**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

MARCUS VINICIUS FREIRE ANDRADE

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA E DAS
CONDIÇÕES NUTRICIONAIS NA REMOÇÃO DE SURFACTANTE
ANIÔNICO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVANDERIA E SEUS
EFEITOS NA COMUNIDADE MICROBIANA**

São Carlos/SP

2016

MARCUS VINICIUS FREIRE ANDRADE

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA E DAS
CONDIÇÕES NUTRICIONAIS NA REMOÇÃO DE SURFACTANTE
ANIÔNICO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVANDERIA E SEUS
EFEITOS NA COMUNIDADE MICROBIANA**

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

Orientadora: Prof. Assoc. Maria Bernadete Amâncio Varesche

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos/SP

2016

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.

A322i Andrade, Marcus Vinicius Freire
 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA E DAS
 CONDIÇÕES NUTRICIONAIS NA REMOÇÃO DE SURFACTANTE
 ANIÔNICO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVANDERIA E SEUS
 EFEITOS NA COMUNIDADE MICROBIANA / Marcus Vinicius
 Freire Andrade; orientador Maria Bernadete Amâncio
 Varesche. São Carlos, 2016.

 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
 Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
 Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
 Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
 2016.

 1. água de lavanderia. 2. degradação. 3.
 desnitrificação. 4. etanol. 5. LAS. 6. reator de leito
 fluidificado. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Tecnólogo **MARCUS VINÍCIUS FREIRE ANDRADE**.

Título da tese: "Influência do tempo de detenção hidráulica e das condições nutricionais na remoção de surfactante aniônico de água residuária de lavanderia e seus efeitos na comunidade microbiana".

Data da defesa: 23/09/2016.

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovado

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

Aprovado

Profa. Dra. **Suzana Maria Ratusznei**
(Escola de Engenharia de Mauá/EEM)

Aprovado

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

Aprovado

Prof. Dr. **Theo Syrto Octavio de Souza**
(Escola Politécnica/EP-USP)

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 **Luis Fernando Costa Alberto**

Dedico a Deus e aos meus pais, com amor e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por todas as graças permitidas em minha vida e por ter estado ao meu lado desde meu primeiro suspiro.

Aos meus pais, Francisco e Socorro Andrade, por todo amor dispensado, por cada ligação e gesto de carinho durante meus anos de doutorado. Obrigado por me ensinarem tudo que sei em minha existência e obrigado por nunca terem desistido de mim. Obrigado também por desempenharem para mim a missão de serem meus pais, avós e padrinhos.

Aos meus irmãos: Ana Kercya, Rafaela, Andrea, Rivelino, Roberto e Junior por me ensinarem a toda dificuldade pode ser vencida quando estamos unidos.

À minha família de São Carlos, a república Maria Groselha, nas pessoas de Vanessa Silva, Monaisa Andrade e Thais Correia, por terem dividido comigo três anos de amor, partilha e companheirismo.

À minha orientadora Maria Bernadete A. Varesche (Berna) pela oportunidade, atenção e orientação durante meu período de doutorado. Obrigado por cada “puxão de orelha” que me impulsionaram a dar o máximo de mim.

Ao professor Edson Luiz Silva, pelo auxílio com o projeto dos reatores e pela ajuda com o planejamento experimental.

Ao professor Juliano Corbi pela possibilidade de realização dos ensaios ecotoxicológicos e por todo ensinamento.

Aos profissionais Maria Angela Talarico Adorno, Isabel Kimiko Sakamoto, Eloisa Pozzi Gianotti, Carolina Sabatini e Juliana Custódio por toda ajuda, instrução, empenho e auxílio na execução de atividades no laboratório e monitoria.

À professora Marcia Damianovic e ao professor Dagoberto Okada, pelas sugestões e contribuições na banca de qualificação.

Às amigas Vanessa Silva, Kiemi Murata, Clara Faria, pela amizade, carinho e cuidado durante todos esses anos em São Carlos. Cada risada, cada piada e cada conversa aleatória ou com cunho acadêmico foram fundamentais para que eu fosse mais feliz em São Carlos. Amo vocês.

Aos amigos do Grupo de Oração Universitária GOU Sangue e Água, em especial a Rodrigo Carneiro, por fazerem de cada segunda feira, um novo encontro com Deus. Obrigado Carneiro por nunca ter deixado que eu fosse uma pessoa sem fé. Obrigado também por cada partilha e pela amizade.

À amiga Vanessa Silva, Florzinha, não somente pela amizade, mas por ter sido irmã, mãe, amiga, pesquisadora conselheira e por ter transformado minha vida. Obrigado por me fazer construir uma família em São Carlos e por ter me mostrado que a vida não é apenas construída de livros, artigos e bactérias. Obrigado por cada oração e por todo cuidado que tu tiveste comigo durante estes três anos.

I would like to say thank you to my big Pakistani friend Fiaz Ahmad for being thoughtful and caring for me. For made me smiling for every single situation.

Ao meu amigo de doutorado, Altair Rosa, por ser um amigo tão querido e por me dar forças a cada conversa descontraída! Obrigado por toda ajuda nestes anos.

Aos amigos de laboratório com os quais pude compartilhar risadas e bons momentos: Lucas Fuess, Clara Faria, Kiemi Murata, Vanessa Silva, Fernanda Peiter, Livia Botta, Dagoberto Okada, Tiago Palladino, Carla Diniz, Thais Zaninetti, Rodrigo Carneiro, Fiaz Ahmad, Adriana Maluf, Juliana Kawanishi, Fabrício Montteran, Raíssa Mazzareli, Alejandra Vila, Leonardo Gerosa, Alana Moura, Vinicius Masquetti e Carol Granatto.

Aos meus amigos de Fortaleza: Amanda, Crislayne, Débora, Livia, Ederson, Fellipe, Joab, Lilian, Patricia e Kelly Rodrigues, por me mostrarem que a distância física não foi capaz de separar vínculos tão bonitos. Obrigado pelas palavras carinhosas e por terem feito eu seguir em frente.

E não poderia esquecer das incríveis pessoas que conheci em São Carlos, obrigado à Thales Minelli, Floyd Andrade, Ana Paula Guaratini e Jaime Leite por tirarem sorrisos de mim nos momentos mais tristes.

À USP, EESC, SHS e LPB.

Ao CNPq pelo apoio financeiro inicial, e a FAPESP pela bolsa concedida através do processo 2013/19367-1.

RESUMO

ANDRADE, M. V. F. **Influência do tempo de detenção hidráulica e das condições nutricionais na remoção de surfactante aniônico de água residuária de lavanderia e seus efeitos na comunidade microbiana.** 2016. 200 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Objetivou-se neste trabalho avaliar a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH) na remoção do surfactante aniônico, alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), de água residuária de lavanderia, em dois reatores de leito fluidificado (RLF) operados em TDH de 8 horas (RLF1) e 12 horas (RLF2). Os reatores foram inoculados com biomassa de lodos ativados e foi investigado a influência da adição de nitrato e etanol na degradação do LAS e seus impactos na comunidade microbiana. Para tal fim, o trabalho foi desenvolvido nas fases que se seguem: caracterização da água residuária de lavanderia comercial, ensaio de degradação desnitrificante de LAS, operação dos reatores de leito fluidificado, planejamento experimental de condições ótimas de degradação de surfactante em reatores em batelada e caracterização microbiana do consórcio microbiano do RLF1 e RLF2 por meio do Illumina MiSeq. Verificou-se considerável remoção de LAS (77%) no ensaio de degradação sob condição desnitrificante nos reatores em batelada com 21 mgLAS/L e adição de 100 mgNO₃⁻/L. Ao longo de 436 dias de operação, verificou-se elevada remoção de LAS em RLF1 e RLF2, todavia, observou-se diferença significativa; ou seja, maior remoção global de LAS (99±3%) para 22,5±5,9 mg/L afluente em RLF2. A adição de etanol influenciou, notadamente, a remoção de LAS em RLF1, por outro lado a adição de nitrato exerceu influência na remoção de LAS em ambos os reatores. Na realização do planejamento experimental, em reatores em batelada, pode-se obter condições ótimas de degradação de LAS, verificando-se os valores críticos para etanol de 97,5 mg/L, e de 87,5 mg/L para nitrato. Para as seis etapas de operação foram identificados gêneros relacionados à desnitrificação e a degradação de LAS. Para Etapa I, foram identificadas bactérias relacionadas com a redução de nitrato, dentre eles *Flavobacterium*, *Sphingobium* e *Xanthobacter*. Para as etapas com adição de surfactante (II, III, IV, V e VI) identificou-se *Dechloromonas*, *Zoogloea*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Desulfobulbus*, provavelmente relacionadas à degradação de LAS.

Palavras-chave: água de lavanderia, degradação, desnitrificação, etanol, LAS, reator de leito fluidificado

ABSTRACT

ANDRADE, M. V. F. **Influence of hydraulic retention time and nutritional conditions in anionic surfactant from laundry wastewater and theirs effects in microbial community.** 2016. 200 p. Thesis (PhD) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The aim of this study was to evaluate the influence of hydraulic retention time (HRT) on anionic surfactant; linear alkyl benzene sulphonate (LAS) from laundry wastewater in two fluidized bed reactors (FBR) operated in HRT of 8 hours (FBR1) and 12 hours (FBR2). The reactors were inoculated with activated sludge and the influence of nitrate and ethanol addition on LAS removal was studied with subsequent impact on microbial diversity. The study was conducted in following phases; laundry wastewater characterization, denitrifying degradation potential of LAS, fluidized bed reactor operation under specified conditions, central composite design, and determination of microbial shift between biofilm of FBR1 and FBR2 through Mi-Seq Illumina®. Higher LAS removal (77%) was verified in denitrifying potential degrading of LAS using batch reactors feed with 21 mg LAS/L and 150 mg NO₃⁻/L. Great LAS removal efficiency was observed for 436 days, however significant notice was observed for global LAS removal between FBR1 and FBR2, i.e. greater LAS removal in FBR2 (99±3% for 22,5±5,9 mg LAS/L) than FBR1 (93±12% for 20,6±4,4 mg LAS/L). The ethanol addition significantly influenced FBR1 efficiency while nitrate addition improves LAS removal in both reactors. Central composite design resulted into optimal values for LAS removal (94%) in addition to 97,5 mg/L ethanol and 87,5 mg/L nitrate. Microbial shift showed genus abundance related to denitrification and LAS degradation. In Step I denitrifying bacteria *Flavobacterium*, *Shingobium* and *Xanthobacter* were identified. For Steps with laundry wastewater addition, *Dechloromonas*, *Zoogloea*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Desulfobulbus*, were identified, probably, related to LAS degradation.

Keywords: degradation, denitrification, ethanol, fluidized bed reactor, LAS, laundry wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Possíveis caminhos de inserção de surfactantes químicos no ambiente.	7
Figura 4.1. Protocolo operacional da pesquisa.	24
Figura 4.2: Diagrama esquemático do reator de leito fluidificado.	26
Figura 4.3. Etapas de operação dos reatores de leito fluidificado RLF1 e RLF2.	29
Figura 4.4. Amostras retiradas para caracterização microbiana.	38
Figura 5.1. Remoção de LAS no ensaio de degradação sob condição desnitrificante.	46
Figura 5.2: Análise dos coeficientes de similaridade (correlação de Pearson) para o perfil de bandas de DGGE relacionadas ao domínio Bacteria.	48
Figura 5.3: <i>Response Surface</i> para remoção de LAS em função da concentração de etanol e nitrato.	55
Figura 5.4. Análise do cluster de acordo com o coeficiente de similaridade (Correlação de Pearson) para as bandas do DGGE do domínio Bacteria.	62
Figura 5.5: Variação temporal de DQO durante a fase de inoculação dos reatores de leito fluidificado.	66
Figura 5.6. Bloxplot da remoção de DQO nos reatores RLF1(TDH 8h) e RFL2 (TDH 12 h) ao longo das etapas de operação.	67
Figura 5.7. Bloxplot dos valores de percentuais de remoção de LAS ao longo das etapas dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	74
Figura 5.8. Bloxplot da remoção de nitrato nos reatores RFL1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h) ao longo da operação.	77
Figura 5.9. Variação de pH ao longo da operação do reator RLF1.	78
Figura 5.10. Variação de pH ao longo da operação do reator RLF2.	79
Figura 5.11. Bloxplot dos valores de alcalinidade total ao longo da operação do reator RLF1.	80
Figura 5.12. Bloxplot dos valores de alcalinidade total ao longo da operação do reator RLF2.	81
Figura 5.13. Dendograma para Domínio Bacteria para o reator RLF1 (TDH 8h).	92

Figura 5.14. Dendograma para Domínio Bacteria para o reator RLF2 (TDH 12 h).	93
Figura 5.15. Filos identificados para a biomassa inóculo de lodos ativados utilizado para imobilização da biomassa nos reatores RLF1 e RLF2.	100
Figura 5.16. Gêneros identificados no inóculo de lodos ativados em abundância relativa menor que 1% e que apresentam potencial biotecnológico.	102
Figura 5.17. Filos identificados na Etapa I dos reatores fluidificados RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	103
Figura 5.18. Modificação das populações de bactérias em nível de família nos reatores RLF1 e RLF2 em relação ao inóculo.	104
Figura 5.19. Diagrama de Venn em relação a presença de gêneros em função das OTU's do inóculo e dos reatores RLF1 e RLF2 na Etapa I.	106
Figura 5.20. Gêneros identificados nos reatores RLF1 e RFLF2 e que apresentaram abundância relativa abaixo de 5%.	110
Figura 5.21. Filos identificados nos reatores RLF1 e RLF2 com abundância relativa maior a 2,5%.	111
Figura 5.22. Famílias identificadas na Etapa II dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	112
Figura 5.23. Diagrama de Venn da presença e ausência de OTUs nos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	114
Figura 5.24. Gêneros identificados nos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h) para a Etapa II.	115
Figura 5.25. Filos abundantes na Etapa III dos reatores de leito fluidificado RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	120
Figura 5.26. Distribuição das sequencias em nível de família na Etapa III dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	122
Figura 5.27. Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros nos reatores RLF1 e RLF2.	123
Figura 5.28. Distribuição das sequencias em nível de gênero na Etapa III dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	125
Figura 5.29. Filos identificados na Etapa IV dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	129
Figura 5.30. Famílias abundantes na Etapa IV de operação dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	131

Figura 5.31. Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função do número OTUs observadas na biomassa do reator RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	131
Figura 5.32. Gêneros mais frequentes identificados na Etapa IV de operação dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	133
Figura 5.33. Filos identificados na biomassa do material suporte de RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h) na Etapa V.	136
Figura 5.34. Distribuição de famílias nos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h) para Etapa V.	137
Figura 5.35. Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função dos números de OTUs.	138
Figura 5.36. Distribuição de gêneros nos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) para Etapa V.	139
Figura 5.37. Filos observados nos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h) na Etapa VI.	142
Figura 5.38. Famílias observadas nos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h) na Etapa VI.	143
Figura 5.39: Diagrama de Venn em função do número de OTUs observadas para os reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).	144
Figura 5.40: Abundância relativa de gêneros identificados nos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h) na Etapa VI.	145
Anexo 1. Figura 1: Avaliação temporal de LAS nos reatores em batelada do Ensaio I.	174
Anexo 1. Figura 2: Avaliação temporal de LAS nos reatores em batelada do Ensaio I.	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Principais classes de surfactantes e seus respectivos usos.	5
Tabela 3.2. Remoção de LAS em água residuária de lavanderia.	12
Tabela 3.3. Principais gêneros relacionados à degradação de LAS e compostos aromáticos em reatores de leito fluidificado.	22
Tabela 4.1: Composição do Meio de Dolfing.	27
Tabela 4.2: Composição da solução de micronutrientes.	28
Tabela 4.3. Condições operacionais e nutricionais do reator RLF1.	29
Tabela 4.4. Condições operacionais e nutricionais do reator RLF2.	30
Tabela 4.5. Análises físico-químicas.	31
Tabela 4.6. Matriz do Planejamento Fatorial.	34
Tabela 4.7. Descrição dos reatores em batelada utilizados na cinética de degradação de LAS.	35
Tabela 5.1: Parâmetros físico-químicos da caracterização da água residuária de lavanderia.	40
Tabela 5.2: Composição de Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV) nas amostras da água residuária de lavanderia.	43
Tabela 5.3: Valores de metais da água residuária de lavanderia.	44
Tabela 5.4: Compostos xenobióticos da água residuária de lavanderia por <i>headspace</i> .	44
Tabela 5.5: Compostos xenobióticos da água residuária de lavanderia por injeção direta.	45
Tabela 5.6. Remoção de LAS no planejamento experimental.	50
Tabela 5.7. Coeficientes de Regressão para Remoção de LAS	54
Tabela 5.8. Análise de Variância para remoção de LAS	54
Tabela 5.9. Constante de velocidade de degradação específica (KLAS) expressa em h ⁻¹ dos reatores em batelada dos ensaios I e II.	57
Tabela 5.10. Velocidade de consumo de nitrato (mgNO ₃ ⁻ /mgSTV.h) dos reatores em batelada do Ensaio I e II.	61
Tabela 5.11. Índice de diversidade de Shannon e dominância dos reatores em batelada do ensaio I e II.	64
Tabela 5.12. Variação da concentração de matéria orgânica e carga aplicada nos reatores de leito fluidificado.	70
Tabela 5.13. Ácidos orgânicos voláteis detectados ao longo da operação dos reatores RLF1 e RLF2.	82

Tabela 5.14. Balanço de massa dos reatores RLF1 e RLF2.	83
Tabela 5.15. Balanço de massa da quantidade de LAS adicionada em diferentes reatores.	84
Tabela 5.16. Análise comparativa da eficiência de remoção de LAS e DQO em cada etapa dos reatores fluidificados.	85
Tabela 5.17. Compostos orgânicos xenobióticos detectados na Etapa VI dos reatores.	87
Tabela 5.18. Resultados do ensaio ecotoxicológico com o macroinvertebrado <i>Chironomus xanthus</i> para o reator RLF1.	91
Tabela 5.19. Resultados do ensaio ecotoxicológico com o macroinvertebrado <i>Chironomus xanthus</i> para o reator RLF2.	91
Tabela 5.20. Caracterização molecular: número de sequências obtidas para cada amostra dos reatores.	96
Tabela 5.21. Índices Ecológicos: Estimador de riqueza, diversidade e dominância.	98
Tabela 5.22. Características metabólicas dos representantes em comum nos reatores RLF1 e RLF2	108
Tabela 5.23. Características metabólicas dos representantes mais abundantes na Etapa II dos reatores RLF1 e RLF2.	118
Tabela 5.24. Características metabólicas dos representantes mais abundantes nos reatores RFL1 e RFL2 na Etapa III.	126
Tabela 5.25. Características metabólicas dos gêneros identificados em RLF1 e RLF2 na Etapa IV.	134
Tabela 5.26. Características metabólicas dos gêneros em maior abundância nos reatores RLF1 e RLF2 na Etapa V.	140
Tabela 5.27. Gêneros identificados na Etapa VI para os reatores RLF1 e RLF2	148
Tabela 5.28. <i>Heatmap</i> para as famílias mais frequentes em RLF1 ao longo da operação.	153
Tabela 5.29. <i>Heatmap</i> em função da abundância relativa das famílias mais frequentes no reator RLF2.	154

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DQO	Demanda química de oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EGSB	Expanded granular sludge bed
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo
IC50	50% da concentração de inibição
LAS	Alquilbenzeno Linear Sulfonado
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
NMP	Número Mais Provável
NTK	Nitrogênio Total Khedjal
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
RALF	Reator anaeróbio de leito fluidificado
RAHLF	Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
RLF	Reator de Leito Fluidificado
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manda de lodo
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	microlitro
cm	centímetro
d	dia
g	grama
g/L	Gramas por litro
K ^{LAS}	Constante de velocidade de degradação
mg/L	Miligramas por litro
mgLAS/L	Miligramas de LAS por litro
mgDQO/L	Miligramas de DQO por litro
mgLAS/L.dia	Miligramas de LAS por litro por dia
mgDQO/L.dia	Miligramas de DQO por litro por dia
mgNO ₃ -/L	Miligramas de nitrato por litro
mgLAS/mgSTV.d	Miligramas de LAS por miligramas de sólido total volátil por dia
mM	Milimolar
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Alquilbenzeno Linear Sulfonado	5
3.2. Remoção de LAS em reatores biológicos.....	8
3.3. Influência dos parâmetros operacionais na remoção de compostos recalcitrantes	13
3.4. Remoção de compostos recalcitrantes via redução do nitrato	17
3.5. Micro-organismos envolvidos na degradação do LAS.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Água residuária de lavanderia comercial.....	24
4.2. Inóculo	25
4.3. Avaliação do potencial desnitrificante do inóculo na presença de surfactante.....	25
4.4. Montagem e operação dos reatores de leito fluidificado (RLF)	26
4.5. Inoculação dos reatores de leito fluidificado	27
4.6. Etapas de operação dos reatores de leito fluidificado	28
4.7. Análises físico-químicas	30
4.8. Extração do LAS adsorvido no biofilme dos reatores de leito fluidificado.....	32
4.9. Ensaio Ecotoxicológico	32
4.10. Otimização da degradação de LAS.....	33
4.10.1. Delineamento do Composto Central Rotacional.....	33
4.10.2. Ensaio cinético de degradação de LAS em reatores em batelada	35
4.11. Operação dos Reatores Contínuos em Condição Otimizada	36
4.12. Caracterização da Comunidade Microbiana por Técnicas de Biologia Molecular	36
4.12.1. Amostragem.....	36
4.12.2. Extração do DNA genômico	37

4.12.3. PCR/DGGE	38
4.12.4. Sequenciamento Massivo	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Caracterização da água residuária de lavanderia comercial	40
5.2. Avaliação do potencial desnitrificante do inóculo na presença de surfactante	46
5.3. Otimização das Condições de Degradação de LAS	49
5.3.1. Planejamento Fatorial	49
5.3.2. Ensaio cinético de degradação de LAS em reatores em batelada	56
5.3.3. Comunidade Microbiana	61
5.4. Operação dos Reatores de Leito Fluidificado	65
5.4.1. Inóculo	65
5.4.2. Imobilização da biomassa ao meio suporte	65
5.4.3. Monitoramento dos Reatores de Leito Fluidificado	66
5.4.3.1. Matéria orgânica	66
5.4.2. LAS	71
5.4.3. Nitrato	74
5.4.4. pH e alcalinidade	77
5.4.5. Ácidos orgânicos voláteis	81
5.5. Balanço de massa	83
5.6. Análise comparativa dos reatores de leito fluidificado	85
5.7. Operação dos Reatores de Leito Fluidificado em Condição Otimizada	86
5.8. Análise de Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa	87
5.9. Ensaio Ecotoxicológico	88
5.9.1. Ensaio Agudo	89
5.9.2. Ensaio Crônico	90
5.10. Diversidade Microbiana dos Reatores de Leito Fluidificado	92
5.10.1. Análise da Diversidade	92
5.10.2. Análise Filogenética	94
5.10.2.1. Índices Ecológicos e estimadores de riqueza	94
5.10.2.2. Caracterização filogenética da biomassa do sistema de lodos ativados	99
5.10.2.3. Caracterização microbiana da Etapa I dos reatores RLF1 e RLF2	103
5.10.2.4. Caracterização microbiana da Etapa II dos reatores RLF1 e RLF2	110
5.10.2.5. Caracterização microbiana da Etapa III dos reatores RLF1 e RLF2	120

5.10.2.6. Caracterização microbiana da Etapa IV dos reatores RLF1 e RLF2	128
5.10.2.7. Caracterização microbiana da Etapa V dos reatores RLF1 e RLF2.....	136
5.10.2.8. Caracterização microbiana da Etapa VI nos reatores RLF1 e RLF2	142
5.10.2.9. Alterações na comunidade microbiana ao longo das etapas de operação	150
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	155
7 CONCLUSÕES	157
8 SUGESTÕES	158
9 BIBLIOGRAFIA	159
10 ANEXOS	174

1 INTRODUÇÃO

O crescente consumo de água pelos mais diversos tipos de atividades industriais tem inserido no ambiente diferentes compostos xenobióticos, muitos dos quais possuem toxicidade aos organismos aquáticos, plantas, bem como em seres humanos. Como exemplo, pode-se citar a indústria têxtil, que ao utilizar grandes volumes de água para fabricação de tecidos, tinturas e lavagens acabam descartando elevado volume de efluente com alta carga orgânica, corantes e surfactantes.

Dentro deste contexto, as lavanderias industriais utilizam grandes volumes de água no processo de lavagem de roupas, consumindo grandes quantidades de surfactantes diversos, produtos de branqueamento, e fragrâncias (BRAGA e VARESCHE, 2014).

Surfactantes fazem parte de grupo de compostos químicos que são designados como agentes de limpeza ou com propriedades de solubilização. Geralmente são constituídos por um grupo polar (com ou sem carga), o qual é solvatada pela água, e um grupo não polar (cadeia de hidrocarbonetos) a qual não é facilmente solúvel em água (MUNGRAY e KUMAR, 2009), possuindo assim características anfífilas. Os surfactantes aniônicos são extensivamente utilizados devido ao baixo custo, e por sua vez ocasionam muitos impactos negativos ao ambiente, e assim justificam a importância de remoção destes compostos dos efluentes (PENTEADO et al., 2006). O LAS (alquilbenzeno linear sulfonado) é o surfactante aniônico mais empregado na constituição de produtos de limpeza, na indústria têxtil e de alimentos (KARAHAN, 2010).

Vale ressaltar que muitos surfactantes desencadeiam toxicidade à fauna e flora, sem contar que podem sofrer alterações químicas mediadas pela presença de outros compostos, gerando compostos intermediários com toxicidade superior ao composto de origem (ROMANELLI et al, 2006). Tendo como função a limpeza, os surfactantes atingem o sistema biológico por alvos variados, causando alteração na permeabilidade da membrana celular, no processo de fosforilação oxidativa prejudicando o desenvolvimento microbiano; já em rios, induzem a eutrofização e redução nas trocas gasosas, dentre outros efeitos (PENTEADO et al 2006).

Nas estações de tratamento de esgoto (ETE) ocorre redução de cerca de um terço do total de surfactantes dispostos nas águas. Todavia, boa parte desses compostos atinge águas e sedimento de rio, mar e ambiente terrestre, e parte dele fica adsorvida no sedimento e lodo (HAMADA et al., 2011). Adicionalmente, a presença destes compostos em ETEs pode causar decréscimo da eficiência da etapa biológica, pelo efeito tóxico e formação de espumas e também nos processos físico-químicos, pois reduz a capacidade de floculação e, conseqüentemente, a sedimentação de sólidos presentes nos efluentes (ABOULHASSAN et al., 2006; MUNGRAY e KUMAR, 2008). Desta forma é imprescindível o seu tratamento, por meio da remoção e degradação, com o intuito de mitigar impactos ambientais.

A utilização e aplicação de métodos químicos, físico-químicos e físicos geralmente são mais dispendiosas, elevando custos no tratamento destes efluentes, enquanto as aplicações dos processos avançados têm como desvantagem o uso de produtos químicos, a possibilidade de compostos residuais no efluente e a geração de intermediários tóxicos. Assim, a utilização de processos biológicos pode se tornar um atrativo para a degradação de surfactantes.

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP/São Carlos, empregando diversas configurações de reatores para remoção de LAS em meio sintético e água residuária de lavanderia. Em relação a condição metanogênica-fermentativa há algumas limitações quanto à degradação de LAS, como por exemplo, a influência da concentração de sulfeto (DELFORNO et al., 2015), a presença de co-substratos, e outros nutrientes (MACEDO, 2015), a influência da carga orgânica e de ácidos orgânicos voláteis (OKADA et al., 2013a), dentre outros.

Assim, é importante que se estude e consolide outras possibilidades de tratamento biológico do LAS. Nesta perspectiva, a utilização de bactérias desnitrificantes para a degradação de LAS surge como alternativa atrativa, visto que há reporte do uso desses micro-organismos para degradação de diversos compostos orgânicos (DUARTE et al., 2015, PAULO et al., 2013). Segundo Rabus et al. (2001) as bactérias desnitrificantes são capazes de acoplar a redução do nitrato à nitrogênio gasoso, junto à conversão e degradação de compostos aromáticos, aliando assim a remoção do tóxico e de nitrogênio.

Nesta perspectiva, propôs-se no presente trabalho avaliar a degradação de LAS, oriundo de água residuária de lavanderia, em reatores de leito fluidificado para menores valores de TDH (8 e 12 horas). Adicionalmente, avaliou-se os efeitos da adição de nitrato e etanol no processo de degradação do LAS, bem como sua influência na diversidade microbiana.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Objetivou-se nesta pesquisa, investigar a influência do tempo de detenção hidráulica e das condições nutricionais sobre a remoção de LAS presente em água de lavanderia comercial em reatores de leito fluidificado por biomassa desnitrificante.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Avaliar a influência do etanol como co-substrato na remoção de LAS;
- Avaliar a influência do nitrato como receptor de elétrons na remoção de LAS;
- Definir as condições ótimas de degradação de LAS em reatores em batelada por meio do delineamento de composto central rotacional;
- Avaliar a aplicação das condições ótimas obtidas a partir de ferramenta estatística em reatores de leito fluidificado com biomassa adaptada;
- Estudar a dinâmica populacional da comunidade microbiana em reatores de leito fluidificado usados para remoção de LAS, e submetidos à diferentes condições nutricionais.
- Investigar a toxicidade de amostras afluentes e efluentes dos reatores de leito fluidificado através de bioensaios com *Chironomus xanthus*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Alquilbenzeno Linear Sulfonado

Os surfactantes são agentes tensoativos presentes nas formulações de detergentes, produtos de higiene, tintas, polímeros e outros produtos. São moléculas constituídas por duas extremidades: grupamentos polares e uma cadeia de hidrocarbonetos não polares (JESSEN, 1999).

As principais classes de surfactantes são as seguintes: aniônico, não iônico, catiônico e anfotérico (PENTEADO et al. 2006). Devido às propriedades anfipáticas destas moléculas, são universalmente usadas em composição que visam limpeza e solubilização de compostos (YING, 2006). São utilizados na constituição de detergentes, aditivos de tintas, amaciantes têxteis, antiespumantes, agroquímicos, produtos farmacêuticos, indústria de petróleo, dentre outros (REBELLO et al. 2013). A Tabela 3.1 mostra as principais classes de surfactantes e seus respectivos usos.

Tabela 3.1. Classes de surfactantes e seus principais usos.

<i>Classe</i>	<i>Usos</i>	<i>Tipos</i>
Aniônico (RSO_3^-M^+ , RCOO^-M^+)	Xampus, detergentes, agentes de superfície, cosméticos faciais, agentes anti-idade	Lauril sulfato de amônio Dodecil sulfato LAS
Catiônico ($\text{R}_4\text{N}^+\text{X}^-$)	Crems dentais, enxaguantes bucais sprays nasais, inibidores de corrosão	Cetil trimetil amônio Cloreto de Cetilpiridínio
Anfotérico	Purificação de enzimas Amplificação de RNA	Betaínas, lecitinas
Não ionico	Xampus, loções	Álcool esteárico, Tween 80, Triton X100

Fonte: Penteado et al, 2006; Rebello et al, 2013.

Dentre as classes de surfactantes existentes, o surfactante aniônico LAS (Alquilbenzeno Linear Sulfonado) é de grande utilização nos produtos de limpeza, sendo constituído de uma mistura de vários homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares, com a quantidade de carbono variando, principalmente, entre 10 e 14 átomos (GARCIA et al. 2005, PENTEADO et al. 2006). Cada homólogo contém um anel aromático sulfonado na posição *-para* ligado a cadeia linear alquil em qualquer posição, excetuando-se os carbonos terminais (GARCIA et al. 2006), e dependendo da posição do anel benzênico a degradabilidade do tensoativo pode variar (LEON et al. 2006).

Devido as suas características químicas, associadas ao seu custo de produção, o LAS é um dos surfactantes aniônicos mais utilizados mundialmente - 2,8 milhões de toneladas anuais (CAVALCANTE et al. 2014). Sua utilização extensiva na formulação de detergentes domésticos e industriais resulta em altas concentrações deste contaminante em águas residuárias. Embora as concentrações médias de LAS em esgoto sanitário não sejam elevadas, de 1 a 18 mg/L (MUNGRAY e KUMAR, 2008), lançamentos de efluentes, como água de lavanderias comerciais e indústrias, podem tornar a concentração do surfactante superior a 250 mg/L no ponto de lançamento e ao longo do corpo hídrico (MUNGRAY e KUMAR, 2009). Somado ao fato da presença do surfactante, outros parâmetros como matéria orgânica e pH podem estar em desacordo com os limites estabelecidos pela legislação, e adicionam impactos ao meio ambiente.

Por estarem na constituição de produtos agroquímicos, os surfactantes podem chegar ao solo, sendo outra via de poluição, além do mais, eles podem ser utilizados em áreas contaminadas por petróleo, devido sua capacidade tensoativa criando micelas com as partículas hidrofóbicas do petróleo e facilitando sua remoção, contudo, aplica-se em grandes quantidades para garantir a recuperação de óleo. A Figura 3.1 ilustra as possíveis vias pelas quais os surfactantes podem chegar aos corpos receptores.

Braga e Varesche, (2014) verificaram em água residuária de lavanderia de São Carlos (SP) entre 60 mg/L e 1.024 mg/L de LAS. Destaca-se que uma vez lançado nas redes coletoras de esgoto, por meio dos tratamentos convencionais não ocorre a remoção destes poluentes. Desse modo, são lançados aos corpos hídricos na sua forma intacta. Em casos de sistemas de tratamento aeróbio, muitas vezes há adsorção do LAS ao lodo, e parte deste é biodegradado, entretanto, em condições anaeróbias pode haver

parcial remoção do poluente, ou inibição dos processos, devido a sua concentração (MUNGRAY e KUMAR, 2008).

Figura 3.1. Possíveis caminhos de inserção de surfactantes químicos no ambiente.

Fonte: Rebello et al. (2013); Rebello et al. (2014).

As águas de lavanderia são conhecidas como águas cinzas e podem conter surfactantes, branqueadores, amaciantes, corantes, sólidos suspensos, óleos, patógenos e possíveis substâncias recalcitrantes (SOSTAR-TURK et al. 2005) chegando a alcançar valores de DQO entre 1200 – 20.000 mg/L (CIABATTI et al, 2009; BRAGA e VARESCHE, 2014). Devido ao grande processamento de roupas em lavanderias, estas chegam a descartar 400 m³ de efluentes por dia (CIABATTI et al, 2009), volume este geralmente liberado nas redes coletoras de esgotos, ou que passam por tratamento em unidades de tratamento convencionais, todavia não sendo adequadamente tratados. Estima-se que cerca de 50% de produtos que contém surfactantes são descartados em

sistemas de tratamento de esgotos (HAMZA et al. 2016) e parte destes não são considerados facilmente biodegradáveis. Desta forma, a presença de surfactantes nas águas residuárias de lavanderia, bem como águas cinzas é de grande preocupação, visto que a diversidade de compostos xenobióticos que está contida nos produtos utilizados podem causar efeitos deletérios na fauna e flora.

Braga e Varesche (2014) realizaram a caracterização de água residuária de lavanderia e observaram a existência de 33 compostos orgânicos xenobióticos, alguns com toxicidade potencial em organismos aquáticos, como o nonilfenol etoxilado. Eriksson (2002) realizou caracterização de águas cinzas e verificou a existência de mais de 900 compostos refratários, dentre os quais identificou surfactantes com toxicidade elevada devido a capacidade de mimetizarem a ação de hormônios (disruptores endócrinos).

Em relação ao LAS comercial, atenta-se que a complexidade estrutural deste torna difícil a tarefa de avaliação toxicológica dos componentes individuais (PENTEADO et al. 2006). Contudo, em diversos relatos foram investigados a toxicologia de surfactantes aniônicos como o LAS (IVANKOVIC et al. 2010). Entretanto, no Brasil não há legislação federal específica que estabeleça padrão de lançamentos de efluentes para surfactantes, por outro lado, a legislação brasileira estabelece padrão para qualidade de água, sendo 0,5 mg/L de MBAS (substâncias reativas com azul de metileno) definido como permissível.

Devido as suas características químicas tensoativas, o LAS pode se ligar a enzimas, proteínas e fosfolípidos (CSERAHTÍ et al. 2002) alterando a função destas e afetando diretamente a atividade biológica, representando uma ameaça à biota aquática. Desta forma, é primordial a remoção efetiva de surfactantes como o LAS de águas residuárias cinzas, e quaisquer outras que o contenham.

3.2. Remoção de LAS em reatores biológicos

Biorremediação é um processo pelo qual organismos vivos, normalmente micro-organismos são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir poluentes no ambiente. Embora outras tecnologias, como por exemplo, processos físicos e/ou químicos, sejam também indicados para descontaminar ambientes poluídos (GAYLARDE et al., 2005), por muitas vezes os resíduos químicos gerados através dos tratamentos físico-químico podem gerar compostos com toxicidade elevada, outrossim,

a biodegradação através de condições aeróbias e anaeróbias possuem vantagem de serem relativamente viáveis economicamente, e são capazes de converter moléculas xenobióticas a produtos não tóxicos, como gás carbônico e energia celular para o anabolismo (DIONISI, 2014).

Neste sentido, a remoção de surfactantes no meio ambiente já foi estudada e reportada utilizando processos físico-químicos e biológicos, contudo, sabe-se que a utilização de processo químico pode favorecer a geração de subprodutos com toxicidade superior ao poluente de origem (REBELLO et al., 2014), além de ser oneroso. Em relação aos processos biológicos, a remoção de LAS foi verificada por culturas de bactérias puras (KHEIFLAT et al., 2006; ABBOUD et al., 2007, ASOK e JISHA, 2012, PAULO et al. 2013) e em consórcios microbianos em condição anaeróbia (BRAGA, 2014), aeróbia (KARAHAN, 2010) e ferro redutora (DELFORNO, 2014).

Em condição aeróbia, a degradação do LAS é iniciada pela ω -oxidação da cadeia alquílica, seguida de β -oxidação, dessulfonação e no final há ruptura do anel aromático (SCHORBERL, 1989). Sob condições anaeróbias, a degradação de LAS foi descrita por Lara-Martin et al. (2010), sendo iniciada pela formação de ácidos sulfofenil dicarboxílicos pela ação do fumarato, sendo seguida de formação de ácidos sulfofenil carboxílicos que sofrem β -oxidação, há regeneração do fumarato, dessulfonação do anel benzênico, com posterior liberação da estrutura aromática.

A degradação anaeróbia do LAS vem sendo reportada recentemente, e seus estudos preliminares iniciaram-se com os trabalhos de ANGELIDAKI et al. (2004), MOGENSEN et al. (2003), e SANZ et al. (2003). No Brasil, diversos trabalhos foram realizados sob condições anaeróbias para remoção de LAS padrão em diversas configurações de reatores (OLIVEIRA et al. 2010; DELFORNO et al. 2012; OKADA et al. 2013a). Entretanto, atualmente há relatos do uso de bioprocessos para remoção do LAS em águas residuárias de lavanderias (DELFORNO et al. 2014, OKADA et al. 2014; BRAGA et al. 2015; MACEDO et al., 2015).

Oliveira et al. (2010) avaliaram a remoção de LAS padrão em reatores anaeróbios de leito fluidificado preenchidos com diferentes materiais suporte (areia, pérola de vidro, argila expandida, e carvão) operados em TDH de 18 horas, e alimentados com substrato sintético contendo sacarose e extrato de levedura como co-substratos. Os autores verificaram que a remoção de LAS foi mais acentuada para os

reatores preenchidos em areia ($99\pm 2\%$) e pérolas de vidro ($99\pm 2\%$), possivelmente, pela diversidade microbiana estabelecida no biofilme de tais materiais suportes.

Delforno et al. (2012) estudaram a remoção de LAS em reator de leito de lodo expandido (EGSB) com tempos de detenção hidráulica de 26 h e 32 h. A alimentação do reator foi realizada com meio mineral suplementado com etanol, metanol e 14 mg/L de LAS. Os autores registraram para a fase operada em TDH 32 horas, remoção de LAS de 74%, enquanto para a fase operada em TDH de 26 horas a remoção de surfactante foi de 48%, implicando a necessidade de maior tempo de contato da biomassa com o composto para efetuar sua remoção.

Okada et al. (2013a) avaliaram a influência do TDH e da concentração de co-substratos na remoção de LAS padrão (12 mg/L) em reatores UASB. Os autores verificaram que a degradação do LAS foi maior (76%) para reator com TDH de 35 horas e com menor concentração de co-substrato, consequentemente, menor carga orgânica. Os autores verificaram não haver diferenças entre as remoções dos reatores cujos valores de TDH foram de 35 e 80 horas, nos quais as remoções de LAS foram 53% e 55%, respectivamente, para 12,4 mgLAS/L e 11,7 mgLAS/L afluente. Em TDH de 6 horas os autores verificaram que a remoção de LAS (12,2 mg/L) foi 18% corroborando com os resultados de Delforno et al. (2012) e enfatizando a necessidade de maior tempo de contato para remoção de LAS em sistemas anaeróbios.

Okada et al. (2013b) estudaram a influência da concentração de ácidos orgânicos voláteis sobre a remoção de LAS em reatores UASB e EGSB operados em TDH de 24 horas. Os autores observaram maior remoção (40 – 80%) no reator EGSB cuja concentração de ácidos voláteis foi menor (1 – 22 mg/L), por outro lado, para o reator UASB foi observada baixa remoção (20 – 25%) para 2 – 45 mg/L de ácidos voláteis. Os autores justificaram as diferenças entre as remoções, devido a recirculação no reator EGSB que possibilitou menor concentração de ácidos voláteis, e consequentemente, maior remoção de LAS (14 mgLAS/L afluente em ambos reatores).

Delforno et al. (2014) avaliaram a adaptação prévia da biomassa com LAS padrão na remoção de LAS de água residuária de lavanderia em reator EGSB. Os reatores foram operados em temperatura mesofílica, em TDH de 38 horas com etanol, metanol e extrato de levedura como co-substratos. O reator com biomassa adaptada foi exposto previamente a 13,2 mg/L de LAS comercial para em seguida ser operado com água residuária de lavanderia diluída (11,2 mgLAS/L), enquanto o reator com biomassa

não adaptada foi iniciado com água residuária de lavanderia diluída para concentração de LAS de 11,5 mg/L. Como resultado os autores observaram que a adaptação prévia da biomassa não influenciou na obtenção de maior percentual de remoção de LAS, sendo verificada remoção de $78\pm 16\%$ para o reator com biomassa não adaptada e $76\pm 18\%$ para o reator com biomassa adaptada.

Braga et al. (2015) avaliaram a remoção de LAS de água de lavanderia em reator anaeróbio de leito fluidificado utilizando sacarose e extrato de levedura como co-substrato e operado em cinco fases: adaptação (Fase I), alimentação com água de lavanderia diluída para 9,5 mgLAS/L e TDH 18 horas (Fase II), alimentação com água de lavanderia diluída para 23,3 mgLAS/L e TDH 19 horas (Fase III), alimentação com água de lavanderia diluída para 21,1 mgLAS/L e TDH de 23 horas (Fase IV) e Fase V cujo reator foi alimentado com água de lavanderia diluída para 27,9 mgLAS/L sem adição de co-substratos em TDH de 18 horas. Ao final de 489 dias de operação, observou-se que o maior percentual de remoção de LAS foi observado para fase com menor concentração de surfactante (Fase II – remoção de 74,6%), enquanto para fase sem adição de co-substrato, fase V, verificou-se a menor remoção de LAS (39,3%), refletindo a necessidade de adição de co-substrato para melhores remoções de LAS através do consórcio microbiano estabelecido na areia.

Macedo et al. (2015) avaliaram a suplementação com sacarose e etanol na remoção de LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado utilizando inóculo de reator UASB de tratamento de resíduos de suinocultura. Os autores verificaram que a principal influência dos co-substratos se deu na modificação da comunidade microbiana, e consequentemente, na remoção de LAS. Quando utilizaram etanol (80 mg/L) e sacarose (80 mg/L) a remoção de LAS verificada foi de 52%, havendo predomínio de representantes pertencentes à família Commamonadacea, entretanto, quando o reator foi suplementado apenas com etanol, a remoção de LAS foi de 73%, havendo substituição por bactérias pertencentes à família Rhodocyclaceae. Após retirar o co-substrato da alimentação do reator, houve incremento no percentual de remoção de LAS para 77%. Os autores observaram, ainda, que nesta fase sem adição de co-substrato houve manutenção de representantes pertencentes a família Rhodocyclaceae. Desta forma, os autores verificaram maior remoção do poluente na ausência da suplementação com co-substrato, contrariamente, Braga et al. (2015) verificaram que a remoção de LAS foi menor na fase cujo reator foi alimentado sem co-substrato.

A Tabela 3.2 resume os principais trabalhos relacionados a degradação de LAS em água residuária de lavanderia realizadas no Brasil em reatores biológicos.

A partir dos trabalhos mencionados anteriormente, bem como os referenciados na Tabela 3.2, evidenciou-se que a degradação do LAS por processos anaeróbios pode ser influenciada por fatores como carga orgânica e tempo de detenção hidráulica (OKADA et al., 2013a), pela concentração de ácidos orgânicos voláteis (OKADA et al., 2013b), pela composição dos produtos de limpeza (CAROSIA et al., 2014), pela presença de co-substratos (BRAGA et al., 2015; MACEDO et al., 2015), sendo imprescindível que haja, para cada configuração de reator, estudo sobre variáveis que influenciem no seu desempenho quanto à remoção de LAS.

Tabela 3.2. Remoção de LAS em água residuária de lavanderia

<i>Configuração reacional</i>	<i>Co-substrato</i>	<i>TDH (h)</i>	<i>LAS</i>	<i>Remoção %</i>	<i>Referência</i>
Reator Anaeróbio Operado em Bateladas Sequenciais	Etanol e extrato de levedura	24*	4,1 mg/L	17,9	Blanco, 2012
UASB	Etanol, metanol e extrato de levedura	35	10,1 mg/L	82	Okada, 2012
Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado	Sacarose	18	23 mg/L	68	Braga, 2014
EGSB	Etanol, metanol e extrato de levedura	39	28,8 mg/L	58,6	Delfono, 2014
Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado	Etanol e sacarose	18	18,2 mg/L	51,7	Macedo, 2015

* referente ao tempo de ciclo de cada batelada

3.3. Influência dos parâmetros operacionais na remoção de compostos recalcitrantes

De modo geral fatores ambientais, parâmetros operacionais e configuração dos reatores biológicos influenciam na dinâmica dos processos biológicos, por conseguinte, interferindo diretamente no metabolismo microbiano. Portanto, quando se propõe uma configuração reacional para remoção de um tóxico, é necessário que se conheça os fatores que irão intervir no processo de remoção destes compostos.

3.3.1. Suplementação com fontes nitrogenadas

O nitrogênio pode ser assimilado pelas bactérias através da forma orgânica (compostos orgânicos nitrogenados) e inorgânica (nitrato, nitrito e amônia), e em geral é utilizado para síntese de componentes celulares através de reações anabólicas (MADIGAN, 2010). Sendo um macro nutriente, todos os organismos exigem determinadas quantidades de nitrogênio para que seu desempenho celular e funcional não seja afetado. Nos processos de biorremediação, o nitrogênio pode induzir o sistema enzimático dos micro-organismos na secreção de enzimas que atuam na descontaminação de ambientes (XU et al., 2014). Especificamente na respiração anóxica, a adição de nitrato pode aliviar a limitação de nitrogênio, e facilitar a redução de nitrato e remoção de matéria orgânica (XU et al., 2014).

Em relação à suplementação com fonte de nitrogênio, Abboud et al. (2007) observaram que a suplementação com nitrato de amônio aumentou de 60% para 90% a remoção de LAS (200mg/L) por co-cultura de *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pantoea agglomerans*. Os autores observaram ainda que a adição de sacarose ou glicose (2 g/L) promoveu incremento na velocidade de degradação do surfactante. Por outro lado, Khleifat et al. (2010) observaram a degradação de LAS (300 mg/L) por *Burkholderia* sp. e verificaram que as melhores condições para remoção desse surfactante foram a 37°C, pH 6,5, e agitação de 150 rpm, em reatores em batelada. Para estas condições, avaliando a suplementação com carbono (glicose, sacarose, maltose, ácido succínico), os autores verificaram que o ácido succínico promoveu maior velocidade de degradação (6,9 mgLAS/L.h), enquanto a suplementação de nitrogênio por meio da adição de extrato de levedura foi favorável em relação a velocidade de degradação (6,2 mgLAS/L.h). Tais possibilidades, endossam a necessidade da adição da fonte de nitrogênio e carbono para a degradação do LAS.

Kim et al. (2013) estudaram a influência da concentração do nitrato na remoção de tolueno por *Pseudomonas putida* F1 em dois ensaios em reatores batelada. No primeiro ensaio, foi avaliada a remoção de tolueno (50 mg/L) em curto período de tempo (4 dias) para faixa de concentração de nitrato entre 0 a 700 mg/L. Os autores observaram que a maior velocidade de remoção ocorreu para 300 mg/L de nitrato (0,083 mgtolueno/L.h). No segundo ensaio, os autores investigaram a remoção de tolueno (25 mg/L) em período de operação maior (14 dias) e observaram que a maior velocidade de remoção (0,068 mgtolueno/L.h) foi obtida quando houve adição de 200 mgNO₃⁻/L. Na ausência de nitrato, não houve remoção de tolueno em nenhum dos experimentos. Além disso, os autores enfatizaram que para menor concentração de nitrato (50 mg/L) a taxa de remoção foi ínfima, provavelmente devido à baixa biodisponibilidade do receptor de elétrons. Similarmente, a adição de nitrato (1.875 mg/L) em concentração ótima foi necessária para remoção de 1.000 mg/L de metanol por cultura metilotrófica isolada de sistemas de tratamento de efluentes de papel (BABBITT e LINDNER, 2011).

Adicionalmente, a suplementação com nitrogênio, em reatores com biomassa imobilizada, tende a facilitar o crescimento do biofilme e maturação deste. Holubar et al. (1999) investigaram o efeito da adição de nitrato no desenvolvimento do biofilme em reator de leito fixo em fluxo contínuo para degradação de n-heptano e tolueno. Os autores observaram que, inicialmente, ocorreu depleção rápida da concentração do nitrogênio devido a metabolização deste para o crescimento celular, sendo seguida de uma fase estacionária do biofilme (biofilme maduro), onde verificaram a maior taxa de degradação de hidrocarbonetos.

Em suma, a adição de nitrogênio nos trabalhos mencionados possibilitou a melhoria no processo de remoção de poluentes, provavelmente, devido ao maior crescimento da biomassa (ABBOUD et al. 2007, KHLEIFAT, 2006), amadurecimento do biofilme (HOLUBAR et al. 2009), bem como serviu como receptor de elétrons nos processos de degradação (DOU et al. 2009, KIM et al. 2013).

3.3.2. Tempo de detenção hidráulica

O tempo de detenção hidráulica, definido como o tempo de contato dos micro-organismos (biofilme ou biomassa planctônica) ao substrato, influencia diretamente no metabolismo microbiano, bem como na conversão da matéria orgânica biodegradável e recalcitrante (SPEECE, 1996; JORDÃO e PESSOA, 2011). Desta forma, de acordo com

o objetivo pretendido (remoção de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo ou compostos refratários) aliado às características do sistema biológico proposto, é necessário que seja avaliado também o TDH. Sistemas biológicos anaeróbios (UASB e EGSB) são operados em maiores valores de TDH se comparados aos sistemas aeróbios (lodos ativados) e anóxicos, principalmente devido às diferenças do metabolismo microbiano. Comparativamente, sistemas anóxicos são operados em baixos valores de TDH (2 a 16 horas) (LU et al., 2014), enquanto os sistemas anaeróbios são operados em TDH que variam de 8 a 120 horas (SPEECE, 1996).

Pishgar et al. (2013) investigaram a influência do TDH na remoção de fenol em reator anaeróbio de leito fluidificado. Ao final do experimento, os autores não observaram alterações significativas na remoção do fenol para TDH entre 72 horas e 4 horas, respectivamente de 93% e 98%. Contudo, ao reduzirem o TDH para 2,5 horas a remoção de fenol decresceu para 80%. Vale ressaltar que os autores operaram o reator por 90 dias em maior TDH para que o biofilme estivesse estabelecido, e adaptado à remoção do poluente.

Muda et al. (2011) utilizaram reator anaeróbio com biomassa granular para remoção de corante sintético (50 mg/L) avaliando o TDH no processo de remoção. Os autores verificaram que o aumento do TDH de 6 horas para 24 horas favoreceu a maior remoção de corante (76%), endossando assim a necessidade de maior tempo de contato.

Zhang et al. (2015) avaliaram a influência do TDH na degradação de tricloroetileno em reator UASB. Os autores verificaram que a redução do TDH de 25 horas para 5 horas influenciou na remoção do composto, uma vez que a eficiência reduziu de 99% para 84%. Além disso, os autores verificaram também que o TDH foi fator influente na diversidade de micro-organismos do reator.

Estrada-Arriga et al. (2011) utilizaram reator biológico de membranas operados em TDH de 12 e 7 horas para remoção de estrogênios em meio sintético. Os autores verificaram que a remoção de estrogênios foi melhor quando se empregou TDH de 12 horas, por outro lado, em TDH de 7 horas, a remoção decresceu e houve desestabilização do sistema.

De forma geral, o TDH exerce pressão seletiva sobre o metabolismo microbiano, uma vez que o maior tempo de contato entre os micro-organismos e o poluente, pode levar a maior remoção do composto (MUDA et al. 2011), como pode promover maior adaptação dos micro-organismos (PISGHAR et al. 2013).

Especificamente, em relação ao LAS, Delforno et al. (2012) afirmaram que é necessário maior tempo de contato entre a biomassa e o composto para que se atinja maior remoção. Estes autores trabalharam com reator EGSB para remoção de LAS padrão, em TDH de 26 e 32 horas, e verificaram menor remoção de LAS (48% para 14,4 mg/L afluente) para TDH de 26 horas. Por outro lado, para maior TDH verificaram maior remoção do LAS (64%), provavelmente, devido ao maior tempo de contato dos micro-organismos ao tensoativo.

Tal afirmação foi corroborada por Okada et al. (2013a) ao trabalharem com reatores UASB submetidos a diferentes TDH para remoção de LAS padrão. Os autores verificaram que para TDH de 6 horas, a remoção de surfactante foi de 18%, para 12,2 mgLAS/L afluente. Contudo, ao utilizarem TDH de 35 horas, verificaram aumento na eficiência de remoção de LAS para 53%, com 12,4 mgLAS/L afluente. Adicionalmente, estes autores operaram reator UASB em TDH de 80 horas, e observaram não haver diferenças significativas entre o TDH de 35 horas, sendo observadas remoções de 53% (TDH 35 horas) e 55% (TDH 80 horas), para 12,2 mg/L e 12,4 mg/L afluente, respectivamente.

Especificamente em relação aos reatores fluidificados, Oliveira et al. (2010) avaliaram a remoção de LAS padrão (20 mg/L) com extrato de levedura (500 mg/L) e sacarose (80 mg/L) em TDH de 18 horas. Sob tais condições, os autores verificaram 98% de remoção de LAS (18,8 mg/L afluente). Por outro lado, Carosia (2011) utilizou a mesma configuração reacional, porém em TDH de 15 horas, para remoção de LAS de sabão em pó, com etanol (80 mg/L) e extrato de levedura (500 mg/L) como co-substratos. Nesse último caso, foi observada 47,6% de remoção de LAS (14,4 mg/L). Provavelmente, devido às diferenças de composição do substrato (LAS padrão ou LAS a partir de sabão em pó), bem como, o valor de TDH aplicado, pode-se mencionar que a remoção obtida por Carosia (2011) foi bem menor aquela observada por Oliveira et al. (2010), ou seja de 47,6% para 14,4 mgLAS/L afluente contra 98% para 18,8 mgLAS/L afluente, respectivamente.

Braga et al. (2015) avaliaram reator anaeróbio de leito fluidificado, em TDH de 19 horas, para remoção de LAS de água residuária de lavanderia com extrato de levedura (500 mg/L) e sacarose (80 mg/L) como co-substratos. Os autores verificaram remoção de 65,3% de LAS para 23,3 mg/L afluente, porém, ao aumentar o TDH para 23

horas, verificaram decréscimo no percentual de remoção para 52,8% (21,7 mgLAS/L afluyente).

Macedo et al. (2015) aplicaram TDH de 18 horas para remoção de LAS de água residuária de lavanderia em reator de leito fluidificado sob condição fermentativa-metanogênica com etanol e sacarose como co-substratos. Os autores verificaram remoção de 51,7% para 18,2 mgLAS/L afluyente. Além disso, ao retirarem a sacarose da composição do substrato, verificaram remoção de 72,9% para 25,4 mgLAS/L.

Assim, pode-se inferir que a aplicação de TDH de 18 horas foi mais adequado para remoção de LAS de água residuária de lavanderia (BRAGA et al., 2015; MACEDO et al., 2015) e LAS padrão (OLIVEIRA et al., 2010), todavia sob condição anaeróbia. Desta forma, é importante que se estude outra condição metabólica, como a anóxica, para a remoção de LAS, uma vez que há possibilidade de reduzir o TDH aplicado nos reatores biológicos, devido ao crescimento rápido das bactérias desnitrificantes aliado às condições facultativas que podem ser utilizadas para facilitar o desenvolvimento do biofilme.

3.4. Remoção de compostos recalcitrantes via redução do nitrato

A degradação de compostos xenobióticos pelos micro-organismos pode ocorrer em condição aeróbia, anaeróbia e anóxica. Através destas vias, oxigênio, sulfato, dióxido de carbono e nitrato, por exemplo, são utilizados como receptores de elétrons, no metabolismo desassimilativo, sendo convertidos às formas mais reduzidas (GAYLARDE et al., 2005; MADIGAN, 2010). As bactérias desnitrificantes, por serem em sua maioria facultativas, utilizam o nitrato ou oxigênio (quando disponível) na transferência de elétrons dos compostos orgânicos, xenobióticos ou recalcitrantes (WILSON e BOUWER, 1997) gerando energia celular.

Segundo Fuchs (2008) compostos aromáticos irão ser degradados, preferencialmente, por bactérias desnitrificantes, uma vez que, o rendimento energético, sob esta condição é mais favorável termodinamicamente ao se comparar a metabolização por anaeróbios estritos, bactérias redutoras de sulfato e bactérias redutoras de ferro. Desta forma, a degradação de compostos recalcitrantes sob ambiente anóxico se torna uma possibilidade promissora a julgar pelos diversos trabalhos reportados na literatura sobre a habilidade das bactérias desnitrificantes na degradação

dos mais diversos tipos de tóxicos (DOLFING et al. 1990; WILSON e BOUWER, 1997; XU et al. 2014; DUARTE et al. 2015).

Spormann e Widell (2000) afirmam que o metabolismo de compostos aromáticos por bactérias desnitrificantes envolve a geração de um intermediário comum, o benzoil-CoA. Na respiração na ausência de oxigênio livre, ele é o principal mecanismo envolvido na degradação. Após sua formação, há redução do anel aromático, β -oxidação da cadeia carbônica, clivagem do anel aromático e mineralização via glutaril-CoA. Os micro-organismos que participam destas reações são em sua maioria pertencentes a subclasse β e γ -Proteobacteria (RABUS et al. 1999). Vale ressaltar que no filo Proteobacteria estão incluídos mais de 380 gêneros, implicando assim grande variedade metabólica (BRENNER et al., 2005).

Elsgaard (2010) verificou a toxicidade de compostos orgânicos xenobióticos (LAS, nonilfenol) em inóculo de lodos ativados, em diferentes condições redutoras, e observou, especificamente para o LAS, que a condição nitrato redutora foi aquela mais resistente às altas concentrações do surfactante (105 ± 6 mg/L). Sob tais condições, os autores constataram a redução de nitrato e inferiram não haver interferência do poluente no processo de respiração celular. O ensaio foi conduzido em batelada, e a concentração de nitrato (1,86 g/L) diminuiu durante duas semanas em 0,61 g/L.semana. O autor sugere que a condição nitrato redutora é uma rota potencial na degradação de matéria orgânica na presença de compostos tóxicos.

Mbadinga et al. (2011) relataram que bactérias nitrato redutores são eficientes e hábeis na degradação de alcanos e hidrocarbonetos, sugerindo que a degradação destes compostos por esta via é favorável energeticamente. Os autores ainda realçaram que a maioria dos micro-organismos relatados na degradação de alcanos de cadeias longas são desnitrificantes e pertencentes ao filo Proteobacteria. ETTWIG et al (2010) e ZEDELIUS et al. (2010) sugeriram que compostos intermediários da redução do nitrato (nitrito e óxido nitroso) podem ser reativos e ativar as moléculas à degradação.

Delforno et al. (2015) trabalharam com reator EGSB para remoção de LAS de água residuária de lavanderia comercial e quando da realização do sequenciamento massivo após o final dos experimentos, constataram que o filo mais abundante foi Proteobacteria, com abundância relativa alta para *Pseudomonas*, gênero este relatado com versatilidade metabólica e capaz de desnitrificar.

Macedo (2015) trabalhou com reator anaeróbio de leito fluidificado para remoção de LAS com água residuária de lavanderia e avaliou a influência de co-substratos na degradação do surfactante. Nesse trabalho foram identificados 37 gêneros relacionados à degradação do poluente, todos capazes de realizar a desnitrificação, mesmo para baixa concentração de nitrato no meio reacional ($5,5 \pm 2,5$ mg/L). Os gêneros de maior abundância relativa foram *Zooglea* e *Dechloromonas*.

Em suma, há na literatura diversos trabalhos que endossam a capacidade de degradação de compostos recalcitrantes por bactérias desnitrificantes. Uma vez que estas são facultativas, podem crescer em ambientes com baixa pressão de oxigênio e utilizam o nitrato em seu metabolismo desassimilativo como receptor de elétrons, assim estas bactérias podem degradar compostos xenobióticos acoplando à redução de nitrogênio. Outrossim, a presença de uma molécula facilmente biodegradável, como os álcoois de cadeia curta (etanol ou metanol) e podem induzir o metabolismo desassimilativo das bactérias desnitrificantes, pois agem como co-substratos no processo de degradação (SHÖERBL, 1989; WILSON e BOUWER, 1997; THOMSEN et al., 2007; LU et al., 2014).

3.5. Micro-organismos envolvidos na degradação do LAS

O conhecimento acerca dos micro-organismos que participam dos processos de degradação de moléculas recalcitrantes é de grande importância, pois auxilia a elucidar de que forma estes micro-organismos interagem no microcosmo.

As técnicas mais utilizadas para conhecimento da diversidade microbiana são as seguintes: 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 massivo (metagenômica e/ou amplicons da região do RNAr 16S) (MADIGAN, 2010).

Okada et al., (2014) avaliaram a diversidade microbiana em reatores UASB utilizados na remoção de LAS padrão e LAS oriundo de água residuária de lavanderia. Através da técnica de pirosequenciamento os autores identificaram 34 gêneros de bactérias relacionados a degradação do LAS e outros compostos aromáticos, dentre os quais se incluíam: *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Desulfobulbus*, *Holophaga*,

Hydrogenophaga, *Geobacter*, *Pseudomonas* e *Zoogloea*. Dentre os gêneros citados, cinco deles possuem a capacidade de realizar a respiração anóxica.

Carosia et al., (2014) avaliaram a diversidade microbiana em reator de leito fluidificado por meio de análise filogenética do RNAr 16S, por meio de clonagem e sequenciamento, de amostras da biomassa do meio suporte e do separador de fases na última etapa de operação do reator, em TDH de 15 horas e alimentado com LAS oriundo de sabão em pó de uso doméstico. Nesse trabalho foram obtidos 83 clones para biomassa do meio suporte, dos quais 88% foram relacionados com representantes pertencentes ao filo Proteobacteria, assim distribuídos: 43% dos clones pertenciam a classe β -Proteobacteria e 31% a classe δ -Proteobacteria. Em nível de gênero, os autores identificaram que os principais representantes da classe β -Proteobacteria e δ -Proteobacteria foram, respectivamente, *Dechloromonas* e *Geobacter* sendo ambas bactérias relacionadas à degradação de LAS e compostos aromáticos (BRENNER et al. 2005; MACEDO et al. 2015).

Braga et al., (2015) estudaram a diversidade de bactérias em reator de leito fluidificado de tratamento de água residuária de lavanderia, por meio do pirosequenciamento 454. Os autores observaram a nível de filo, predominância de Proteobacteria (25,8 – 83%) e Gemmatimonadetes (2 – 34%), com destaque para as famílias Rhodocyclaceae (3 – 12%) e Desulfobulbaceae (1 – 58%). Os autores identificaram bactérias semelhantes a *Desulfobulbus* (58,5%) quando operaram o reator na presença de sacarose. Além dessa bactéria foram identificadas outras semelhantes a *Zoogloea*, *Gemmatimonas*, *Dechloromonas* e *Geobacter*. Ao retirar a sacarose da alimentação do reator, os autores verificaram alteração na comunidade microbiana, sendo identificado bactérias semelhantes a *Gemmatimonas* cuja abundância relativa observada foi de 25,5%. Os gêneros citados pelos autores são descritos pela habilidade de degradação de compostos aromáticos, como fenol, benzeno, tolueno, e outros hidrocarbonetos (BRENNER et al., 2005).

Delforno et al., (2015) estudaram a diversidade microbiana de reator EGSB para remoção de LAS de água residuária de lavanderia comercial em condições anaeróbias, por meio do sequenciamento do RNAr 16S via Ion Torrent, além da diversidade de populações pelo DGGE. Ao analisarem o DGGE, concluíram que houve modificação nas populações de micro-organismos do reator para os grânulos da manta de lodo, quando comparadas com o inóculo, exibindo similaridade de 60%. Em relação ao

sequenciamento os autores identificaram 175 gêneros, dos quais 33 possuíam relação direta com a degradação de LAS. Os gêneros identificados com maior abundância relativa foram os seguintes: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas*, *Syntrophorhabdus* e *Desulfomonile*. Cabe ressaltar que *Pseudomonas* é capaz de utilizar o nitrato como receptor de elétrons na respiração anóxica (BRENNER et al., 2005).

Macedo et al., (2015) avaliaram a diversidade microbiana em reator anaeróbio de leite fluidificado frente aos co-substratos (etanol e sacarose) no tratamento de água residuária de lavanderia. Os autores verificaram diferenças significativas na comunidade microbiana mediante o uso de um ou outro co-substrato. Na presença de etanol e sacarose, os autores verificaram predominância de representantes da família Comamodaceae (*Curvibacter*). Na presença de apenas etanol verificaram a predominância de representantes pertencentes a família Rhodocyclaceae. Ao retirar o co-substrato do reator, os autores verificaram que representantes pertencentes a família Rhodocyclaceae permaneceram em abundância. Os gêneros identificados com relação direta à degradação do LAS foram os seguintes: *Dechloromonas*, *Georgfuchsia* e *Zooglea*. Vale ressaltar que foram identificados 37 gêneros nesse estudo, dentre os quais 22 possuíam capacidade de utilizar o nitrato como receptor de elétrons.

A Tabela 3.3 compila os gêneros identificados em diversos trabalhos utilizando reatores biológicos para remoção de LAS, e que foram relacionados diretamente à degradação de LAS e/ou aromáticos.

Tabela 3.3. Principais gêneros relacionados à degradação de LAS e compostos aromáticos em reatores de leito fluidificado

Referência	Fonte de LAS	Co-substrato	Principais gêneros	Gêneros em comum
OLIVEIRA (2010)	LAS padrão	Extrato de levedura	<i>Sediminibacterium</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Novosphingobium</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Azospira</i>	
CAROSIA (2011)	Sabão em pó	Etanol e extrato de levedura	<i>Dechloromonas</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Azospira</i> ,	<i>Dechloromonas</i> ,
BRAGA (2014)		Sacarose e extrato de levedura	<i>Gemmatimonas</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Desulfobulbus</i> , <i>Dechloromonas</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Holophaga</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Sporomusa</i> , <i>Azospira</i>	<i>Zoogloea</i> , <i>Acinetobacter</i> ,
MACEDO (2015)	Água de lavanderia	Etanol, sacarose e extrato de levedura	<i>Comamonas</i> , <i>Sporomusa</i> , <i>Variovax</i> , <i>Magnetospirillum</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Azospira</i>	<i>Geobacter</i> , <i>Azospira</i>

É importante salientar, que os trabalhos listados na Tabela 3.3 foram agrupados devido a utilização do mesmo tipo de sistema operacional, reator de leito fluidificado, contudo as técnicas empregadas para caracterização microbiana foram diferentes, implicando assim em maior ou menor número de gêneros observados, em função da cobertura da técnica empregada (DELFORNO, 2014), e o número de pares de bases de cada sequência identificada. Oliveira (2010) e Carosia (2011) empregaram a técnica de clonagem e sequenciamento de amplicons de fragmentos de RNAr 16S; Braga (2014) empregou a técnica de pirosequenciamento e Macedo (2015) utilizou o sequenciamento via Ion-Torrent.

Ressalta-se ainda, que trabalhos realizados utilizando outras configurações de reatores anaeróbios (DUARTE et al. 2008; OKADA, 2012; DELFORNO, 2014) identificaram gêneros em comum com os listados na Tabela 3.3, exemplificando-se: *Zoogloea*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Acinetobacter*, *Sporomusa* e *Geobacter*. Observou-se também que dentre os gêneros identificados nos trabalhos mencionados, há micro-organismos de metabolismo aeróbio, justificando a importância destes gêneros na degradação do LAS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho de doutorado com o objetivo de investigar a influência do TDH e das condições nutricionais sobre a remoção de LAS em reatores de leito fluidificado foi realizado nas dependências do Laboratório de Processos Biológicos (EESC-USP) e teve seu protocolo experimental delineado conforme a Figura 4.1.

Figura 4.1. Protocolo operacional da pesquisa.

4.1. Água residuária de lavanderia comercial

Foram realizadas 20 coletas, semanalmente, com o intuito de caracterizar a água residuária a ser utilizada. Procedeu-se a coleta da água residuária em frascos de borossilicato, e em seguida foram encaminhadas ao Laboratório de Processos Biológicos para a realização das análises. As águas residuárias foram coletadas em lavanderia comercial localizada em São Carlos (SP), e foi dada preferência àquelas provindas da lavagem de roupas claras, sem adição de adjuvantes de limpeza (amaciante e branqueador).

4.2. Inóculo

O inóculo utilizado nos experimentos em batelada e na montagem dos reatores biológicos foi proveniente de sistema de lodos ativados usado no tratamento de esgoto sanitário (Volkswagen, São Carlos). O lodo foi coletado em frasco plástico com capacidade de 10 L, e após a coleta foi armazenado a 4°C em câmara fria. Ressalta-se que o lodo foi escolhido por ter características mistas apresentando bactérias aeróbias, nitrificantes e desnitrificantes (SANTOS, 2014; MOURA, 2014).

4.3. Avaliação do potencial desnitrificante do inóculo na presença de surfactante

Foram realizados ensaios em reatores em batelada para avaliar o potencial de degradação do LAS por inóculo de lodos ativados em condição desnitrificante. Para tanto, foram testados 25 mg/L e 150 mg/L de nitrato, na forma de nitrato de sódio, na degradação de LAS.

Os reatores em batelada foram agrupados nas seguintes composições em função da adição de LAS: Reator Controle (RC) – sem adição de LAS, Reator LAS Padrão (RLP) e Reator com Água residuária de Lavanderia (RAL). Água residuária de lavanderia diluída foi adicionada aos reatores RAL para obtenção de 19,6 mg/L de LAS. LAS padrão (Sigma Aldrich) foi adicionado em 20,1 mg/L aos reatores RLP.

Vale ressaltar que foi adicionado 120 mg/L de etanol para resultar em DQO na faixa de 300 mg/L, apenas nos reatores RC e RLP. O meio de cultivo utilizado no ensaio foi descrito por DOLFING et al. (1990) (Tabela 4.1). A solução traço de metais foi preparada como descrito por ZEYER e KEARNEY (1982) (Tabela 4.2).

A batelada foi realizada em frascos de Duran (2 L), considerando 1 litro de volume reacional e 10% (v/v) de inóculo. O *headspace* foi mantido em 50% com atmosfera de N₂/CO₂ (70/30%). Os sistemas foram colocados sob agitação a 120 rpm e temperatura controlada a 30°C. A operação dos reatores seguiu-se até 48 horas.

Foram realizadas determinações analíticas de pH, DQO, nitrato, STV e LAS. Para quantificar a degradação de LAS, foi realizado balanço de massa, tendo como base a quantidade de surfactante adsorvida no lodo no final do teste. A extração de LAS adsorvido na biomassa foi realizada segundo os procedimentos descritos em DUARTE (2006). Após 48 horas, biomassa de cada reator foi coletada para realização de técnica de DGGE para verificar a diversidade microbiana.

4.4. Montagem e operação dos reatores de leito fluidificado (RLF)

Foram montados dois reatores (Figura 4.2) de leito fluidificado construídos em acrílico, com 4,0 cm de diâmetro e 100 cm de altura. Os reatores foram preenchidos com areia, e instalados no Laboratório de Processos Biológicos, sendo mantidos em câmara climatizada a 30°C. O Reator 1 (RLF1) e Reator 2 (RLF2) foram operados com tempo de detenção hidráulica de 8 horas e 12 horas, respectivamente.

A alimentação dos reatores de leito fluidificado foi controlada por bomba dosadora. A vazão de recirculação utilizada para manter a fluidificação mínima da areia nos reatores fluidificados foi de 70,3 L/h (30% de expansão do leito).

Figura 4.2: Diagrama esquemático do reator de leito fluidificado.

A areia foi escolhida como meio suporte, devido aos ótimos resultados obtidos por Oliveira (2010). Em cada reator foi adicionado 320 g de areia com dimensões entre 1,4 e 1,7 mm. A areia foi submetida a tratamento ácido para retirada de impurezas e

aumento da rugosidade nas partículas. A areia ficou mergulhada em solução de ácido fluorídrico, e após 2 horas, foi lavada com água destilada, e levada em estufa à 100°C durante 24 horas (MONTERAN, 2014).

4.5. Inoculação dos reatores de leito fluidificado

A inoculação do reator foi realizada mediante a adaptação da biomassa ao meio sintético. Para imobilização da biomassa foi utilizado frasco Duran com capacidade de 5L o qual continha, meio sintético (Tabela 4.1) e lodo aeróbio (20% em volume). Adicionou-se 20% de volume de lodo devido à baixa concentração de sólidos suspensos no mesmo.

O sistema foi mantido em circuito semi-fechado por 20 dias à temperatura controlada em 30°C. Foi adicionado 150 mg/L de nitrato, na forma de nitrato de sódio (206 mg/L) em ambos os reatores de leito fluidificado (RLF1 e RLF2).

O meio sintético utilizado para inoculação e alimentação dos reatores ao longo da operação foi descrito por DOLFING et al., (1990), com adição de solução de micronutrientes estabelecido por ZEYER e KEARNEY (1982). A composição das soluções encontra-se descritas nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1: Composição do Meio de Dolfig

Componentes	Quantidade – q.s.p. 1000 mL de água ultrapurificada
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
NH ₄ Cl	0,11 g
KH ₂ PO ₄	0,33 g
Na ₂ HPO ₄	1,2 g
Solução de micronutrientes	1 mL

Fonte: DOLFING et al., (1990),

Tabela 4.2: Composição da solução de micronutrientes

Componentes	Quantidade – q.s.p. 1000 mL de água ultrapurificada
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg

Fonte: ZEYER e KEARNEY (1982)

4.6. Etapas de operação dos reatores de leito fluidificado

Após o período de inoculação, o sistema foi aberto para regime de escoamento contínuo, sendo alimentado com meio sintético descrito por Dolfing et al., (1990) (Tabela 4.1) para o enriquecimento e adaptação de consórcio desnitrificante, sendo adicionado também 1 mL/L de solução de micronutrientes (Tabela 4.2) na Etapa I.

A Tabela 4.3 e 4.4 contém as condições nutricionais as quais os reatores RLF1 e RLF2 foram submetidos (concentração de DQO, concentração de LAS e concentração de nitrato).

O enriquecimento do consórcio microbiano desnitrificante (Etapa I) ocorreu durante 63 dias. A Figura 4.3 apresenta o fluxograma das etapas de operação dos reatores de leito fluidificado.

Vale ressaltar que a água residuária de lavanderia, adicionada a partir da Etapa II, foi diluída em meio sintético para que a concentração de LAS fosse, aproximadamente de 20 mg/L dos reatores RLF1 e RLF 2. Como co-substrato foi adicionado etanol (100 mg/L) durante as Etapas I, II, III e V.

Na Etapa III a concentração afluente de nitrato foi reduzida para 88 ± 10 mg/L em RLF1, e 90 ± 10 mg/L em RLF2. Durante a Etapa IV o co-substrato foi retirado e os reatores foram alimentados apenas com meio sintético contendo nitrato (132 ± 30 mg/L – RLF1 e 151 ± 36 mg/L – RLF2) e água residuária de lavanderia diluída.

Na Etapa V os reatores foram alimentados com meio sintético adicionado com etanol (100 mg/L) e água residuária de lavanderia diluída. Por fim, na Etapa VI os reatores foram alimentados apenas com água residuária de lavanderia diluída.

Cabe ressaltar que após os 436 dias de operação dos reatores, estes foram operados por mais 120 dias em condições ótimas para degradação de LAS.

Figura 4.3. Etapas de operação dos reatores de leito fluidificado RLF1 e RLF2.

Tabela 4.3. Condições operacionais e nutricionais do reator RLF1.

Etapas	Duração (dias)	RLF1 (TDH 8±0,5 h)			
		DQO (mg/L)	LAS (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	Etanol (mg/L)
Etapa I	63	625±59	-	130±45	100
Etapa II	107	617±150	18,6±4,1	132±40	100
Etapa III	70	526±36	21,3±4,2	88±10	100
Etapa IV	68	186±28	21,6±3,6	132±30	-
Etapa V	63	452±76	21,1±5,0	-	100
Etapa VI	65	242±99	22,1±4,5	-	-

Tabela 4.4. Condições operacionais e nutricionais do reator RLF2.

Etapas	Duração (dias)	RLF2 (TDH 12±0.3 h)			
		DQO (mg/L)	LAS (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	Etanol (mg/L)
Etapa I	63	650±47	-	140±50	100
Etapa II	107	700±120	19,2±5,2	159±43	100
Etapa III	70	644±54	24,6±5,1*	90±10	100
Etapa IV	68	191±31	27,1±5,6	151±36	-
Etapa V	63	454±100	22,1±5,1	-	100
Etapa VI	65	228±78	22,4±4,8	-	-

4.7. Análises físico-químicas

A caracterização físico-química da água residuária foi realizada por meio da determinação de: pH, alcalinidade demanda química de oxigênio (DQO) e metais pesados, segundo APHA (2005), ácidos orgânicos voláteis (ADORNO et al., 2014) e LAS (DUARTE et al., 2006). Nitrato, nitrito e sulfato foram realizados através de cromatografia iônica com coluna ION PAC ânion Exchange AG23.

Para acompanhamento analítico dos reatores foram retiradas amostras afluentes e efluentes seguindo os parâmetros e frequências apresentados na Tabela 4.5.

As determinações de pH, alcalinidade, DQO, ácidos e sólidos foram realizadas segundo os procedimentos de APHA (2005). A concentração do LAS foi determinada através da metodologia desenvolvida e validada por DUARTE et al. (2006). As amostras foram previamente filtradas a 0,22 µm e em seguida injetadas em HPLC, com fluxo de 0,5 mL/min tendo metanol/perclorato de sódio (70%/30%) como eluentes.

Nitrato foi determinado utilizando cromatografia iônica nas seguintes condições de uso: fluxo de 1 mL/min tendo como eluente 4,5 mM de carbonato de cálcio e 0,8 mM de bicarbonato de cálcio, com uso de coluna ION PAC ânion Exchange AG23 em temperatura controlada de 30°C.

Amostra da água residuária de lavanderia durante a caracterização, e amostras efluentes ao final da última etapa de operação dos reatores RLF1 e RLF2, foram coletadas e enviadas a Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP para quantificação de compostos oriundos da degradação do LAS, e outros compostos orgânicos xenobióticos presentes na água residuária de lavanderia.

Tabela 4.5. Análises físico-químicas

Parâmetro	Método	Frequência	Referência
LAS	Cromatográfico	2x	Duarte et al., (2006)
DQO	Espectrofotométrico	2x	APHA (2005)
pH	Potenciométrico	2x	APHA (2005)
Ácidos Orgânicos Voláteis	Cromatográfico	Quinzenalmente	Adorno et al., (2014)
Alcalinidade	Titulométrico	2x	Dillalo e Albertson (1961) modificada por Ripley et al. (1986)
Nitrato	Cromatográfico	2x	APHA (2005)
Sólidos	Gravimétrico	Mensalmente	APHA (2005)
Vazão	-	Diariamente	-

A análise da amostra foi realizada em duas etapas: análise do *headspace*, e análise por injeção direta. Na análise por *headspace* as amostras foram aquecidas à 80°C por 5 minutos, e os vapores gerados foram analisados por GC-MS. Na análise por injeção direta, houve extração dos compostos na amostra com diclorometano, sendo em seguida concentradas, e analisadas por GC-MS Shimadzu tipo quadrupolo linear.

As condições cromatográficas empregadas foram:

- ✓ Coluna HP5-MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm),
- ✓ 1mL/min (Hélio 99,999%)
- ✓ 280°C (injetor – modo split)
- ✓ Forno: 70°C (2 min), 230°C (20 min), 280°C (50 min)

Para identificação dos compostos detectados nos cromatogramas foram utilizadas as bases de dados de espectros de massa NIST11 e o programa AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution Mass and Identification System*).

4.8. Extração do LAS adsorvido no biofilme dos reatores de leito fluidificado

A quantidade de LAS adsorvida na biomassa da areia, distribuidor e na biomassa do separador de fases das Etapas ao final de operação dos reatores de leito fluidificado, RLF1 e RLF2, foi quantificada através de extração com metanol e água de acordo com os procedimentos descritos em DUARTE (2006).

A biomassa foi previamente seca à 110°C durante 24 horas, após pesagem foram submetidas à três extrações consecutivos com 50 mL de metanol, em banho de ultrassom por 30 min. A cada lavagem, o resíduo líquido final foi armazenado em frasco de vidro. A última extração foi procedida com 20 mL de água ultra-purificada.

Ao final do processo de extração, o volume aproximado de 170 mL de resíduo líquido foi evaporado à 60°C até volume final de 20 mL. Em seguida, as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm com posterior injeção em cromatógrafo para quantificação de LAS.

4.9. Ensaio Ecotoxicológico

4.9.1. Ensaio Agudo

Foram realizados ensaios agudos de toxicidade com o macroinvertebrado aquático *Chironomus xanthus* para as Etapas com adição de água de lavanderia aos reatores. Os organismos foram dispostos em contato com amostras afluentes e efluentes dos reatores de leito fluidificado e foi observada a mortalidade destes. O macroinvertebrado aquático *Chironomus xanthus* foi cultivado em meio constituído de água destilada, areia e solução alimento. Para realização dos ensaios foram utilizadas larvas do terceiro estágio. A solução alimento foi constituída de ração de peixe diluída em água destilada na proporção de 2%.

Os testes de toxicidade agudo foram realizados em frascos plástico com capacidade de 1 L. Em cada frasco foi adicionado 300 mL de amostra (afluente ou efluente), 10 larvas do *Chironomus xanthus*, e 10 mL de solução alimento.

Os frascos foram mantidos em foto-período durante 96 horas. Após este período os organismos foram contados, com auxílio de lupa, para verificar a mortalidade. O ensaio controle foi realizado utilizando água destilada, solução alimento e 10 larvas no III instar do *Chironomus xanthus*. A taxa de mortalidade foi calculada a

partir do número de organismos vivos e não vivos, sendo realizada comparação com o ensaio controle.

4.9.2. Ensaio Crônico

Na Etapa de operação dos reatores de leito fluidificado com adição apenas de água residuária de lavanderia (Etapa VI) foi realizado ensaio ecotoxicológico crônico com o *Chironomus xanthus*. Para este teste foram utilizadas larvas do primeiro estágio.

De forma similar ao ensaio agudo, 10 larvas foram expostas em contato com amostras dos afluentes e efluente dos reatores RLF1 e RLF2. Os testes de toxicidade crônica foram realizados em frascos com capacidade de 1 L. Em cada frasco foi adicionado 300 mL de amostra (afluente ou efluente), 10 larvas do *Chironomus xanthus*, e 10 mL de solução alimento (ração para peixe diluído em água), o ensaio foi conduzido durante 10 dias, e observou-se a mortalidade e desenvolvimento das larvas. Cabe ressaltar que cada frasco, após período de 96 horas, foi alimentado novamente com 5 mL de solução alimento.

4.10. Otimização da degradação de LAS

4.10.1. Delineamento do Composto Central Rotacional

A metodologia da superfície de resposta escolhida foi o delineamento do composto central rotacional (DCCR), no qual foram levados em consideração 3 fatores e 2 níveis. Os fatores foram os seguintes: nitrato, LAS e etanol, denotados como X_1 , X_2 e X_3 , respectivamente. As concentrações dos compostos foram previamente definidas, de acordo com a literatura, em 15, 25 e 35 mg/L de LAS (ANDRADE et al., 2015; BRAGA et al., 2015; DUARTE et al., 2015) e 50, 100 e 150 mg/L de nitrato e etanol (GUSMÃO et al., 2007; MAINTIGUER et al., 2013). Estes compostos foram analisados por cromatografia e os valores quantificados encontram-se listados na Tabela 4.6.

A equação empírica de segunda ordem foi utilizada para descrever a resposta (Y - remoção de LAS) de acordo com as variáveis independentes como mostra a Equação 1.

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^k \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^k \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \alpha_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação 1}$$

Sendo: Y a resposta predita; X_i e X_j são os parâmetros que influenciam a resposta Y ; k é o número de variáveis; α_0 é a constante; α_i é o coeficiente linear; α_{ii} é o coeficiente quadrático e α_{ij} é o coeficiente da interação dos parâmetros.

A superfície de resposta e análise dos parâmetros (Teste F e ANOVA) foram realizados com auxílio do programa *Statistica* 10 (StatSoftInc, 2014, USA). Análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância dos fatores (LAS, nitrato e etanol) no ajuste da equação polinomial de segunda ordem.

Tabela 4.6. Matriz do Planejamento Fatorial

Nitrato (X1)	LAS (X2)	Etanol (X3)	Nitrato (x1)	LAS (x2)	Etanol (x3)
1	1	1	150,65	32,3	150,2
1	1	-1	150,65	31,2	50,05
1	-1	1	150,65	15,6	150,2
1	-1	-1	150,65	15,6	50,05
-1	1	1	56,3	37,4	150,2
-1	1	-1	56,3	31,2	50,05
-1	-1	1	56,3	15,6	150,2
-1	-1	-1	56,3	15,6	50,05
0	0	0	100	22,5	100,13
0	0	0	100	22,5	100,13
0	0	0	100	22,5	100,13
0	0	1,68	100	22,5	185,12
0	0	-1,68	100	22,5	16,23
0	1,68	0	100	41,2	100,13
0	-1,68	0	100	9,8	100,13
1,68	0	0	184,6	22,5	100,13
-1,68	0	0	26,3	22,5	100,13

4.10.2. Ensaio cinético de degradação de LAS em reatores em batelada

Após análise estatística do planejamento fatorial, junto à obtenção dos parâmetros otimizados foi verificada a aplicação de tais parâmetros ótimos (concentração de etanol e nitrato), com a realização de ensaio cinético. Foram realizados dois ensaios cinéticos utilizando concentrações distintas de LAS oriundo de água residuária de lavanderia diluída: $27 \pm 0,5$ mgLAS/L (Ensaio I) e $60 \pm 0,4$ mgLAS/L (Ensaio II).

Os ensaios foram realizados em batelada de forma similar aos procedimentos descritos no planejamento experimental, em temperatura controlada a 30°C , suplementados com nitrato e etanol ($97,5$ mg/L e 88 mg/L), a partir das condições ótimas obtidas no *design* do composto central rotacional. Os reatores foram agrupados de acordo com a Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Descrição dos reatores em batelada utilizados na cinética de degradação de LAS

Alimentação		
Reatores	Ensaio I	Ensaio II
R₁	MM + $27 \pm 0,5$ mgLAS/L + $97,5$ mg/L de etanol + 88 mg/L NO_3^-	MM + $60 \pm 0,4$ mgLAS/L + $97,5$ mg/L de etanol + 88 mg/L NO_3^-
R₂	MM + $27 \pm 0,5$ mgLAS/L + 88 mg/L NO_3^-	MM + $60 \pm 0,4$ mgLAS/L + 88 mg/L NO_3^-
R₃	MM + $27 \pm 0,5$ mgLAS/L + $97,5$ mg/L de etanol	MM + $60 \pm 0,4$ mgLAS/L + $97,5$ mg/L de etanol
R₄	MM + $97,5$ mg/L de etanol + 88 mg/L NO_3^-	
R₅	MM + $27 \pm 0,5$ mgLAS/L	MM + $60 \pm 0,4$ mgLAS/L

*MM: meio mineral (Tabela 4.1)

Alíquotas, em período de 2 em 2 horas, foram retiradas durante o experimento e analisadas quanto à concentração de LAS e nitrato para obtenção do perfil de remoção dos mesmos, determinando-se a velocidade de degradação de LAS (K^{LAS}) e a velocidade de consumo de nitrato (K_1). As análises de Sólidos totais voláteis foram realizadas nas amostras iniciais e finais de cada reator.

Para obtenção da constante de velocidade de degradação de LAS (K^{LAS}), utilizou-se ajuste de cinética de primeira ordem modificado, a qual admite concentração residual do composto de estudo, conforme a Equação 2.

$$C = C_r + (C_0 - C_r)e^{K^{LAS} \times T} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo, C a concentração em um determinado ponto, C_r a concentração residual (equivalente a concentração final de cada reator), C_0 a concentração inicial, K^{LAS} a constante de velocidade de degradação e T o tempo.

4.11. Operação dos Reatores Contínuos em Condição Otimizada

Após a realização do DCCR, e análise estatística dos dados, os parâmetros ótimos obtidos, quanto à concentração de nitrato e de etanol foram aplicados na operação dos reatores de leito fluidificado RLF1 e RLF2.

Os reatores foram operados por 112 dias e alimentados com água residuária de lavanderia diluída, com etanol (97,5 mg/L) e nitrato (87,5 mg/L). Durante esta Etapa os reatores foram monitorados por análises de pH, DQO solúvel, e LAS.

Nesta fase, os reatores foram operados em duas etapas: Etapa VII (adição de 24,4 mgLAS/L em RLF1 e 28 mgLAS/L em RLF2) e Etapa VIII (adição de 35 mgLAS/L em RLF1 e 39 mgLAS/L em RLF2).

4.12. Caracterização da Comunidade Microbiana por Técnicas de Biologia Molecular

4.12.1. Amostragem

Amostras biológicas foram retiradas ao longo de todo o estudo para caracterização da comunidade microbiana. As principais técnicas utilizadas no presente

trabalho foram DGGE e Sequenciamento Massivo. A Figura 4.4 ilustra como ocorreu a divisão das amostras para realização das análises de biologia molecular.

Figura 4.4. Amostras retiradas para caracterização microbiana

As amostras de biomassa foram coletadas, lavadas com tampão fosfato, e centrifugadas a 4°C, sendo armazenadas a -20°C. As amostras de biofilme dos reatores foram retiradas no último dia de operação de cada etapa, respectivamente. Em seguida estas amostras foram agitadas em frascos de vidro (10 mL) com solução de isotônica (NaCl – 0,9%) para promover o desprendimento do biofilme do material suporte (areia). Após isso, as amostras foram lavadas com tampão fosfato e armazenadas a -20°C.

4.12.2. Extração do DNA genômico

O DNA genômico das amostras, dos reatores de leito fluidificado e os reatores do ensaio em batelada foram obtidos através de lise celular com *glass beads* (Sigma), fenol tamponado com tris e clorofórmio de acordo com o protocolo de GRIFFITHS et al., (2000) modificado.

4.12.3. PCR/DGGE

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com iniciadores 968FGC – 1401R para Domínio Bacteria (NUBEL et al., 1996). No presente trabalho, para confecção do DGGE foi usado gradiente desnaturante nas concentrações de 45% e 65% (100% desnaturante - 7 M ureia e 40% (v/v) de formamida deionizada) para o domínio Bacteria. As condições da corrida foram de 75V por 16 horas a temperatura constante de 60° C (MUYZER et al., 1993). Brometo de Etídeo (diluída 10.000 vezes) foi usado como solução fluorescente. O aparelho utilizado para leitura dos padrões de bandas foi Eagle Eye TM III (Stratagene) sob exposição a 254 nm UV, acoplada ao computador e software Eagle Sight.

O perfil das bandas padrões do DGGE foi usado na construção das matrizes por meio do programa Bionumerics 3.5, para servir como base para os cálculos do coeficiente de similaridade (Correlação de Pearson) e agrupamento com UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*). O cálculo do índice de diversidade (Shannon-Wiener) e dominância foram realizados com auxílio do software PAST.

4.12.4. Sequenciamento Massivo

O sequenciamento massivo foi realizado pelo Laboratório Multiusuário de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ/USP (Piracicaba – São Paulo), utilizando o sequenciado MiSeq – Illumina. O volume de DNA gênomico enviado para sequenciamento foi de 30 µL em concentração de 50 ng/µL.

O sequenciamento foi realizado para o gene 16S das regiões V3 e V4 com iniciadores 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e o 785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') gerando fragmento de aproximadamente 400 pb (KLINDWORTH et al., 2013).

Na análise de bioinformática, a filtragem dos reads de baixa qualidade, sequências de adaptadores e vetores foi realizada pelo programa Seqclean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>), utilizando como *cut off* bases com qualidade inferior a 24QScore. As bases de dados de contaminantes usadas foram a Univec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>).

Para a análise de metagenômica foi utilizada a base de dados RDP (Cole et al 2014) do Domínio Bacteria. O pipeline usado foi o do pacote QIIME v.1.9 (CAPORASO ET AL, 2010) em 3 etapas:

- 1) Concatenação dos *reads* paired-end;
- 2) Filtragem, procura e identificação de OTUs. Nessa etapa o programa também realiza uma montagem de novo dos *reads* que não tiveram hit com a base de dados e procura hit contra todas as bases disponíveis;
- 3) Análises de rarefação, alfa e beta diversidade. Para essas análises foi levada em consideração a profundidade de cobertura da amostra com menos *reads* para utilizar o parâmetro *sampling depth* de forma adequada.

As singletons (OTUs com apenas uma sequência) foram usadas na análise do índice da diversidade, mas não na análise taxonômica. A diversidade alfa (Chao1, Shannon e Dominância) foi realizada usando o Software PAST.

Para facilitar a discussão dos resultados gerados, as sequências classificadas à nível de filo, família e gênero foram calculadas em relação à abundância relativa. Devido ao grande número de gêneros identificados foram descritos aqueles mais abundantes, e os relacionados à degradação da molécula de LAS e/ou outros compostos aromáticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da água residuária de lavanderia comercial

Na Tabela 5.1 encontram-se os resultados de caracterização da água residuária de lavanderia utilizada nesse estudo.

Tabela 5.1: Parâmetros físico-químicos da caracterização da água residuária de lavanderia.

Parâmetro	Valor (mg/L)			
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
pH*	7,6	9,5	8,6	0,7
Alcalinidade Total	107,0	354,3	181,8	77,2
DQO bruta	791,7	2.192,5	1.143,5	414,5
DQO filtrada	372,0	1.374,6	722,9	337,3
LAS	34,6	107,8	70,34	22,5
Nitrato	0,0	10,1	1,9	3,3
Fosfato	0,0	15,8	1,8	4,7
Nitrito	0,0	5,5	1,0	1,8
Brometo	0,0	5,8	0,3	1,3
Cloreto	3,8	60,2	15,1	13,2
Sulfato	0,0	260,5	92,5	62,7
Sulfeto	0,0	0,282	0,088	0,075
SST	480	1390	713	386
SSV	365	950	541	241
SSF	95	440	172	150

*parâmetro físico-químico adimensional

Na água residuária de lavanderia verificou-se $70,34 \pm 22,5$ mg/L de LAS. Tais valores são elevados, em vista ao que a legislação vigente, CONAMA 430/2011, preconiza; ou seja, 0,5 mg/L de substâncias reagentes com azul de metileno. A homogeneidade dos valores de LAS, conforme análise do desvio padrão (DP) foi considerada alta.

Braga e Varesche (2014) caracterizaram água residuária de lavanderia comercial de estabelecimento de São Carlos. Os autores observaram $163 \pm 247,8$ mg/L de LAS, valor este maior em comparação ao obtido no presente trabalho.

Provavelmente, tais diferenças sejam relacionadas a quantidade de produto químico adicionada para a lavagem, e que variou de acordo com o padrão de roupa e sujeira. No estabelecimento em que se coletou a água residuária de lavanderia para a realização da lavagem é usado um mecanismo de controle para adição do surfactante. Usa-se uma proveta para dosagem o que, provavelmente, explica o baixo valor de desvio padrão encontrado.

Em relação aos valores de pH verificou-se baixa variabilidade, e de acordo com o disposto na Resolução CONAMA 430/2011, que informa faixa de pH entre 6,0 e 9,0. Dentre as 20 coletas realizadas, em 5 (pH 9,5) delas observou-se valores fora do estabelecido com a resolução.

A variação de pH ocorrida no presente trabalho foi entre 7,6 e 9,5. Braga e Varesche (2014) verificaram valores de pH entre 3,3 e 6,8 para água residuária de lavanderia. Em contraposição, Delforno (2014) observou pH entre 9,7 a 10,2. Tal fato demonstra que o pH da água residuária de lavanderia pode estar atrelado ao produto químico utilizado na lavagem das roupas.

Em relação à matéria orgânica bruta, observou-se $1.143 \pm 414,1$ mg DQO/L. O alto teor de matéria orgânica bruta, possivelmente, foi devido a sujeira das roupas submetidas ao processo de lavagem, bem como a interferência de sólidos orgânicos presentes uma vez que no processo de lavagem, material orgânico particulado se desprende junto às fibras e são quantificados como DQO. Em relação à matéria orgânica solúvel observou-se 722 ± 373 mg/L. Tal valor foi similar ao observado por Macedo et al. (2015), que avaliaram a remoção de LAS em água residuária de lavanderia comercial em reator anaeróbio de leito fluidificado.

Em relação aos valores de alcalinidade total observou-se $181 \pm 77,2$ mg/L. A alcalinidade é um parâmetro ambiental importante, pois exerce influência nos processos

biológicos e pode dar indícios do consumo ou acúmulo de ácidos orgânicos nos reatores. Assim, o conhecimento das características das águas residuárias utilizadas em cada estudo se faz importante, para que se conheçam fatores intrínsecos a cada efluente.

Sulfeto foi observado em 90% das amostras coletadas, cujos valores mínimo, máximo e médio foram de 0,025 mg/L, 0,282 mg/L e $0,088 \pm 0,075$ mg/L, respectivamente. Braga e Varesche (2014) observaram $0,17 \pm 0,14$ mg/L para sulfeto em estudo de caracterização de água residuária de lavanderia. Os valores observados para sulfeto nesta pesquisa diferem dos autores mencionados, sendo ligeiramente inferior, o que corrobora sobre as diferenças existentes entre os processos de lavagens e produtos utilizados.

Em relação ao sulfato foram detectados valores mínimo e máximo entre 6,7 e 260,5 mg/L, respectivamente, com média de $92,5 \pm 62,7$ mg/L.

Em relação a nitrato, não se observou este íon em 70% das amostras coletadas. Para o restante das amostras observou-se valores entre 4,3 e 10,1 mg/L. Em contraposição Braga e Varesche (2014) observaram valores compreendidos entre 1,1 e 25,7 mg/L, e em todas as coletas os autores observaram a presença de nitrato. Semelhante ao observado para nitrato, em 70% das amostras não foi detectado nitrito. Para o restante das amostras, observou-se valores entre 2,0 e 5,5 mg/L.

Em 85% das amostras coletadas (17 amostras de 20 coletas) não foi observado fosfato. Atualmente, há uma rigorosa fiscalização quanto à presença de fosfato em detergentes, na qual há proibição de fósforo na composição destes produtos químicos, devido aos problemas ambientais que podem acarretar, principalmente relacionados à eutrofização. Os valores observados ao longo de toda a caracterização foram de 7,6 mg/L, 15,2 mg/L e 15,8 mg/L.

Diferentemente dos valores observados para caracterização da água residuária desta pesquisa, Macedo (2013) observou fosfato entre 81 e 402 mg/L. Adicionalmente, Braga e Varesche (2014) observaram valores entre 9,8 e 279 mg/L de fosfato na água residuária de lavanderia, tendo ambos os trabalhos citados, valores elevados de fosfato.

Valores entre 0,1 mg/L e 5,8 mg/L foram observadas para brometo durante a caracterização, enquanto para cloreto observou-se valores entre 3,8 e 60,2 mg/L, e média de $15,1 \pm 13,2$ mg/L.

Em relação aos sólidos suspensos totais observou-se entre 480 mg/L e 1.390 mg/L, enquanto, para sólidos suspensos voláteis observou-se entre 365 mg/L e 950

mg/L, e média de 541 ± 241 mg/L. Grande parte dos sólidos na forma suspensa são compostos de fibras e restos de tecidos das roupas, sendo uma parcela não biodegradável.

Ampla variedade de ácidos orgânicos voláteis (Tabela 5.2) foi observada em 95% das coletas realizadas, sendo observado principalmente ácido láctico, prevalente, na maioria das amostras.

Tabela 5.2: Composição de Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV) nas amostras da água residuária de lavanderia.

Ácido orgânico	Concentração média (mg/L)
Cítrico	$0,9 \pm 1,8$
Málico	$1,4 \pm 2,4$
Succínico	$0,2 \pm 0,5$
Lático	$29,9 \pm 48,3$
Fórmico	$9,5 \pm 36,9$
Acético	$7,6 \pm 17,9$
Propiônico	$1,9 \pm 3,8$
Isobutírico	$0,4 \pm 1,9$
Butírico	$0,1 \pm 0,5$
Isovalérico	$0,1 \pm 0,5$
Valérico	$3,4 \pm 6,5$
Capróico	$7,4 \pm 5,8$

Observou-se ácido láctico entre 2,3 mg/L e 181,7 mg/L, e média de $29,9 \pm 48,3$ mg/L. Similarmente, Braga e Varesche (2014) observaram maiores valores de ácido láctico (92 ± 103 mg/L) em relação aos outros ácidos orgânicos. Ácido acético e ácido fórmico foram observados, respectivamente, em $7,6 \pm 17,9$ mg/L e $9,5 \pm 36,9$ mg/L. Dentre os álcoois analisados observou-se principalmente metanol (150 ± 25 mg/L).

Nesta pesquisa, os metais (Tabela 5.3) mais abundantes observados foram ferro e zinco, com valores respectivos de $1,149 \pm 1,83$ mg/L e $0,452 \pm 0,47$ mg/L. De acordo com Aonghusa e Gray (2002), a concentração de metais pesados em efluentes domésticos brutos tende a ser baixa, entretanto, tais metais podem estar adsorvidos em material sólido.

Embora, o chumbo tenha sido detectado em 40% das amostras coletadas a média, para efeito comparativo, foi de $0,094 \pm 0,040$ mg/L.

Tabela 5.3: Valores de metais da água residuária de lavanderia.

Metal	Média (mg/L)	Mínimo (mg/L)	Máximo (mg/L)
Zn	0,452±0,47	0,0592	1,842
Pb	0,094±0,04	< 0,01	0,16
Cd	0,020±0,01	< 0,0006	0,041
Ni	0,098±0,05	< 0,008	0,188
Fe	1,149±1,83	0,103	8,257
Mn	0,047±0,09	0,003	0,392
Cu	0,040±0,03	< 0,003	0,155
Cr	0,087±0,05	< 0,005	0,144

A importância de detecção de metais pesados se faz porque estes podem interferir nas reações bioquímicas de degradação durante os processos biológicos, mediado pela concentração destes, como exemplo, tem-se o zinco que pode ter ação bacteriostática e bactericida, entretanto, tal metal foi observado em concentrações abaixo das reportadas inibitórias (MUDHOO e KUMAR, 2013).

Observou-se para a água residuária de lavanderia, por meio de GC-EM uma variedade de compostos orgânicos xenobióticos (Tabela 5.4 e Tabela 5.5).

Tabela 5.4: Compostos xenobióticos da água residuária de lavanderia por *headspace*

Composto	%A	Qualidade^I
Dimetil Silanodiol	19,78	72
Etil Benzeno	3,96	AMDIS
Canfeno	10,73	94
Dimetil Octanol	6,74	AMDIS
Decanal	4,67	AMDIS
Ftalato de Butila	15,92	78
Ftalato de Octila	38,15	74

%A = Porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra.

^IQualidade é o índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massa obtido com os registros em bibliotecas. Foram adotados índices de qualidade maior que 70.

Os compostos descritos na Tabela 5.4 compreendem plastificantes (ftalato de butila, ftalato de octila) aromatizantes (canfeno, decanal) e produtos utilizados na fabricação de surfactantes (Dimetil Silanodiol e Dimetil Octanol).

Tabela 5.5: Compostos xenobióticos da água residuária de lavanderia por injeção direta.

Composto	%A	Qualidade
Dodecametil Cicloexassiloxano	1,58	AMDIS
Ciclotetradecano	2,8	70
Tetradecametil Cicloheptassiloxano	2,15	90
Ácido Dodecanóico	51,41	98
Hexadecametil Ciclooctassiloxano	2,4	AMDIS
Ácido Tetraecanóico	8,31	98
Octadecametil Ciclononassiloxano	1,52	AMDIS
Ftalato de Isobutila	10,86	AMDIS
Ácido hexadecanóico	9,82	98
Ftalato de Butila	3,56	AMDIS
Oxibenzona	2,97	95
Ftalato de Pentila	1,38	AMDIS

%A = Porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra.

¹Qualidade é o índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massa obtido com os registros em bibliotecas. Foram adotados índices de qualidade maior que 70.

A Tabela 5.5 agrupa componentes silanóis utilizados em sua maioria na fabricação de produtos de higiene pessoal (Dodecametil Cicloexassiloxano, Tetradecametil Cicloheptassiloxano, Hexadecametil Ciclooctassiloxano, Octadecametil Ciclononassiloxano). Ftalato de Butila e Ftalato de Pentila são utilizados como amaciantes. O ácido dodecanóico é utilizado na fabricação de surfactante.

Braga e Varesche (2014) encontraram compostos semelhantes aos citados anteriormente, entretanto a composição dos compostos orgânicos xenobióticos é bastante diversificada em virtude da riqueza de componentes que são utilizados na

fabricação de surfactantes, sabões e outros produtos de limpeza empregados nas lavanderias comerciais.

5.2. Avaliação do potencial desnitrificante do inóculo na presença de surfactante

Para verificar o potencial de degradação de LAS de água de lavanderia em condição anóxica por inóculo de lodos ativados, as seguintes condições foram avaliadas em reatores em batelada: Reator Controle (RC), Reator com LAS Padrão (RLP) e Reator com Água Residuária de Lavanderia (RAL). Verificou-se nos ensaios com adição de 25 mg/L e 150 mg/L de nitrato, completo consumo em todos os reatores em 48 horas de operação, ou seja, 99,9% de remoção de nitrato em todos os reatores para as duas concentrações de nitrato propostas – 25 mg/L e 150 mg/L.

Observou-se remoção de 66% e 57% de LAS (Figura 5.1) na adição de 25 mg/L de nitrato para os reatores RLP - I e RAL - I com 18,6 mgLAS/L e 18,2 mgLAS/L, respectivamente. Durante as 2 horas iniciais de operação observou-se redução acentuada da concentração de LAS, em ambos os reatores, provavelmente devido a adsorção inicial do surfactante na biomassa.

Figura 5.1. Remoção de LAS no ensaio de degradação sob condição desnitrificante. RLP – I (18,6 mgLAS/L+25 mgNO₃⁻/L), RAL – I (18,2 mgLAS/L+25 mgNO₃⁻/L); RLP – II (20,5 mgLAS/L+150 mgNO₃⁻/L), RAL – II (21 mgLAS/L+ 150mgNO₃⁻/L).

Nos reatores com 150 mg/L de nitrato, verificou-se remoção de 74% de LAS (20,6 mg/L) para o reator RLP – II, e de 79% para o reator RAL – II (21 mg/L). Semelhante ao observado para variação temporal de LAS nos reatores com 25 mg/L de nitrato, verificou-se redução rápida na concentração de LAS durante as 2 horas iniciais, cujos valores observados foram de 6 mg/L e 4,2 mg/L para os reatores RLP – II e RAL – II, respectivamente. Possivelmente, esse fato foi devido a adsorção inicial do LAS a biomassa, com posterior degradação biológica, conforme reportado por GARCIA et al., (2005).

Duarte et al., (2010) avaliaram a remoção de LAS (15 mg/L) em reator operado em bateladas sequenciais na presença e ausência de co-substrato (extrato de levedura). Os autores obtiveram na ausência do co-substrato maior remoção de LAS (53,3%). Os autores verificaram na presença do extrato de levedura, 24% de remoção de LAS. Provavelmente, ocorreu uso preferencial do composto orgânico biodegradável em detrimento ao tóxico.

Em contraposição, verificou-se neste trabalho, que em ambos os ensaios em batelada com nitrato, ocorreu remoção do surfactante mesmo na presença de etanol (co-substrato) na condição com LAS padrão (reator RLP), com percentuais de remoção maiores aos encontrados pelos autores supracitados.

Ao final do ensaio nos reatores com 25 mg/L de nitrato verificou-se adsorção de 8 mg de LAS na biomassa dos reatores RLP – I, obtendo-se assim 23% de degradação do surfactante. Para os reatores RAL – I verificou-se 5,6 mg de LAS adsorvido e 26% de degradação. Por outro lado, na adição de 150 mg/L de nitrato, observou-se adsorção de 0,39 mg para os reatores RAL – II, por conseguinte, remoção de 77%; e ausência de adsorção do surfactante na biomassa dos reatores RLP – II.

Em relação à matéria orgânica, (DQO), verificou-se consumo em ambas as condições, com 25 mg/L (Ensaio I) e 150 mg/L de nitrato (Ensaio II). Foram observados percentuais de remoção de 76,3% para o reator RC – I, 91,2% para o reator RLP – I e 83% para o reator RAL – I, quando da adição de 25 mg/L de nitrato. Sob tais condições os valores de DQO foram respectivamente de 287 mg/L, 304 mg/L e 292 mg/L. Quando da adição de 150 mg/L de nitrato foram observados percentuais de remoção de DQO de 72%, 82%, 87% para os reatores RC – II, RLP – II e RAL – II, respectivamente.

Cabe ressaltar que o etanol foi adicionado aos reatores controle e RLP como co-substrato metabólico para utilização pelos micro-organismos, e aparentemente, essa adição não interferiu na remoção do LAS.

Alterações na comunidade microbiana foram observadas em 48 horas de operação para biomassa dos reatores em batelada em condição desnitrificante, por meio da análise do perfil de bandas do DGGE (Figura 5.2).

Figura 5.2: Análise dos coeficientes de similaridade (correlação de Pearson) para o perfil de bandas de DGGE relacionadas ao domínio Bacteria. I – Inóculo; RC – I (25 mgNO₃⁻/L); RLP – I (25 mgNO₃⁻/L); RAL – I (25 mgNO₃⁻/L); RC – II (150 mgNO₃⁻/L); RLP – II (150 mgNO₃⁻/L) e RAL – II (150 mgNO₃⁻/L).

Verificou-se mudanças na comunidade microbiana influenciada pela concentração de nitrato (25 e 150 mg/L). Embora, o tempo de operação tenha sido reduzido, pode-se notar alterações na estrutura da comunidade microbiana, provavelmente devido principalmente a composição química da água residuária de lavanderia, em relação as demais condições.

Comparando-se o inóculo com os reatores RC – I, RLP – I e RAL– I, observou-se perfis semelhantes e coeficiente de similaridade de 81%, inferindo-se que populações bacterianas do inóculo permaneceram nas condições cujos reatores foram submetidos, ou seja, adição de etanol e nitrato em RC– I, e adição de nitrato, etanol e LAS em RLP– I e RAL– I. Desta forma, para concentração de nitrato adicionada (25 mg/L) não foi observado modificação acentuada nas populações microbianas se comparadas ao inóculo. Por outro lado, ao comparar-se os perfis obtidos para RLP– I e RAL– I, reatores que receberam 18,6 mgLAS/L e 18,2 mgLAS/L respectivamente, observou-se similaridade de 94%, inferindo-se que na presença do LAS, para condição de adição de 25 mg/L de nitrato, as populações bacterianas foram semelhantes.

Ao se comparar os perfis obtidos para os reatores RLP – II e RAL – II, observou-se similaridade de 92%, inferindo elevada semelhança entre as populações microbianas de ambos os reatores. Vale ressaltar que a estes foi adicionado nitrato na (150 mg/L), o que provavelmente, possibilitou a similaridade verificada entre as populações bacterianas destes reatores, que receberam adição de LAS de 20,5 mg/L e 21 mg/L.

Por fim, ao comparar-se as populações bacterianas dos reatores RLP– I, RAL– I com os reatores RLP– II e RAL– II, verificou-se que a similaridade entre as populações microbianas foi de 59%, inferindo-se alterações na comunidade microbiana em função da adição de maior concentração de nitrato. Ressalta-se que no ensaio I e II foram adicionados 25 mg/L e 150 mg/L de nitrato, respectivamente. Assim, a adição de nitrato nos reatores, possibilitou alterações na comunidade microbiana em função da sua concentração, uma vez que a concentração de surfactante nos reatores RLP e RAL para os ensaios I e II foram deveras semelhantes.

5.3. Otimização das Condições de Degradação de LAS

5.3.1. Planejamento Fatorial

Nos ensaios em reatores em batelada do design de composto central rotacional (DCCR) foram verificadas remoções entre 2% a 99,9% de LAS (Tabela 5.6) e de 90 a 99,9% de nitrato.

Maiores remoções de LAS (99,9%) e de nitrato (99,9%) foram verificadas para as condições dos pontos centrais; ou seja, com 100 mg/L de etanol, 100 mg/L de nitrato e 22,5 mg/L de surfactante. Na condição experimental com 31,2 mg/L de LAS, 56,3 mg/L de nitrato e 50,0 mg/L de etanol verificou-se 95,2% de remoção de LAS e 99% de nitrato. Para as condições com menor concentração de nitrato (26,3 mg/L), 100,13 mg/L de etanol e 22,5 mg/L de LAS, verificou-se apenas 2% de remoção do surfactante. Nesta condição foi observada remoção de 99% para nitrato e 99,9% de remoção de etanol. Provavelmente, sob tais condições as populações desnitrificantes devido a reduzida concentração de nitrato realizaram a respiração anóxica somente com etanol.

Tabela 5.6. Remoção de LAS no planejamento Experimental

Nitrato (X1)	LAS (X2)	Etanol (X3)	Nitrato (x1)	LAS (x2)	Etanol (x3)	Remoção de LAS (%)
1	1	1	150,65	32,3	150,2	53,5
1	1	-1	150,65	31,2	50,05	99,9
1	-1	1	150,65	15,6	150,2	45,9
1	-1	-1	150,65	15,6	50,05	52,0
-1	1	1	56,3	37,4	150,2	67,5
-1	1	-1	56,3	31,2	50,05	95,2
-1	-1	1	56,3	15,6	150,2	78,2
-1	-1	-1	56,3	15,6	50,05	96,2
0	0	0	100	22,5	100,13	95,3
0	0	0	100	22,5	100,13	99,9
0	0	0	100	22,5	100,13	99,9
0	0	1,68	100	22,5	185,12	45,3
0	0	-1,68	100	22,5	16,23	99,9
0	1,68	0	100	41,2	100,13	96,9
0	-1,68	0	100	9,8	100,13	95,8
1,68	0	0	184,6	22,5	100,13	80,0
-1,68	0	0	26,3	22,5	100,13	2,0

As remoções de LAS (22,5 mg/L) e nitrato (100 mg/L), para a menor concentração de etanol (16,23 mg/L) foram de 99%, respectivamente. Neste caso, provavelmente, a menor concentração de etanol não interferiu significativamente na remoção de nitrato. Provavelmente, as bactérias desnitrificantes utilizaram outros doadores de elétrons biodegradáveis e recalcitrantes da água residuária de lavanderia na respiração anóxica. Entretanto, a remoção de LAS foi prejudicada em menor concentração do co-substrato (etanol).

Nitrato foi removido eficientemente em todos os ensaios (90% - 99,9%). Foram observados altos percentuais de remoção de nitrato na presença de diferentes

concentrações de LAS, concluindo-se que a presença do surfactante não interferiu na desnitrificação. Desta forma, pode-se inferir que as condições experimentais com nitrato favoreceram a manutenção das populações desnitrificantes provenientes de inóculo de sistema de lodos ativados e capazes de degradação do LAS.

Elsgaard (2013) observou em ensaios em batelada, a habilidade da comunidade microbiana submetida à condição desnitrificante em tolerar altas concentrações de LAS (105 mg/L), e a não interferência do surfactante na velocidade de redução do nitrato. De forma similar ao autor citado, observou-se nesse trabalho que para as diferentes concentrações de LAS (9,8 mg/L – 41,2 mg/L) usadas no design do composto central rotacional obteve-se altas remoções de nitrato, implicando assim a não interferência do surfactante na desnitrificação. Destaca-se também que o etanol favoreceu sobremaneira a desnitrificação como observado por Santos et al., (2004) utilizando reatores em batelada com lodo granulado; Gusmão et al., (2007) utilizando reatores de leito fixo com biomassa desnitrificante; e Maintinguer et al., (2013) utilizando reatores em batelada com inóculo de lodos ativados.

Santos et al. (2004) relataram que o etanol foi o melhor doador de elétrons na desnitrificação. Estes autores realizaram ensaios em batelada para verificar a cinética de desnitrificação utilizando diferentes doadores de elétrons (etanol, metanol, metano) e observaram que na presença de 38,3 mg/L de etanol favoreceu a remoção em 99,9% de nitrato (100 mg/L) em 1 hora.

Cabe ressaltar que durante a realização do ensaio do design de composto central rotacional observou-se maior remoção de LAS para concentrações crescentes de nitrato no meio, inferindo-se que a concentração de nitrato influenciou diretamente na remoção do surfactante. Verificou-se na realização dos ensaios de planejamento experimental maior remoção de LAS de 95,2% (31,2 mgLAS/L) a 99,9% (22,5 mgLAS/L) nos reatores cuja concentração de nitrato foi de 56,3 mg/L e 100 mg/L, respectivamente. Entretanto, observou-se para a condição com 184,6 mg/L de nitrato que a remoção de LAS (22,5 mg/L) não foi superior a 80%. Desse modo, pode-se inferir que valores maiores que 100 mg/L de nitrato não foram favoráveis para melhor remoção de LAS. Diferentemente desse trabalho, Abboud et al., (2007) avaliaram diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de amônio, cloreto de amônio, triptona, peptona) na remoção de LAS comercial (Sigma Aldrich) por co-cultura de *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pantoea agglomerans*. Os autores verificaram aumento da remoção de LAS padrão (200 mg/L)

de, 60% para 90%, quando houve adição de 2 g/L de nitrato de amônio aos reatores. Provavelmente, em função da origem do surfactante, (LAS comercial ou oriundo de água de lavanderia), os valores de nitrato tenham diferido em relação ao trabalho de Abboud et al. (2007), sendo obtido menor valor para nitrato nesta pesquisa.

Duarte et al., (2015) também verificaram maior concentração de nitrato na remoção de LAS em reator operado em bateladas sequenciais em condição desnitrificante com biomassa oriunda de sedimento de rio (Rio Tietê – São Paulo). Os autores verificaram remoção de 68% de LAS (15 mg/L) na presença de 200 mg/L de nitrato. O LAS padrão utilizado no trabalho dos autores foi de mistura comercial de homólogos de C₁₀-C₁₃ (Sigma Aldrich). Destaca-se que os autores adicionaram na alimentação do reator 500 mg/L de extrato de levedura, 80 mg/L de sacarose, 400 mg/L de bicarbonato de sódio e 230 mg/L de amido. Provavelmente, as origens distintas das biomassas usadas como inóculo, além do LAS padrão e proveniente da água residuária de lavanderia, foram fundamentais para obtenção de distintos valores de remoção de LAS e desnitrificação, no caso específico desse trabalho, com adição de etanol.

Em relação ao co-substrato (etanol) observou-se para as condições experimentais com maior concentração desse álcool menor percentual de remoção de LAS. Quando se adicionou 185,12 mg/L de etanol verificou-se remoção de 45,3% de LAS (22,5 mg/L) e 99% de nitrato (100 mg/L). Na condição com 100 mg/L de etanol verificou-se remoção de LAS (22,5 mg/L) entre 80% e 99,9% para os reatores com 184,6mg/L e 100 mg/L de nitrato. Em relação ao nitrato obteve-se remoção de, 85% e 99,9%, respectivamente. Na condição com menor concentração de etanol (16,23 mg/L) verificou-se remoção de 99,9% de LAS (22,5 mg/L) e 99% de remoção de nitrato (100 mg/L). A adição de álcool de cadeia curta (etanol) possibilitou aumento na remoção de LAS a medida que se aumentou a concentração do etanol de 16,23 mg/L para 100 mg/L. Para maior concentração de etanol (185,12mg/L) verificou-se redução da remoção (45,3%) de LAS (22,5 mg/L), provavelmente, inibindo algumas populações de bactérias responsáveis pela degradação dos compostos recalcitrantes, todavia, mantendo-se favorável o predomínio das populações desnitrificantes, uma vez que em todas as condições se obteve elevada remoção de nitrato.

Macedo et al., (2015) observaram a importância do etanol na manutenção de populações microbianas capazes de remover LAS em reator de leito fluidificado. Estes autores verificaram a influência da suplementação de fonte de carbono (sacarose e

etanol) na remoção de surfactante, e verificaram que na presença simultânea dos co-substratos, a remoção de LAS (18,2 mg/L) foi de 52%, enquanto que na presença somente de etanol (76 mg/L) houve aumento da remoção para 73%. Os autores observaram também que houve modificação da comunidade microbiana em resposta à mudança do co-substrato, e reafirmaram a importância do etanol no favorecimento de populações de bactérias degradadoras de LAS.

De forma similar, para os ensaios do DCCR observou-se nos reatores com adição de 100 mg/L de etanol elevada remoção de LAS (80% - 99,9%). Todavia, quando se adicionou 185 mg/L de etanol aos reatores, a remoção diminuiu para 45%. Provavelmente, o excesso de co-substrato tenha ocasionado desvio das rotas metabólicas de degradação do recalcitrante (SINGH, 2006).

Pode-se inferir que a adição de nitrato, concomitante ao etanol favoreceram as bactérias desnitrificantes (MAINTIGUER et al., 2013; SANTOS et al., 2004), as quais são relatadas na literatura como hábeis na remoção de compostos tóxicos (ELSGAARD, 2010; DE WEERT et al., 2011; WANG et al., 2012; LU et al., 2014, DORER et al., 2016). GUSMÃO et al., (2007) relataram alta eficiência de remoção de compostos BTEX com etanol como co-substrato em reator horizontal de leito fixo em condição desnitrificante.

Conforme análise estatística do planejamento experimental foram verificados os níveis ótimos para os fatores (nitrato e etanol) e seus efeitos na remoção de LAS. Aplicando-se a regressão linear múltipla nos dados experimentais do delineamento obteve-se a equação ajustada completa (Equação 3) referente a remoção de LAS:

$$Y = 97,8 + 3,59x_1 + 3,62x_2 - 13,66x_3 - 19,14(x_1)^2 - 0,46(x_2)^2 - 7,93(x_3)^2 + 7,95x_1.x_2 - 1,32x_1.x_3 - 6,7x_2.x_3.$$

Equação 3

Sendo, Y o valor da variável dependente (remoção de LAS), x_1 a concentração de nitrato, x_2 a concentração de LAS, e x_3 a concentração de etanol.

Os coeficientes de regressão foram obtidos através dos dados do planejamento fatorial e estão dispostos na Tabela 5.7. A análise de variância dos dados é exibida na Tabela 5.8.

Com exceção das variáveis lineares de concentração de nitrato e concentração de LAS, os outros parâmetros foram significativos. A significância estatística da equação

de predição foi analisada usando o teste F e ANOVA. O valor F calculado foi maior do que F tabelado, indicando que o modelo predito apresenta significância estatística para remoção de LAS. As variáveis X1 (nitrato) e X3 (etanol) foram consideradas significativas para a resposta (remoção de LAS).

Tabela 5.7. Coeficientes de Regressão para Remoção de LAS.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor (Prob>F)
Média	97,7754	1,896010	51,5690	0,000376*
x1 (L)	3,5940	0,890903	4,0342	0,056307
x1 (Q)	-19,1448	0,981488	-19,5059	0,002618*
x2 (L)	3,6239	0,890903	4,0677	0,055457
x2 (Q)	0,4662	0,981488	0,4750	0,681633
x3 (L)	-13,6679	0,890903	-15,3416	0,004222*
x3 (Q)	-7,9309	0,981488	-8,0805	0,014972*
x1x2	7,9500	1,163508	6,8328	0,020755*
x1x3	-1,3250	1,163508	-1,1388	0,372814
x2x3	-6,7250	1,163508	-5,7799	0,028653*

$R^2 = 0,6778$, $p < 0,05$, Erro puro = 10,83, *Efeito significativo a 95% de confiança

Tabela 5.8. Análise de Variância para remoção de LAS.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcalc	Ftab
Regressão	8794,06	5	1758,81	4,36	3,26
Resíduos	4436,6	11	403,33		
Falta de Ajuste	4414,94	9	490,55		
Erro Puro	21,66	2	10,83		
Total	13230,66	16			

A Figura 5.3 mostra a superfície de resposta correspondente a regressão linear da equação 3. Os valores ótimos observados foram de 97,5 mg/L para etanol e 88 mg/L para nitrato, predizendo 94,7% de remoção de LAS (10 ± 4 mg/L) conforme a Equação 3.

Figura 5.3: Superfície de resposta para remoção de LAS em função da concentração de etanol e nitrato.

A fim de confirmar as condições ótimas previstas pelo modelo foram realizados ensaios de validação em batelada. Para tanto, utilizou-se 12,6 mg de LAS/L, 97 mg/L de etanol e 88 mg/L de nitrato. Sob tais condições obteve-se 90% de remoção de LAS, e verificou-se boa correlação entre o valor predito (94%) e obtido da resposta (90%).

Boas correlações entre os valores preditos e observados, também foram observadas por Pati e Jena (2015). Estes autores estudaram a degradação de fenol por *Bacillus pumilus* OS1 em reatores batelada, e investigaram fatores na degradação de fenol através de delineamento composto central; e observaram que o pH (7), a concentração de sulfato de amônio (392,1 mg/L), a quantidade de inóculo (6,3% v/v) e temperatura (29°C) influenciaram expressivamente na remoção de fenol, havendo

variação entre 25% e 98% de remoção do composto. Os autores verificaram que a interação entre a quantidade de inóculo e concentração de sulfato de amônio influenciaram significativamente na degradação do fenol. A remoção do composto aromático aumentou quando se elevou a concentração da fonte de nitrogênio até 390 mg/L, provavelmente devido ao maior crescimento celular. Na validação do experimento, verificaram remoção de 98,87% de fenol (227,4 mg/L) ao utilizarem 6,3% de inóculo e 392,1 mg/L de sulfato de amônio, sendo este percentual de remoção coerente ao predito segundo o modelo dos autores (99,9%).

Semelhantemente aos autores supracitados, na validação do ensaio de degradação de LAS (12,6 mg/L) verificou-se elevada remoção de surfactante (90%) corroborando o percentual predito segundo o ajuste da equação polinomial (94%) para concentração de surfactante de 10,4 mg/L. Adicionalmente, observou-se também maior remoção de LAS com o aumento da concentração de nitrato até 100 mg/L, fato similar ao observado por Pati e Jena (2015), quando aumentaram a concentração de sulfato de amônio para obtenção de maior remoção de fenol.

5.3.2. Ensaio cinético de degradação de LAS em reatores em batelada

Os dados obtidos nos ensaios de remoção de LAS foram ajustados por meio de cinética de primeira ordem considerando a concentração residual de LAS na qual a velocidade de reação foi zero (Tabela 5.9). Os perfis de decaimento na concentração de surfactante nos ensaios, encontram-se nas Figuras 1 (Ensaio I) e Figura 2 (Ensaio II) em anexo.

Foram observadas remoções de LAS de 93%, 91%, 91% e 88% para os reatores R₁ (LAS + 88 mgNO₃⁻/L + 97,5 mg de etanol/L), R₂ (LAS + 88 mgNO₃⁻/L), R₃ (LAS + 97,5 mg/L de etanol) e R₅ (Somente LAS), respectivamente, quando se adicionou 27±0,5 mg LAS/L (Ensaio I). No reator R₄ (controle com 88 mgNO₃⁻/L e 97,5 mg/L de etanol) não houve adição de LAS. Verificou-se maior constante de velocidade de degradação específica de LAS (K^{LAS}) (Tabela 5.9) para as condições nutricionais dos reatores R₁ (0,054 h⁻¹) e R₂ (0,052 h⁻¹). Ambos os reatores continham nitrato como componente em comum, endossando, assim que a presença do receptor de elétrons favoreceu maior degradação do surfactante, fato este observado durante a realização do planejamento experimental.

Tabela 5.9. Constante de velocidade de degradação específica (K^{LAS}) expressa em h^{-1} dos reatores em batelada dos ensaios I e II

Reatores	27±0,5 mg LAS/L			60±4 mg LAS/L		
	K^{LAS}	R^2	Cr* (mg/L)	K^{LAS}	R^2	Cr* (mg/L)
R_1 (etanol/ nitrato/LAS)	0,054	0,9310	1,87	0,011	0,9963	9,7
R_2 (nitrato/LAS)	0,052	0,9244	2,30	0,011	0,9381	16,0
R_3 (etanol/LAS)	0,038	0,9265	2,30	0,008	0,9723	12,0
R_5 (LAS)	0,038	0,9283	3,18	0,010	0,9199	16,0

*Cr: concentração residual de LAS em cada reator.

Vale ressaltar que para as condições nutricionais dos reatores em batelada do DCCR com concentração baixa de nitrato (26,3 mg/L – 56,3 mg/L) não se observou remoção expressiva de LAS. Desta forma, ratifica-se que a adição do nitrato aos reatores R_1 e R_2 , do ensaio cinético I, favoreceu maior K^{LAS} implicando em maior remoção de LAS.

Provavelmente, a presença de nitrato favoreceu as populações de bactérias desnitrificantes, e, conseqüentemente, maior remoção do poluente. Duarte et al., (2015) verificaram para reator operado em bateladas sequenciais remoção de LAS comercial, mistura de homólogos C_{10} - C_{13} , com inóculo de sedimento de rio. Os autores adicionaram 200 mg/L de nitrato. Sob tais condições verificaram aumento de bactérias desnitrificantes de $7,6 \cdot 10^6$ NMP/gSTV (alimentação com 180 mg/L de nitrato e sem LAS) para $2,2 \cdot 10^{13}$ NMP/gSTV (alimentação com 200 mg/L de nitrato e 15,1 mg/L de LAS). Contudo, os autores verificaram que ao reduzirem a concentração do co-substrato (80 mg/L para 40 mg/L de sacarose), houve redução do percentual de remoção de LAS (68% para 59%), e do número de bactérias desnitrificantes (de $2,2 \cdot 10^{13}$ NMP/gSTV para $1,1 \cdot 10^8$ NMP/gSTV).

De forma comparativa, obteve-se maior remoção de LAS (93%), no ensaio cinético I, para o reator R_1 , na presença de etanol (97,5mg/L) e nitrato (88 mg/L), enquanto na presença apenas de nitrato, reator R_2 , a remoção foi ligeiramente menor; ou seja, de 91%, e K^{LAS} foi ligeiramente menor (0,052 h^{-1}). Destaca-se que nas condições

experimentais do R₂, tinha-se além do LAS e nitrato, ácido láctico (30±48 mg/L), ácido fórmico (19,5±5 mg/L) e ácido acético (8,4±10,3 mg/L). Desta forma, ratifica-se que a presença do etanol foi importante para remoção de LAS, quando adicionados em concentração adequada às necessidades nutricionais dos micro-organismos desnitrificantes. Provavelmente, os demais compostos orgânicos da água residuária de lavanderia não foram usados preferencialmente pelas bactérias desnitrificantes.

Verificou-se para o reator R₃ (27±0,5 mgLAS/L + 97,5 mg/L de etanol) menor K^{LAS} (0,038) se comparado ao reator R₁ (27±0,5 mgLAS/L + 88 mgNO₃⁻/L + 97,5 mg/L de etanol) cujos valores obtidos foram de 0,038 h⁻¹ e 0,054 h⁻¹, respectivamente. Todavia, houve 91% de remoção de surfactante após 96 horas para a condição do R₃. Apesar da presença do etanol ser algo em comum para as condições do R₁ e R₃, verificou-se para as condições experimentais do reator R₃ valor de K^{LAS} 1,5 vezes menor. Provavelmente, a ausência de nitrato desfavoreceu as populações de bactérias desnitrificantes, por conseguinte ocasionou redução da velocidade de degradação do surfactante no reator R₃. Pode-se inferir que outras populações de bactérias provenientes da biomassa de lodos ativados usaram o LAS e etanol como doadores de elétrons para a respiração. Destaca-se também que na água residuária de lavanderia tinha-se baixa concentração de nitrato (3,5±0,5 mg/L de nitrato) não favorecendo a desnitrificação na condição nutricional do R₃.

Verificou-se para o reator R₅ (27±0,5 mg LAS/L), menor valor de K^{LAS} se comparado ao reator R₁ (27±0,5 mgLAS/L + 88 mgNO₃⁻/L + 97,5 mg/L de etanol). Entretanto, verificou-se para este reator considerável remoção de LAS (88%) ao final do experimento (96 horas). Sob tais condições, provavelmente, outras populações de bactérias foram responsáveis pela degradação do LAS, todavia, obtendo-se para tais condições K^{LAS} inferior ao ensaio com nitrato e etanol. Destaca-se que na biomassa de sistemas de lodos ativados têm-se predominantemente populações de bactérias desnitrificantes, nitrificantes e heterotróficas aeróbias; sendo as primeiras mais aptas a degradação de compostos tóxicos e recalcitrantes, como o LAS.

Shen et al., (2015) realizaram ensaio em batelada sob condição desnitrificante para remoção de piridina (500 mg/L). Os autores verificaram que houve aumento na velocidade de degradação da piridina quando se aumentou a concentração de nitrato para até 389 mg/L. Para esta condição a velocidade de degradação foi de 1,09.10⁻³ g

piridina/g STV.h, sem a adição de co-substrato, com a finalidade de favorecer a utilização da piridina como doador de elétrons.

De forma semelhante a pesquisa de Shen et al., (2015), no reator R₂, condição na qual os reatores foram alimentados com LAS e nitrato, obteve-se K^{LAS} de 0,052 h⁻¹, sendo este valor próximo à constante de velocidade observada nos reatores R₁ que receberam etanol como co-substrato (0,054 h⁻¹), podendo-se inferir que a adição de nitrato foi importante para que a comunidade microbiana utilizasse o LAS como doador de elétrons.

Devido aos resultados observados na realização do ensaio I, deu-se prosseguimento à realização do ensaio II, aumentando-se a concentração de LAS (60±4 mg/L LAS) nos reatores, afim de verificar comportamento cinético de degradação do surfactante pelo inóculo proveniente de lodos ativados, bem como a influência da condição nutricional com e sem doador e receptor de elétrons (adição de nitrato e/ou etanol).

Para o Ensaio II foram observadas remoções de LAS de 86%, 77%, 83% e 77% para os reatores R₁ (LAS + 88 mgNO₃⁻/L + 97,5 mg/L de etanol), R₂ (LAS + 88 mgNO₃⁻/L), R₃ (LAS + 97,5 mg/L de etanol) e R₅ (somente LAS), respectivamente.

No Ensaio II foi testada concentração inicial de surfactante de 60±4mg/L e verificou-se valores de K^{LAS} , diferentes daqueles do Ensaio I. Para as condições experimentais do reator R₁ observou-se redução da K^{LAS} , de 0,054 h⁻¹ (27,5 mg/L LAS) para 0,011 h⁻¹ (60 mg/L LAS), indicando possível inibição dos micro-organismos pelo aumento da concentração do surfactante, bem como dos outros compostos tóxicos da água residuária de lavanderia. O valor obtido sob tais condições do Ensaio II foi igual aquele obtido para o R₅ (27,5 mg/L LAS) do ensaio I. Pode-se inferir, portanto, que na condição do R₁ do ensaio II (60 mg/L LAS), etanol e nitrato não favoreceu maior K^{LAS} . Provavelmente, essa redução de K^{LAS} foi devido ao excesso do surfactante e dos outros compostos na água residuária de lavanderia. Essa possibilidade foi confirmada por meio da análise da velocidade de consumo de nitrato (K_1) (6,0.10⁻⁴ mgNO₃⁻/mgSTV.h) menor desse R₁ do Ensaio II, em relação àquela obtida para o R₁ do ensaio I (2,0.10⁻³ mgNO₃⁻/mgSTV.h) (Tabela 5.10). A partir desses valores, pode-se inferir que 60 mgLAS/L foi tóxico para as bactérias desnitrificantes.

No reator R₂, verificou-se redução dos valores de K^{LAS} em ambos os ensaios, sendo obtido 0,052 h⁻¹ para o ensaio com 27,5 mg/L LAS e 0,011 h⁻¹ para 60±4 mg

LAS/L. Comportamento semelhante foi observado para o reator R_3 cuja K^{LAS} passou de $0,038 \text{ h}^{-1}$ ($27,5 \text{ mg/L LAS}$) para $0,008 \text{ h}^{-1}$ com 60 mg/L LAS .

Para o reator R_5 observou-se redução no valor de K^{LAS} para maior concentração do surfactante. No ensaio cinético I ($27 \pm 0,5 \text{ mg de LAS/L}$) obteve-se K^{LAS} de $0,038 \text{ h}^{-1}$, enquanto para as condições do ensaio II ($60 \pm 4 \text{ mg de LAS/L}$) verificou-se $0,010 \text{ h}^{-1}$. Provavelmente, nas condições do ensaio II diluiu-se menos a água residuária de lavanderia, por conseguinte, maior proporção de substratos orgânicos biodegradáveis e recalcitrantes fez parte da composição nutricional dos reatores em batelada favorecendo o crescimento de outras populações de bactérias, talvez aeróbias facultativas ou anaeróbias facultativas do inóculo proveniente de sistemas de lodos ativados.

Para as demais condições nutricionais dos reatores (R_1 , R_2 e R_3) com $60 \pm 4 \text{ mg de LAS/L}$ verificou-se valores de K^{LAS} menores em relação as mesmas condições com $27 \pm 0,5 \text{ mg de LAS/L}$. Nos reatores com adição simultânea de etanol e nitrato (R_1), nitrato (R_2) e etanol (R_3) verificou-se redução significativa de K^{LAS} , respectivamente de $0,011 \text{ h}^{-1}$, $0,011 \text{ h}^{-1}$ e $0,008 \text{ h}^{-1}$.

Pode-se inferir, portanto, que maior concentração de LAS pode ser um fator limitante (MÖSCHE e MEYER, 2002) para as populações de bactérias degradadoras do surfactante nas condições estabelecidas neste estudo. Mesmo na presença de etanol e nitrato, fatores influentes no processo de degradação, a existência de um ou outro separadamente não exerceu interferência notável quando o LAS foi usado em maior concentração ($>50 \text{ mg/L}$), visto que houve redução discreta dos valores de K^{LAS} para os reatores R_2 e R_3 que continham separadamente nitrato e etanol em sua composição. Além disso, observou-se também redução de K^{LAS} para o reator R_1 que continha nitrato e etanol.

No reator R_4 não houve adição de LAS, e este reator foi considerado o controle (com etanol e nitrato) para a desnitrificação. Para as condições desses ensaios cinéticos I e II verificou-se consumo completo do nitrato (88 mg/L) em 6 horas de operação. De acordo com as velocidades cinéticas de consumo do nitrato (K_1) (Tabela 5.10) pode-se inferir sobre a possibilidade do LAS ter sido usado como doador de elétrons para a respiração anóxica para as condições impostas do ensaio I e II. Na presença de menor concentração de LAS (Ensaio I), o nitrato foi consumido rapidamente, e as velocidades foram maiores se comparadas ao Ensaio II, com maior concentração de LAS. Verificou-se para as condições do R_4 (sem LAS e com etanol) que K_1 foi menor ($3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mgNO}_3^-$

/mgSTV.h), em relação aqueles reatores com R_1 ($27 \pm 0,5$ mgLAS/L, etanol e nitrato) e R_2 ($27 \pm 0,5$ mgLAS/L e nitrato), respectivamente de $2,0 \cdot 10^{-3}$ mgNO₃⁻/mgSTV.h e $2,1 \cdot 10^{-3}$ mgNO₃⁻/mgSTV.h. Comportamento semelhante, porém com K_1 menores, foi verificado para os reatores do ensaio II para R_1 (60 ± 4 mgLAS/L, etanol e nitrato) e R_2 (60 ± 4 mgLAS/L e nitrato) cujos valores observados foram de $6,0 \cdot 10^{-4}$ mgNO₃⁻/mgSTV.h e $8,0 \cdot 10^{-4}$ mgNO₃⁻/mgSTV.h.

Tabela 5.10. Velocidade de consumo de nitrato (mgNO₃⁻/mgSTV.h) dos reatores em batelada do Ensaio I e II

	<i>Ensaio I</i>		<i>Ensaio II</i>	
<i>Reatores</i>	K_1	R^2	K_1	R^2
$R_1(LAS/etanol/NO_3)$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	0,96	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,98
$R_2(LAS/NO_3)$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	0,97	$8,0 \cdot 10^{-4}$	0,96
$R_4(etanol/Nitrato)$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	0,96	$3,2 \cdot 10^{-3}$	0,97

Desta forma, observou-se que em maiores concentrações de LAS, a velocidade de consumo de nitrato foi reduzida para os reatores que continham o receptor de elétrons (R_1 e R_2). Destaca-se também que o consumo de nitrato em R_1 deve ter ocorrido devido a respiração anóxica das bactérias desnitrificantes que utilizaram etanol como doador de elétrons. Já no reator R_2 ocorreu desnitrificação na ausência do etanol, mas na presença de outros doadores de elétrons da água residuária de lavanderia, incluindo o LAS.

5.3.3. Comunidade Microbiana

A partir da análise do coeficiente de similaridade do Domínio *Bacteria* (Figura 5.4) observou-se a formação de 3 grupos microbianos distintos. Verificou-se coeficiente de similaridade de 28% entre a comunidade microbiana do reator R_4 , sem adição de LAS, em relação aquelas dos reatores com adição de LAS. Para os reatores com concentração de LAS diferente verificou-se coeficiente de similaridade de 54% entre as populações dos reatores dos Ensaios I e II. Desse modo, para ambas as condições de LAS ($27 \pm 0,5$ mg LAS/L e 60 ± 4 mg de LAS/L) avaliadas nos reatores em batelada

verificou-se alteração das populações de bactérias, assim como constatado nas velocidades de degradação de LAS e consumo de nitrato.

Destaca-se que foi observado 81% de similaridade entre as populações da biomassa do inóculo proveniente de sistema de lodos ativados e aquelas do Reator R₄ (controle positivo para desnitrificação, sem LAS, com nitrato e etanol), refletindo a permanência de determinadas populações de bactérias mesmo com a restrição nutricional com somente um doador de elétrons para respiração. Na análise comparativa dos reatores do Ensaio I verificou-se para as populações de bactérias do reator R₁ (LAS, etanol e nitrato) e R₃ (LAS e etanol) similaridade de 95%. Todavia, 88% de similaridade foi observada na análise das populações desses dois reatores com aquelas das condições nutricionais do R₂ (LAS e nitrato). Embora, a remoção de LAS tenha sido semelhante nos reatores R₂ e R₃, o valor de K^{LAS} em R₁, foi ligeiramente maior, principalmente, em relação ao R₂; provavelmente devido a adição de etanol.

Na análise comparativa das condições nutricionais do ensaio II verificou-se similaridade de 86% entre as populações do reator R₅ (LAS) com aquelas do R₃ (LAS e etanol). Entre as populações do R₁ (LAS, etanol e nitrato) e R₂ (LAS e nitrato) verificou-se 88% de similaridade. Destaca-se que similaridade de 76% foi observada entre as populações dos reatores R₃ e R₅ com aquelas dos reatores R₁ e R₂.

Figura 5.4. Análise do cluster de acordo com o coeficiente de similaridade (Correlação de Pearson) para as bandas do DGGE do domínio Bacteria. Amostras: Inóculo; R4: controle); R1 – I (Reator 1 – Ensaio I); R2 – I (Reator 2 – Ensaio I); R3 – I (Reator 3 – Ensaio I); R5 – I (Reator 5 – Ensaio I); R1 – II (Reator 1 – Ensaio II); R2 – II (Reator 2 – Ensaio II); R3 – II (Reator 3 – Ensaio II); R5 – II (Reator 5 – Ensaio II).

Na comparação da comunidade microbiana na presença de LAS, etanol e nitrato (R_1) e LAS e nitrato (R_2) verificou-se coeficiente de similaridade de 88% para as condições do ensaio I (27,5 mg/L de LAS) e 89% para aquelas do ensaio II (60 mg/L de LAS). Já na comparação das populações de bactérias na presença de LAS, etanol e nitrato (R_1) e LAS e etanol (R_3) verificou-se coeficiente de similaridade de 95% para as condições do ensaio I (27,5 mg/L de LAS) e 76 % para aquelas do ensaio II (60 mg/L de LAS). Portanto, observou-se para as condições impostas para o ensaio II com etanol e LAS maior alteração das populações. Sob tais condições verificou-se K^{LAS} menor em relação as demais condições, por conseguinte, não ocorreu favorecimento da degradação de LAS na condição de maior concentração (Reator R_3).

Observou-se que houve aumento do índice de diversidade de Shannon de 2,842 para 3,177 para o Domínio Bacteria da biomassa do inóculo proveniente do inóculo de sistema de lodos ativados em relação àquela do reator R_4 (etanol e nitrato) (Tabela 5.11). Entretanto, verificou-se menor índice de dominância de 0,06633 para 0,04370 do inóculo em relação a biomassa do R_4 , respectivamente. Provavelmente foram selecionadas populações devido à restrição nutricional devido a adição somente de nitrato e etanol aos reatores.

De forma geral, observou-se que na adição de LAS aos reatores, em ambos os ensaios I e II, à medida em que houve aumento do índice de dominância, o índice de diversidade reduziu, inferindo-se que houve predomínio de populações de bactérias em relação ao inóculo. Para maior concentração de LAS (Ensaio II - 60mg/L), observou-se maior índice de dominância em relação aos reatores do ensaio I, predizendo que a concentração de LAS exerceu influência na seleção de populações de bactérias.

Na análise comparativa da biomassa do ensaio I, entre os reatores R_1 (LAS, etanol e nitrato) e R_2 (LAS e nitrato) verificou-se que o índice de diversidade (3,007 e 3,075, respectivamente) foi maior em relação aos reatores R_3 (LAS e etanol) e R_5 (LAS) sem adição de nitrato, cujos valores foram de 2,812 e 2,702, respectivamente. Provavelmente, a adição de nitrato influenciou na diversidade das populações de bactérias. Contudo, verificou-se para a dominância comportamento inverso, ou seja, para os reatores sem adição de nitrato verificou-se dominância maior (0,06517 e 0,07367), em relação aqueles com nitrato (0,05458 e 0,04906), respectivamente. Provavelmente, ocorreu seleção de outras populações de bactérias, visto que a dominância foi maior para esses sistemas reacionais (R_3 e R_5).

No ensaio II, para os reatores R₁, R₂, R₃ e R₅, observou-se redução do índice de diversidade concomitante com o aumento do índice de dominância, quando comparado ao reator R₄. A maior concentração de LAS nestes reatores pode ter selecionado algumas populações microbianas mais adaptadas ao surfactante, talvez algumas dessas populações estejam relacionadas à microbiota envolvida na degradação desse composto.

Tabela 5.11. Índice de diversidade de Shannon e dominância dos reatores em batelada do ensaio I e II.

	Dominância	Índice de Shannon
Inóculo	0,06633	2,842
R4 (etanol/nitrato)	0,04370	3,177
R1 – Ensaio I (LAS/nitrato/etanol)	0,05458	3,007
R2 – Ensaio I (LAS/nitrato)	0,04906	3,075
R3 – Ensaio I (LAS/etanol)	0,06517	2,812
R5 – Ensaio I (LAS)	0,07367	2,702
R1 – Ensaio II (LAS/nitrato/etanol)	0,09505	2,451
R2 – Ensaio II (LAS/nitrato)	0,06969	2,744
R3 – Ensaio II (LAS/etanol)	0,09289	2,469
R5 – Ensaio II (LAS)	0,07997	2,584

5.4. Operação dos Reatores de Leito Fluidificado

5.4.1. Inóculo

O inóculo utilizado foi de lodo facultativo oriundo do tanque de aeração de sistema de lodos ativados utilizados no tratamento de esgoto sanitário. Para esse lodo obteve-se 1,69 g/L de sólidos suspensos voláteis e 2,0 g/L de sólidos suspensos totais. Nessa biomassa não foi observado LAS.

5.4.2. Imobilização da biomassa ao meio suporte

Os reatores foram mantidos em câmara em temperatura de 30°C, e mantidos em regime semi-fechado para imobilização da biomassa ao meio suporte (areia) e adaptação da biomassa às condições de operação.

Manteve-se a inoculação durante 19 dias e alimentação com 630 ± 129 mg DQO/L. Inicialmente, a remoção de DQO em ambos os reatores, RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) foi baixa, entretanto, a partir do terceiro dia verificou-se remoção acima de 50% (Figura 5.5). A partir do quinto dia verificou-se aumento da remoção de DQO, até estabilização em 91% para o reator RLF 1 e 92% para o reator RLF 2, sendo possível, nesse período, abrir o sistema em ambos os reatores e iniciar a fase de adaptação e enriquecimento.

Verificou-se remoção de nitrato a partir do terceiro dia de operação dos reatores. Os percentuais de remoção de nitrato foram de 55% (RFL 1) e 60% (RFL 2) até a abertura do sistema. Nesse período foi adicionado 150 ± 10 mg/L de nitrato e 100 mg/L de etanol.

Os valores pH nos reatores permaneceram na faixa neutra durante a fase de inoculação, sendo pH 7,1 afluente e pH 7,5 efluente de ambos os reatores RLF 1 e RLF 2.

Figura 5.5: Variação temporal de DQO durante a fase de inoculação dos reatores de leito fluidificado. *As setas em azul indicam quando houve suplementação da alimentação dos reatores com etanol (100 mg/L)

5.4.3. Monitoramento dos Reatores de Leito Fluidificado

5.4.3.1. Matéria orgânica

Observou-se boa remoção de matéria orgânica solúvel (Tabela 5.12 e Figura 5.6) nos reatores RLF1 e RLF2 durante a Etapa I. Nessa Etapa os sistemas foram alimentado com 130 ± 45 mg/L de nitrato e 100 mg/L de etanol (RLF1) e 140 ± 50 mg/L e 100 mg/L de etanol (RLF2). Para 625 ± 59 mg/L (RLF1) e 650 ± 47 mg/L (RLF2) afluentes, obteve-se remoção de $89 \pm 6\%$ e $95 \pm 3\%$, respectivamente. Os resultados observados estão semelhantes aos obtidos por Oliveira et al. (2010) que registraram $89 \pm 2\%$ na sua etapa de adaptação, apenas com o substrato sintético, todavia, sob condição fermentativa-metanogênica.

A carga orgânica aplicada na Etapa I foi de 1.828 ± 181 mg/L.dia ao reator RLF1 e de 1.318 ± 108 mg/L.dia no reator RLF2. Quando da adição de água residuária de lavanderia aos reatores de leito fluidificado (Etapa II) observou-se carga orgânica em ambos os reatores, de 1.826 ± 450 mg/L.dia (RLF1) e de 1.412 ± 239 mg/L.dia (RLF2). Essa oscilação na concentração de DQO ocorreu devido a heterogeneidade da água residuária de lavanderia, uma vez que os frascos de alimentação dos reatores eram

separados e, portanto, sem a mesma homogeneidade a partir da amostra coletada no estabelecimento.

Após adição de LAS aos reatores na Etapa II ($18,6 \pm 4,1$ mg/L em RLF1 e $19,5 \pm 5,2$ mg/L em RLF2), observou-se 617 ± 150 mg/L e 700 ± 120 mg/L de DQO afluentes aos reatores RLF1 e RLF2, sendo registrados percentuais de remoção de $86 \pm 6\%$ e $93 \pm 5\%$, respectivamente. Aparentemente, a presença de LAS na alimentação dos reatores não influenciou na remoção de matéria orgânica, fato observado também por Macedo et al. (2015). Esses autores observaram que a adição de água residuária de lavanderia com LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado não influenciou na remoção de matéria orgânica, havendo acréscimo no percentual de remoção de DQO solúvel de $82,9 \pm 13,6\%$ (etapa de adaptação) para $88,5 \pm 3,0\%$ (etapa com adição de água de lavanderia).

A carga orgânica aplicada pelos autores supracitados foi de $1.163,1 \pm 189,0$ mg/L.dia, carga essa, inferior a aplicada aos reatores RLF1 e RLF2, entretanto, no caso específico desses reatores observou-se remoção semelhante àquela de Macedo et al. (2015).

Durante a Etapa III, onde houve redução da concentração de nitrato na alimentação dos reatores em 30%, a remoção de matéria orgânica solúvel foi de $94 \pm 4\%$ e $97 \pm 2\%$, respectivamente, nos reatores RLF1 e RLF2. Os percentuais de remoção de matéria orgânica observados aumentaram em relação à Etapa II. Na Etapa III foi aplicado DQO de 526 ± 36 mg/L e 644 ± 54 mg/L afluente em RLF1 e RLF2, e a carga orgânica foi de 1565 ± 134 mgDQO/L.dia em RLF1 e 1288 ± 108 mgDQO/L.dia em RLF2.

Na etapa IV com a retirada do co-substrato da alimentação dos reatores observou-se 186 ± 28 mg/L (RLF1) e 191 ± 31 mg/L (RLF2) afluentes registrando-se percentuais de remoção de matéria orgânica solúvel de $92 \pm 5\%$ e $92 \pm 6\%$, respectivamente. Aparentemente, a retirada do etanol não ocasionou redução no percentual de remoção de matéria orgânica.

Duarte et al. (2015) trabalharam com reator operado em bateladas sequenciais, inoculado com sedimento de rio poluído, para remoção de 15 mg/L de LAS utilizando sacarose (80 mg/L) como co-substrato. Após reduzirem a concentração de co-substrato em 50% na alimentação dos reatores, os autores verificaram decréscimo na remoção de

matéria orgânica (37%). Diferentemente destes autores, verificou-se alta remoção de DQO solúvel mesmo na ausência de co-substrato (etanol).

A carga orgânica na etapa IV (ausência de etanol na composição do substrato) foi de 553 ± 85 mg/L.dia para o reator RLF1 e de 383 ± 63 mg/L.dia para o reator RLF2. Mesmo após a retirada do etanol observou-se percentuais de remoção de matéria orgânica solúvel elevados. Ainda que a matéria orgânica adicionada aos reatores tenha sido oriunda somente da diluição da água residuária de lavanderia, com predomínio de compostos recalcitrantes (BRAGA et al. 2015), não foi observada alteração significativa no comportamento do reator para remoção de DQO.

Durante a Etapa V, houve adição de etanol e retirada do nitrato da alimentação dos reatores. As remoções de DQO observadas foram de $90 \pm 8\%$ (RLF1) e $96 \pm 5\%$ (RLF2) para 452 ± 76 mg/L e 454 ± 100 mg/L afluentes, respectivamente.

Na etapa VI, ausência de co-substrato e receptor de elétrons, a concentração de matéria orgânica solúvel nos reatores foi de 242 ± 99 mg/L, e 228 ± 78 mg/L, respectivamente aos reatores RLF1 e RLF2. Sob tais condições observou-se $90 \pm 13\%$ de remoção de DQO para RLF1 e $90 \pm 10\%$ para RLF2.

Braga et al. (2015) usaram reator anaeróbio de leito fluidificado para remoção de LAS de água residuária de lavanderia comercial, com sacarose como co-substrato e TDH de 18 horas. Os autores observaram após a retirada do co-substrato, com alimentação do reator apenas com água residuária de lavanderia diluída, que a remoção de matéria orgânica diminuiu discretamente para $88 \pm 5\%$, para 666 ± 161 mg/L afluente. Similarmente, observou-se discreta redução no valor de remoção de DQO para os reatores RLF1 e RLF2 da etapa V para etapa VI.

Figura 5.6. Bloxplot da remoção de DQO nos reatores RLF1(TDH 8h) e RFL2 (TDH 12 h) ao longo das etapas de operação: Etapa I (RLF1: 130 ± 45 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol em RLF1, RLF2: 140 ± 50 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RLF1: 132 ± 40 mg/NO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 18,6 mgLAS/L; RLF2: 159 ± 43 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 19,2 mgLAS/L;) Etapa III: (RLF1: 88 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 21,3 mgLAS/L; RLF2: 90 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 24,6 mgLAS/L); Etapa IV (RLF1: 132 ± 30 mgNO₃⁻L e 21,6 mgLAS/L; RLF2: 151 ± 36 mgNO₃⁻L e 27,1 mgLAS/L); Etapa V (RLF1: 100 mg/L de etanol e 21,1 mgLAS/L; RLF2: 100 mg/L de etanol e 22,1 mgLAS/L); Etapa VI (RLF1: 22 mgLAS/L; RLF2: 22,4 mgLAS/L).

Tabela 5.12. Variação da concentração de matéria orgânica e carga aplicada nos reatores de leito fluidificado.

<i>Reator RLF 1 (TDH 8 h)</i>						
	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV	Etapa V	Etapa VI
<i>Carga orgânica aplicada (mg/L.dia)</i>	1828±81	1826±450	1565±134	553±85	1373±332	784±334
<i>DQO afluyente (mg/L)</i>	625±59	617±150	526±36	186±28	452±76	242±99
<i>DQO efluente (mg/L)</i>	68±34	88±90	32±18	15±7	49±42	20±21
<i>Remoção (%)</i>	89±6	86±6	94±4	92±5	90±8	90±13
<i>Reator RLF 2 (TDH 12 h)</i>						
	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV	Etapa V	Etapa VI
<i>Carga orgânica aplicada (mg/L.dia)</i>	1318±108	1412±239	1288±108	383±63	908±230	489±186
<i>DQO afluyente (mg/L)</i>	650±47	700±120	644±54	191±31	454±100	228±78
<i>DQO efluente (mg/L)</i>	33±19	49±45	17±12	19±13	17±19	22±20
<i>Remoção (%)</i>	95±3	93±5	97±2	92±6	96±5	90±10

5.4.2. LAS

De forma geral, observou-se alta eficiência de remoção do surfactante ao longo das etapas de operação dos reatores RLF1 e RLF2, contudo para o reator RLF2 observou-se maior estabilidade de remoção durante os 373 dias de operação (Figura 5.7).

A água residuária de lavanderia foi adicionada aos reatores de leito fluidificado a partir do 63º dia, dando-se início à Etapa II. A carga aplicada de LAS ao reator RLF1 durante esta fase foi de 61 ± 13 mg de LAS/L.dia, havendo remoção média de $86 \pm 16\%$. No reator RLF2 a carga aplicada de LAS foi de 45 ± 12 mg/L.dia, com remoção média de $99 \pm 2\%$. Nesta fase de operação, as concentrações afluentes de LAS aos reatores RLF1 e RLF2 foram respectivamente de $18,2 \pm 4,2$ mg/L e $19,2 \pm 5,2$ mg/L.

Braga et al. (2015) avaliaram essa mesma configuração reacional para remoção de LAS oriundo de água residuária de lavanderia, com extrato de levedura e sacarose como co-substratos e TDH de 18 horas. Para estas condições, os autores observaram remoção de 65% de LAS para 23 mg/L afluente. Por outro lado, Macedo et al. (2015) utilizaram também a mesma configuração reacional para remoção de LAS, com etanol como co-substrato. Nesse último caso, obteve-se remoção de LAS de 72% em TDH de 18 horas, para 25,4 mg/L afluente. Vale ressaltar que em ambos os trabalhos citados anteriormente foi utilizado inóculo de reator UASB usado no tratamento de resíduo de suinocultura.

Ao confrontar os resultados obtidos, da Etapa II, do presente trabalho com os dados observados pelos autores supracitados, observou-se que os TDH empregados em RLF1 (8 horas) e RLF2 (12 horas) foram adequados para a remoção de LAS de água residuária de lavanderia, quando do uso de etanol como co-substrato, utilizando inóculo de sistemas de lodos ativados. Especificamente, nesse trabalho obteve-se remoção de LAS de $86 \pm 16\%$ e $99 \pm 2\%$, respectivamente para $18,6 \pm 4,1$ mg/L (RLF1), e $19,2 \pm 5,2$ mg/L (RLF2), sendo estes percentuais maiores em comparação aqueles obtidos por Braga et al. (2015) e Macedo et al. (2015).

Durante a Etapa III houve redução da concentração afluente de nitrato aos reatores, e para esta condição, verificou-se em reator RLF1 $96 \pm 6\%$ de remoção de LAS $21,3 \pm 4,2$ mgLAS/L afluente. Para o reator RLF2 observou-se remoção de $98 \pm 2\%$ para $24,6 \pm 5,1$ mg/L de LAS afluente. A diminuição da concentração afluente de nitrato,

aparentemente, influenciou na remoção de LAS no reator RLF1, no qual foi observado incremento no percentual de remoção de LAS.

Confrontando-se os dados da Etapa II e Etapa III quanto à remoção de LAS, verificou-se que a diminuição da concentração de nitrato, exerceu influência na remoção de LAS no reator RLF1. A partir da redução em 30% de nitrato afluente (Etapa III) observou-se maior remoção de LAS no referido reator, demonstrando grande significância se comparado à etapa anterior (Etapa II) ($p < 0.05$).

Na Etapa IV, na qual houve retirada do etanol, a concentração afluente ao reator RLF1 foi de $21,6 \pm 3,6$ mgLAS/L, e para o reator RLF2 foi de $27,1 \pm 5,6$ mgLAS/L, as remoções percentuais observadas foram de $99 \pm 3\%$ e $99 \pm 2\%$, respectivamente. Possivelmente, a retirada do etanol não influenciou na remoção de LAS, em ambos reatores. Entretanto, a presença de co-substrato na biorremediação de tóxicos é de fundamental importância, pois favorece a manutenção fisiológica dos micro-organismos (MACEDO et al. 2015). Pode-se inferir que, provavelmente, a adição de etanol nas etapas anteriores (I, II e III) foi fundamental para o estabelecimento e manutenção de populações aptas a degradação do LAS, com favorecimento das populações facultativas e desnitrificantes. Esse aspecto também foi observado por Macedo et al., (2015); ou seja, após a retirada do etanol da alimentação do reator de leito fluidificado com água residuária de lavanderia obteve-se elevada remoção de LAS para inóculo proveniente de reator anaeróbio.

Remoção de $81 \pm 20\%$ e $98 \pm 4\%$ foi observada para os reatores RLF1 e RLF2, durante a etapa V, para $20,6 \pm 4,6$ mg/L e $22,3 \pm 5$ mg/L de LAS afluente de, respectivamente. Na Etapa V houve retirada do nitrato afluente e adição de etanol aos reatores. A condição imposta nesta etapa exerceu influência na remoção de LAS, especificamente para o reator RLF1. Houve redução em 8% na remoção do surfactante para o reator RLF1, em comparação à etapa anterior (Etapa IV). Provavelmente, a ausência do nitrato desfavoreceu o metabolismo desnitrificante ocasionando redução na remoção de surfactante, adicionalmente, a adição do etanol possibilitou o crescimento de outros micro-organismos em detrimento às desnitrificantes, possibilitando desvio de rota metabólica de degradação do LAS.

Pradini et al. (2015) ao utilizarem inóculo de lodos ativados para remoção de LAS em reatores operados em bateladas sequenciais sob condição anóxica, observaram que na ausência do receptor de elétrons a remoção de LAS foi de 20%, enquanto que na

presença do receptor de elétrons a remoção foi de 29%. Desta forma, justifica-se a importância da adição de nitrato, conforme endossado por Abboud et al. (2007) que afirmaram que a presença de uma fonte de nitrogênio melhora a eficiência de remoção do surfactante.

Durante a Etapa VI, com adição somente de água residuária de lavanderia, verificou-se remoção de $99\pm\%$ de LAS no reator RLF1 (22 ± 4 mgLAS/L afluente), e $99\pm 1\%$ no reator RLF2 ($22,4\pm 4,8$ mgLAS/L afluente). Nesta etapa, observou-se maior estabilidade de remoção em RLF1, fato este observado também na etapa em que não houve adição de etanol (Etapa IV). Desta forma, infere-se que o etanol, apesar de exercer importante efeito para integridade celular dos micro-organismos, acaba por reduzir o percentual de remoção do surfactante, uma vez que trata-se de composto orgânico prontamente biodegradável. Mas, a importância da sua adição foi anteriormente justificada para o estabelecimento e manutenção das populações de bactérias aptas na degradação do LAS.

Em comparação à etapa anterior, Etapa V, em RLF1 observou-se diferenças significativas quanto à remoção de LAS ($p<0.05$); ou seja, na Etapa V, observou-se remoção de $90\pm 15\%$, enquanto, na Etapa VI verificou-se $99\pm 3\%$.

Em suma, observou-se remoção global para o reator RLF1 e RLF2 de $93\pm 12\%$ e $99\pm 3\%$, respectivamente. Portanto, verificou-se maior percentual de remoção no reator RLF2, com maior TDH (12 horas). Tal fato foi devido, provavelmente, ao maior tempo de detenção hidráulica, que influenciou positivamente na obtenção de maior percentual de remoção. Okada et al. (2013b) avaliaram a remoção de LAS em sete reatores UASB, e observaram que a degradação do LAS requereu maior tempo. Em menores cargas aplicadas de LAS ao reator UASB operado em TDH de 35 horas e com adição de etanol e metanol como co-substratos, os autores observaram remoção de 70%.

Figura 5.7. Bloxplot dos valores de percentuais de remoção de LAS ao longo das etapas dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h): Etapa I (RLF1: 130 ± 45 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol em RLF1, RLF2: 140 ± 50 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RLF1: 132 ± 40 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 18,6 mgLAS/L; RLF2: 159 ± 43 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 19,2 mgLAS/L;) Etapa III: (RLF1: 88 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 21,3 mgLAS/L; RLF2: 90 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 24,6 mgLAS/L); Etapa IV (RLF1: 132 ± 30 mgNO₃⁻L e 21,6 mgLAS/L; RLF2: 151 ± 36 mgNO₃⁻L e 27,1 mgLAS/L); Etapa V (RLF1: 100 mg/L de etanol e 21,1 mgLAS/L; RLF2: 100 mg/L de etanol e 22,1 mgLAS/L); Etapa VI (RLF1: 22 mgLAS/L; RLF2: 22,4 mgLAS/L).

5.4.3. Nitrato

Verificou-se na Etapa I (enriquecimento e adaptação) elevada remoção de nitrato em ambos os reatores RLF1 ($96 \pm 4\%$) e RLF2 ($95 \pm 4\%$) para 128 ± 50 mg/L e 140 ± 50 mg/L afluentes, respectivamente, indicando a existência de populações desnitrificantes provenientes do sistema de lodos ativados e favorecidas pelas condições impostas na operação dos reatores RLF1 e RLF2 (Figura 5.8)

Remoção de nitrato de $95 \pm 8\%$ (RLF1) e $92 \pm 11\%$ (RLF2) foi observada na Etapa II, após a adição de LAS aos reatores, inferindo que a presença do surfactante não influenciou na remoção de nitrato no meio pela comunidade microbiana. As concentrações afluentes foram de 132 ± 40 mg/L em RLF1 e 159 ± 43 mg/L em RLF2.

Duarte et al. (2015) observaram remoção de nitrato de 87% para concentração de 200 ± 23 mg/L em reator operado em bateladas sequenciais alimentado com 15 mg/L de LAS. Os autores não observaram influência da adição de LAS na remoção de nitrato no reator. Elsgaard (2010) também verificou que na presença de LAS (105 mg/L) a remoção de nitrato não foi afetada.

Na Etapa III, apesar da redução em 30% da concentração de nitrato, observou-se remoção de $82 \pm 15\%$ (RLF1) e $81 \pm 16\%$ (RLF2) para 88 ± 10 mg/L e 90 ± 10 mg/L afluentes, respectivamente. Notou-se decréscimo da remoção de nitrato após a redução da sua concentração na alimentação dos reatores.

Quando se retirou o co-substrato (etanol) da alimentação dos reatores, Etapa IV não se verificou no reator RLF1 remoção de nitrato, entretanto, no reator RLF2 foi verificada remoção de nitrato, mesmo que em baixos percentuais, sendo estes de $27 \pm 48\%$ para 151 ± 36 mg/L afluente. Sob tais condições pode-se inferir sobre a possibilidade do LAS ter sido utilizado como doador de elétrons na desnitrificação. Salienta-se que na caracterização microbiana desta etapa identificou-se bactérias semelhantes a *Pseudomonas* (32,29%), como o mais abundante gênero dentre aqueles identificados. Tais bactérias tem como característica diferencial a plasticidade metabólica, o que implica na utilização de diversas fontes de carbono, nitrogênio e receptores de elétrons, o que pode ter contribuído para remoção de nitrato neste reator; ou seja, são micro-organismos que crescem em condições aeróbias, facultativas e anóxicas (BRENNER et al., 2005)

Santos et al. (2004), Shen et al. (2013) utilizaram etanol como doador de elétrons para desnitrificação. Os autores verificaram que é de fundamental importância a adição da fonte de carbono para se obter eficiente remoção de nitrogênio no meio. Os autores também afirmaram que a presença de etanol favoreceu a cinética de remoção de nitrato. Contudo, Shen et al (2015) verificaram que a piridina foi utilizada como doador de elétrons para remoção de $389 \text{ mg-NO}_3^-/\text{L}$.

Durante a Etapa V, na qual houve ausência de nitrato observou-se 0.6 ± 0.2 mg/L e 0.3 ± 0.7 mg/L afluentes aos reatores RLF1 e RLF2. Entretanto, foi observado maiores valores de nitrato nas amostras efluentes. Tal fato foi relacionado a presença de cloreto de amônio na solução de macro nutrientes, utilizada na alimentação dos reatores, e provavelmente foi convertido pela comunidade microbiana via nitrificação. Para o

reator RFL1 a concentração efluente de nitrato foi de $13,8 \pm 15,7$ mg/L e em RLF2, observou-se $24,2 \pm 26,4$ mg/L de nitrato.

Durante a Etapa VI a concentração efluente de nitrato nos reatores RLF1 e RLF2 foi de 10 ± 12 mg/L, e $5,6 \pm 7,8$ mg/L. De forma similar à etapa V, provavelmente ocorreu a nitrificação.

A conversão do íon amônio ocorre por micro-organismos nitrificantes capazes de utilizar o nitrogênio amoniacal, convertendo-o a nitrito e, posteriormente a nitrato (MADIGAN, 2010). Moura (2014) trabalhou com reator de leito estruturado para remoção de nitrogênio de esgoto sanitário com inóculo de lodos ativados – o mesmo do presente trabalho, e na análise de diversidade microbiana, identificou bactérias semelhantes a *Azospira*, *Nitrosomonas* e *Comamonas*, sendo estes gêneros capazes de nitrificar. No presente trabalho, identificou-se gêneros semelhantes a *Nitrospira* em RLF1 (0,041%) e RLF2 (0,242%) na Etapa V, enquanto na Etapa VI identificou-se gêneros semelhantes a *Nitrospira* (0,03%), *Azospira* (0,02%) e *Comamonas* (0,01%) em RLF1. Em RLF2 foi identificada bactéria semelhante a *Nitrospira* (0,03%). Desta forma, a presença de nitrato no efluente dos reatores é justificada pela identificação destes gêneros que são capazes de utilizar o cloreto de amônio (110 mg/L) convertendo-o a nitrito, e em seguida a nitrato (BRENNER et al. 2005).

Figura 5.8. Bloxplot da remoção de nitrato nos reatores RFL1 (TDH 8h) e RFL2 (TDH 12h) ao longo da operação: Etapa I (RFL1: 130 ± 45 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol em RFL1, RFL2: 140 ± 50 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RFL1: 132 ± 40 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 18,6 mgLAS/L; RFL2: 159 ± 43 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 19,2 mgLAS/L;) Etapa III: (RFL1: 88 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 21,3 mgLAS/L; RFL2: 90 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 24,6 mgLAS/L); Etapa IV (RFL1: 132 ± 30 mgNO₃⁻L e 21,6 mgLAS/L; RFL2: 151 ± 36 mgNO₃⁻L e 27,1 mgLAS/L); Etapa V (RFL1: 100 mg/L de etanol e 21,1 mgLAS/L; RFL2: 100 mg/L de etanol e 22,1 mgLAS/L); Etapa VI (RFL1: 22 mgLAS/L; RFL2: 22,4 mgLAS/L).

5.4.4. pH e alcalinidade

Verificou-se variação dos valores de pH em RFL1 (Figura 5.9) e RFL2 (Figura 5.10) ao longo das etapas de operação. Durante a Etapa I foi verificado pH efluente de $7,5 \pm 0,1$ para o reator RFL1 e $7,5 \pm 0,2$ para o reator RFL2.

Na Etapa II, quando da adição de água residuária de lavanderia (pH $9,5 \pm 1,5$) verificou-se valores de pH efluente no reator RFL1 entre 6,7 e 7,8, com média de $7,4 \pm 0,2$. Já no reator RFL2 verificou-se valores efluentes de pH entre 6,4 e 7,8, com média de $7,2 \pm 0,34$.

Na Etapa III, com redução da concentração de nitrato observou-se manutenção nos valores de pH afluente e efluente. Verificou-se em reator RFL1 pH afluente de $7,2\pm0,1$ e pH efluente de $7,2\pm0,1$. No reator RFL2 verificou-se pH de $7,2\pm0,1$ afluente e $7,1\pm0,2$ efluente.

Entretanto, quando da realização da Etapa IV, na qual o etanol foi retirado, observou-se diminuição dos valores de pH efluente em ambos os reatores. Em reator RFL1 e RFL2, observou-se pH efluente de $6,4\pm0,5$ e $6,7\pm0,5$, respectivamente. Os valores de pH afluente foram de $7,4\pm0,2$ em ambos os reatores.

Figura 5.9. Variação de pH ao longo da operação do reator RFL1: Etapa I (RLF1: 130 ± 45 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RLF1: 132 ± 40 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 18,6 mgLAS/L) Etapa III: (RLF1: 88 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 21,3 mgLAS/L); Etapa IV (RLF1: 132 ± 30 mgNO₃⁻L e 21,6 mgLAS/L); Etapa V (RLF1: 100 mg/L de etanol e 21,1 mgLAS/L); Etapa VI (RLF1: 22 mgLAS/L).

Durante a Etapa V observou-se manutenção nos valores de pH efluente em comparação aos valores de pH afluente. No reator RFL1 o valor médio de pH afluente foi de $7,2\pm0,2$ e pH efluente de $7,0\pm0,2$. Já para o reator RFL2, os valores afluente e efluente foram de $7,2\pm0,2$ e $7,0\pm0,3$, respectivamente. Na Etapa VI, observou-se pH

afluente de $7,6 \pm 0,2$ em RLF1 e $7,6 \pm 0,3$ em RLF2. Em relação ao pH efluente observou-se $7,7 \pm 0,3$ em ambos os reatores RFL1 e RLF2.

Figura 5.10. Variação de pH ao longo da operação do reator RLF2: Etapa I (RLF2: 140 ± 50 mgNO₃⁻/L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RLF2: 159 ± 43 mgNO₃⁻/L, 100 mg/L de etanol e 19,2 mgLAS/L); Etapa III: (RLF2: 90 ± 10 mgNO₃⁻/L, 100 mg/L de etanol e 24,6 mgLAS/L); Etapa IV (RLF2: 151 ± 36 mgNO₃⁻/L e 27,1 mgLAS/L); Etapa V (RLF2: 100 mg/L de etanol e 22,1 mgLAS/L); Etapa VI (RLF2: 22,4 mgLAS/L).

Em relação a alcalinidade total no reator RFL1, obteve-se na Etapa I e Etapa II 134 ± 20 mg/L e 187 ± 68 mg/L efluente, respectivamente. Na Etapa III, quando da redução da concentração de nitrato observou-se manutenção nos valores de alcalinidade afluente e efluente no reator RFL1, de 181 ± 26 mg/L e 190 ± 30 mg/L, respectivamente (Figura 5.11).

Entretanto, na Etapa IV (ausência de etanol como co-substrato) verificou-se diminuição da alcalinidade durante todo o período, fato endossado pela redução de pH efluente. Nessa etapa obteve-se 192 ± 45 mg/L afluente e 70 ± 40 mg/L efluente; a redução de alcalinidade nesta etapa foi de 63%. Para Etapa V, observou-se discreta redução da alcalinidade. Observou-se 222 ± 87 mg/L afluente e 214 ± 81 mg/L efluente do RLF1.

No reator RFL2 (Figura 5.12) foi observado comportamento diferente do reator RFL1, com manutenção nos valores de alcalinidade afluente e efluente na Etapa II,

respectivamente de 146 ± 46 mg/L e 148 ± 69 mg/L. Para Etapa III foi observado discreta redução de alcalinidade no meio, com 192 ± 14 mg/L afluente e 183 ± 31 mg/L efluente. Durante a Etapa IV verificou-se oscilação nos valores afluente e efluentes; ou seja, de 198 ± 45 mg/L e 115 ± 13 mg/L, respectivamente, havendo redução de alcalinidade no meio. Verificou-se oscilação e redução da alcalinidade durante a Etapa V de 256 ± 117 mg/L afluente e 169 ± 58 mg/L efluente.

Figura 5.11. Bloxplot dos valores de alcalinidade total ao longo da operação do reator RLF1: Etapa I (RLF1: 130 ± 45 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RLF1: 132 ± 40 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 18,6 mgLAS/L) Etapa III: (RLF1: 88 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 21,3 mgLAS/L); Etapa IV (RLF1: 132 ± 30 mgNO₃⁻L e 21,6 mgLAS/L); Etapa V (RLF1: 100 mg/L de etanol e 21,1 mgLAS/L); Etapa VI (RLF1: 22 mgLAS/L).

Figura 5.12. Bloxplot dos valores de alcalinidade total ao longo da operação do reator RLF2 (TDH 12 h): Etapa I (RLF2: 140 ± 50 mgNO₃⁻/L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RLF2: 159 ± 43 mgNO₃⁻/L, 100 mg/L de etanol e 19,2 mgLAS/L;) Etapa III: (RLF2: 90 ± 10 mgNO₃⁻/L, 100 mg/L de etanol e 24,6 mgLAS/L); Etapa IV (RLF2: 151 ± 36 mgNO₃⁻/L e 27,1 mgLAS/L); Etapa V (RLF2: 100 mg/L de etanol e 22,1 mgLAS/L); Etapa VI (RLF2: 22,4 mgLAS/L).

5.4.5. Ácidos orgânicos voláteis

Durante toda a operação dos reatores RLF1 e RLF2 foi observada baixa produção de ácidos orgânicos voláteis efluente (Tabela 5.13). Observou-se maior concentração de ácido acético para ambos os reatores na primeira etapa de operação, sendo $5,64 \pm 3,1$ mg/L para RLF1 e $1,80 \pm 0,5$ mg/L em RLF2. Na Etapa II observou-se para o RLF1 maior concentração de ácido fórmico ($3,4 \pm 2,1$ mg/L), enquanto para o RLF2 observou-se ácido butírico ($7,5 \pm 0,5$ mg/L).

Durante a Etapa III observou-se ácido fórmico ($9,1 \pm 0,1$ mg/L) em maior concentração no reator RLF1, assim como ácido butírico para o reator RLF2 ($4,75 \pm 0,5$ mg/L). Para a Etapa IV, observou-se ácido butírico em maior concentração para ambos os reatores, de $7,4 \pm 2,0$ mg/L e $4,0 \pm 1,0$ mg/L, respectivamente aos reatores RLF1 e RLF2. Na Etapa V e VI não foram observados ácidos orgânicos voláteis, ou seja, com valores abaixo do limite de detecção (LD) do método para ambos os reatores.

Tabela 5.13. Ácidos orgânicos voláteis detectados ao longo da operação dos reatores RLF1 e RLF2.

Reator RFL1		Ácido <i>Acético</i> (mg/L)	Ácido <i>Propiônico</i> (mg/L)	Ácido <i>Butírico</i> (mg/L)	Ácido <i>Fórmico</i> (mg/L)
	Etapa I	5,64	<LD	<LD	<LD
	Etapa II	<LD	<LD	<LD	3,39
	Etapa III	<LD	1,91	<LD	9,10
	Etapa IV	<LD	<LD	7,38	<LD
	Etapa V	<LD	<LD	<LD	<LD
	Etapa VI	<LD	<LD	<LD	<LD
Reator RFL2		Ácido <i>Acético</i> (mg/L)	Ácido <i>Propiônico</i> (mg/L)	Ácido <i>Butírico</i> (mg/L)	Ácido <i>Fórmico</i> (mg/L)
	Etapa I	<LD	1,74	<LD	<LD
	Etapa II	<LD	<LD	7,47	3,50
	Etapa III	<LD	<LD	4,75	10,12
	Etapa IV	<LD	<LD	4,03	<LD
	Etapa V	<LD	<LD	<LD	<LD
	Etapa VI	<LD	<LD	<LD	<LD

*LD: Limite de detecção

Okada et al. (2013a) investigaram a influência de ácidos orgânicos voláteis na remoção de LAS em reatores UASB e EGSB. Os autores verificaram em reator UASB, que 1 a 10 mg/L de ácido acético influenciaram na estabilidade de remoção de LAS (20 – 25%), para 13,8 mg/L afluente. Contudo, para o reator EGSB verificaram para maior concentração de ácido acético (1 a 22 mg/L) maior estabilidade de remoção do LAS (40 – 80%), provavelmente, devido a recirculação do efluente no reator que aumentou a transferência de massa entre o substrato e a biomassa. Nesse último caso foi aplicado 14,3 mg/L de LAS afluente.

De forma similar a Okada et al. (2013a) observou-se eficiente remoção de LAS nos reatores RLF1 e RLF2, sendo que ambos possuíam recirculação do efluente, o que pode ter facilitado a menor concentração de ácidos orgânicos voláteis, e elevada eficiência de remoção.

5.5. Balanço de massa

O ensaio de adsorção serviu para determinar a quantidade de LAS adsorvido no biofilme, no meio suporte, e na biomassa do separador de fases ao longo de 436 dias de operação. Durante o período de operação foram adicionados no reator RLF1 9,64 g de LAS e observou-se 0,63 g no efluente. No reator RLF2 adicionou-se 10,46 g de LAS e no efluente foi verificado 0,13 g de LAS.

Por meio de balanço de massa verificou-se no reator RLF1 que 93,4% de LAS foram degradados. Observou-se que 0,012% de LAS ficaram adsorvidos, dos quais 0,007% foram adsorvidos na areia, e 0,005% adsorvido na biomassa do separador de fases (Tabela 5.14).

No reator RLF2 verificou-se que 98,77% de LAS foram degradados. Observou-se que 0,017%, do total de LAS adicionado, foram removidos por adsorção, dos quais 0,005% foram adsorvidos na areia, e 0,010% na biomassa do efluente ao longo da operação.

Tabela 5.14. Balanço de massa dos reatores RLF1 e RLF2.

Balanço de massa	Reator RLF1		Reator RLF2	
	mg	%	mg	%
Adicionado	9.643,2	100	10.460,4	100
Efluente	634,9	6,58	127,1	1,21
Adsorvido	1,20	0,012	1,79	0,017
Adsorvido na areia	0,66	0,007	0,54	0,005
Adsorvido na biomassa efluente	0,00	0,00	1,00	0,010
Adsorvido na biomassa do separador	0,47	0,005	0,25	0,002
Adsorvido na biomassa do distribuidor	0,07	0,001	0,00	0,00
Degradado	9.007,1	93,40	10.331,5	98,77
Duração (d)	436	-	436	-

As porcentagens de degradação observadas no presente trabalho foram de 93,4% para RLF1 e 98,77% para RLF2. Tais valores foram superiores aqueles observados por Delforno et al., (2013), Carosia et al., (2014), Macedo et al. (2015) e Braga et al. (2015). Destaca-se, contudo que esses valores foram obtidos em reatores EGSB e de leito fluidificado operados sob condições anaeróbias. No caso específico desse trabalho avaliou-se a remoção e degradação sob condição anóxica (Tabela 5.15).

Macedo et al. (2015) avaliaram reator anaeróbio de leito fluidificado para remoção de LAS a partir de água residuária de lavanderia, e após 330 dias de operação foram adicionados 7,68 g de LAS, sendo recuperado no efluente 2,23 g de LAS. Os autores observaram remoção total de 70,44%, dos quais 69,63% foram degradados e 0,81% removidos por adsorção, no biofilme, areia e biomassa do separador de fases. Por outro lado, Oliveira et al. (2013) verificaram ao final de 270 dias, após adição de 7,76 g de LAS na com a mesma configuração de reator degradação de LAS padrão (Sigma), em condição anaeróbia, de 93% foi degradado biologicamente.

É válido ressaltar que as condições empregadas nesta pesquisa são diferentes das empregadas pelos autores supracitados, que trabalharam com remoção de LAS de água residuária de lavanderia e LAS padrão (Sigma), todavia sobre outras condições metabólicas, sendo predominantemente anaeróbia em contraposição à condição anóxica utilizada nesta pesquisa.

Tabela 5.15. Balanço de massa da quantidade de LAS adicionada em diferentes reatores.

Referência	Reator	Inóculo	Fonte de LAS (mg/L)	TDH (h)	Operação (d)	Degradação (%)	Adsorção (%)
Oliveira et al. (2013)	RALF	Lodo de reator UASB	LAS padrão 20 mg/L	18	270	93	0
Delforno et al. (2012)	EGSB	Lodo de reator UASB	LAS padrão 14,3 mg/L	32	285	48	8
Carosia et al. (2014)	RALF	Lodo de reator UASB	Sabão em pó 14 mg/L	32	156	42,4	5,4
Macedo et al. (2015)	RALF	Lodo de reator UASB	Água de Lavanderia 27,2 mg/L	18	330	69,6	0,8
Braga et al. (2015)	RALF	Lodo de reator UASB	Água de Lavanderia 21,7 mg/L	18	489	56,9	1,6
Presente estudo	RLF1	Lodos Ativados	Água de Lavanderia 21 mg/L	8	436	93,4	0,012
Presente estudo	RLF2	Lodos Ativados	Água de Lavanderia 23 mg/L	12	436	98,7	0,017

5.6. Análise comparativa dos reatores de leito fluidificado

Análise de variância (ANOVA *one way*) foi aplicada nos valores obtidos de remoção de LAS e DQO, a fim de verificar diferenças significativas ($p < 0,05$), em função do TDH aplicado em RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) (Tabela 5.16).

Neste sentido, observou-se para o parâmetro DQO que houve diferença significativa entre os valores de remoção obtidos ao longo das etapas. A remoção global em RLF1 e RLF2 foi de $89 \pm 8\%$ e $94 \pm 6\%$, respectivamente. A partir desses resultados pode-se inferir que para a remoção de matéria orgânica a partir da água residuária de lavanderia a aplicação do TDH de 12 horas (RLF2) foi mais adequado se comparado ao de 8 horas (RLF1).

Em relação a remoção de LAS observou-se novamente que houve diferença significativa entre os reatores RLF1 e RLF2 ($p < 0,05$), sendo verificada remoção global de $93 \pm 12\%$ e $99 \pm 3\%$ em TDH de 8 horas e 12 horas, respectivamente.

Tabela 5.16. Análise comparativa da eficiência de remoção de LAS e DQO em cada etapa dos reatores fluidificados.

	RLF1	RLF2
DQO	(%)	
Etapa I	89 ± 6	95 ± 3
Etapa II	86 ± 6	93 ± 5
Etapa III	94 ± 4	97 ± 2
Etapa IV	92 ± 5	92 ± 6
Etapa V	90 ± 8	96 ± 5
Etapa VI	90 ± 13	90 ± 10
Global	89 ± 8	94 ± 6
LAS	(%)	
Etapa II	86 ± 16	99 ± 2
Etapa III	96 ± 6	98 ± 2
Etapa IV	99 ± 3	99 ± 2
Etapa V	81 ± 20	98 ± 4
Etapa VI	99 ± 2	99 ± 1
Global	93 ± 12	99 ± 3

Cabe ressaltar, que os percentuais de remoção de LAS observados foram elevados, e maiores se comparados a outras pesquisas realizadas no grupo do LPB/EESC/USP, todavia, ressalta-se que o inóculo utilizado nessa pesquisa foi proveniente de lodos ativados; ou seja, com potencial metabólico diferente da biomassa anaeróbia empregada em pesquisas anteriores, aliado ao fato das diferentes

configurações de reatores empregadas, tais como, RHLF (reator anaeróbio horizontal de leito fixo) (DUARTE, 2006); ESGB (DELFORNO, et al., 2012), UASB (OKADA, et al., 2014); RALF (OLIVEIRA et al., 2013; CAROSIA, et al., 2014; BRAGA, et al., 2015; MACEDO, et al., 2015).

5.7. Operação dos Reatores de Leito Fluidificado em Condição Otimizada

Após a definição de condições ótimas de degradação de LAS através da metodologia design de composto central rotacional, etanol (97,5 mg/L) e nitrato (87,5 mg/L) foram adicionados aos reatores RLF1 e RLF2 nas referidas concentrações. Os reatores foram operados em duas etapas (Etapa VII e Etapa VIII) contabilizando 112 dias. Vale ressaltar que os reatores foram operados logo em seguida à etapa VI (alimentação com água de lavanderia diluída).

Observou-se na Etapa VII remoção de LAS de 99,9% para os reatores RLF1 ($24,4 \pm 3,8$ mgLAS/L – afluente) e RLF2 ($28 \pm 7,2$ mgLAS/L – afluente). Durante toda a etapa não foi observado nos efluentes dos reatores o LAS. Da mesma forma, na Etapa VIII notou-se remoção de 99,9% de LAS nos reatores RLF1 e RLF2 para concentrações afluentes de $35,1 \pm 9,6$ mgLAS/L e $41 \pm 17,2$ mgLAS/L.

As elevadas remoções observadas nos reatores e leito fluidificado confirmam a remoção predita através do planejamento experimental (10,2 mgLAS/L – 94% de remoção), todavia sendo verificadas para maior concentração de LAS. Adicionalmente, os reatores foram operados por 436 dias, dos quais 373 dias houve adição de água residuária de lavanderia, assim o biofilme formado estava adaptado, e consequentemente pode ter permitido maior remoção de surfactante nas duas etapas de operação em condição otimizada.

Em relação à DQO na Etapa VII verificou-se remoção média de 87 ± 9 % para 398 ± 42 mg/L afluente de matéria orgânica no reator RLF1, enquanto notou-se remoção de 93 ± 5 % para o reator RLF2 (404 ± 52 mg/L).

Na Etapa VIII verificou-se remoção de DQO de 79 ± 5 % em RLF1 (409 ± 112 mg/L) e 80 ± 6 % para 422 ± 61 mg/L afluente em RLF2. Pretendeu-se aumentar a concentração de água de lavanderia na Etapa VIII, logo a concentração de compostos refratários foi maior, isso interferiu na remoção de matéria orgânica, uma vez que as

populações podem ter consumido o etanol, preferencialmente, em detrimento aos demais componentes da água residuária de lavanderia.

5.8. Análise de Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa

Para identificação dos compostos detectados nos cromatogramas foram utilizadas as bases de dados de espectros de massa NIST11 e o programa AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution Mass and Identification System*). Desta forma, foram encontrados 10 compostos orgânicos para o efluente do reator RLF1 e 3 compostos para o efluente do reator RLF2 (Tabela 5.17).

Tabela 5.17. Compostos orgânicos xenobióticos detectados na Etapa VI dos reatores.

Pico	Composto	Reator RLF1		Reator RLF2	
		%A	Qualidade	%	Qualidade
Análise por Headspace					
1	Dimetil Ftalato	1,72	93	9,86	90
2	Diisobutil Ftalato	1,06	AMDIS	-	-
3	Dimetoxi Difenil Etanona	6,08	86	4,53	AMDIS
Análise por Injeção Direta					
1	Triacetina	5,07	83	95,87	83
2	Ácido Hexadecanóico	4,70	95	-	-
3	Ácido Linoléico	72,71	99	-	-
4	Ácido Octadecanóico	10,32	96	-	-
5	Monolinoleína	0,52	80	-	-
6	Ácido Linoléico	4,72	98	-	-
7	Cloreto de Linoleílo	1,45	90	-	-

A%: Porcentagem de área que indica a distribuição relativa dos compostos na amostra.

Qualidade: Reflete a similaridade dos espectros de massas obtidos com os registrados pelas bibliotecas.

Dimetil Ftalato, dimetoxi difenil etanona e triacetina foram os compostos encontrados em comum para as amostras de ambos os reatores. Dimetil Ftalato é um composto derivado do ácido 1,2 benzeno dicarboxílico, com uso em tintas industriais, plastificantes, cosméticos, corantes (SOUZA, 2013) que tem efeito nocivo sobre a biota aquática (EPA, 2013). A Agência Ambiental Europeia (EEA, 2013) não reconhece

efeitos agudos de tal composto, entretanto, pode apresentar toxicidade crônica. Triacetina é composto derivado de glicerol, e é utilizado em fragrâncias e corantes industriais, apresenta toxicidade aguda baixa, sendo seu LC_{50} , para camundongos, maior do que 1.000 mg/kg.

Diisobutil Ftalato foi observado para o efluente do reator RLF1, e está associado com efeitos tóxicos, devido sua capacidade de mimetizar hormônios, agindo então como desregulador endócrino (SOUZA, 2013). Na análise por injeção direta do efluente do reator RLF1, o composto de maior abundância foi o ácido linoleico (72,71%), seguido de ácido octadecanóico (10,32%), sendo estes compostos citados extensivamente utilizados na composição de cosméticos e produtos de higiene pessoal.

No reator RLF2, a triacetina foi o composto mais abundante na análise por injeção direta, ocupando 95,87% em abundância relativa. É composto utilizado na fabricação de cosméticos, na fixação de perfumes, e como agente plastificante (MOTA et al. 2009).

Braga et al. (2015) caracterizaram efluente da última fase de operação de reator anaeróbio usado no tratamento de água residuária de lavanderia comercial diluída sob condição anaeróbia. Os autores observaram que metanotiol (48,7%) e adipato de octila (55,72%) foram os compostos de maior abundância, não sendo verificado composto em comum com a presente pesquisa. Por outro lado, Faria (2015) observou na caracterização de efluente de reator EGSB, utilizado para remoção de LAS de água residuária de lavanderia, compostos como tolueno (18,7%) e diisopropilamina (52,77%), não sendo observado nenhum composto orgânico em comum com a presente pesquisa.

Desta forma, as distintas origens da água residuária de lavanderia, o tipo de sabão utilizado em cada processo, bem como os adjuvantes (branqueadores, amaciantes), podem interferir na composição afluyente dos reatores biológicos. Além disso, as condições metabólicas impostas nas configurações reacionais em função das populações estabelecidas no biofilme irão degradar os compostos, no caso específico dessa água residuária, a maioria tóxicos.

5.9. Ensaio Ecotoxicológico

A realização de testes ecotoxicológicos é de fundamental importância no contexto da biorremediação de tóxicos, uma vez que após tratamento ou remediação de

águas residuárias com poluentes, estes podem ser transformados em compostos com toxicidade superior ao composto de origem. Neste tocante, realizaram-se ensaios ecotoxicológicos com o macroinvertebrado *Chironomus xanthus* a fim de verificar a toxicidade de amostras afluentes e efluentes dos reatores RLF1 e RLF2, e consequentemente, verificar a eficiência de remoção do LAS nos reatores citados.

5.9.1. Ensaio Agudo

Na Tabela 5.18 estão apresentados os percentuais de mortalidade para amostras afluentes e efluentes do reator RLF1. Em todas as etapas de operação, observou-se significativa redução da toxicidade nas amostras efluentes no referido reator, por outro lado, observou-se toxicidade nas amostras afluentes em cada fase de operação.

Durante a etapa II observou-se mortalidade de 100% nas amostras afluentes, enquanto na amostra efluente, registrou-se mortalidade de 30% ao macroinvertebrado, sendo observado, em média, 7 organismos vivos na amostra efluente, cuja concentração foi de 2,3 mg/L de LAS. Vale ressaltar que a remoção de surfactante no reator RLF1 foi de $86 \pm 16\%$.

Para a Etapa III verificou-se 100% de mortalidade nos organismos para amostra afluyente ao reator RLF1 e mortalidade de 20% na amostra efluente do referido reator. Ressalta-se que a concentração de LAS nesta etapa para o afluyente e efluente foi de 23,1 mg/L e 2,1 mg/L.

Na Etapa IV, novamente, 100% de mortalidade aos organismos foi registrada para amostra afluyente em RLF1, cuja concentração foi de 25,4 mg/L, entretanto, para amostra efluente (2,1 mgLAS/L), registrou-se 20% de mortalidade. Na etapa subsequente (Etapa V) observou-se 20% de mortalidade dos organismos na amostra efluente ao reator RLF1.

Na última fase de operação do reator RLF1 foi observada 100% de mortalidade do macroinvertebrado na amostra afluyente (23,4 mgLAS/L), e observou-se 20% de mortalidade nas amostras efluentes (1,6 mg/L).

No reator RLF2 (Tabela 5.19) verificou-se redução elevada de toxicidade em todas as fases de operação do reator, e de forma semelhante ao reator RLF1, observou-se toxicidade em todas as amostras afluentes, registrando-se 100% de mortalidade para o afluyente em todas as etapas.

Contudo, nas amostras efluentes do reator RLF2, observou-se apenas 10% de mortalidade para os efluentes das Etapas II, III e IV. Nas Etapas V e VI foi observado sobrevida do macroinvertebrado aquático, ou seja, todas as larvas adicionadas permaneceram vivas após 96 horas de contato com o efluente do reator.

É válido ressaltar que nas amostras afluentes, além do LAS, há outros componentes químicos que podem aumentar a toxicidade da água residuária, tais como, compostos plastificantes (ftalatos), disruptores endócrinos (alquilfenóis etoxilados). Compostos como os citados foram encontrados por Braga e Varesche (2014) ao realizarem caracterização de água residuária de lavanderia.

5.9.2. Ensaio Crônico

No ensaio de toxicidade crônica, verificou-se, após 10 dias de incubação, 100% de mortalidade para as larvas de *Chironomus xanthus* nas amostras afluentes de RLF1 e RLF2, contudo, nas amostras efluentes de tais reatores foram verificadas taxas de mortalidades de 40% e 10% respectivamente.

Desta forma, infere-se que as amostras afluentes (água de lavanderia diluída) foram tóxicas ao organismo, todavia, após tratamento por meio dos reatores RLF1 e RLF2 no presente trabalho, observou-se redução da toxicidade em ambos os reatores, sendo de forma mais expressiva no reator com maior TDH de 12 h (RLF2).

De acordo com a composição qualitativa das amostras afluentes e efluentes, verificou-se haver maior abundância de componentes químicos no reator RLF1, endossando a mortalidade de 40%. É importante ressaltar que o composto diisobutil ftalato foi observado na caracterização por GC-EM do efluente do reator RLF1, e este composto apresenta efeitos tóxicos, sendo considerado um desregulador endócrino, o que endossa a mortalidade observada na amostra efluente do referido reator.

Tabela 5.18. Resultados do ensaio ecotoxicológico com o macroinvertebrado *Chironomus xanthus* para o reator RLF1.

Reator de Leito Fluidificado 1						
Etapa	Afluente			Efluente		
	Concentração (mg/L)	Taxa de Mortalidade (%)	Organismos vivos	Concentração (mg/L)	Taxa de Mortalidade (%)	Organismos vivos
II	21,2	100	0	2,8	30	7
III	23,1	100	0	2,0	20	8
IV	25,4	100	0	2,1	20	8
V	22,8	100	0	1,3	20	8
VI	23,4	100	0	1,6	20	8

Tabela 5.19. Resultados do ensaio ecotoxicológico com o macroinvertebrado *Chironomus xanthus* para o reator RLF2.

Reator de Leito Fluidificado 2						
Etapa	Afluente			Efluente		
	Concentração (mg/L)	Taxa de Mortalidade (%)	Organismos vivos	Concentração (mg/L)	Taxa de Mortalidade (%)	Organismos vivos
II	24,3	100	0	0,2	10	9
III	25,0	100	0	0,1	10	9
IV	21,5	100	0	0,2	10	9
V	25,3	100	0	0,1	0	10
VI	26,4	100	0	0,1	0	10

5.10. Diversidade Microbiana dos Reatores de Leito Fluidificado

5.10.1. Análise da Diversidade

Em relação ao perfil de bandas do DGGE para as amostras retiradas durante a operação dos reatores RLF1 (Figura 5.13) e RLF2 (Figura 5.14) verificou-se alterações no padrão de bandas das populações de bactérias em função da condição nutricional.

Observou-se similaridade de 30% entre as bandas do DGGE do inóculo e da biomassa da areia na Etapa I, para o reator RLF1. Provavelmente, ocorreu modificação das populações de bactérias em função da condição nutricional na Etapa I. Deve-se ressaltar que a biomassa usada como inóculo foi proveniente de sistema de lodos ativados de tratamento de esgoto sanitário. Dessa forma, ocorreu restrição nutricional porque na Etapa I os reatores foram alimentados com meio sintético, nitrato e etanol.

Figura 5.13. Dendrograma para Domínio *Bacteria* para o reator RLF1 (TDH 8h): Inóculo= lodos ativados, Etapa I (RLF1: 130 ± 45 mgNO₃⁻L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RLF1: 132 ± 40 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 18,6 mgLAS/L) Etapa III: (RLF1: 88 ± 10 mgNO₃⁻L, 100 mg/L de etanol e 21,3 mgLAS/L); Etapa IV (RLF1: 132 ± 30 mgNO₃⁻L e 21,6 mgLAS/L); Etapa V (RLF1: 100 mg/L de etanol e 21,1 mgLAS/L).

Na análise comparativa das populações de bactérias da areia na Etapa I e Etapa II (início da adição de LAS ao reator) no reator RLF1 (TDH 8 h) observou-se similaridade de 74%. Provavelmente, ocorreu a manutenção das populações após a operação do reator com LAS, em relação aquelas da Etapa I.

Na Etapa III houve redução na concentração afluente de nitrato ao reator RLF1 e tal fato ocasionou modificação nas populações de bactérias, sendo observado

similaridade de 20%, entre as populações da biomassa da areia para a Etapa III em relação à Etapa II.

Quando o co-substrato (etanol) foi retirado da composição do substrato sintético – Etapa IV – verificou-se 34% de similaridade entre as populações de bactérias da biomassa da areia da Etapa IV em comparação à Etapa III (adição de etanol), inferindo desta forma que o co-substrato influenciou na modificação das populações de bactérias.

Quando o nitrato (receptor de elétrons) foi retirado da alimentação do reator na etapa V, observou-se coeficiente de similaridade de 34% entre as populações de bactérias em relação à etapa com adição de nitrato (Etapa IV). Por outro lado, ao se comparar as comunidades microbianas da Etapa V (ausência da adição de nitrato) à Etapa III (redução da concentração afluenta de nitrato) observou-se 55% de similaridade entre as populações de bactérias.

No reator RLF2 (TDH 12h) foi observado percentual de similaridade de 20% entre o inóculo e a biomassa da areia na Etapa I, indicando modificação da biomassa durante o enriquecimento da biomassa para a condição desnitrificante (Etapa I) (Figura 5.14).

Figura 5.14. Dendograma Domínio *Bacteria* para o reator RLF2 (TDH 12 h): Etapa I (RLF2: 140 ± 50 mgNO₃⁻/L e 100 mg/L de etanol), Etapa II (RLF2: 159 ± 43 mgNO₃⁻/L, 100 mg/L de etanol e 19,2 mgLAS/L;) Etapa III: (RLF2: 90 ± 10 mgNO₃⁻/L, 100 mg/L de etanol e 24,6 mgLAS/L); Etapa IV (RLF2: 151 ± 36 mgNO₃⁻/L e 27,1 mgLAS/L); Etapa V (RLF2: 100 mg/L de etanol e 22,1 mgLAS/L); Etapa VI (RLF2: 22,4 mgLAS/L).

Quando da adição de LAS ao reator RLF2, Etapa II, o coeficiente de similaridade foi de 47% se comparado à Etapa I, indicando modificação nas populações de bactérias no reator RLF 2 após a adição do surfactante. Com a redução da concentração de nitrato afluenta na etapa III observou-se similaridade de 79% entre as

populações de bactérias da biomassa da areia da Etapa III em comparação à Etapa II. Por outro lado, quando o etanol (co-substrato) foi excluído da composição do substrato sintético, verificou-se 20% de similaridade entre as populações de bactérias da biomassa da areia na Etapa IV (ausência de etanol) em relação à Etapa III (adição de etanol), endossando que a adição do co-substrato influenciou na modificação das populações.

Quando o nitrato foi retirado da alimentação do reator RLF2 na Etapa V foi observado coeficiente de similaridade de 46% entre a biomassa microbiana da areia da Etapa V em comparação à Etapa IV (adição de nitrato). Sob tais condições ocorreu manutenção de parte das populações em função das condições nutricionais impostas.

Comparando-se a biomassa da areia entre as Etapas V e VI (adição somente de água residuária de lavanderia), a similaridade observada foi de 25%. Provavelmente, ocorreu modificação das populações de bactérias ao longo da operação do reator RLF2, e em função da retirada do etanol da etapa V para etapa VI, ocasionado modificação da comunidade microbiana.

Em suma, foi possível constatar que houve mudança na estrutura da comunidade microbiana em todas as etapas de operação de ambos os reatores, em função da adição de etanol (co-substrato) e nitrato (receptor de elétrons).

5.10.2. Análise Filogenética

Para facilitar a apresentação e discussão dos resultados do sequenciamento em larga escala do gene RNAr 16S, seguiu-se a ordem de acordo com os seguintes itens: 1) Índices ecológicos e estimadores de riqueza; 2) Caracterização microbiana da mesma condição nutricional em função da diferença no TDH (RLF1 = 8 h e RLF2 = 12 h) e 3) Modificação microbiana ocorrida nos reatores à nível taxonômico de família e gênero cada reator em função das diferentes condições nutricionais.

5.10.2.1. Índices Ecológicos e estimadores de riqueza

Por meio do sequenciamento massivo foram obtidas 550.612 sequências do gene RNAr 16S em 13 amostras da biomassa do material suporte dos reatores RLF1(TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) nas 6 etapas de operação, incluindo a caracterização molecular do inóculo proveniente de sistema de lodos ativados (Tabela 5.20).

O maior número de sequencias foi observado para amostras do meio suporte na Etapa III dos reatores RLF1 e RLF2, correspondendo respectivamente a 56.610 e

69.205 sequencias. Foram obtidas entre 722 – 1.893 OTU's, sendo o maior número de OTU's observado para a amostra do inóculo, inferindo grande riqueza de micro-organismos. Notou-se maior número de singletons para a amostra do inóculo (2.808), enquanto o menor número foi observado para a amostra da biomassa do material suporte (MS) do reator RLF2 (TDH 12 h) na Etapa I (722).

A cobertura de Good estima a proporção da comunidade microbiana sequenciada (DELFONO, 2014), desta forma observou-se que todas as amostras possuíram adequada cobertura, sendo este valor entre 94% - 98% para as 13 amostras.

O valor médio das bases obtidas após processamento foi de 456 pares de base (pb), com máxima de 458 pb, e mínima de 453 pb. Vale ressaltar que o tamanho médio do número de pares de bases varia conforme a técnica empregada, bem como sua robustez. Delforno (2014) empregou a técnica de pirosequenciamento para estudo da diversidade microbiana em reatores EGSB utilizados para remoção de LAS, e observou que o tamanho médio das bases foi de 225 pb.

Em relação ao índice Chao1 (estimador de riqueza) verificou-se para o inóculo maior estimativa de riqueza (11.520 ± 1.260 – Tabela 5.21), enquanto a menor estimativa foi observada para a biomassa do reator RLF2 na Etapa I.

Tabela 5.20. Caracterização molecular: número de sequências obtidas para cada amostra dos reatores.

Resultados	Inóculo	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Sequenciamento		RLF1 – Etapa I	RLF2 – Etapa I	RLF1 – Etapa II	RLF2 – Etapa II	RLF1 – Etapa III	RLF2 – Etapa III	RLF1 – Etapa IV	RLF2 – Etapa IV	RLF1 – Etapa V	RLF2 – Etapa V	RLF1 – Etapa VI	RLF2 – Etapa VI
Cobertura de Good (%)	95	97	94	96	97	97	97	97	96	96	97	98	97
Total de Sequencias	55.455	50.965	13.530	30.038	24.009	56.610	69.205	51.743	28.094	39.427	33.441	44.845	53.250
Tamanho da sequência (pb)	457 ± 11	453 ± 11	453 ± 15	457 ± 12	458 ± 14	457 ± 11	454 ± 11	455 ± 14	456 ± 13	458 ± 13	457 ± 15	454 ± 12	455 ± 12
Total de OTU's	4.701	2.843	1.496	1.925	1.597	2.977	3.023	2.992	1.924	2.915	2.043	1.981	2.992
Singletons	2.808	1.557	774	1.070	776	1.613	1.750	1.637	1.081	1.675	1.128	1.050	1.701
Total de OTU's (classificação taxonômica)	1.893	1.286	722	855	821	1.364	1.273	1.355	843	1.240	917	931	1.291

Verificou-se ao longo de 436 dias de operação do reator RLF1 (TDH 8 h) variação do índice Chao1 em função da condição nutricional. Na primeira Etapa (adaptação e enriquecimento da biomassa desnitrificante) a estimativa de riqueza foi de 6.344 ± 1.174 , entretanto, ao adicionar água residuária de lavanderia ao reator o índice observado foi de 4.279 ± 1.133 . Nas etapas seguintes a estimativa de riqueza aumentou (5.847 ± 1.290 - Etapa III, 6.219 ± 1.225 - Etapa IV, 6.153 ± 1.246 - Etapa V), com diminuição na Etapa VI (4.141 ± 1.220) na qual o reator foi alimentado apenas com água residuária de lavanderia diluída, para obtenção de 22 mg/L de LAS.

Por outro lado, para o reator RLF2 (TDH 12h) observou-se baixa estimativa de riqueza na Etapa I (2.875 ± 930). Após adição de água residuária de lavanderia ao reator na Etapa II (2.989 ± 1.123) observou-se aumento gradativo do índice de riqueza até a Etapa III (6.879 ± 1.220). Observou-se neste reator, redução da estimativa de riqueza nas Etapas IV (ausência de etanol - 4.110 ± 1.155) e V (ausência do receptor de elétrons - 4.129 ± 1.138), em contraposição, na Etapa VI (somente com água residuária de lavanderia) a estimativa de riqueza foi 7.042 ± 1.230 .

Em relação ao índice de Shannon verificou-se valor superior a 4,80, inferindo alta diversidade microbiana. Para o inóculo obteve-se alto índice de diversidade (5,8), o que de certa forma era esperado, uma vez que a biomassa utilizada era proveniente de sistema de lodos ativados, com grande riqueza e diversidade de micro-organismos.

Notou-se diminuição do índice de diversidade durante a Etapa I, em ambos os reatores, em relação ao inóculo, provavelmente por ter sido a etapa de enriquecimento e adaptação que pode ter restringido determinadas populações bacterianas. Verificou-se diminuição do índice de diversidade após a adição de água residuária de lavanderia na alimentação dos reatores (4,94) RLF1 e RLF2, contudo, na Etapa VI, verificou-se para o reator RLF2 maior índice de diversidade (5,39).

De forma geral, verificou-se baixo índice de dominância para a biomassa dos reatores RLF1 e RLF2 ao longo da operação e inóculo, inferindo a não predominância de um táxon.

Tabela 5.21. Índices Ecológicos: Estimador de riqueza, diversidade e dominância.

Índices Ecológicos	Inóculo	MS RLF1 – Etapa I	MS RLF2 – Etapa I	MS RLF1 – Etapa II	MS RLF2 – Etapa II	MS RLF1 – Etapa III	MS RLF2 – Etapa III	MS RLF1 – Etapa IV	MS RLF2 – Etapa IV	MS RLF1 – Etapa V	MS RLF2 – Etapa V	MS RLF1 – Etapa VI	MS RLF2 – Etapa VI
Estimativa de Riqueza (Chao1)	11.520 ±1.260	6.344 ±1.174	2.875 ±930	4.279 ±1.133	2.989 ±1.133	5.847 ±1.290	6.879 ±1.220	6.219 ±1.225	4.110 ±1.155	6.153 ±1.246	4.129 ±1.138	4.141 ±1.220	7.042 ±1.230
Diversidade (Shannon-Wiener – H)	5,80 ±0,035	5,54 ±0,034	5,55 ±0,065	5,21 ±0,047	5,28 ±0,052	4,80 ±0,034	4,70 ±0,035	5,12 ±0,038	4,80 ±0,046	5,00 ±0,039	4,70 ±0,042	4,94 ±0,037	5,39 ±0,036
Dominância (D)	0,014 ±0,0002	0,012 ±0,0002	0,012 ±0,0004	0,017 ±0,0003	0,014 ±0,0003	0,041 ±0,0002	0,035 ±0,0002	0,023 ±0,0002	0,032 ±0,0003	0,034 ±0,0002	0,038 ±0,0003	0,023 ±0,0002	0,017 ±0,0002

5.10.2.2. Caracterização filogenética da biomassa do sistema de lodos ativados

A partir da classificação filogenética da biomassa do inóculo obteve-se 92,8%, 51,8% e 20,8% das sequências classificadas à nível de filo, família e gênero, respectivamente. Dentre os filos identificados observou-se 35,7% para Proteobacteria e 23,7% para Bacteroidetes. Para os demais filos observou-se menor abundância relativa, e dentre estes foram identificados representantes pertencentes em 6,7% ao filo SR1; 5,6% ao filo Acidobacteria e 4,2% para Planctomycetes. Para os demais filos obteve-se abundância relativa menor que 4% (Figura 5.15).

As bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria possuem ampla diversidade, sendo que muitas delas estão reportadas como degradadoras de compostos recalcitrantes como hidrocarbonetos e LAS (RABUS et al. 2001; BRENNER et al. 2005).

Oliveira et al. (2013) usaram reator anaeróbio de leito fluidificado, inoculado com lodo de reator UASB, para remoção de LAS padrão. Os autores verificaram por meio da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S que 41,8% dos clones pertenciam ao filo Proteobacteria e 40% ao filo Bacteroidetes. Por outro lado, Delfono et al. (2012) utilizaram reator EGSB para remoção de LAS de água residuária de lavanderia e avaliaram a adaptação prévia da biomassa ao LAS padrão. Os autores observaram, após análise por pirosequenciamento do gene RNAr 16S, predominância de representantes pertencentes ao filo Proteobacteria com abundância relativa entre 20-35%. Estes autores verificaram também que representantes pertencentes ao filo Firmicutes foram abundantes no reator (12-17%). Assim, inferiu-se que no filo Proteobacteria estão incluídos diversos micro-organismos, provavelmente, envolvidos na degradação de compostos recalcitrantes, uma vez que foi verificado pelos autores supracitados que membros deste filo estiveram envolvidos na degradação do tóxico.

Representantes pertencentes ao filo SR1 (6,7%) não são descritos na literatura, apenas um destes teve seu genoma decodificado, e em alguns relatos são abordados sobre os micro-organismos que realizam metabolismo fermentativo, e estão envolvidos na degradação de matéria orgânica complexa (DUEHOLM et al. 2015). As bactérias pertencentes ao filo Acidobacteria (5,6%) são heterotróficas e capazes de metabolizar moléculas como celulose, hemicelulose e quitina, enquanto, alguns representantes são capazes de reduzir nitrato (WARD et al. 2009). O filo Planctomycetes (4,2%) abrange micro-organismos que participam dos ciclos do carbono e nitrogênio, contendo

representantes capazes de realizar a oxidação anaeróbia da amônia (JOGLER et al. 2011).

Delforno et al. (2014) após caracterização molecular, via pirosequenciamento, da biomassa do reator EGSB utilizado para remoção de surfactante de água residuária de lavanderia, identificaram bactérias pertencentes aos filos Acidobacteria e Planctomycetes, com abundância relativa menor que 1%. Em oposição, neste trabalho, observou-se abundância de 5,6% (Acidobacteria) e 4,2% (Planctomycetes) na biomassa usada como inóculo nos reatores RLF1 e RLF2. Entretanto, vale ressaltar que as origens dos inóculos em Delfono et al. (2014) e no presente trabalho foram distintas.

Figura 5.15. Filos identificados para a biomassa inóculo de lodos ativados utilizado para imobilização da biomassa nos reatores RLF1 e RLF2.

Ao todo, na biomassa do inóculo, foram identificados representantes pertencentes a 115 famílias, sendo as mais abundantes, Rhodocyclaceae (13,2%), Chitinophagaceae (10,3%), Ellin6075 (3,1%) e Moraxellaceae (3,0%). Membros da família Rhodocyclaceae apresentam potencial biotecnológico, incluindo a capacidade de degradar compostos halogenados (SONG et al. 2000), além de possuírem representantes que realizam desnitrificação e remoção de fósforo (KALYUZHNYAYA et al. 2006). A família Chitinophagaceae agrupa diversos micro-organismos aeróbios e anaeróbios

facultativos (ROSENBERG, 2014), gram-negativos que podem ser encontrados em ambientes eutróficos (KÄMPFER et al. 2011). A família Moraxellaceae inclui micro-organismos ubíquos e com metabolismo diversificado, agrupando gêneros capazes de produzir biopolímeros e hábeis na detoxificação de áreas poluídas (TEIXEIRA e MERQUIOR, 2014).

Considerando que a abundância relativa mínima do total de sequências foi de 0,04%, foram identificados 38 gêneros para a biomassa do inóculo utilizado nos reatores RLF1 e RLF2. A partir do total de sequências obtidas (55.455 sequências – Tabela 5.20), apenas 20,8% foram identificadas a nível de gênero, sendo *Dechloromonas* (12,5%) o mais abundante. *Kouleothrix* correspondeu a 1,15% das sequências identificadas, seguido de *Novosphingobium* (0,83%), *Opitutus* (0,65%), *Veillonella* (0,57%) e *Bdellovibrio* (0,5%).

Bactérias semelhantes a *Dechloromonas* são reportadas com capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos (CHAKRABORTY et al. 2005). Bactérias semelhantes a esse gênero foram identificadas em diversos trabalhos de remoção de LAS em reatores biológicos (DELFORNO et al. 2014; MACEDO et al. 2015,), realizam respiração anóxica e estão presentes em diversos ecossistemas (BRENNER et al. 2005). *Kouleothrix* é um microorganismo filamentosso encontrado em lodos ativados e que pode desencadear o fenômeno conhecido como *bulking* filamentosso (SAUNDERS et al. 2016). Entretanto, foi identificado em menor abundância na biomassa de lodos ativados (OEHMEN et al. 2010).

Novosphingobium são micro-organismos aeróbios estritos, heterotróficos e capazes de reduzir nitrato (TAKEUCHI et al. 2001), já foram encontrados em ambientes contaminados por compostos xenobióticos, como por exemplo, pentaclorofenóis (TIIROLA et al. (2001). A presença deste microorganismo corrobora com as características do inóculo, uma vez que este foi coletado de tanque de aeração em processos de lodos ativados.

Opitutus é um gênero que compreende micro-organismos anaeróbios, capazes de crescer na presença de mono e dissacarídeos e que promovem a redução do nitrato a nitrito (SHIN et al. 2001). Esse gênero tem sido relatado em trabalhos que utilizaram reatores biológicos para remoção de LAS (OLIVEIRA, 2010; DELFORNO, 2014). *Veillonella* é um micro-organismo anaeróbio capaz de utilizar acetato e piruvato como fonte de carbono, e tem sido identificado em grânulos anaeróbios (SLOBODKIN e

VERSTRAETE, 1993), e em lodos ativados usado no tratamento de efluentes com fármacos (SHIU et al. 2013). *Bdellovibrio* é um micro-organismo aeróbio que parasita bactérias Gram-negativas, sendo comumente encontrado em lodos ativados (DIAS e BHAT, 1965).

Nannocystis, *Streptococcus* e *Zoogloea* foram identificados em abundância relativa de 0,44%, 0,44% e 0,43%, respectivamente. Esses micro-organismos são encontrados em sistemas de lodos ativados (KIM et al. 2013), sendo *Zoogloea* capaz de reduzir nitrogênio.

De forma geral, os micro-organismos identificados no inóculo dos reatores de leite fluidificado são característicos de sistemas de tratamento de efluentes contaminados, uma vez que a diversidade encontrada aponta diversos representantes identificados em pesquisas com recalcitrantes e compostos aromáticos. Na Figura 5.16 estão ilustrados os gêneros identificados em abundância relativa menor que 1% e que se encontram relacionados à degradação de compostos aromáticos.

Figura 5.16. Gêneros identificados no inóculo de lodos ativados em abundância relativa menor que 1% e que apresentam potencial biotecnológico.

5.10.2.3. Caracterização microbiana da Etapa I dos reatores RLF1 e RLF2

Na Etapa I, realizou-se a adaptação e enriquecimento de micro-organismos desnitrificantes ao substrato sintético com adição de 100 mg/L de etanol em ambos os reatores e 130 ± 45 mgNO₃⁻/L em RLF1 e 140 ± 50 mgNO₃⁻/L em RLF2. As sequências obtidas para amostras do reator RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h) na Etapa I foram identificadas em nível de filo em 98% e 99,5%, respectivamente. Em nível de família, 83% (RLF1) e 81,3% (RLF2) foram identificadas, e em nível de gênero, 53,7% e 34,8% das sequências foram identificadas em RLF1 e RLF2, respectivamente.

Em relação a filo (Figura 5.17), no reator RLF1, Proteobacteria (45,5%) foi o mais abundante, em oposição ao reator RLF2, cujo filo mais abundante foi Bacteroidetes (38,3%). Contudo, representantes pertencentes ao filo Proteobacteria foram identificados em 32,3% das sequências no reator RLF2. Cabe ressaltar que no inóculo utilizado para imobilização da biomassa representantes pertencentes ao filo Proteobacteria foram identificados em abundância relativa de 35,7% e para o filo Bacteroidetes em 23,3%.

Figura 5.17. Filos identificados na Etapa I dos reatores fluidificados RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) e inóculo.

Para os representantes pertencentes ao filo Acidobacteria observou-se aumento da abundância relativa em ambos os reatores. No inóculo, este filo foi identificado em 5,6% das sequencias, e na Etapa I foi identificado em 11,3% para o reator RLF1 e 13,3% para o reator RLF2. Adicionalmente, notou-se que houve redução na abundância para o filo Planctomycetes (4,2% - inóculo) que foi identificado em 0,37% (RLF1) e 0,58% (RLF2).

Foram identificadas 83 famílias no reator RLF1 e 66 para o reator RLF2. Sendo os representantes pertencentes a família Chitinophagaceae predominantes em ambos os reatores, com abundância relativa de 21,3% e 18,2%, respectivamente. Representantes pertencentes a família Rhodocyclaceae foram identificados em 10,5% das sequencias em RLF1 e em 5,0% em RLF2. A Figura 5.18 ilustra a modificação à nível de família do inóculo para a biomassa do meio suporte dos reatores RLF1 e RLF2 na Etapa I.

Observou-se redução nos representantes da família Moraxellaceae, em ambos os reatores, de 3,0% no inóculo para 0,3% no reator RLF1 e 0,01% no reator RLF2. Contrariamente, para família Sphingomonadaceae verificou-se aumento na abundância relativa de 1,9% no inóculo para 5,0% em RLF1 e 4,8% em RLF2.

Figura 5.18. Modificação das populações de bactérias em nível de família nos reatores RLF1 e RLF2 em relação ao inóculo.

Observou-se modificações nas populações de bactérias em nível de família, em ambos os reatores, se comparados ao inóculo utilizado para imobilização da biomassa. Desta forma, a condição nutricional estabelecida nesta etapa favoreceu determinados grupos bacterianos, possivelmente, aqueles capazes de consumir etanol como fonte de carbono e capazes de reduzir o nitrogênio, uma vez que se verificou elevada remoção de matéria orgânica nos reatores RLF1 ($89\pm 6\%$) e RLF2 ($95\pm 3\%$), bem como remoção de nitrato de $97,5\pm 3\%$ em RLF1 e $96\pm 4\%$ em RLF2.

Em relação aos gêneros identificados verificou-se que em RLF1 46,3% das sequências não foram classificadas, enquanto em RLF2 este percentual foi de 65,2%. Por outro lado, identificou-se bactérias pertencentes a 107 e 63 gêneros no reator RLF1 e RLF2, respectivamente. Dentre os gêneros mais abundantes nos reatores observou-se *Sediminibacterium* (12%), *Zoogloea* (7,2%) e *Pseudoxanthomonas* (6,1%) para o reator RLF1, enquanto no RLF2 foram identificados *Flavobacterium* (9%), *Bdellovibrio* (4,5%) e *Zoogloea* (3,6%).

A fim de avaliar a influência do TDH na dinâmica populacional dos micro-organismos dos reatores utilizou-se o Diagrama de Venn para verificar quantas OTU's foram compartilhadas entre as biomassas dos reatores. Desta forma, na Figura 5.19 está ilustrada a quantidade de OTU's compartilhadas entre as amostras da Etapa I de ambos os reatores e aquela proveniente do inóculo.

Observou-se que 4,7% dos gêneros identificados foram compartilhados entre as amostras dos reatores e inóculo, e que apenas 14,2% dos gêneros foram compartilhados entre os reatores RLF1 (8 horas) e RLF2 (12 horas), inferindo que o TDH influenciou na população microbiana.

Figura 5.19. Diagrama de Venn em relação a presença de gêneros em função das OTU's do inóculo e dos reatores RLF1 e RLF2 na Etapa I.

Bactérias semelhantes a *Sediminibacterium* (12%) foram identificadas no reator RLF1. São micro-organismos aeróbios (KIM et al. 2013), desprovidos da capacidade de reduzir nitrato e nitrito, entretanto, utilizam ampla diversidade de álcoois e ácidos orgânicos para crescimento celular, justificando a presença deste gênero no reator devido a presença de etanol na composição do substrato sintético. Este gênero foi identificado na biomassa do reator RLF2, em menor número de sequências, totalizando 1,5% em abundância relativa. Provavelmente, as diferenças de abundância de tal gênero nos reatores, ocorreu devido ao TDH empregado nos reatores, de 8 horas em RLF1 e 12 horas no RLF2, assim a velocidade ascensional, ocasionada devido a recirculação e vazão de alimentação, pode ter exercido pressão sobre modificação bacteriana nos sistemas.

Representantes do gênero *Zoogloea* foram identificados em ambos os reatores RLF1 (7,2%) e RLF2 (4,6%). São micro-organismos capazes de utilizar uma variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e utilizam nitrato como receptor de elétrons (BRENNER et al. 2005). Vale ressaltar que esses micro-organismos já foram identificados em reatores anaeróbios para remoção de LAS (OKADA, 2012).

Bactérias semelhantes a *Pseudoxanthomonas* foram identificadas em RLF1 (6,1%) e RLF2 (1,7%). São micro-organismos capazes de utilizar açúcares simples como fonte de carbono e nitrato como receptor de elétrons (BRENNER et al. 2005). A presença de etanol (álcool de cadeia curta) e nitrato, provavelmente favoreceram a presença de tal gênero nos reatores de leito fluidificado.

Representantes do gênero *Flavobacterium* (0,6% - RLF1; 9% - RLF2) são capazes de utilizar nitrato como receptor de elétrons e diversos açúcares para crescimento celular. São anaeróbios facultativos, existindo espécies exclusivamente aeróbias, que crescem na faixa de temperatura entre 20 – 30°C (BRENNER et al. 2005, ROSENBERG, 2014).

Sequências semelhantes a *Bdellovibrio* foram identificadas em ambos os reatores RLF1 (2,4%) e RLF2 (4,5%), são micro-organismos aeróbios que parasitam células de outras bactérias, especificamente no espaço periplasmático. São capazes de utilizar compostos orgânicos presentes no periplasma das bactérias parasitadas (BRENNER et al. 2005).

Dentre os 107 e 63 gêneros identificados em RLF1 e RLF2 obteve-se, em comum nas duas amostras, 56 gêneros, sendo os mais abundantes descritos na Tabela 5.22 e Figura 5.20). Dentre os representantes mais abundantes, 15 deles são capazes de realizar respiração anóxica.

Tabela 5.22. Características metabólicas dos representantes em comum nos reatores RLF1 e RLF2. (Continua)

<i>Gêneros</i>	<i>Redução do nitrato</i>	<i>Utilização de etanol</i>	<i>Ocorrência</i>	<i>Referência</i>
<i>Acidovorax</i>	+	-	Sistema de tratamento de esgoto	Willems et al. (1992), Heylen et al. (2008)
<i>Azospirillum</i>	+	+	Solo, raízes, áreas contaminadas com óleo	Lin et al. (2009)
<i>Bdellovibrio</i>	-	+	Solo, esgoto, água contaminada com BTEX	Brenner et al. (2005), Okada (2012)
<i>Cloacibacterium</i>	+	-	Águas residuárias não tratadas	Allen et al. (2006) -
<i>Dechloromonas</i>	+	+	Sistemas de lodos ativados, reatores anaeróbios fluidificados de tratamento de água de lavanderia	Brenner et al. (2005), Macedo et al. (2015)
<i>Dokdonella</i>	-	+	Solo	Yoo et al. (2009)
<i>Flavobacterium</i>	+	+	Solo, água fresca e grande variedade de ambientes	Duarte et al. (2010); Krieg et al. (2010); Parte et al. (2010)
<i>Magnetospirillum</i>	+	+	Ambientes aquáticos, sedimentos, biorreator (tolueno)	Brenner et al. 2005, Meyer et al. (2013)
<i>Methyloversatilis</i>	+	+	Solo contaminado	Lu (2012); Doronina et al. (2014)
<i>Mycobacterium</i>	+	+	Solo, pântanos, águas superficiais, subterrâneas e água do mar	Schulze-Röbbecke (1993); Sohaskei, Modesti (2009)
<i>Phenylobacterium</i>	+	+	Parte aeróbica superior do solo	Dworki et al. (2006)
<i>Prostheco bacter</i>	+	+	Água doce, lodos ativados, ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes	Lee et al. (2014)
<i>Pseudoxanthomonas</i>	+	+	Adubo, filtros biológicos, solo, lodo	Weon et al. (2006)

Continuação Tabela 5.22

<i>Sediminibacterium</i>	+	-	RALF (LAS)	Oliveira et al. (2010)
<i>Sphingobium</i>	+	+	Solos contaminados e biorreatores (pentaclorofenol)	Takeuchi et al. (2001), Zilouei et al. (2008), Chen et al. (2013)
<i>Xanthobacter</i>	+	+	Solo, sedimentos marinhos, água e sedimentos de lagos de água doce, águas residuárias	Saéz et al. (2006)
<i>Zoogloea</i>	+	+	Sistemas de Lodos Ativados, Reatores de Leito Fluidificado de tratamento de LAS	Rosenberg et al. 2014, Okada et al. 2014.

(+): positivo, (-) negativo.

Figura 5.20. Gêneros identificados nos reatores RLF1 e RFLF2 e que apresentaram abundância relativa abaixo de 5%.

5.10.2.4. Caracterização microbiana da Etapa II dos reatores RLF1 e RLF2

Na Etapa II de operação dos reatores houve adição de água residuária de lavanderia diluída para 18 ± 4 mgLAS/L (RLF1) e 19 ± 5 mgLAS/L (RLF2). Nessa etapa foram identificadas em nível de filo, 99,3% das sequencias em RLF1 e 99,5% em RLF2. Os sete filos mais abundantes (Figura 5.21) em ambos os reatores foram os seguintes: Proteobacteria (38,6 – 39,6%), Acidobacteria (7,2 – 15%), Bacteroidetes (13,6 – 27,6%), Chlorobi (9,1 – 10,4%) Armatimonadetes (4,9 – 5,5%), Chloroflexi (2,5 – 5,3%) e Firmicutes (3,4 – 4,2%).

Bactérias pertencentes a Proteobacteria tem sido relatadas em trabalhos com reatores biológicos para remoção de compostos tóxicos (ROSENBERG et al., 2014), surfactante não iônico (MOTTERAN, 2013), e LAS (DELFORNO et al. 2014, BRAGA et al. 2015). Este filo agrupa mais de 500 gêneros de bactérias implicando em grande diversidade metabólica (BRENNER et al. 2005).

O filo *Acidobacteria* possui representantes em diversos habitats que crescem em temperatura mesofílica (25 – 30°C), utilizam oxigênio como receptor de elétrons, mas há gêneros que utilizam nitrato e ferro (BRENNER et al. 2005). São capazes de consumir ácidos orgânicos como acetato, propionato, lactato, bem como utilizam aminoácidos (ROSENBERG et al. 2014).

Figura 5.21. Filos identificados nos reatores RLF1 e RLF2 com abundância relativa maior a 2,5%.

Braga (2014) ao realizar a caracterização microbiana de reator anaeróbico de leito fluidificado utilizado na remoção de LAS de água residuária de lavanderia, observou na Etapa IV (21,7 mgLAS/L, TDH 23 horas, sacarose – co-substrato) a predominância de bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria* (83%) na biomassa do meio suporte, enquanto, aquelas pertencentes ao filo *Acidobacteria* estiveram em menor abundância (0,7%). Provavelmente, as diferenças entre as composições da microbiota no reator da referida autora e nesta pesquisa, em nível de filo, deva-se a origem do inóculo utilizado nos sistemas; ou seja, de lodo anaeróbico de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura e inóculo de lodos ativados, respectivamente. Adicionalmente, a constituição do substrato sintético específica de cada reator, além do favorecimento de metabolismos específicos, respectivamente, anaeróbico e anóxico, reforçam a dinâmica diferenciada dos filos encontrados.

O filo Bacteroidetes (13,6% - RLF1; 27,6% - RLF2) é um grupo fenotipicamente diverso de bactérias gram-negativas não formadoras de endósporos que agrupam micro-organismos anaeróbios e anaeróbios facultativos, que crescem em temperaturas mesofílicas (ROSENBERG et al. 2014).

Em nível de família (Figura 5.22), observou-se mudanças em relação a Etapa anterior, na qual representantes pertencentes a família Chitinophagaceae estiveram predominantes em RLF1 (21,3%) e RLF2 (18,2%) durante a Etapa I. Durante a Etapa II, a abundância relativa de representantes pertencentes a família Chitinophagaceae decresceu para 4,8% e 6,3%, respectivamente. Contrariamente, a família Rhodocyclaceae foi mais abundante nos reatores RLF1 e RLF2, se comparados a etapa anterior, onde em abundância relativa equivalia a 10,5% e 5%, e após adição de LAS aos reatores (Etapa II), o número de sequências semelhantes à família passaram a valores de 15,8% e 12,7%, em RLF1 e RLF2, respectivamente.

Figura 5.22. Famílias identificadas na Etapa II dos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h).

Representantes pertencentes a família Fimbriimonadaceae foram observados nos dois reatores em 5,5% (RLF1) e 4,8% (RLF2). Cabe ressaltar que na etapa anterior (enriquecimento e adaptação) a abundância relativa desta família para os reatores foi de 0,04% e 1,4%, respectivamente. A adição de água residuária de lavanderia na alimentação dos reatores, aparentemente, favoreceu o crescimento de bactérias pertencentes à esta família.

Membros da família Comamonadaceae foram identificados em RLF1 (4,6%) e RLF2 (5,7%) em abundância superior à etapa anterior, especificamente em RLF2, onde a abundância relativa na etapa de adaptação foi de 2,1%.

Macedo et al. (2015) utilizaram a técnica de *Ion Torrent* para sequenciamento e identificação da comunidade microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado utilizado para remoção de LAS, com sacarose e etanol como co-substratos. Os autores observaram na etapa com etanol e sacarose, como fonte suplementar de carbono, que representantes pertencentes a família Comamonadaceae (46,59%) foram predominantes. Contudo, observaram redução na abundância relativa (2,41%) para esta família, quando apenas etanol foi utilizado, havendo substituição pela família Rhodocyclaceae (88,7%). Similarmente, na Etapa II desta pesquisa, em ambos os reatores RLF1 e RLF2, quando da adição de água residuária de lavanderia e presença de etanol como co-substrato, a família Rhodocyclaceae foi a mais abundante, de 15,8% e 12,7%, respectivamente. Membros da família Rhodocyclaceae têm sido relatados em pesquisas com remoção de LAS (OKADA et al. 2014, CAROSIA et al. 2014).

Braga (2014) ao caracterizar a biomassa da areia de reator anaeróbio de leito fluidificado utilizado na remoção de surfactante, verificou que a família mais abundante foi Desulfobulbaceae (58,5%), seguida por Rhodocyclaceae (22,38%). Na família Rhodocyclaceae estão incluídos micro-organismos capazes de degradar moléculas de tolueno e hidrocarbonetos aromáticos. Membros das famílias acima citadas foram observados também em reatores biológicos para remoção de LAS em água residuária de lavanderia (OKADA et al. 2014, BRAGA et al. 2015). A família Desulfobulbaceae foi observada nos reatores RLF1 e RLF2 em abundância relativa de 0,4%.

A família Flavobacteriaceae foi abundante em RLF2 (6,8%), entretanto, em RLF1 (0,7%) a presença de membros desta família não foi expressiva. Em RLF1, as famílias mais predominantes foram Rhodocyclaceae (15,8%), Ellin6075 (14%) e Fimbriimonadaceae (5,5%).

Em nível taxonômico de gênero observou-se que 66,2% (RLF1) e 55,6% (RLF2) das sequências não foram classificadas. Foram identificados 86 gêneros em RLF1 e 93 gêneros em RLF2 e dentre os identificados 71 deles estiveram em comum entre ambos os reatores, contudo, representando 39% das OTUs observadas. Sob tais condições pode-se inferir que a aplicação de TDH diferentes exerceu pressão seletiva sobre a dinâmica de bactérias no biofilme dos reatores (Figura 5.23 e 5.24). Na Tabela 5.23 estão listados os 20 gêneros mais abundantes e em comum nos reatores RLF1 e RLF2.

Figura 5.23. Diagrama de Venn da presença e ausência de OTUs nos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h).

Figura 5.24. Gêneros identificados nos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) para a Etapa II.

Bactérias semelhantes a *Acidaminobacter* são mesofílicas, anaeróbias estritas, que utilizam aminoácidos como fonte de energia, crescem em ambientes com sulfato, e tem seu crescimento estimulado por bactérias hidrogenotróficas (BRENNER et al. 2005), e tem sido identificadas em ambientes contaminados por hidrocarbonetos aromáticos (CHANG et al. 2005; PADRON, 2013). A identificação dessas bactérias nos reatores RLF1 (1,28%) e RLF2 (0,75%) foi associada a presença de sulfato na composição do meio sintético e da água residuária de lavanderia (92,5 mg/L de sulfato). Além disso, vale ressaltar que a molécula de LAS possui grupamento sulfônico, o qual pode ser utilizado pelos micro-organismo para crescimento celular.

Representantes do gênero *Bdellovibrio* são micro-organismos aeróbios e predam obrigatoriamente bactérias gram-negativas (ROSENBERG et al., 2014), assim a identificação deste gênero nos reatores RLF1 (2,1%) e RLF2 (1,89%), provavelmente, esteja relacionada a presença de bactérias gram-negativas e protozoários oriundo do inóculo (lodos ativados).

Bactérias semelhantes a *Cloacibacterium* foram identificadas em RLF1 (2,24%) e RLF2 (4,17%). São micro-organismos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não móveis, e crescem em temperatura de 30°C, não são capazes de reduzir nitrato,

entretanto podem utilizar etanol como fonte de carbono. *Cloacibacterium* foi identificado em áreas contaminadas por naftaleno, águas contaminadas por petróleo (JURELEVICIUS et al. 2013, CERQUEIRA et al. 2012) e não há nenhum relato na literatura sobre sua presença em reatores biológicos com LAS. Provavelmente, representantes semelhantes a esse gênero foram favorecidas pela adição do etanol na alimentação dos reatores.

Sequências semelhantes a *Dechloromonas* foram identificadas em RLF1 (0,90%) e RLF2 (2,24%). São bactérias facultativas, capazes de utilizar o etanol como fonte de carbono e nitrato como receptor de elétrons; e muitas espécies são hábeis na degradação de compostos aromáticos e surfactantes, como o LAS (DELFORNO, 2014; MACEDO et al. 2015).

Pseudomonas foram identificadas em ambos os reatores em abundância relativa de 2,9% e 3,98%, respectivamente em RLF1 e RLF2. Esse gênero é considerado versátil e capaz de crescer em ambientes contaminados com petróleo, hidrocarbonetos aromáticos e LAS (CERQUEIRA et al. 2012; DELFORNO et al. 2015). São micro-organismos capazes de utilizar etanol e de reduzir nitrato (BRENNER et al. 2005). Desta forma, a identificação de *Dechloromonas* e *Pseudomonas* nos reatores pode ter sido favorecida pela presença de etanol e nitrato no substrato sintético, bem como pela presença de LAS oriundo da água residuária de lavanderia. Vale ressaltar que elevados percentuais de matéria orgânica, nitrato e LAS foram observados nesta Etapa II, endossando ainda mais a participação dos micro-organismos citados.

Zoogloea são micro-organismos facultativos capazes de realizar a desnitrificação levando nitrato à N_2 (BRENNER et al. 2005), e na presença de ácidos orgânicos acumulam material de reserva na forma de grânulos de poli- β -hidroxibutirato. Crescem em pH 7 a 7,5, temperatura mesofílica, são micro-organismos heterotróficos capazes de utilizarem ácidos orgânicos, álcoois, benzeno, e tolueno como fonte de carbono (ROSENBERG et al. 2014). Okada et al. (2014) utilizaram reator UASB para remoção de LAS de água de lavanderia, e na caracterização bacteriana da biomassa da manta de lodo, e biomassa do separador de fases, identificaram tais bactérias em 0,31% e 22%, respectivamente. *Zoogloea* tem sido identificada em diversas configurações reacionais para remoção de LAS (MACEDO et al. 2015, BRAGA et al. 2015, DELFORNO et al. 2015) e nesta pesquisa foi identificada em abundância de 9,97% e 7,5% em RLF1 e RLF2, respectivamente.

Bactérias semelhantes à *Sphingobium* foram identificadas em RLF1 (2,12%) e RLF2 (2,17%). São micro-organismos aeróbios, acumuladores de poli- β -hidroxibutirato, crescem em temperatura ótima de 30°C, reduzem nitrato e utilizam ácidos orgânicos e carboidratos simples como fonte de carbono (LIANG e LLOYDE-JONES, 2010). São micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos, bifenilas policloradas (ROY et al. 2013) e já foram identificados em reatores biológicos usados na degradação de alquilfenóis (LOZADA et al. 2006) e nonilfenol etoxilado (GABRIEL et al. 2007), e identificadas em biomassa de lodos ativados. Desta forma, a presença deste micro-organismo nos reatores é justificada pela sua capacidade de utilizar nitrato e degradar surfactante.

Membros do gênero *Flavobacterium* foram identificados em ambos os reatores, entretanto, em maior abundância em RLF2 (6,85%), enquanto em RLF1 foi identificado em 0,69% das sequencias. São micro-organismos aeróbios, gram-negativos, capazes de reduzir nitrato a nitrito e capaz de utilizar açúcares simples, para crescimento celular (ROSENBERG et al. 2014). Esse gênero já foi identificado em ensaios de biodegradabilidade de shampoos e surfactantes não-iônicos em 10% das sequencias (OKPOKWASILI et al. 1991) e isolado de ambientes lênticos (BRENNER et al. 2005).

Bactérias semelhantes a *Pseudomonas* foram identificadas em RLF1 (2,9%) e RLF2 (3,98%). Agrupam micro-organismos metabolicamente versáteis, capazes de reduzir nitrato a N_2 , utilizam etanol como fonte de carbono (BRENNER et al. 2005), e são capazes de degradar moléculas recalcitrantes (MAKI et al. 1994).

Na Tabela 5.23 estão incluídas as características metabólicas dos representantes mais abundantes na Etapa II dos reatores RLF1 e RLF2.

Tabela 5.23. Características metabólicas dos representantes mais abundantes na Etapa II dos reatores RLF1 e RLF2. (Continua)

<i>Gêneros</i>	<i>Utilização de nitrato ou amônio</i>	<i>Consumo ácidos orgânicos</i>	<i>Degradação de LAS</i>	<i>Degradação de aromático</i>	<i>Referência</i>
<i>Acidaminobacter</i>	+(N)	+	-	-	Dworkin et al. (2006)
<i>Anaerovorax</i>	-	+	+	-	Whitman et al. (2005); Duarte (2008)
<i>Bdellovibrio</i>	+(A)	-	-	+	Starr et al. (1981)
<i>Cloacibacterium</i>	-(N)	+	-	-	Parte et al. (2010)
<i>Dechloromonas</i>	+(N)	+	+	+	Achenbach et al. (2001); Brenner et al. (2005)
<i>Desulfobulbus</i>	+(N)	+	+	+	Brenner et al. (2005); Garrity et al. (2005)
<i>Flavobacterium</i>	+(A); +(N)*	+	-	+	Steiert et al. (1987) Duarte et al. (2010)

Continuação da Tabela 5.23

<i>Hydrogenophaga</i>	+(N)	+	+	+	Dangmann et al. (1989); Brenner et al. (2005)
<i>Methyloversatilis</i>	+(N)*	+			Lu (2012)
<i>Phenylobacterium</i>	+(A)			+	Brenner et al. (2005)
<i>Planctomyces</i>	+(A); +(N)	+			Krieg et al. (2010)
<i>Pseudomonas</i>	+(A); +(N)*		+	+	Brenner et al. (2005)
<i>Sphingobium</i>	+(N)*	+		+	Rosenberg et al. (2014A)
<i>Sulfurospirillum</i>	+(A)			+	Garrity et al. (2005); Rosenberg et al. (2014)
<i>Zoogloea</i>	+(A); +(N)	+	+	+	Rosenberg et al. (2014)

(+N): positivo para consumo de nitrato; (+A): positivo para consumo de amônio; (-) negativo; (+) positivo.

5.10.2.5. Caracterização microbiana da Etapa III dos reatores RLF1 e RLF2

Na Etapa III de operação dos reatores de leito fluidificado a concentração de nitrato foi reduzida de 132 ± 10 mg/L para 88 ± 10 mg/L e de 159 ± 43 mg/L para 90 ± 10 mg/L, respectivamente, em RLF1 e RLF2. A partir dessas condições observou-se acentuada modificação nas populações de bactérias. As sequências obtidas em RLF1 (56.610) e em RLF2 (69.205) foram 99,2% e 98,4% classificadas em filos, respectivamente, sendo verificado o filo Proteobacteria o mais abundante em ambos os reatores; ou seja, de 64,7% e 40,6%, respectivamente para RLF1 e RLF2 (Figura 5.25).

Para representantes do filo Bacteroidetes obteve-se 27,3% e 10,1% das sequências em RLF1 e RLF2, respectivamente. É importante ressaltar que na etapa II verificou-se 13,6% e 27,6% em abundância relativa para representantes pertencentes ao filo Bacteroidetes em RLF1 e RLF2, respectivamente. Desse modo, pode-se inferir que a alteração da abundância relativa foi em função da redução da concentração de nitrato afluente aos reatores, em relação a este filo. Por sua vez, obteve-se para representantes pertencentes ao filo Acidobacteria 2,2% (RLF1) e 23,5% (RLF2) das sequências identificadas.

Verificou-se que 1,1% e 7,2% das sequências identificadas em RLF1 e RLF2, respectivamente foram incluídas no filo Chlorobi, enquanto 0,3% e 5,9% foram incluídas no filo Armatimonadetes, respectivamente.

Figura 5.25. Filos abundantes na Etapa III dos reatores de leito fluidificado RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).

Em nível de família, 84% das sequencias foram classificadas em RLF1 e 60% em RLF2. As famílias mais abundantes em RLF1 (Figura 5.26) foram: *Helicobacteraceae* (17,9%), *Rhodocyclaceae* (14,6%), *Hyphomonadaceae* (7,3%), *Flavobacteriaceae* (6,9%), *Weeksellaceae* (6,5%) e *Desulfobulbaceae* (5,4%). Em RLF2 (Figure 5.27) as famílias mais abundantes foram: *Ellin6075* (22,5%), *Rhodocyclaceae* (6,6%) e *Fimbriimonadaceae* (5,9%).

Para a Etapa III observou-se aumento expressivo de representantes pertencentes a família *Helicobacteraceae* em RLF1 (17,9%) em comparação com a etapa anterior (Etapa II) cuja abundância relativa foi de 0,25%.

Membros da família *Helicobacteraceae* são micro-organismos gram-negativos de metabolismo heterotrófico que crescem em ambientes de microaerofilia (BRENNER et al. 2005), alguns representantes são capazes de reduzir nitrato e outros apresentam requerimentos específicos para crescimento (ROSENBERG et al. 2014). Membros desta família foram isolados de sedimentos, rios, águas termais, e em ambientes com enxofre (PILLONI et al. 2011), também foram encontrados em reatores anaeróbios utilizados para degradação de petróleo bruto em condição sulfato redutora (SHERRY et al. 2011). A presença de sulfato na composição do meio sintético e na água residuária de lavanderia, bem como a adição de nitrato ao reator, provavelmente colaboraram para a presença de representantes desta família em RLF1.

Observou-se em RLF1 que para família *Hyphomonadaceae* houve aumento na abundância relativa da Etapa II (0,5%) para Etapa III (7,3%). São micro-organismos aeróbios, capazes de reduzir nitrato e crescem em temperatura na faixa de 20-30°C. São muito encontrados em ambientes salinos e ambientes oligotróficos (ROSENBERG et al. 2014). Estão associados com a degradação de resíduos sólidos orgânicos (TRZCINSKI et al. 2010), bem como são hábeis em degradar compostos orgânicos xenobióticos. A presença de membros desta família no reator, possivelmente está associada à presença de nitrato na composição do substrato sintético.

Em RLF2, observou-se aumento da abundância relativa de membros da família *Ellin6075* de 0,56% (Etapa II) para 22,5% na Etapa III. Atualmente, sabe-se pouco sobre a família *Ellin6075*, entretanto, fazem parte dela micro-organismos aeróbios, de metabolismo heterotrófico, que crescem em temperaturas mesofílicas e podem usar carboidratos complexos como fonte de carbono. A família *Ellin6075* pertence ao filo

Acidobacteria e este esteve em elevada abundância relativa no reator RLF2 (23,5%) na Etapa III.

A família Fimbriimonadaceae identificada em RLF2 em abundância relativa de 5,9% agrupa micro-organismos mesofílicos, gram-negativos, capazes de utilizar diversos ácidos orgânicos como fonte de carbono e utilizam etanol e metanol (ROSENBERG et al. 2014).

Figura 5.26. Distribuição das sequências em nível de família na Etapa III dos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h).

Em nível de gênero, observou-se que 48,3% (RLF1) e 23% (RLF2) das sequências foram classificadas. Na Etapa III foram identificados 105 gêneros em RLF1 e 88 para RLF2, e dentre estes, 64 gêneros estiveram compartilhados em ambos os reatores.

É importante salientar que nesta etapa foram observadas 2.265 OTUs e destas, 373 estiveram compartilhadas em ambos os reatores representando 16,5% do total, inferindo que houve diferenças entre as comunidades bacterianas de RLF1 e RLF2, em função do tempo de detenção hidráulica de 8 e 12 horas, respectivamente (Figura 5.27).

Em RLF1, os 6 gêneros mais abundantes foram os seguintes: *Cloacibacterium* (6,4%), *Dechloromonas* (7,4%), *Desulfobulbus* (5,4%), *Flavobacterium* (6,9%), *Geobacter* (3,3%) e *Zoogloea* (4,2%). Por outro lado, em RLF2, os gêneros mais abundantes foram os seguintes: *Bdellovibrio* (1,2%), *Deinococcus* (1,9%), *Cloacibacterium* (1,4%), *Methyloversatilis* (1,8%), *Sphingobium* (0,9%), *Zoogloea* (3,5%). A Figura 5.28 ilustra os gêneros mais abundantes identificados em ambos os reatores.

Figura 5.27. Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros nos reatores RLF1 e RLF2.

Geobacter (3,3% - RLF1, 0,075% - RLF2) está associado diretamente com a degradação de LAS, pois é micro-organismo com capacidade de utilizar moléculas aromáticas (tolueno, benzeno), e realizar beta-oxidação, sendo este uma das etapas da reação de degradação do LAS (BRENNER et al. 2005). São bactérias anóxicas, com capacidade de utilizar o nitrato como receptor de elétrons, entretanto, reduzindo-o a amônio. Podem utilizar ferro, enxofre, fumarato e outros ácidos como receptores de elétrons, e a maioria das espécies são capazes de utilizar o etanol como fonte de carbono. São organismos frequentemente encontrados em ambientes ferro-redutores, sedimentos de rios e em ambientes ácidos (LOVLEY et al. 2011). Destaca-se que são micro-organismos com potencial biotecnológico para aplicação em áreas contaminadas

por compostos clorados, por hidrocarbonetos aromáticos e em áreas contaminadas por metais (ROSENBERG et al. 2014).

Membros do gênero *Desulfobulbus* foram identificados em RLF1 (5,4%) e em RLF2 (0,12%), são micro-organismos anaeróbios, sulfato redutores, predominantemente heterotróficos, encontrados em diversos ambientes (BRENNER et al. 2005). Utilizam piruvato, álcoois, H₂, e lactato como doadores de elétrons, sendo receptores de elétrons moléculas de tiosulfato sulfato e sulfeto (ROSENBERG et al. 2014). Esse gênero possui mecanismo enzimático para clivagem de moléculas aromáticas, podendo favorecer a degradação de LAS (DELFORNO et al. 2014). Delforno et al. (2014) avaliaram a adaptação da biomassa na degradação de LAS de água residuária de lavanderia em reatores EGSB e verificaram que no reator cuja biomassa foi adaptada previamente com LAS padrão, bactérias semelhantes a *Desulfobulbus* foram identificadas em 2,5% das sequencias.

Bactérias semelhantes ao gênero *Cloacibacterium* foram identificadas em RLF1 (6,4%) e RLF2 (1,4%). São descritos como micro-organismos anaeróbios facultativos, mesofílicos, não são capazes de redução de nitrato, encontrados em ambientes estuarinos, ambientes hipóxicos, e em reservatórios de petróleo (BRENNER et al. 2005, TANG et al. 2015). A presença deste gênero em ambientes contaminados por petróleo, e óleo inferem possibilidade de associação deste gênero com a degradação de compostos recalcitrantes (KHARUSI et al. 2016) e, provavelmente, a molécula de LAS.

Zoogloea representaram 4,2% e 3,5% das sequencias em RLF1 e RLF2, respectivamente. São descritos como micro-organismos heterotróficos, com capacidade proteolítica e que utilizam nitrato como receptor de elétrons. Está relacionado com a degradação de moléculas aromáticas como benzoato, fenantreno, aromáticos policíclicos e foi identificado em trabalhos com LAS (WATANABE et al. 2002; ROSENBERG et al. 2014, OKADA et al. 2014,)

Deinococcus foi identificado apenas no reator RLF2 representando 1,9% das sequencias. São micro-organismos com genes resistentes à radiação, possuem enzimas termoestáveis, o que os tornam atrativos para biologia molecular (ROSENBERG et al. 2014). São relatados em ambientais contaminados com compostos aromáticos (BRIM et al. 2006) e é capaz de degradar tolueno, transformando-o em piruvato, sendo em seguida consumido como fonte de carbono.

Methyloversatilis foi identificado nos reatores RLF1 (0,54%) e RLF2 (1,8%). São micro-organismos gram-negativos, metilotróficos, mas que podem usar compostos com mais de 1 carbono em sua estrutura (KALYUZHNYA et al. 2006). São capazes de reduzir nitrato e utilizar etanol como fonte de carbono, justificando sua presença nos reatores RLF1 e RLF2. Cresce em ambientes com carbono simples e metilaminas, sendo encontrados em reator desnitrificante (DORONINA et al.2014) e reatores com metanol e etanol (BAYTSHLOK et al. 2009).

Figura 5.28. Distribuição das sequências em nível de gênero na Etapa III dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).

A Tabela 5.24 sumariza os representantes mais abundantes encontrados em comum nos reatores RLF1 e RLF2 para Etapa III.

Tabela 5.24. Características metabólicas dos representantes mais abundantes nos reatores RFL1 e RFL2 na Etapa III. Continua

	<i>Consumo de nitrato ou amônio</i>	<i>Consumo de etanol</i>	<i>Redução de sulfato</i>	<i>Degradação de LAS</i>	<i>Degradação de aromático</i>	<i>Referência</i>
<i>Cloacibacterium</i>	-(N)	+		+	+	Parte et al. (2010)
<i>Dechloromonas</i>	+(N)	+		+	+	Achenbach et al. (2001); Brenner et al. (2005).
<i>Deinococcus</i>	+(A)		+	-	+	Servinsky, (2008)
<i>Desulfobulbus</i>	+(N)	+	+	+	+	Brenner et al. (2005)
<i>Desulfovibrio</i>	+(A)	+	+	+	+	Laanbroek (1984) Garrity et al. (2005)
<i>Flavobacterium</i>	+(A); +(N)	+	+	-	+	Whitman et al. (2010)
<i>Geobacter</i>	+(A)	+	+	+	+	Carmona et al. (2009)
<i>Hyphomicrobium</i>	+(A)	+	+	-	+	Garrity et al. (2005)
<i>Magnetospirillum</i>	+(N)	+	+	+	+	Brenner et al. (2005); Garrity et al. (2005)

Continuação da Tabela 5.24

<i>Methyloversatilis</i>	+(N)	+	+	-	+	Lu (2012), Doronina et al. (2014)
<i>Novosphingobium</i>	+(A)	-	+	+	+	Garrity et al. (2005); Oliveira (2013)
<i>Pseudomonas</i>	+(N), +(A)	+	+	+	+	Cornelis (2008)
<i>Sphingobium</i>	+(N)	-	+	-	+	Garrity et al. (2005)
<i>Sulfurospirillum</i>	+(A)	-	+	-	+	Garrity et al. (2005); Rosenberg et al. (2014)
<i>Thiobacillus</i>	+(A), +(N)	-	+		+	Garrity et al. (2007)
<i>Zoogloea</i>	+(A); +(N)	+	+	+	+	Rosenberg et al. (2014)

(+/-N): positivo ou negativo para consumo de nitrato; (+/-A): positivo ou negativo para consumo de amônio; (-) negativo; (+) positivo.

5.10.2.6. Caracterização microbiana da Etapa IV dos reatores RLF1 e RLF2

Durante a Etapa IV houve a retirada do etanol (co-substrato) na composição do meio sintético dos reatores, desta forma, os reatores RLF1 e RLF2 foram alimentados com água residuária de lavanderia diluída em substrato sintético acrescido de 132 ± 30 mgNO_3^-/L e 151 ± 36 mgNO_3^-/L , respectivamente. Para esta condição, identificou-se à nível de filo 99,2% das sequências em RLF1, e 99% em RLF2. Os filos mais abundantes em ambos os reatores (Figura 5.29) foram Proteobacteria (54,2 – 64,2%), Bacteroidetes (18,9 – 31,6%) e Spirochaetes (2,5 – 6,0%).

Em ambos os reatores, o filo Proteobacteria foi observado em elevada abundância relativa (RLF1 – 64,2% e RLF2 – 54,2%), contudo, em RLF1 se verificou que o filo Spirochaetes (6%) foi mais abundante em comparação à RLF2 (2,5%). Por outro lado, em RLF2, observou-se que o filo Bacteroidetes (31,6%) foi mais abundante em comparação ao reator RLF1 (18,2%) corroborando a influência do TDH sobre as mudanças nas populações de bactérias.

Adicionalmente, notou-se aumento na abundância relativa de representantes pertencentes ao filo Nitrospirae na Etapa III, em comparação à Etapa II em RLF1 (0,02% $\Rightarrow$ 0,28%) e RLF2 (0,04% $\Rightarrow$ 0,12%).

A adição ou ausência de co-substratos, bem como, de receptores de elétrons causam impactos na estrutura da comunidade bacteriana porque interferem diretamente na oferta de nutrientes, e de fonte de carbono suplementar para a biomassa, influenciando assim no metabolismo microbiano. Desta forma, a retirada do co-substrato na alimentação de RLF1 e RLF2 possibilitou mudanças nas populações de bactérias em nível de filo, excetuando-se para o filo Proteobacteria, cujos representantes foram observados em alta abundância relativa em ambos reatores, todavia, observou-se também que o TDH exerceu pressão seletiva sobre tais populações.

Braga et al. (2015) avaliaram a remoção de LAS de água de lavanderia em reator de leito fluidificado inoculado com lodo anaeróbio de reator UASB. Os autores observaram na caracterização microbiana da biomassa do meio suporte que houve redução na abundância relativa de 83% para 37,6% para o filo Proteobacteria, após a sacarose (co-substrato) ter sido retirada da alimentação do reator. Por outro lado, os autores verificaram aumento na abundância relativa dos filos Bacteroidetes (3,1% $\Rightarrow$ 16,6%) e Gemmatimonadetes (2% $\Rightarrow$ 25,5%). Contrariamente, nesta pesquisa

observou-se para os representantes do filo Proteobacteria alta abundância relativa em RLF1 (64,1%) e RLF2 (54,2%) mesmo na ausência do co-substrato (etanol).

Figura 5.29. Filos identificados na Etapa IV dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).

Em relação a família (Figura 5.30) obteve-se 83,1% e 87,6% das sequências classificadas em RLF1 RLF2, respectivamente. As famílias mais abundantes em ambos os reatores foram as seguintes: Caulobacteraceae (1,3% - 12,8%), Chitinophagaceae (11,2% - 13,1%), Flavobacteriaceae (4,6% - 15,6%), Pseudomonadaceae (10,1% - 32,6%) e Sphingomonadaceae (5% - 17,1%), respectivamente.

Para o reator RLF1 observou-se redução da abundância relativa, em relação à Etapa III, para as famílias Rhodocyclaceae (14,6%⇒0,01%), Helicobacteraceae (17,9%⇒0,01%) e Hyphomonadaceae (7,3%⇒0,11%). Por outro lado, observou-se para este reator aumento expressivo na abundância relativa de representantes pertencentes as famílias Caulobacteraceae (0,7%⇒12,8%), Chitinophagaceae (4,2%⇒11,2%), Pseudomonadaceae (2,1%⇒10,1%) e Sphingomonadaceae (0,6%⇒17,1%).

Caulobacteraceae agrupa micro-organismos gram-negativos, anaeróbios facultativos e aeróbios, capazes de utilizar diversos açúcares como fonte de carbono, e

com capacidade de desnitrificação. São encontrados em ambientes aquáticos, ambientes oligotróficos e possuem facilidade na formação de biofilme (ROSENBERG et al. 2014). A família Sphingomonadaceae agrupa micro-organismos heterotróficos, anaeróbios facultativos, e são frequentemente isolados de ambientes contaminados por hidrocarbonetos aromáticos, bifenilas e pesticidas, apresentando assim grande potencial para biorremediação (ROSENBERG et al. 2014).

Chitinophagaceae reúne bactérias anaeróbias facultativas e aeróbias, com capacidade de consumir diversos tipos de carboidratos, possuindo espécies capazes de degradar celulose, e de utilizarem nitrato como fonte de nitrogênio (BRENNER et al. 2005). A família Pseudomonadaceae agrupa micro-organismos aeróbios, heterotróficos, que podem utilizar o nitrato como receptor de elétrons quando em ambiente anóxico. Utilizam diversos açúcares como fonte de carbono, e são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos (BRENNER et al. 2005; ROSENBERG et al. 2014).

No reator RLF2, observou-se redução na abundância relativa, em relação à Etapa III, para as famílias Rhodocyclaceae (6,6%⇒0,9%) e Ellin6075 (22,1%⇒0,4%), todavia, verificou-se aumento na abundância de representantes da família Flavobacteriaceae (0,2%⇒15,6%), Chitinophagaceae (3,4%⇒13,1%), e aumento expressivo na abundância relativa da família Pseudomonadaceae (0,5%⇒32,6%).

Por meio do diagrama de Venn, da ausência e presença de gêneros (Figura 5.31), ao comparar-se as OTUs observadas na biomassa do meio suporte para o reator RLF1 e RLF2, verificou-se que 31,4% estiveram presentes em ambos reatores, inferindo-se assim que o TDH influenciou na estrutura da comunidade microbiana em ambos reatores.

Figura 5.30. Famílias abundantes na Etapa IV de operação dos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h).

Figura 5.31. Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função do número OTUs observadas na biomassa do reator RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h).

Em nível de gênero (Figura 5.32), foram identificados 48,3% (84 gêneros) das sequências em RLF1 e 66,2% (59 gêneros) das sequências em RLF2. Os gêneros mais abundantes em RLF1 foram os seguintes: *Sphingopyxis* (10,6%) e *Pseudomonas* (9,9%). Por outro lado, em RLF2 os gêneros mais abundantes foram *Pseudomonas* (32,29%) e *Flavobacterium* (15,6%).

Pseudomonas está diretamente ligada a degradação de LAS, pois é capaz de realizar β -oxidação e dessulfonação, etapas de degradação da molécula de surfactante, além da degradação de compostos aromáticos, como benzeno e tolueno (BRENNER et al. 2005). Vale ressaltar que bactérias pertencentes a este gênero são capazes de realizar a respiração anóxica, justificando assim que a maior abundância deste gênero em reator RLF2 (32,29%) pode ter favorecido a desnitrificação na ausência de etanol, sugerindo a utilização do LAS ou outros compostos da água residuária de lavanderia, como doadores de elétrons, uma vez que somente neste reator foi verificada remoção de nitrato na etapa IV ($27 \pm 48\%$).

Sphingopyxis são descritos na literatura como hábeis em degradar compostos recalcitrantes, incluindo bifenilas policloradas, naftaleno, fluoreno, fenantreno, nonilfenol, carbazólicos, dentre outros (STOLZ et al. 2009). Podem ser encontrados em ambientes anaeróbios (KIM et al. 2005), ambiente desnitrificante (KÄMPFER et al. 2002). São micro-organismos anaeróbios facultativos, com metabolismo heterotrófico, não são capazes de reduzir nitrato à nitrogênio gasoso (GODOY et al. 2003).

Novosphingobium, observado em RLF1 (5,5%), pertence à família Sphingomonadaceae, e possui capacidade de degradar compostos aromáticos (ROSENBERG et al. 2014). Sohn et al. (2014) verificaram a capacidade do gênero *Novosphingobium* em degradar fluoreno, fenantreno, fluoranteno, antraceno, pireno, benzoantraceno, criseno, dentre uma série de hidrocarbonetos aromáticos de alto peso molecular. São micro-organismos anaeróbios facultativos com capacidade de reduzir nitrato a nitrito (LIU et al. 2005) e possuem metabolismo heterotrófico.

Magnetospirillum são micro-organismos gram-negativos, microaeróbios, encontrados em diferentes habitats e capazes de reduzir nitrato (ROSENBERG et al. 2014). São capazes iniciar reações de carboxilação em estruturas aromáticas, aumentando a reatividade da estrutura do anel benzênico facilitando sua degradação (BOLL et al. 2014). Possuem as enzimas benzoil-CoA redutase e benzilsuccinato sintase

responsáveis pela degradação do tolueno e benzoato pelas bactérias desnitrificante (SHINODA et al. 2005).

Flavobacterium (RLF1 – 4,6%; RLF2 – 15,6%) são micro-organismos aeróbios, capazes de reduzir nitrato e com capacidade de degradar compostos aromáticos (SAMANTA et al. 2002). *Phenylobacterium* (RLF1 – 1,44%; RLF2 – 1,24%) são micro-organismos aeróbios, com metabolismo heterotrófico, não são capazes de desnitrificar, mas podem utilizar nitrato e amônio como fonte de nitrogênio, são capazes de metabolizar compostos xenobióticos através da oxidação dissimilativa, incorporando O₂ à estrutura do anel benzênico por enzimas dioxigenases (BRENNER et al. 2005). Tais bactérias realizam meta clivagem, uma das etapas de degradação da molécula de LAS, inferindo assim sua contribuição na degradação do surfactante.

Figura 5.32. Gêneros mais frequentes identificados na Etapa IV de operação dos reatores RLF1 (TDH 8h) e RLF2 (TDH 12h).

Na Tabela 5.25 estão sumarizadas as características metabólicas dos micro-organismos identificados na biomassa do material suporte dos reatores RLF1 e RLF2.

Tabela 5.25. Características metabólicas dos gêneros identificados em RLF1 e RLF2 na Etapa IV. Continua

<i>Gênero</i>	<i>Atmosfera</i>	<i>Utiliza nitrato como receptor de elétrons</i>	<i>Consumo de ácidos orgânicos</i>	<i>Degradação de LAS</i>	<i>Degradação de aromático</i>	<i>Referência</i>
<i>Acidovorax</i>	Aeróbia	+	+	-	+	Brenner et al. (2005)
<i>Acinetobacter</i>	Aeróbia	+	+	+	+	Abboud et al. (2007); Delforno (2014)
<i>Alicyciphilus</i>	Anaeróbio facultativo	+	+	+	+	Rosenberg et al. (2014)
<i>Chryseobacterium</i>	Anaeróbio facultativo	+	+	-	+	Parte et al. (2010)
<i>Flavobacterium</i>	Aeróbio	+	+	-	+	Duarte et al. (2010); Krieg et al. (2010)
<i>Magnetospirillum</i>	Microaeróbio	+	+	+	+	Brenner et al. (2005); Garrity et al. (2005);
<i>Meiothermus</i>	Aeróbia	+	+	-	-	Rosenberg et al. (2014)

Continuação da Tabela 5.25

<i>Methylosinus</i>	Aeróbia	-	+	-	+	Rosenberg et al. (2014)
<i>Nitrospira</i>	Aeróbia	+	+	-	+	Brandt (2001); Brenner et al. (2005)
<i>Novosphingobium</i>	Aeróbia	+	+	+	+	Garrity et al. (2005); Oliveira (2013)
<i>Phenylobacterium</i>	Aeróbia obrigatória	+	+	-	+	Brenner et al. (2005); Sanchez- Peinado et al. (2010)
<i>Prostheobacter</i>	Aeróbia obrigatória	-	+	-	+	Krieg et al. (2010)
<i>Pseudomonas</i>	Aeróbia	+	+	+	+	Brenner et al. (2005)
<i>Sediminibacterium</i>	Aeróbia obrigatória		+	-	+	Qu e Yuan (2008)
<i>Sphingopyxis</i>	Aeróbia obrigatória		+	-	+	Takeuchi et al. (2001)

(+): presente (-): negativo

5.10.2.7. Caracterização microbiana da Etapa V dos reatores RLF1 e RLF2

Na Etapa V, o receptor de elétrons (nitrato) foi retirado da composição do substrato sintético utilizado como alimentação dos reatores e estes passaram a ser alimentados com água residuária de lavanderia diluída em meio sintético adicionado de 100 mg/L de etanol. Assim, para esta condição nutricional, observou-se classificação de 98,66% e 99,38% em nível de filo em RLF1 e RLF2, respectivamente.

Representantes do filo Proteobacteria foram identificados em elevada abundância relativa em RLF1 (68,9%) e RLF2 (82,4%). Os outros filios identificados foram identificados em abundância relativa entre 0,01% e 17,9%, dos quais incluíram-se os filios Acidobacteria (3,3% - 4,4%), Bacteroidetes (7,4% - 17,9%) e Verrucomicrobia (1,1% - 1,4%), respectivamente (Figura 5.33). Salienta-se que em nível de filo verificou-se que o TDH influenciou nas populações de bactérias de cada reator.

Figura 5.33. Filos identificados na biomassa do material suporte de RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) na Etapa V.

Na classificação em nível de família (Figura 5.34) verificou-se que 88% das sequencias foram classificadas em RLF1 e 84,1% das sequencias em RLF2. Observou-se membros da família Rhodocyclaceae em RLF1 (10,6%) e RLF2 (12%). Membros da

família Holophagaceae também foram identificados em RLF1 (1,8%) e RLF2 (1,6%). A família Holophagaceae agrupa micro-organismos anaeróbios, de metabolismo heterotrófico, capazes de utilizar o nitrato como receptor de elétrons e utilizar compostos aromáticos como fonte de carbono (BRENNER et al. 2005).

Verificou-se em RLF1 que as famílias Pseudomonadaceae (7,2%), Weeksellaceae (13,8%) e Hyphomonadaceae (16,8%) foram mais abundantes neste reator se comparadas a RLF2, cujas abundâncias relativas para as famílias citadas acima foram de 3,2%, 1,3% e 0,7%, respectivamente.

Por outro lado, em RLF2, observou-se que as famílias Comamonadaceae (31,6%), Sphingomonadaceae (13,1%) e Chitinophagaceae (5,4%) foram mais abundantes em relação à RLF1 sendo verificado 7,7%, 0,9% e 1,9% para as respectivas famílias. Desta forma, inferiu-se que o TDH exerceu influência sobre a composição das populações de bactérias nos reatores. A Figura 5.34 ilustra a distribuição das famílias nos reatores RLF1 e RLF2 em função da abundância relativa.

Figura 5.34. Distribuição de famílias nos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) para Etapa V.

Conforme o diagrama de Venn de presença e ausência de gêneros, em função no número de OTUs notou-se que apenas 19,6% das OTUs estiveram compartilhadas entre os reatores (Figura 5.35), endossando que o TDH foi fator influente no estabelecimento dos micro-organismos nos sistemas biológicos.

Figura 5.35. Diagrama de Venn da presença e ausência de gêneros em função dos números de OTUs.

Em nível de gênero (Figura 5.36) observou-se que os mais abundantes em RLF1 foram os seguintes: *Cloacibacterium* (13,42%), *Zoogloea* (8,66%), *Pseudomonas* (6,84%), *Curvibacter* (6,45%) e *Geobacter* (5,11%). Em RLF2 os gêneros mais abundantes foram os seguintes: *Curvibacter* (18,12%), *Zoogloea* (9,46%), *Thiomonas* (8,88%) e *Novosphingobium* (5,13%).

A Tabela 5.26 resume as características metabólicas dos gêneros mais abundantes da Etapa V e identificados em ambos reatores.

Figura 5.36. Distribuição de gêneros nos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) para Etapa V.

Tabela 5.26. Características metabólicas dos gêneros em maior abundância nos reatores RLF1 e RLF2 na Etapa V.

<i>Gênero</i>	<i>Atmosfera</i>	<i>Consumo de etanol</i>	<i>Redução de sulfato</i>	<i>Degradação de LAS</i>	<i>Degradação de aromático</i>	<i>Referência</i>
<i>Curvibacter</i>	Microaerofílica	+	-	*	-	Macedo et al. (2015)
<i>Dechloromonas</i>	Anaeróbia facultativa	+	+	+	+	Achenbach et al. (2001); Brenner et al. (2005)
<i>Desulfobulbus</i>	Anaeróbia estrita	+	+	+	+	Brenner et al. (2005); Garrity et al. (2005)
<i>Desulfovibrio</i>	Anaeróbia	+	+	+	+	Laanbroek (1984) Garrity et al. (2005)
<i>Geobacter</i>	Anaeróbia estrita	+	+	+	+	Carmona et al. (2009)
<i>Hyphomicrobium</i>	Aeróbia	+	+	-	+	Garrity et al. (2005)
<i>Magnetospirillum</i>	Microaerofílica/ Anaeróbia	+	+	+	+	Brenner et al. (2005); Garrity et al. (2005); Shinoda et al. (2005)
<i>Mesorhizobium</i>	Aeróbia Facultativa	-	-	-	+	Rosenberg et al. (2014)

Continuação da Tabela 5.26

<i>Nitrospira</i>	Aeróbia	+	+	-	+	Koch et al. (2015)
<i>Phenylobacterium</i>	Aeróbia obligatória	+		-	+	Brenner et al. (2005); Sanchez-Peinado et al. (2010)
<i>Pseudomonas</i>	Aeróbia	+	+	+	+	Cornelis (2008)
<i>Sediminibacterium</i>	Aeróbia	+		(+)*	*	Qu, Yuan (2008)
<i>Sulfurospirillum</i>	Anaeróbia	-	+	-	+	Garrity et al. (2005)
<i>Thiobacillus</i>	Anaeróbia facultativa	-	+	+	+	Garrity et al. (2007)
<i>Thiomonas</i>	Anaeróbia	+	+	-	+	Arsène-Ploetze et al. (2010)
<i>Zoogloea</i>	Aeróbia	+	+	+	+	Rosenberg et al. (2014)

(+): presente; (-): negativo; (+*) presente em trabalhos com degradação de LAS

5.10.2.8. Caracterização microbiana da Etapa VI nos reatores RLF1 e RLF2

Na Etapa VI os reatores de leito fluidificado foram alimentados apenas com água residuária de lavanderia diluída para a concentração de LAS de $22 \pm 4,6$ mg/L (RLF1) e $22 \pm 4,8$ mg/L (RLF2). Para esta etapa foram observados 16 filos em ambos os reatores, entretanto, aqueles de maior abundância relativa foram Proteobacteria (33-42%), Bacteroidetes (28-29%), Verrucomicrobia (6,7-9,4%), Spirochaetes (7,2-8,7%) Chlorobi (3,8-6,3%) e Acidobacteria (4,1-4,2%). Os filos Actinobacteria, Chlorobi, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobacteria e Planctomycetes representaram menos de 3% em ambos os reatores (Figura 5.37).

Figura 5.37. Filos observados nos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) na Etapa VI.

Em nível taxonômico de família (Figura 5.38) observou-se que representantes pertencentes a família Chitinophagaceae foram identificados em elevada abundância relativa para RLF1 (22%) e RLF2 (22,5%). Adicionalmente, no reator RLF1 representantes pertencentes as famílias Comamonadaceae (11%) e Chthoniobacteraceae

(8,35%) estiveram em maior abundância relativa se comparadas ao reator RLF2, cujas abundâncias relativas obtidas foram de 2,6% e 3,6%, respectivamente.

No reator RLF2 observou-se maior abundância relativa para representantes pertencentes as famílias Rhodocyclaceae (7,6%) e Coxiellaceae (5,4%) em relação ao reator RLF1, cujos valores observados foram de 4,2% e 0,2%, respectivamente. Novamente, observou-se que o TDH influenciou na modificação das populações de bactérias entre os reatores para o nível taxonômico de família.

Figura 5.38. Famílias observadas nos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) na Etapa VI.

Observou-se por meio do Diagrama de Venn (Figura 5.39) que os reatores compartilharam 27,9% das OTUs identificadas, enquanto para o reator RLF1 observou-se que 25,7% das OTUs foram exclusivas deste reator, enquanto 46,4% das OTUs foram exclusivas do reator RLF2. Desta forma, pode-se inferir que a condição operacional aplicada aos reatores (tempo de detenção hidráulica) influenciou na seleção das populações de bactérias.

Em nível de gênero, 26,6% e 37,8% das sequencias foram classificadas em RLF1 e RLF2, respectivamente.

Figura 5.39: Diagrama de Venn em função do número de OTUs observadas para os reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h).

No reator RLF1 (Figura 5.40), observou-se maior abundância relativa para os gêneros *Turneriella* (7,1%), *Curvibacter* (5,5%) e *Zoogloea* (2,9%). Os gêneros *Sediminibacterium*, *Phenylobacterium* e *Prosthecobacter* foram identificados em abundância relativa de 0,83% – 1,88%. Outros gêneros como *Magentspirillum*, *Aquicella*, *Novosphingobium* e *Desulfobulbus* foram identificados em abundância relativa menor que 0,5%.

Para o reator RLF2 (Figura 5.40) observou-se maior abundância relativa para os gêneros *Turneriella* (8,3%), *Aquicella* (5,2%), e *Zoogloea* (5%). Gêneros como *Acidaminobacter*, *Runella*, *Prosthecobacter* e *Sediminibacterium* foram identificados em abundâncias relativas, respectivamente, de 1,11%, 1,58%, 2,45% e 3,58%.

Figura 5.40: Abundância relativa de gêneros identificados nos reatores RLF1 (TDH 8 h) e RLF2 (TDH 12 h) na Etapa VI.

A identificação de *Curvibacter* endossou a predominância de representantes pertencentes a família Commamonadacea no reator operado em TDH de 8 horas (RLF1), enquanto *Aquicella* pertencente a família Coxiellacea predominou no reator RLF2. Adicionalmente, *Zoogloea*, *Dechloromonas* e *Dok59* da família Rhodocyclacea foram identificados em maior abundância no reator RLF2 em contraposição ao reator RLF1.

Turneriella foi o gênero mais abundante em ambos os reatores. Esse gênero tem sido isolado em água de abastecimento (MA et al, 2013), de tanques aeróbio/anóxico (GONZALEZ-MARTINEZ et al, 2015). É um micro-organismo aeróbio e de metabolismo quimiorganotrófico.

Zoogloea foi identificada em ambos os reatores e tem sido reportada amplamente como degradadora de compostos aromáticos. LIANG et al. (2006) utilizaram *Zoogloea* sp. na degradação de óleo de lubrificação em reator compartimentado. Os autores observaram elevada remoção de óleo em TDH de 12 horas. OKADA et l. (2014), DELFORNO et al. (2015), MACEDO et al. (2015) identificaram o referido gênero em abundância relativa de 0,1%, 15,8% e 22,1% ao

utilizarem reatores UASB, EGSB e de leito fluidificado, respectivamente, para tratamento de água residuária de lavanderia.

Curvibacter foi identificada como predominante apenas no reator RLF1, sendo reportado na literatura com capacidade de degradação de compostos aromáticos. Este microrganismo microaerófilo, cresce em faixa de pH entre 6.0 e 7.0 e temperatura mesofílica (LEVET et al., 2005). Tem sido isolado de águas de poços, ambientes contaminados por biodiesel (RAMOS et al, 2014), águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos (TÁNCIS et al, 2010), e de lodos ativados (CZERWIONKA et al, 2014).

Macedo et al (2015) operaram reator de leito fluidificado em condição anaeróbia para remoção de surfactante de água residuária de lavanderia. Os autores investigaram a influência do co-substrato (etanol e sacarose) na dinâmica microbiana do reator. Os referidos autores observaram que na presença de sacarose (80 mg/L) e etanol (80 mg/L) houve baixa remoção de LAS ($51,7 \pm 23,9\%$) e predomínio de representantes da família Comamonadaceae, sendo *Curvibacter* aquele com maior abundância relativa. Os autores atribuíram o predomínio deste gênero à presença de sacarose e extrato de levedura, os quais facilitaram o crescimento desse micro-organismo. Por outro lado, quando o reator foi operado apenas com etanol houve aumento na remoção de LAS ($72,9 \pm 18,8\%$). Assim, na fase de trabalho em que o gênero *Curvibacter* foi predominante, não houve elevada remoção de LAS no trabalho de Macedo et al. (2015). Em contraposição, no presente trabalho a presença do gênero *Curvibacter* parece não ter afetado a remoção de LAS, pois observou-se que no reator RLF1 onde o gênero esteve presente em 5,8% de abundância relativa e a remoção de LAS foi de $99 \pm 2\%$.

Aquicella foi o gênero predominante no reator RLF2. Este gênero tem sido isolado de reatores usados no tratamento de água residuária de gaseificação de carvão (JIA et al, 2016), sistemas de tratamento de esgoto, e sistemas anóxicos/anaeróbios de tratamento de águas residuárias de minas de carvão.

Dentre os 63 gêneros identificados, 11 foram relacionados diretamente à degradação do LAS, podendo-se citar *Zoogaea*, *Pseudomonas*, *Geobacter*, *Gemmatimonas*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Magnetospirillum*, *Dechloromonas* e *Desulfovibrio*, *Pseudomonas* e *Pleomorphomonas*. Parte dos micro-organismos estão diretamente relacionados com degradação de compostos aromáticos e já foram identificados em reatores biológicos utilizados para remoção de LAS.

A Tabela 5.27 sumariza os principais gêneros identificados na etapa VI em ambos os reatores.

Tabela 5.27. Gêneros identificados na Etapa VI para os reatores RLF1 e RLF2.

<i>Gêneros</i>	<i>Degradação de LAS</i>	<i>Degradação de composto aromático</i>	<i>Referência</i>
<i>Curvibacter</i>	*	*	Macedo et al. (2015)
<i>Dechloromonas</i>	+	+	Delforno et al. (2012); Duarte et al. (2010);
<i>Desulfobulbus</i>	+	+	Brenner et al. (2005);
<i>Magnetospirillum</i>	+	+	Brenner et al. (2005); Garrity et al. (2005); Shinoda et al. (2005)
<i>Meiothermus</i>	*	+	Rosenberg et al. (2014)
<i>Methyloversatilis</i>	-	+	Rosenberg et al. (2014)
<i>Novosphingobium</i>	+	+	Garrity et al. (2005); Oliveira (2013)

Continuação da Tabela 5.27

<i>Phenylobacterium</i>	*	+	Brenner et al. (2005); Sanchez- Peinado et al. (2010)
<i>Prostheco bacter</i>	*	*	Okada (2012)
<i>Pseudomonas</i>	+	+	Brenner et al. (2005); Lara-Martin et al. (2007)
<i>Runella</i>	-	+	Parte et al. (2010)
<i>Sediminibacterium</i>	*	*	Carosia (2011)
<i>Thiobacillus</i>	*	+	Garrity et al. (2007)
<i>Zoogloea</i>	+	+	Rosenberg et al. (2014)

(+) positivo, (-) negativo, (*) identificado em trabalhos, mas sem relação direta

5.10.2.9. Alterações na comunidade microbiana ao longo das etapas de operação

A fim de facilitar a visualização na modificação da comunidade de bactérias em RLF1 e RLF2 foram construídos *heatmaps* (Tabela 5.28 e 5.29) para as 20 famílias mais frequentes em cada reator. Vale ressaltar que em ambos os reatores se verificou acentuada alteração nas populações de bactérias em função das diferentes condições nutricionais estabelecidas em cada etapa de operação e TDH aplicado.

Em relação ao inóculo verificou-se predominância dos filos Proteobacteria (35,7%) e Bacteroidetes (23,3%), resultado esse em consonância com a microbiota de lodos ativados, conforme observado por Seviour e Nielsen (2010). Houve predomínio de representantes pertencentes as famílias Rhodocyclaceae (13,2%) e Chitinophagaceae (10,3%), tendo sido identificado também bactérias pertencentes as famílias de bactérias nitrificantes, como Nitrosomonadaceae (0,011%) e Nitrospiraceae (0,005%). O lodo utilizado como inóculo dos reatores foi caracterizado como sendo, aeróbio e rico em bactérias nitrificantes e desnitrificantes (MOURA, 2011; MOURA, 2015; LIMA e SILVA, 2015), logo identificou-se bactérias desnitrificantes, como semelhantes a *Dechloromonas*, *Novosphingobium*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Zoogloea*, *Comamonas* e *Pseudomonas*. O único gênero identificado de bactéria nitrificante foi *Nitrospira*.

Ao longo de 436 dias de operação observou-se mudanças nas populações de bactérias em RLF1 e RLF2, em relação a distribuição em famílias (Tabela 5.28 e 5.29) e gêneros.

Tendo-se como base a caracterização molecular do inóculo observou-se no reator RLF1 e RLF2, após 63 dias de adaptação ao meio sintético (Etapa I), houve enriquecimento de micro-organismos capazes de reduzir nitrato, havendo predomínio de representantes pertencentes a família Chitinophagaceae (21,3% - RLF1 e 18,2% - RLF2), na qual estão incluídas grupos de bactérias desnitrificantes. Observou-se também que outras bactérias desnitrificantes, todavia, pertencentes as famílias Xanthobacteraceae (3,4% - RLF1 e 3,3% - RLF2), e Flavobacteriaceae (0,6% - RLF1 e 9% - RLF2). Identificou-se também representantes pertencentes a família Rhodocyclaceae com abundância de 10,5% em RLF1 e 5,0% em RLF2.

Em relação aos gêneros de bactérias foram identificados na Etapa I, *Zoogloea* em ambos os reatores em abundância relativa de 7,2% e 3,6%, respectivamente em RLF1 e RLF2. Por outro lado, identificou-se bactérias semelhantes a *Sediminibacterium*

e *Pseudoxanthomonas* em abundância relativa de 12% e 6,1% em RLF1, enquanto em RLF2 foram de 1,5% e 1,7%, respectivamente. Contrariamente, verificou-se que *Flavobacterium* foi abundante (9,0%) em reator RLF2, enquanto em RLF1 observou-se apenas 0,6% das sequencias identificadas.

Na Etapa II, com adição de 18,2 mgLAS/L em RLF1 e 19,2 mgLAS/L em RLF2, verificou-se aumento no número de representantes pertencentes a família Rhodocyclaceae, em ambos os reatores, em comparação à Etapa I, ou seja, em RLF1 a abundância relativa foi de 10,5% para 15,8% e em RLF2 foi de 5,0% para 12,7%. Adicionalmente, observou-se que houve redução na abundância relativa para os representantes pertencentes a família Chitinophagaceae no reator RLF1 de 21,3% para 4,8%, enquanto para RLF2 a redução foi de 18,2% para 6,3%.

Em função do nível taxonômico de gênero observou-se comparativamente à Etapa I, que *Zoogloea* foi identificada nos reatores RLF1 e RLF2 em abundancia relativa de 9,9% e 7,5%, respectivamente, enquanto para *Sediminibacterium* verificou-se redução em RLF1 de 12% para 1% em abundância relativa.

Na Etapa III a concentração de nitrato foi reduzida de 132 ± 40 mg/L para 88 ± 10 mg/L em RLF1, e de 149 ± 53 mg/L para 90 ± 10 mg/L em RLF2. LAS foi adicionado aos reatores nas concentrações de $21,3 \pm 4$ mg/L (RLF1) e $24,6 \pm 5$ mg/L (RLF2) e etanol foi adicionado aos reatores em 100 mg/L. Sob estas condições, observou-se que à nível de família, houve redução na abundância relativa da família Rhodocyclaceae se comparada à Etapa II, onde a redução em RLF2 foi de 12,7% para 6,6%, enquanto em RLF1 foi de 15,8% para 14,6%. Adicionalmente, verificou-se que houve aumento da abundância relativa da família Helicobactereaceae em RLF1 (0,25%→17,9%) enquanto em RLF2 notou-se na Etapa II, 1,25% e na etapa III 0,3% para esta família.

Em relação aos gêneros, observou-se na Etapa III que *Dechloromonas* foi abundante em RLF1 (7,4%) enquanto na Etapa II este gênero agrupou 0,90% das sequencias. Em RLF2 este gênero agrupou 2,24% e 0,15% nas Etapas II e III, respectivamente. Em RLF2 o gênero abundante foi *Zoogloea* (3,4%), tendo sido observada redução na abundância relativa se comparada à etapa II (7,5%). Este mesmo gênero em RLF1 reduziu de 9,9% para 4,2%.

Na Etapa IV, o etanol foi retirado da composição do substrato sintético e os reatores foram alimentados com $21,6 \pm 3,6$ mgLAS/L e 132 ± 30 mg/L de nitrato (RLF1), e com $27,1 \pm 5,6$ mgLAS/L e 151 ± 36 mg/L de nitrato. Para esta condição, observou-se a

nível taxonômico de família que houve redução acentuada da família Rhodocyclaceae em ambos os reatores, de 14,6% para 1,3% em RLF1, e de 6,6% para 0,9%. Adicionalmente, verificou-se que representantes pertencentes a família Pseudomonadaceae aumentaram em abundância relativa, em comparação à Etapa III, de 0,5% para 32,6% em RLF2, enquanto para RLF1 verificou-se aumento de 2,1% para 10,1%.

Em relação aos gêneros identificados na Etapa IV, verificou-se que *Sphingopyxis* (10,6%) e *Pseudomonas* (32,3%) foram mais abundantes em RLF1 e RLF2, que em comparação à Etapa III aumentaram em relação à abundância relativa, uma vez que na Etapa III agruparam 0,14% e 0,49%, respectivamente.

Na Etapa V, o nitrato foi retirado da alimentação dos reatores, e estes foram alimentados com $21,1 \pm 5.0$ mgLAS/L (RLF1) e $22,1 \pm 5.1$ mgLAS/L, além de 100 mg/L de etanol cada. Para esta condição nutricional, verificou-se aumento da abundância relativa dos representantes pertencentes as famílias Rhodocyclaceae em comparação à Etapa IV. Em RLF1, os representantes pertencentes a família Rhodocyclaceae aumentaram em abundância relativa de 1,3% para 10,6% e em RLF2, aumentou de 0,9% para 12%. Adicionalmente, verificou-se que houve aumento na abundância relativa para os representantes da família Comamonadaceae em RLF1 de 4,3% para 7,7% e em RLF2 foi de 5,4% para 31,6%.

Em relação aos gêneros verificou-se que *Cloacibacterium* (13,4%) foi o abundante em RLF1, e comparativamente à Etapa IV agrupou 0,054% das sequencias identificadas. Em RLF2, o gênero mais abundante foi *Curvibacter* (18,12%) e na Etapa IV este gênero representou 0,008% das sequencias identificadas.

Na Etapa VI os reatores RLF1 e RLF2 foram alimentados apenas com água residuária de lavanderia diluída para $22 \pm 4,5$ mgLAS/L e $22,4 \pm 4,8$ mgLAS/L, respectivamente. Para estas condições, verificou-se redução dos representantes da família Rhodocyclaceae. Em comparação a etapa V, observou-se redução em abundância relativa de 10,6% para 4,2% (RLF1) e 12% para 7,5% (RLF2) para os representantes da família Rhodocyclaceae. Por outro lado, verificou-se aumento da abundância relativa para os representantes da família Chitinophagaceae em RLF1 de 1,9% para 21,9% e de 2,4% para 21,7% em RLF2.

Observou-se que *Turneriella* foi o mais abundante em ambos os reatores, agrupando 7,1% e 8,3% das sequencias identificadas, respectivamente em RLF1 e

RLF2, enquanto na Etapa V para esse mesmo gênero verificou-se 0,053% e 0,048% das sequências, respectivamente.

Em suma, nos reatores de leito fluidificado, as mudanças na microbiota em cada etapa de operação ocorreram em virtude da condição nutricional imposta, havendo predomínio de famílias e gêneros relacionados à redução de nitrato e/ou capazes de utilizarem o etanol como co-substrato. Notou-se, a partir do Diagrama de Venn, que houve diferenciação entre as OTUs compartilhadas entre os reatores para cada etapa, corroborando assim com a modificação da população bacteriana. Observou-se também que nas etapas em que houve adição de água de lavanderia haviam gêneros relacionados à degradação do LAS e outros compostos aromáticos, endossando assim os altos percentuais de remoção de LAS obtidos em cada etapa de operação.

Tabela 5.28. *Heatmap* para as famílias mais frequentes em RLF1 ao longo da operação.

Famílias	Inóculo	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV	Etapa V	Etapa VI
Caulobacteraceae	0,040	1,200	0,600	0,700	12,80	0,80	4,700
Chitinophagaceae	10,30	21,289	4,800	4,200	11,20	1,90	22,00
Chthoniobacteraceae	0,014	0,800	0,800	0,100	0,10	0,007	8,347
Comamonadaceae	1,600	4,200	4,584	5,000	4,30	7,67	11,00
Cytophagaceae	1,300	0,100	1,200	0,400	1,90	0,030	4,335
Desulfobulbaceae	0,000	5,435	0,500	5,400	0,10	4,60	0,400
Ellin6075	3,100	8,953	13,900	0,200	0,30	0,010	0,800
Fimbriimonadaceae	0,148	0,040	5,516	0,300	0,10	0,20	0,100
Flavobacteriaceae	0,200	6,932	0,700	6,900	4,60	0,20	0,020
Geobacteraceae	0,001	0,09	0,12	3,30	0,014	5,20	0,100
Helicobacteraceae	0,000	17,912	0,300	17,900	0,010	5,80	0,100
Hyphomonadaceae	1,800	7,349	0,600	7,300	0,10	16,82	0,400
Leptospiraceae	0,043	0,200	0,200	0,100	6,00	0,10	7,100
Nitrosomonadaceae	0,011	0,239	0,06	0,024	0,51	0,150	0,062
Nitrospiraceae	0,005	0,092	0,017	0,024	0,278	0,040	0,031
Pseudomonadaceae	0,004	0,010	2,900	2,100	10,10	7,22	0,200
Rhodocyclaceae	13,200	10,490	15,800	14,612	1,00	10,57	4,200
Sphingomonadaceae	1,900	5,202	3,700	0,600	17,10	0,90	2,100
Weeksellaceae	0,200	6,453	2,200	6,500	0,10	13,8	0,300
Xanthomonadaceae	0,300	7,225	0,400	0,400	4,10	0,100	0,100

Tabela 5.29. *Heatmap* em função da abundância relativa das famílias mais frequentes no reator RLF2.

Famílias	Inóculo	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV	Etapa V	Etapa VI
Bdellovibrionaceae	0,544	4,46	1,90	1,20	0,10	0,20	0,20
Caulobacteraceae	0,040	0,84	0,60	0,80	1,30	0,10	2,70
Chitinophagaceae	10,300	18,19	6,30	3,40	13,10	5,40	21,80
Chthoniobacteraceae	0,014	0,35	1,80	0,70	0,30	0,03	3,70
Comamonadaceae	1,560	2,06	5,80	1,80	5,40	31,60	2,60
Coxiellaceae	0,070	0,23	0,03	0,03	0,02	0,00	5,40
Cytophagaceae	1,300	1,78	0,70	1,80	1,90	0,30	4,20
Desulfobulbaceae	0,000	0,04	0,44	0,12	0,01	2,43	0,60
Ellin6075	3,120	11,97	6,60	22,10	0,50	0,10	0,10
Fimbriimonadaceae	0,148	1,41	4,90	5,90	0,03	0,05	0,10
Flavobacteriaceae	0,153	9,02	6,80	0,30	15,20	0,10	0,01
Hyphomonadaceae	1,750	1,27	1,10	0,30	0,00	0,70	0,10
Leptospiraceae	0,043	0,13	0,10	0,20	2,50	0,00	8,30
Pseudomonadaceae	0,004	0,00	4,04	0,50	32,60	3,00	0,30
Rhodocyclaceae	13,200	5,00	12,70	6,60	0,90	12,00	7,60
Saprospiraceae	0,000	3,61	0,01	0,10	0,00	0,00	0,00
Sphingomonadaceae	1,940	4,77	3,10	2,20	5,00	13,10	2,90
Weeksellaceae	0,155	0,25	4,20	1,60	0,40	1,30	0,20
Xanthobacteraceae	0,004	3,25	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Xanthomonadaceae	0,256	1,97	0,30	0,10	0,90	4,00	0,60

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao potencial de degradação do LAS por inóculo de lodos ativados, observou-se que a adição do nitrato favoreceu maior remoção do tensoativo nos reatores em batelada, verificando-se menor adsorção nos reatores com adição de $150 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$.

O TDH foi fator influente na remoção de LAS de água residuária de lavanderia em reator de leito fluidificado. Ao longo de 436 dias de operação verificou-se elevada remoção de LAS em ambos os reatores, todavia maior remoção e menor adsorção foram registradas para o reator operado em TDH de 12 horas.

Ao longo das etapas de operação verificou-se que a adição de etanol e nitrato exerceram influência na remoção de LAS, notadamente, para o reator RLF1 cujo TDH foi de 8 horas. Neste reator, observou-se que a adição de etanol possibilitou o estabelecimento de microbiota desnitrificante e mesmo após sua retirada na alimentação, registrou-se elevado percentual de remoção do surfactante. A respeito da adição de nitrato, observou-se que na ausência deste (etapa V) houve decréscimo do percentual de remoção de surfactante em RLF1, endossando que a adição de nitrato foi importante para remoção de LAS pela microbiota estabelecida no reator.

Notadamente, em RLF2, observou-se que a adição de etanol e nitrato não influenciou na remoção de LAS, implicando que o TDH aplicado neste reator, ou seja, 12 horas, foi considerado ótimo para obtenção de elevada remoção de surfactante por biomassa de lodos ativados imobilizada em reator de leito fluidificado. Todavia, a adição de etanol e nitrato concomitante na etapa de adaptação favoreceu o estabelecimento de microbiota desnitrificante e hábil na remoção de LAS.

Verificou-se que ao longo da operação, quantidades mínimas de ácidos orgânicos foram detectadas em ambos os reatores, inferindo grande estabilidade reacional destes sistemas biológicos.

Por meio do delineamento do composto central rotacional obteve-se otimização de parâmetros influentes na degradação de LAS, uma vez que se definiu concentração ótima para remoção do surfactante. Etanol (co-substrato) e nitrato foram fatores influentes na degradação de LAS. Observou-se seleção das populações de bactérias nos reatores em batelada em virtude da adição de maior concentração de LAS.

Observou-se elevada remoção de surfactante nos reatores de leito fluidificado, RLF1 e RLF2, operados na condição ótima de degradação de LAS obtida pelo DCCR, endossando a influência do etanol e nitrato na remoção de LAS.

Por meio do sequenciamento via plataforma Illumina MiSeq observou-se que houve modificações na comunidade microbiana dos reatores RLF1 e RLF2, em função da condição nutricional imposta, principalmente à nível taxonômico de família e gênero. A adição de nitrato e etanol simultaneamente, e adicionados separadamente propiciaram maior abundância relativa de micro-organismos relativos à redução de nitrogênio e utilização de etanol como co-substrato. Adicionalmente, verificou-se que os micro-organismos identificados nas fases com adição de água de lavanderia estavam relatados à remoção de compostos tóxicos, e capacidade de desnitrificação.

Em suma, pode-se concluir que as condições impostas no reator de leito fluidificado operado sob TDH de 12 horas foi mais adequado na remoção de LAS de água residuária de lavanderia, obtendo-se grande estabilidade de remoção do tóxico. Neste sistema, verificou-se que a adição concomitante de etanol e nitrato não influenciaram diretamente a remoção de LAS, entretanto, ressalta-se que a adição do receptor de elétrons e do co-substrato favoreceram o crescimento de micro-organismos hábeis na remoção do poluente.

Assim, destaca-se o TDH de 12 horas em reator de leito fluidificado imobilizado com biomassa de lodos ativados para remoção de LAS como uma viável possibilidade para tratamento de água residuária de lavanderia.

7 CONCLUSÕES

- ✓ O TDH foi fator influente na remoção de LAS de água residuária de lavanderia em reator de leito fluidificado. Verificando-se maior remoção e menor adsorção para o reator operado em TDH de 12 horas.
- ✓ Verificou-se que a adição de etanol e nitrato exerceram influência na remoção de LAS, notadamente, para o reator RLF1. Neste reator, observou-se que a adição de etanol possibilitou o estabelecimento de microbiota desnitrificante e considerável remoção de LAS.
- ✓ A respeito da adição de nitrato, observou-se que na ausência deste (etapa V) houve decréscimo do percentual de remoção de surfactante em RLF1, endossando que a adição de nitrato foi importante para remoção de LAS pela microbiota estabelecida no reator.
- ✓ Para RLF2, observou-se que a adição de etanol e nitrato não influenciou na remoção de LAS, implicando que o TDH aplicado neste reator (12 horas), foi considerado ótimo para obtenção de elevada remoção de surfactante por biomassa de lodos ativados imobilizada em reator de leito fluidificado.
- ✓ Etanol (co-substrato) e nitrato foram fatores influentes na degradação de LAS, de acordo com o planejamento experimental. Observou-se seleção das populações de bactérias nos reatores em batelada em virtude da adição de maior concentração de LAS.
- ✓ Na caracterização qualitativa dos efluentes dos reatores RLF1 e RLF2, verificou-se a presença de compostos xenobióticos presentes nas formulações de produtos químicos utilizados em lavanderias comerciais. Em RLF1, observou-se presença de compostos tóxicos como o diisobutil ftalato, capaz de causar desregulação endócrina.
- ✓ Na realização dos bioensaios de toxicidade aguda, observou-se que o LAS foi eficientemente removido em ambos os reatores, uma vez que se verificou a redução da mortalidade do organismo teste utilizado para amostras efluentes dos reatores.

- ✓ Nos ensaios crônicos, verificou-se redução da mortalidade do *Chironomus xanthus*, entretanto, observou-se que em RLF1 os compostos presentes no efluente induziram mortalidade em até 60%.
- ✓ Por meio do sequenciamento via plataforma Illumina MiSeq observou-se que houve modificações na comunidade microbiana dos reatores RLF1 e RLF2, em função da condição nutricional imposta, principalmente à nível taxonômico de família e gênero.
- ✓ A adição de nitrato e etanol simultaneamente, e adicionados separadamente propiciaram maior abundância relativa de micro-organismos relativos à redução de nitrogênio e utilização de etanol como co-substrato.
- ✓ Verificou-se que os micro-organismos identificados nas fases com adição de água de lavanderia estavam relatados à remoção de compostos tóxicos, e capacidade de desnitrificação.

8 SUGESTÕES

- ✓ Ampliação da escala do reator de leito fluidificado inoculado com biomassa de lodos ativados para remoção de LAS de água residuária de lavanderia;
- ✓ Utilização de nitrato em etapa de adaptação da biomassa em reator de escala piloto para promover adaptação e seleção de microbiota degradadora;
- ✓ Utilização de técnicas moleculares como a metatranscriptômica para maior abordagem sobre a degradação do LAS por consórcio microbiano.

9 BIBLIOGRAFIA

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

ABOULHASSAN, M. A.; SOUABI, S.; YAACOUBI, A.; BAUDU, M. Removal of Surfactant from Industrial Wastewaters by Coagulation Flocculation Process. *International Journal of Environmental Science Technology*, v. 3, n. 4, p. 327–332, 2006.

ACHENBACH, L. A.; MICHAELIDOU, U.; BRUCE, R. A.; FRYMAN, J.; COATES, J. D. *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 527–533, 2001.

ADORNO, M. A. T.; HIRAWASA, J.; VARESCHE, M. B. A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2 - C6) by CG-FID headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 5, p. 406–414, 2014.

ALLEN, T. D.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D.; FALSEN, E.; TANNER, R. S. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family Flavobacteriaceae isolated from municipal wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1311–1316, 2006.

ANDRADE, M. V. F.; CORBI, J.; SILVA, E.; VARESCHE, M. B. A. Influence of hydraulic retention time in degradation of anionic surfactant in fluidized bed reactor under anoxic condition. In: ANAEROBIC DIGESTION, 14, 2015. Viña del Mar. *Anais...* Viña del Mar, 2015.

ANGELIDAKI, I.; TORANG, L.; WAUL, C. M.; SCHMIDT J. E. Anaerobic bioprocessing of sewage sludge, focusing on degradation of linear alkylbenzene sulfonates (LAS). *Water Science and Technology*, v. 49, n. 10, p. 115–122, 2004.

AONGHUSA, C. N.; GRAY, N. F. Laundry Detergents as a Source of Heavy Metals in Irish Domestic Wastewater. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 37, n. 1, p. 1–6, 2002.

APHA. *Standard methods for examination of water and wastewater*. 21th Ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

ARSÈNE-PLOETZE, F.; KOECHLER, S.; MARCHAL, M.; COPPÉE, J. Y.; CHANDLER, M.; BONNEFOY, V. et al. (2010). Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome. *PLoS Genet*, v. 6, n. 2: e1000859. doi:10.1371/journal.pgen.1000859

ASOK, A. K., JISHA, M. S. Biodegradation of the Anionic Surfactant Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) by Autochthonous *Pseudomonas* sp. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 223, p. 5039–5048, 2012.

BABBITT, C. W.; LINDNER, A. S. Effect of nitrogen source on methanol oxidation and genetic diversity of methylotrophic mixed cultures enriched from pulp and paper mill biofilms. *Biodegradation*, v. 22, p. 309-320, 2011.

BAYTSHLOK, V.; LU, H.; PARK, H.; KIM, S.; YU, R.; CHANDRAN, K. Impact of Varying Electron Donors on the Molecular Microbial Ecology and Biokinetics of Methylotrophic Denitrifying Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 6, p. 1527-1536, 2009.

BLANCO, E. *Caracterização e tratamento de água residuária de lavanderia comercial em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais*. Monografia (Trabalho de conclusão de curso – Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

BOLL, M.; LOFFLER, C.; MORRIS, B. E.; KUNG, J. W. Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes. *Environmental Microbiology*, v. 16, p. 612–267, 2014.

BRAGA, J. K. *Caracterização microbiana e degradação de surfactante aniônico em reator anaeróbio de leito fluidizado com água de lavanderia comercial*. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

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

BRAGA, J. K.; MOTTERAN, F.; MACEDO, T. Z.; OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; SILVA, E.; VARESCHE, M. B. A. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in commercial laundry wastewater by an anaerobic fluidized bed reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* v. 50, p. 946–957, 2015.

BRANDT, K. K.; HESSELSON, M.; ROSLEV, P.; HENRIKSEN, K.; SORENSEN, J. Surfactant-induced stress of ammonia-oxidizing bacteria: effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on growth rate, viability and metabolism in *Nitrosomonas* and *Nitrospira* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 6, p. 2489-2498, 2001.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd New York: Ed. Springer. 2005.

BRIM, H.; OSBORNE, J. P.; KOSTANDARITHES, H. M.; FREDRICKSON, J. K.; WACKETT, L. P.; DALY, M. J. *Deinococcus radiodurans* engineered for complete toluene degradation facilitates Cr(VI) reduction. *Microbiology*, v.152, p. 2469–2477, 2006.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 1, p. 4516–4522, 2011.

CARMONA, M.; ZAMARRO, M. T.; BLÁSQUEZ, B.; DURANTE-RODRÍGUEZ, G.; JUÁREZ, J. F.; VALDERRAMA, J. A. et al. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 73, p. 71-133, 2009.

- CAROSIA, M. F. *Caracterização microbiana e degradação de detergente de uso doméstico em reator anaeróbio de leito fluidificado*. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- CAROSIA, M. F.; OKADA, D. Y.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Microbial characterization and degradation of linear alkylbenzene sulfonate in an anaerobic reactor treating wastewater containing soap powder. *Bioresource Technology*, v. 167, p. 316-323, 2014.
- CAVALCANTE, R. F.; MARINHO, G. M.; BARBOSA, B. C. A. Impactos ambientais do aquil benzeno sulfonado linear. *Holos*, v. 4, p. 135-143, 2014.
- CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A.; PERALBA, M. D. C. R.; BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 1203-1222, 2012.
- CHAKRABORTY, R.; O'CONNOR, S. M.; CHAN, E.; COATES, J. D. Anaerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Compounds by Dechloromonas Strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8649-8655, 2005.
- CHANG, W.; UM, Y.; HOLOMAN, T. R. P. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnology Letters*, v. 28, p. 425-430, 2006.
- CHEN, H.; JOGLER, M.; ROHDE, M.; KLENK, H. P.; BUSSE, H. J.; TINDALL, B. J.; SPROER, C.; OVERMANN, J. *Sphingobium limneticum* sp. nov. and *Sphingobium boeckii* sp. nov., two freshwater planktonic members of the family Sphingomonadaceae, and reclassification of *Sphingomonas suberifaciens* as *Sphingobium suberifaciens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 735-743, 2013.
- CIABATTI, I.; CESARO, F.; FARALLI, L.; FATARELLA, E.; TOGNOTTI, F. Demonstration of a treatment system for purification and reuse of laundry wastewater. *Desalination*, v. 245, p. 451- 459, 2009.
- COLE, H. A.; OCAMPO, J.; IBEN, J. R.; CHEREJI, R. V.; CLARK, D. J. Heavy transcription of yeast genes correlates with differential loss of histone H2B relative to H4 and queued RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 20, p. 12512-12522, 2014.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução n. 430 de 13 de maio de 2011. Diário Oficial da União, n. 92, p. 89. Brasília, 16 de maio de 2011.
- CORNELIS, P.; DINGEMANS, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, n. 75, p. 1-7, 2013.
- CSEHRÁTI, T.; FORGACS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, v. 2, n. 28, p. 337-348, 2002.
- CZERWIONKA, K.; LUCZKIEWICZ, A.; MAJTACZ, J.; KOWAL, P.; JANKOWSKA, K.; CIESIELSKI, S.; PAGILLA, K.; MAKINIA, J. Acclimation of denitrifying activated sludge to

a single vs. complex external carbon source during a start-up of sequencing batch reactors treating ammonium-rich anaerobic sludge digester liquors. *Biodegradation*, v. 25, p. 881-892, 2014.

DANGMANN, E.; STOLZ, A.; KUHLM, A. E.; HAMMER, A.; FEIGEL, B. J.; NOISOMMIT-RIZZI, N.; RIZZI, M.; REUSS, M.; KNACKMUSS, H.J. Degradation of 4-aminobenzenesulfonate by a two-species bacterial coculture. *Biodegradation*, v. 7, p. 223-229, 1996.

DE WEERT, J.; VINAS, M.; GROTNENHIJNS, T.; RIJNAATS, H.; LANGENHOFF, V. Degradation of 4-n-nonylphenol under nitrate reducing conditions. *Biodegradation*, v. 22, p. 175-187, 2011.

DELFORNO, T. P. *Caracterização microbiana e remoção do alquilbenzeno linear sulfonado em reator EGSB*. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

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

DELFORNO, T. P. OKADA, D. Y., POLIZEL, J.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. *Bioresource Technology*, v. 107, p. 103-109, 2012.

DELFORNO, T. P.; MOURA, A. G. L.; OKADA, D. Y.; VARESCHE, M. B. A. Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. *Bioresource Technology*, v. 192, p. 37-45, 2015.

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

DIAS, F. F.; BHAT, J. V. Microbial Ecology of Activated Sludge. *Applied Microbiology*, v. 13, n. 2, p. 257-261, 1965.

DIONISE, D. Potential and Limits of Biodegradation Processes for the Removal of Organic Xenobiotics from Wastewaters. *ChemBioEng Rev*, V. 1, No. 2, 67-82, 2014.

DOLFING, J.; ZEYER, P.; BINDER-EICHER, P.; SCHWARZENBACH, R.P. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Archives of Microbiology*, v. 154, p. 336-34, 1990.

DORER, C.; VOGT, C.; NEU, T.; RICHNOW, H.H. Characterization of toluene and ethylbenzene biodegradation under nitrate-, iron(III)- and manganese(IV)-reducing conditions by compound-specific isotope analysis. *Environmental Pollution*, v. 211, p. 271-281, 2016.

DORONINA, N. V.; KAPARULLINA, E. N.; TROTSSENKO, Y. A. *Methyloversatilis* thermotolerans sp. nov., a novel thermotolerant facultative methylotroph isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 158-164, 2014.

DOU, L., LIU, X., DING, A. Anaerobic degradation of naphthalene by the mixed bacteria under nitrate reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, p. 325–331, 2009.

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

DUARTE, I. C. S.; FRANÇA, P.; OKADA, D. Y.; PRADO, P.; VARESCHE, M. B. A. Anaerobic degradation of anionic surfactants by indigenous microorganisms from sediments of a tropical polluted river in Brazil. *Revista de Biología Tropical*, v. 63, n.1, p. 395-302, 2015a.

DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; BUZZINI, A. P.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Development of a method by HPLC to determine LAS and its application in anaerobic reactors. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 7, p. 1360-1367, 2006.

DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; SAAVEDRA, N. K. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of the microbial diversity in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor treating linear alkylbenzene sulfonate. *Biodegradation*, v. 19, n. 3, p. 375-385, 2008.

DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; SAAVEDRA, N. K. D.; OKADA, D. Y.; MAYOR, M. S.; VARESCHE, M. B. A. Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in mesophilic anaerobic sequencing batch reactor. In: VILAS, A. M. (ed) *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Sevilha: World Scientific Pub Co Inc, 2010. p. 352-355.

DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L.; OKADA, D. Y.; PRADO, P.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of the Microbial Diversity in Sequencing Batch Reactor Treating Linear Alkylbenzene Sulfonate under Denitrifying and Mesophilic Conditions Using Swine Sludge as Inoculum. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 58, n. 3, p. 326-332, 2015b.

DUEHOLM, M. S.; ALBERTSEN, M.; STOKHOLM-BJERREGAARD, M.; MCILROY, S. J.; KARST, S. M.; NIELSEN, P. H. Complete Genome Sequence of the Bacterium Aalborg_AAW-1, Representing a Novel Family within the Candidate Phylum SR1. *Genome Announcements*, v. 3, n. 3, p. 1-2, 2015.

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

ERIKSSON, E.; AUFFARTH, K.; HENZE, M.; LEDIN, A. Characteristics of grey wastewater. *Urban Water Journal*, v. 4, n. 1, p. 85-104, 2002.

ESTRADA-ARRIEAGA, E. B.; MIJAYLOVA, P. N. Influence of operational parameters (sludge retention time and hydraulic residence time) on the removal of estrogens by membrane bioreactor. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 18, p.1121-1128, 2011.

ETTWIG, K.F.; BUTLER, M.K.; LE PASLIER, D.; PELLETIER, E.; MANGENOT, S.; KUYPERS, M.M.M.; SCHREIBER, F.; DUTILH, B.E.; ZEDELIOUS, J.; DE BEER, D.; GLOERICH, J.; WESSELS, H.J.C.T.; VAN ALEN, T.; LUESKEN, F.; WU, M.L.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; OP DENCAMP, H.J.M.; JANSSEN-MEGENS, E.M.; FRANCOIJS,

K.J.; STUNNENBERG, H.; WEISSENBAACH, J.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, v. 464, p. 543-548, 2010.

FARIA, C. V. *Remoção e degradação de alquilbenzeno linear sulfonado de água residuária de lavanderia diluída em esgoto sanitário*. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

FUCHS, G. Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008.

GABRIEL, F. L. P.; CYRIS, M.; JONKERS, N.; GIGER, W.; GUENTHER, K.; KOHLER, H. E. Elucidation of the ipso-Substitution Mechanism for Side-Chain Cleavage of α -Quaternary 4-Nonylphenols and 4-t-Butoxyphenol in *Sphingobium xenophagum* Bayram. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 10, p. 3320-3326, 2007.

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; DALMAU, M.; ILLAN, P.; SANCHEZ-LEAL, J. Inhibition of biogas production by alkyl benzene sulfonates (LAS) in a screening test for anaerobic biodegradability. *Biodegradation*, v. 17, n. 1, p. 39-46, 2006.

GARCIA, M.; CAMPOS, E.; DALMAU, M.; ILLAN, O.; SANCHEZ-LEAL, J. Inhibition of biogas production by alkyl benzene sulfonate (LAS) in a screening test for anaerobic biodegradability. *Biodegradation*, v.17, n 1, p. 39 – 46, 2005.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 34, p. 36-43, 2005.

GODOY, F.; VANCANNEYT, M.; MARTÍNEZ, M.; STEINBUCHER, A.; SWINGS, J.; REHM, B. H. A. *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 473-477, 2003.

GONZALEZ-MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, A.; MUÑOZ-PALAZON, B.; GARCIA-RUIZ, M. J.; OSORIO, F.; LOOSDRECHT, M. C. M.; GONZALEZ-LOPES, J. Microbial community analysis of a full-scale DEMON bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, n. 3, p. 499-508, 2015.

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

GUSMÃO, V.; MARTINS, T. H.; CHINALIA, F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 6, p. 1391-1400, 2007.

HAMADA, N.; MESQUITA, L. C. A.; PEREIRA, I.; NAKANO, E.; BORRELY, S.; TALLARICO, L. Avaliação ecotoxicológica da Estação de Tratamento de Esgotos Suzano (São Paulo) utilizando *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 6, n. 1, p. 31-35, 2011.

HAMZA, R. A.; IORHEMEN, O. T.; TAY, J. H. Occurrence, impacts and removal of emerging substances of concern from wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, v. 5, p. 161–175, 2016.

HEYLEN, K.; LEBBE, L.; VOS, P. D. *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 73–77, 2008.

HOLUBAR, P.; ANDORFER, C.; BRAUN, R. Effects of nitrogen limitation on bio@lm formation in a hydrocarbon-degrading trickle-bed filter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, p. 536–540, 1999.

IVANKOVIĆ, T.; HRENOVIĆ, J. Surfactants in the environment. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v. 61, p. 95–110, 2010.

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

JIA, S.; HAN, H.; ZHUANG, H.; HOU, B. The pollutants removal and bacterial community dynamics relationship within a full-scale British Gas/Lurgi coal gasification wastewater treatment using a novel system. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 103–110, 2016.

JOGLER, C.; GLOCKNER, F. O.; KOLTER, R. Characterization of *Planctomyces limnophilus* and Development of Genetic Tools for Its Manipulation Establish It as a Model Species for the Phylum Planctomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 16, p. 5826–5829, 2011.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C.A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 6. ed. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2011, 1050p.

JURELEVICIUS, D.; ALVAREZ, V. M.; MARQUES, J. M.; LIMA, L. R. F.; DIAS, F. A.; SELDIN, L. Bacterial Community Response to Petroleum Hydrocarbon Amendments in Freshwater, Marine, and Hypersaline Water-Containing Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 19, p. 5927–5935, 2013.

KALYUZHNAIA, M. G.; MARCO, P. D.; BOWERMAN, S.; PACHECO, C. C.; LARA, J. C.; LIDSTROM, M. E.; CHISTOSERDOVA, L. *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp. nov., a novel taxon within the Betaproteobacteria represented by three methylophilic isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 2517–2522, 2006.

KÄMPFER, P.; LODDERS, N.; FALSEN, E. *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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p. 518–523, 2011.

KÄMPFER, P.; WITZENBERGER, R.; DENNER, E. B. M.; BUSSE, H. J.; NEEF, A. *Sphingopyxis wittflariensis* sp. nov., isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 2029–2034, 2002.

KARAHAN, O. Inhibition effect of linear alkylbenzene sulphonates on the biodegradation mechanism of active sludge. *Bioresource Technology*, v. 101, n.1, p. 92 – 97, 2010.

KHARUSI, S. A.; ABED, R. M. M.; DOBRETISOV, S. EDTA addition enhances bacterial respiration activities and hydrocarbon degradation in bioaugmented and non-bioaugmented oil-contaminated desert soils. *Chemosphere*, v. 147, p. 279-286, 2016.

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

KHLEIFAT K. M., HALASAH RA, TARAWNEH K A, HALASAH Z, SHAWABKEH R, WEDYAN MA. Biodegradation of linear alkylbenzenesulfonate by Burkholderia sp.: effect of some growth conditions. *Int. J. Agric. Biol.*, 12 (1): 17–25, 2010.

KIM, M. K.; IM, W. T.; OHTA, H.; LEE, M.; LEE, S. T. Sphingopyxis granuli sp. nov., a β -Glucosidase-Producing Bacterium in the Family Sphingomonadaceae in α -4 Subclass of the Proteobacteria. *The Journal of Microbiology*, v. 43, n. 2, p.152-157, 2005.

KIM, T. S.; JEONG, J. Y.; WELLS, J. F.; PARK, H. D. General and rare bacterial taxa demonstrating different temporal dynamic patterns in an activated sludge bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 1755–1765, 2013.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SSHWEER, T., PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLOCKNER, F. O. Evaluation of a general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, v. 41, e. 1, 2013.

KOCH, H.; LUCKER, S.; ALBERTSEN, M.; KTZINGER, K.; HERBOLD, C.; SPIECK, E.; NIELSEN, P. H.; WAGNER, M.; DAIMS, H. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus Nitrospira. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 36, p. 11371–11376, 2015.

LAANBROEK, H. J.; GEERLIGS, H. J.; SIJTSMA, L.; VELDKAMP, H. Competition for Sulfate and Ethanol Among Desulfobacter, Desulfobulbus, and Desulfovibrio Species Isolated from Intertidal Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 329-334, 1984.

LARA-MARTÍN, P. A.; GÓMEZ-PARRA, A.; SANZ, J. L.; GONZÁLEZ-MAZO, E. Anaerobic Degradation Pathway of Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) in Sulfate-Reducing Marine Sediments. *Environmental Science & Technology*, v. 44, p. 1670–1676, 2010.

LEE, J.; PARK, B.; WOO, S. G.; LEE, J.; PARK, J. Prosthecobacter algae sp. nov., isolated from activated sludge using algal metabolites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 663–667, 2014.

LEÓN VM, C LÓPEZ, PA LARA -MARTÍN, D PRATS, P VARÒ, E GONZÁLEZ-MAZO. Removal of LAS and their degradation intermediates at low temperatures during activated sludge treatment. *Chemosphere*, 64: 1157-1166, 2006.

LIANG, J.; XIAO-JUAN, W.; ZONG-LIAN-, G.; DE-ZHI, Z.; SI-QIN, X. Biodegradation of Lubricating Oil in Wastewater with ZoogZoea sp. *Pedosphere*, v. 16, n. 4, p. 540-544, 2006.

- LIANG, Q.; LLOYD-JONES, G. *Sphingobium scionense* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p. 413–416, 2010.
- LIN, S. Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B.; CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 761–765, 2009.
- LIU, Z. P.; WANG, B. J.; LIU, Y. H.; LIU, S. J. *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 1229–1232, 2005.
- LOVLEY, D. R.; UEKI, T.; ZHANG, T.; MALVANKAR, N. S.; SHRESTHA, P. M.; FLANAGAN, K. A.; AKLUJKAR, M.; BUTLER, J. E. et al. *Geobacter: The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications. Advances in Microbial Physiology*, v. 59, 2011.
- LOZADA, M.; FIGUEROLA, E. L. M.; ITRIA, R. F.; ERIJMAN, L. Replicability of dominant bacterial populations after long-term surfactant-enrichment in lab-scale activated sludge. *Environmental Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 625–638, 2006.
- LU, H.; CHANDRAN, K.; STENSEL, D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Research*, v. 4, p. 237 – 254, 2014.
- MA, J.; NOSSA, C. W.; XIU, Z.; RIXEY, W. G.; ALVAREZ, P. J. J. Adaptive Microbial population shifts in response to a continuous ethanol blend release increases biodegradation potential. *Environmental Pollution*, v. 178, p. 419-425, 2013.
- MACEDO, T. Z. *Remoção e degradação de alquilbenzeno linear sulfonado em água residuária de lavadeira comercial em reator anaeróbio de leito fluidificado com biomassa adaptada*. 2013. Monografia (Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos.
- MACEDO, T. Z.; OKADA, D., Y.; DELFORNO, T. P.; BRAGA, J. K.; SILVA, E.; VARESCHE, M. B. A. The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrate in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.38, n.10, p. 1835-1844, 2015.
- MACEDO, Z. T. *Avaliação da influência da fonte suplementar de carbono na remoção de alquilbenzeno linear sulfonado de água de lavanderia e comunidade microbiana relacionada em reator anaeróbio de leito fluidificado*. 2015. 136p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos.
- MADIGAN, M. *Microbiologia de Brock*. 12º Ed. Artmed, 1160 p. 2010.
- MAINTIGUER, S. I.; ADORNO, M. A. T.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of the microbial diversity of the denitrifying bacteria in batch reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 03, p. 457-465, 2013.

- MAINTINGUER, S. I.; SAKAMOTO, I. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of the microbial diversity of denitrifying bacteria in batch reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 03, p. 457-465, 2013.
- MAKI, H.; MASUDA, N.; FUJIWARA, Y.; IKE, M.; FUJITA, M. Degradation of Alkylphenol Ethoxylates by *Pseudomonas* sp. Strain TR01. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 7, p. 2265-2271, 1994.
- MBADINGA, L. M.; WANG, L.; ZHOU, L.; LIU, J.; GU, J.; MU, B. Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 1, p. 1-13, 2011.
- MEYER, I. MARIN, V.; REYES-RAMIREZ, F.; HEIPIEPER, H. Caracterización fisiológica, molecular y genética de una cepa de *Magnetospirillum* aislada de un bioreactor con tolueno. *Biosaia*, n. 2, 2013.
- MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J. A. D.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Toxic effects of cadmium (Cd^{2+}) on anaerobic biomass: Kinetic and metabolic implications. *Journal of Environmental Management*, v. 106, p. 75-84, 2012.
- MOGENSEN, A. S.; HAAGENSES, F.; AHRING, B. K., Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, n. 4, p. 706-711, 2003.
- MOTTERAN, F. *Caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbico de leito fluidificado envolvida na degradação de surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL)*. 2013. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos.
- MOURA, R. B. *Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e circulação do efluente*. 2014. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos.
- MUDA, K.; ARIS, A.; SALIM, M. R.; IBRAHIM, Z.; LOOSDRECHT, M. C. M.; AHMAD, A.; NAWAHWI, M. Z. The effect of hydraulic retention time on granular sludge biomass in treating textile wastewater. *Water Research*, v. 45, p. 4711-4721, 2011.
- MUDHOO, A.; KUMAR, S. Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *International Journal of Environmental Science Technology*, v. 10, p. 1383-1398, 2013.
- MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Anionic Surfactants in Treated Sewage and Sludges: Risk Assessment to Aquatic and Terrestrial Environments. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 8, p. 2919-2929, 2008.
- MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P., Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, n. 8, p. 981-987, 2009.
- MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 19, p. 5636–5643, 1996.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 19, p. 5636–5643, 1996.

OEHMEN, A.; CARVALHO, G.; LOPEZ-VASQUEZ, C. M.; LOOSDRETCH, M. C. M.; REIS, M. A. M. Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Research*, v. 44, p. 4992–5004, 2010.

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

OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; ESTEVES, A. S.; SAKAMOTO, I. K.; DUARTE, I.; VARESCHE, M. Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate. *Bioresource technology*, v. 128, p. 125–133, 2013b.

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

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

OKADA, Y. D. *Degradação de surfactante aniônico em reator UASB com água residuária de lavanderia*. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

OKPOKWASILI, G. C.; OLISA, A. O. River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoo. *Water Research*, v. 25, n. 11, p. 1425–1429, 1991.

OLIVEIRA, L. L. *Remoção de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado*. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

OLIVEIRA, L. L.; COSTA, R. B.; OKADA, D. Y.; VICH, D. V.; DUARTE, I. C. S.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5112–5122, 2010.

OLIVEIRA, L. L.; COSTA, R. B.; SAKAMOTO, I. K.; DUARTE, C. S.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. LAS degradation in a fluidized bed reactor and phylogenetic characterization of the biofilm. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 03, p. 521-529, 2013.

PATI, S. S.; JENA, H. M. Statistical optimization of phenol degradation by *Bacillus pumilus* OS1 using plackett-bruman design and response surface methodology. *Arabian Journal for Science and Engineering*, v. 40, n. 8, p. 2141-2151, 2015.

PAULO, A. M. S.; PLUGGE, C. M.; GARCÍA-ERCINA, C. A.; STAMS, A. J. M. Anaerobic degradation of sodium dodecyl sulfate (SDS) by denitrifying bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 84, p. 14-20, 2013.

PENTEADO, J. C. P.; EL SEOUD, O. A.; CARVALHO, L. R. F. Alquilbenzeno Sulfonato Linear: Uma Abordagem Ambiental e Analítica. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1038-1046, 2006

PILLONI, G.; NETZER, F.; ENGEL, M.; LUEDERS, T. Electronacceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. *Microbiology Ecology*, v. 78, p. 165-175, 2011.

PISHGAR, R.; NAJAPOUR, G. D.; NEYA, B. N.; MOUSAFI, N.; BAKHSHI, Z. Effects of organic loading rate and hydraulic retention time on treatment of phenolic wastewater in an anaerobic immobilized fluidized bed reactor. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, v. 22, n. 1, p. 40-49, 2014.

PRADINI, A.; ALMEIDA, M.; OKADA, D.; SAKAMOTO, I.; PRADO, P.; RODRIGUES, K.; DUARTE, I. C. S. Avaliação da riqueza bacteriana presente em diferentes inóculos utilizados na degradação de surfactante aniônico. *Revista AIDIS*, v. 8, n. 2, p. 171-185, 2015.

QU, J. H.; YUAN, H. L. *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 2191-2194, 2008.

RABUS, R.; WILKES, H.; SCHRAMM, A.; HARMS, G.; BEHRENDTS, A.; AMANN, R.; WIDDEL, F. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of Proteobacteria. *Environmental Microbiology*, v. 1, n. 2, p. 145-157, 1999.

RABUS, R.; WILKES, H.; BEHRENDTS, A.; ARMSTROFF, A.; FISCHER, T.; PIERIK, A. J.; WIDDEL, F. Anaerobic Initial Reaction of n-Alkanes in a Denitrifying Bacterium: Evidence for (1-Methylpentyl) succinate as Initial Product and for Involvement of an Organic Radical in n-Hexane Metabolism. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 5, p. 1707-1715, 2001.

RABUS, R.; WILKES, H.; SCHRAMM, A.; HARMS, G.; BEHRENDTS, A.; AMANN, R.; WIDDEL, F. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of Proteobacteria. *Environmental Microbiology*, v. 1, n. 2, p. 145-157, 1999.

RAMOS, D. T.; SILVA, M. L. B.; NOSSA, C. W.; ALVAREZ, P. J. J.; CORSEUIL, H. X. Assessment of microbial communities associated with fermentative-methanogenic

biodegradation of aromatic hydrocarbons in groundwater contaminated with a biodiesel blend (B20). *Biodegradation*, v. 25, p. 681–691, 2014.

REBELLO, S.; ASOK, A. K.; MUNDAYOOR, S.; JISHA, M. S. Surfactants: Chemistry, Toxicity and Remediation. In: *Pollutant Diseases, Remediation and Recycling, Environmental Chemistry for a Sustainable World 4*. Switzerland: Springer International Publishing, 2013.

REBELLO, S.; ASOK, A. K.; MUNDAYOOR, S.; JISHA, M. S. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental Chemistry Letters*, v. 12, p. 275–287, 2014.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, v. 58, n.5, p. 406–411, 1986.

ROMANELLI, M. F.; SILVA, G. P.; BORRELY, S. I. Redução da Toxicidade do Surfactante LAS Tratado com o Feixe de Elétrons. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 1, n. 2, p. 103–107, 2006.

ROY, M.; KHARA, P.; BASU, S.; DUTTA, T. K. Catabolic Versatility of *Sphingobium* sp. Strain PNB Capable of Degrading Structurally Diverse Aromatic Compounds. *Bioremediation & Biodegradation*, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2013.

SÁEZ, F.; POZO, C.; GÓMEZ, M. A.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; RODELAS, B.; GÓNZALEZ-LOPEZ, J. Growth and denitrifying activity of *Xanthobacter autotrophicus* CECT 7064 in the presence of selected pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, p. 563–567, 2006.

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, v. 20, n. 6, p. 243–248, 2002.

SANCHEZ-PEINADO, M. D.; GÓNZALEZ-LOPEZ, J.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V. POZO, C.; RODELAS, B. Influence of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the structure of Alphaproteobacteria, Actinobacteria, and Acidobacteria communities in a soil microcosm. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, p. 779–790, 2010.

SANTOS, C. E. D. *Influência da relação carbono/nitrogênio e da fonte de carbono no processo de nitrificação e desnitrificação simultânea em reator de leito estruturado*. 2014. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos.

SANTOS, S. G.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Comparison of Methanol, Ethanol, and Methane as Electron Donors for Denitrification. *Environmental Engineering Science*, v. 21, n. 3, p. 313–320, 2004.

SANZ, J. L.; CULUBRET, E.; DE FERRER, J.; MORENO, A.; BERNA, J. L. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biodegradation*, v. 14, n. 1, 57–64, 2003.

SAUNDERS, A. M.; ALBERTSEN, M.; VOLLERTSEN, J.; NIELSEN, P. H. The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, v. 10, p. 11-20, 2016.

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

SHEN, J.; CHEN, Y.; WU, H.; LIU, X.; SUN, X.; LI, J.; WANG, J. Enhanced pyridine biodegradation under anoxic condition: The key role of nitrate as the electron acceptor. *Chemical Engineering Journal*, v. 277, p. 140–149, 2015.

SHEN, Z.; ZHOU, Y.; WANG, J. Comparison of denitrification performance and microbial diversity using starch/polylactic acid blends and ethanol as electron donor for nitrate removal. *Bioresource Technology*, v. 131, p. 33–39, 2013.

SHERRY, A.; GRAY, N. D.; DITCHFIELD, A. K.; AITKEN, C. M.; JONES, D. M.; ROLING, W. F. M.; HALLMANN, C.; LARTER, S. R.; BOWLER, B. J. F.; HEAD, I. M. Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized sulphate-reducing taxa. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 81, p. 105-113, 2013.

SHINODA, Y.; AKAGI, J.; UCHIHASHI, Y.; HIRAISHI, A.; YUKAWA, H.; YURIMOTO, H.; SAKAI, H.; KATO, N. Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds by Magnetospirillum Strains: Isolation and Degradation Genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 69, n. 8, p. 1483–1491, 2005.

SILVA, M. L. R. *Análise dos parâmetros que interferem no metabolismo da microbiota anaeróbia e anóxica na remoção de bifenilas policloradas*. 2015. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos.

SINGH, H. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. Wiley, Hoboken, 2006;

ŠOSTAR-TURK, S.; PETRINIĆ, I.; SIMONIĆ, M. Laundry wastewater treatment using coagulation and membrane filtration. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 44, p. 185-196, 2005.

SPEECE, R. E. *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Nashville, TN: Archae Press, 1996.

SPORMANN, A. R.; WIDDEL, F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, v. 11, p. 85–105, 2000.

TAKEUSHI, M.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A. Proposal of the genus Sphingomonas sensu stricto and three new genera, Sphingobium, Novosphingobium and Sphingopyxis, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 1405–1417, 2001.

TÁNCICS, A.; SZABÓ, I.; BAKA, E.; SZOBOSZLAY, S.; KUKOLYA, J.; KRISZT, B.; MÁRIALIGETI, K. Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in

hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 33, p. 398-406, 2010.

TANG, Y. Q.; LI, Y.; ZHAO, J. Y.; CHI, C. Q.; HUANG, L. X.; DONG, H. P.; WU, X. L. Microbial Communities in Long-Term, Water-Flooded Petroleum Reservoirs with Different in situ Temperatures in the Huabei Oilfield, China. *Microbial Communities in Oil Reservoirs*, v. 7, n. 3, p. 1-15, 2012.

THIROLA, M. A.; MANNISTO, M. K.; PUHAKKA, J. A.; KULOMAA, M. S. Isolation and Characterization of *Novosphingobium* sp. Strain MT1, a Dominant Polychlorophenol-Degrading Strain in a Groundwater Bioremediation System. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 173-180, 2002.

THOMSEN TR, KONG Y, NIELSEN PH. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria inactivated sludge. *FEMS Microbiol Ecol* 60(3):370–382, 2007.

WANG, Z.; YANG, Y.; XIE, Y. Anaerobic biodegradation of nonylphenol in river sediment under nitrate- or sulfate-reducing conditions and associated bacterial community. *Journal of Hazardous Materials*, v. 286, p. 306–314, 2015.

WARD, N. L.; CHALLACOMBE, J. F.; JANSSEN, P. H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D. H.; SAIT, M.; BADGER, J. et al. Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; KAKU, N. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiology*, v. 2, 2002.

WILSON. L. P.; BOWER, E. J. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 18, p. 116–130, 1997.

XU, M.; ZHANG, Q.; XIA, C.; ZHONG, Y.; SUN, G.; GUO, J.; YUAN, T.; ZHOU, J.; HE, Z. Elevated nitrate enriches microbial functional genes for potential bioremediation of complexly contaminated sediments. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, v. 8, p. 1932-1944, 2014.

YING, G.G. Fate, behavior, and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, v. 32, p. 417-431, 2006.

ZEDELIUS, J.; RABUS, R.; GRUNDMANN, O.; WERNER, I.; BRODKORB, D.; SCHREIBER, F.; EHRENREICH, P.; BEHRENDTS, A.; WILKES, H.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; WIDDEL, F. Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation. *Environmental Microbiology Reports*, v. 3, n. 1, 125–135, 2011.

ZEYER, J.; KERNEY, P. C. Microbial degradation of para- chloroaniline as sole carbon and nitrogen source. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 17, p 215-223, 1989.

ZHANG, Y.; WANG, X.; HU, M.; LI, P. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the biodegradation of trichloroethylene wastewater and anaerobic bacterial community in the UASB reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, p. 1977-1987, 2015.

10 ANEXOS

Figura 1. Avaliação temporal de LAS nos reatores em batelada do Ensaio I.

Figura 2. Avaliação temporal de LAS nos reatores em batelada do Ensaio II.