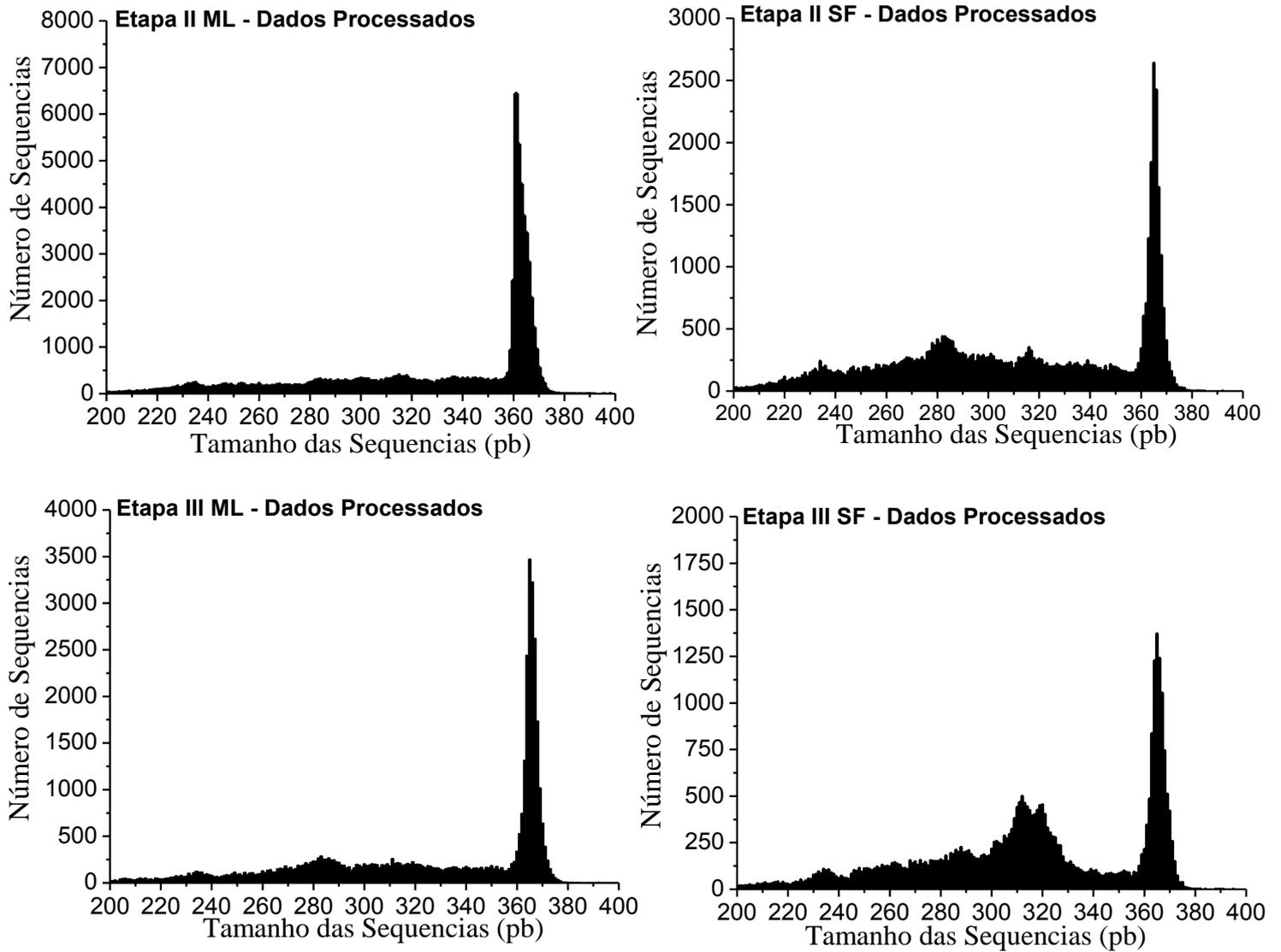


Figura 10.3: Distribuição do tamanho das seqüências nos dados processados para as amostras do EGSB Ag.Lav. ML – manta de lodo e SF – separador de fase.

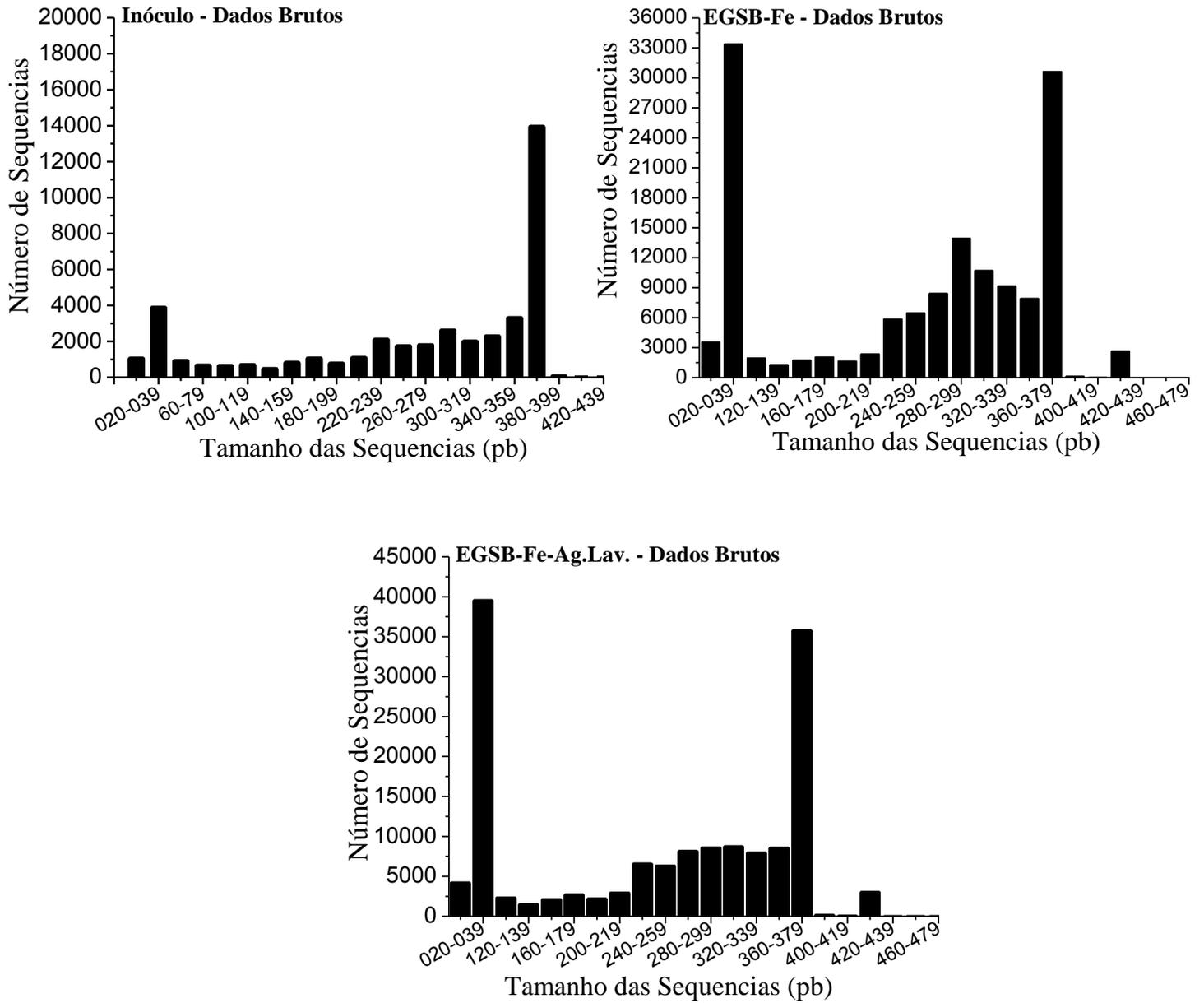


Figura 10.4: Distribuição do tamanho das seqüências nos dados brutos para as amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

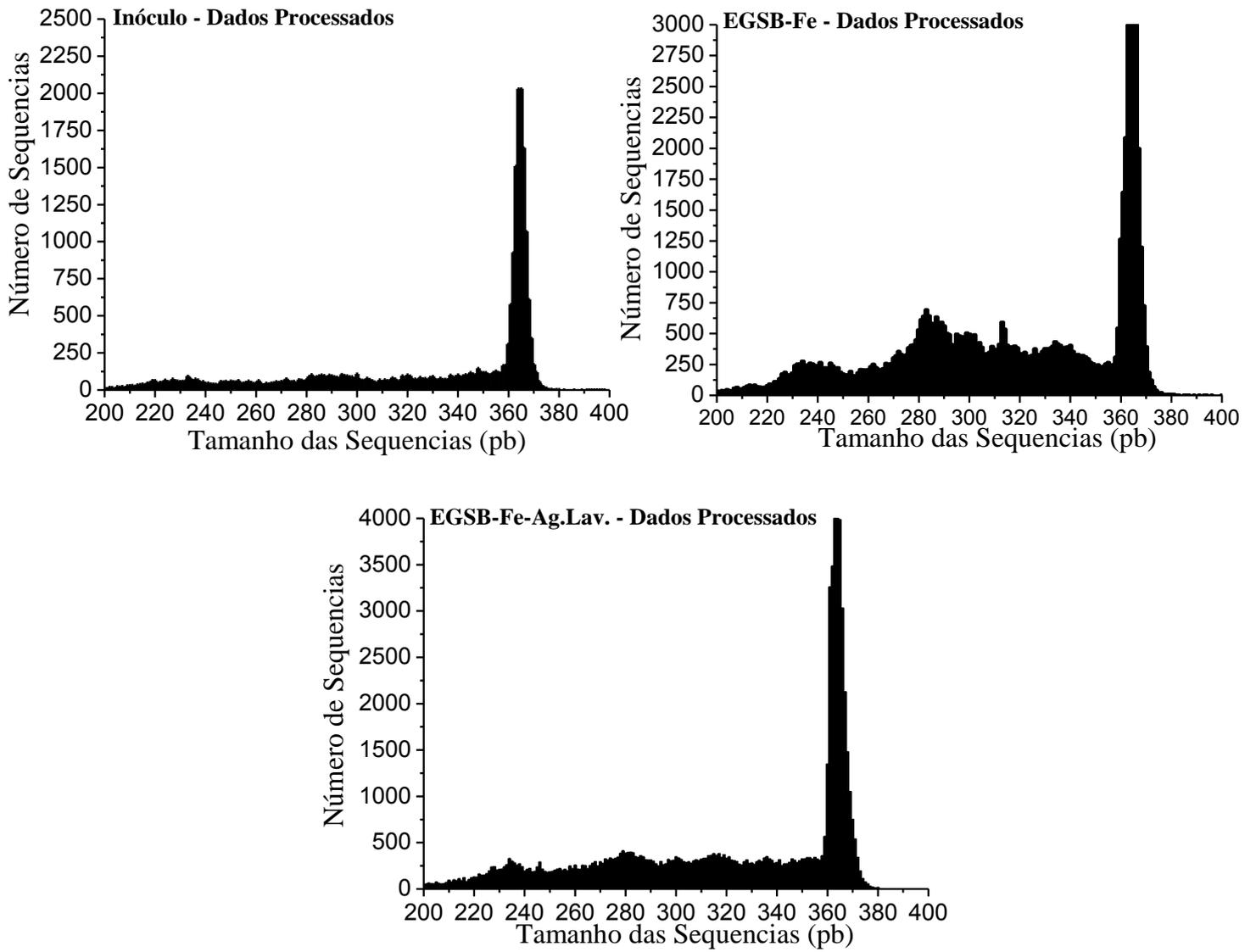


Figura 10.5: Distribuição do tamanho das seqüências nos dados processados para as amostras Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

10.2 Tabelas

Tabela 10.1: Abundância relativa de sequências e OTUs de Filo nas amostras EGSB-BA Etapa II e EGSB-BNA Etapa I.

Filo	EGSB-BA Etapa II		EGSB-BNA Etapa I	
	% de Sequências	Nº de OTUs	% de Sequências	Nº de OTUs
Acidobacteria	0,7%	3	1,6%	7
Actinobacteria	0,1%	1	0,1%	2
Armatimonadetes	0,1%	1	0,0%	1
Bacteroidetes	5,4%	8	3,2%	12
BRC1	0,5%	2	0,3%	1
Chloroflexi	6,2%	26	4,8%	30
Euryarchaeota	0,1%	1	0,2%	3
Firmicutes	12,1%	36	16,9%	61
Fusobacteria	0,1%	1	-	-
Gemmatimonadetes	-	-	0,0%	1
Planctomycetes	0,6%	2	0,1%	2
Proteobacteria	14,8%	46	35,0%	62
Synergistetes	6,7%	9	3,5%	9
Thermotogae	5,1%	5	4,7%	4
Verrucomicrobia	4,2%	8	6,7%	12
Não Classificados	43,4%	83	22,6%	105
TOTAL	56,6%	149	77,4%	207

Total de Sequências EGSB-BA Etapa II = 2371
Total de Sequências EGSB-BNA Etapa I = 4933
Limite de Confiança = 50%

Tabela 10.2: Abundância relativa de filo para amostras do EGSB-Ag.Lav.

Filo	Etapa II		Etapa III	
	Manta de Lodo	Separador de Fase	Manta de Lodo	Separador de Fase
Acidobacteria	0,83%	3,09%	16,23%	4,83%
Actinobacteria	3,19%	1,96%	0,70%	1,02%
Bacteroidetes	46,17%	3,78%	2,70%	2,08%
BRC1	-	-	0,07%	0,28%
Chlamydiae	0,02%	0,01%	0,06%	0,01%
Chlorobi	0,13%	0,43%	-	-
Chloroflexi	18,97%	25,89%	2,09%	0,61%
Euryarchaeota	0,65%	-	0,53%	0,09%
Firmicutes	3,40%	3,82%	2,20%	2,57%
Gemmatimonadetes	0,42%	0,28%	0,01%	-
OD1	0,10%	-	0,02%	-
OP11	0,04%	1,38%	-	-
Planctomycetes	0,30%	0,31%	0,24%	0,16%
Proteobacteria	19,76%	52,40%	64,44%	79,61%
Spirochaetes	0,66%	0,53%	0,04%	-
Synergistetes	1,41%	0,74%	5,68%	6,83%
Thermotogae	0,88%	-	-	-
Verrucomicrobia	0,52%	0,02%	0,40%	0,01%
WS3	-	-	-	-
Não Classificado	2,54%	5,33%	4,54%	1,85%

Tabela 10.3: Abundância relativa de gêneros relacionados com a degradação da molécula de LAS e/ou compostos aromáticos para amostras do EGSB-Ag.Lav.

Gênero	Etapa II Manta de Lodo	Etapa II Separador de Fase	Etapa III Manta de Lodo	Etapa III Separador de Fase
<u>Acinetobacter</u>	0,01	0,17	0,09	0,03
<u>Aeromonas</u>	-	0,02	1,03	0,49
<u>Chelatococcus</u>	-	0,04	0,34	0,92
<u>Comamonas</u>	0,13	0,24	0,08	0,07
<u>Dechloromonas</u>	0,02	0,07	-	-
<u>Desulfatirhabdium</u>	-	0,01	0,39	0,27
<u>Desulfobulbus</u>	0,05	0,08	0,21	0,17
<u>Desulfomonile</u>	0,01	0,20	3,11	4,47
<u>Desulfovibrio</u>	-	0,09	0,04	0,01
<u>Gemmatimonas</u>	0,42	0,26	0,01	-
<u>Geobacter</u>	0,31	1,74	2,33	3,90
<u>Georgfuchsia</u>	-	0,47	0,01	-
<u>Geothrix</u>	0,01	0,04	0,01	0,02
<u>Holophaga</u>	0,01	0,11	0,19	0,05
<u>Hydrogenophaga</u>	0,01	0,04	-	-
<u>Mycobacterium</u>	0,01	0,20	0,01	0,15
<u>Parvibaculum</u>	-	-	0,25	0,13
<u>Pseudomonas</u>	0,01	0,45	9,55	3,74
<u>Rhodopseudomonas</u>	0,02	0,07	0,10	0,07
<u>Shewanella</u>	-	-	0,37	0,18
<u>Sphingosinicella</u>	0,03	0,04	-	-
<u>Sporomusa</u>	0,06	0,66	0,11	0,18
<u>Stenotrophomonas</u>	0,09	0,64	0,90	0,92
<u>Sulfuritalea</u>	0,05	0,14	0,01	0,01
<u>Synergistes</u>	-	-	0,04	0,06
<u>Syntrophomonas</u>	0,02	0,01	0,01	-
<u>Syntrophorhabdus</u>	0,77	0,32	0,28	0,07
<u>Zoogloea</u>	-	0,02	0,05	0,01
Total	2,03	6,12	19,54	15,92

Tabela 10.4: Abundância relativa de filos para amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Filos	Inóculo	EGSB-Fe	EGSB-Fe-Ag.Lav.
Acidobacteria	1,14	1,62	8,83
Actinobacteria	1,42	0,56	5,53
Armatimonadetes	0,02	0,11	0,12
Bacteroidetes	0,55	14,81	26,06
BRC1	0,01	0,03	0,10
Chlamydiae	-	-	0,71
Chlorobi	-	-	0,02
Chloroflexi	24,76	0,35	2,23
Cyanobacteria/Chloroplast	-	-	0,27
Deferribacteres	-	0,44	-
Euryarchaeota	0,36	-	0,37
Firmicutes	12,96	10,73	1,37
Gemmatimonadetes	-	-	0,07
Lentisphaerae	-	-	0,01
Nitrospira	-	-	0,02
OD1	0,33	-	0,06
Planctomycetes	0,08	0,03	2,09
Proteobacteria	16,60	62,54	40,18
Spirochaetes	0,02	0,05	1,85
Synergistetes	33,97	7,58	0,18
Thermotogae	0,18	-	0,11
TM7	0,01	-	0,46
Verrucomicrobia	-	-	5,03
WS3	-	-	0,05
Não Classificados	7,56	1,14	4,28

Tabela 10.5: Abundância relativa de gêneros relacionados com a degradação da molécula de LAS e/ou compostos aromáticos. para amostras do Inóculo, EGSB-Fe e EGSB-Fe-Ag.Lav.

Gênero	Inóculo	EGSB-Fe	EGSB-Fe-Ag.Lav.
Acinetobacter	-	0,01	0,02
Aeromonas	-	0,04	0,09
Azoarcus	-	0,25	-
Brevundimonas	-	0,03	0,05
Comamonas	-	0,11	0,04
Dechloromonas	-	0,02	0,19
Desulfobulbus	0,01	0,43	-
Desulfomicrobium	0,02	-	-
Desulfomonile	0,02	-	-
Desulfovibrio	-	0,14	-
Gemmatimonas	-	-	0,07
Geobacter	0,93	17,53	0,45
Georgfuchsia	-	-	0,10
Geothrix	-	-	0,22
Holophaga	-	-	0,12
Hydrogenophaga	-	0,01	0,17
Magnetospirillum	-	0,05	0,10
Mycobacterium	-	0,01	0,09
Parvibaculum	-	-	0,03
Pigmentiphaga	-	0,01	0,14
Pseudolabrys	-	-	0,01
Pseudomonas	-	0,13	0,19
Rhodanobacter	-	0,03	-
Shewanella	-	0,44	0,77
Soehngenia	-	8,62	-
Sporomusa	-	0,85	0,03
Stenotrophomonas	0,10	0,63	0,01
Synergistes	0,01	0,09	-
Syntrophomonas	1,25	-	0,03
Syntrophorhabdus	1,51	0,12	0,91
Total	3,85	29,56	3,83

