**Caracterização Microbiológica de Cultura Desnitrificante de
Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo Utilizado na
Remoção de BTEX**

Valquiria Ribeiro de Gusmão

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

Valquiria Ribeiro de Gusmão

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CULTURA
DESNITRIFICANTE DE REATOR ANAERÓBIO
HORIZONTAL DE LEITO FIXO UTILIZADO NA
REMOÇÃO DE BTEX.**

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
Hidráulica e Saneamento.

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

São Carlos
2005

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

G982c

Gusmão, Valquiria Ribeiro de
Caracterização microbiológica de cultura
desnitrificante de reator anaeróbio horizontal de leito
fixo utilizado na remoção de BTEX / Valquiria Ribeiro de
Gusmão. -- São Carlos, 2005.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-
Universidade de São Paulo, 2005.

Área : Hidráulica e Saneamento.

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

1. Biodegradação. 2. Benzeno. 3. Tolueno.
4. Etilbenzeno. 5. Xilenos. 6. RAHLF. 7. Bactérias
desnitrificantes. 8. *Paracoccus* e *Pseudomonas*.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **VALQUIRIA RIBEIRO DE GUSMÃO**

Tese defendida e julgada em 23-09-2005 perante a Comissão Julgadora:

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

Aprovada

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

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

Aprovada

Profª. Dra. **SÀVIA GAVAZZA DOS SANTOS**
(Universidade Federal de Pernambuco/UFPE)

Aprovada

Profª. Dra. **CLAUDIA ETCHEBEHERE ARENAS**
(Universidad de la Republica/Montevideo)

APROVADA

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

A DEUS

Porque tu tens sido o meu auxílio, jubiloso
cantarei refugiado à sombra das tuas asas.

Aos meus pais e irmãos

pelo amor que nos sustenta como família.

Ao José Antônio,

por ter dividido comigo todos os momentos
desta etapa, sendo, muitas vezes, os meus
braços, minha mente e o meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Professora Bernadete pela orientação, oportunidade do trabalho, confiança em mim depositada e pelo espírito aguerrido com que conduz os seus trabalhos.

A Professora Beth Moraes, pela paciência nos valiosos conhecimentos repassados, pelo exemplo de tranquilidade, harmonia, compreensão das relações humanas e, especialmente, pelo acolhimento.

A família LPB (amigos, professores e funcionários), pela excelente convivência e calorosas trocas de conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

GUSMÃO, V.R. (2005). *Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator anaeróbio horizontal de leito fixo utilizado na remoção de BTEX*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

Hidrocarbonetos aromáticos conhecidos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) estão entre os maiores problemas de poluição ambiental. Estes compostos são reconhecidos por sua recalcitrância em ambientes anóxicos, e a remoção destes hidrocarbonetos, de sítios anaeróbios contaminados é dependente da atividade de uma população de microrganismos adaptados capazes de promover a biodegradação destes compostos, nestas condições. Neste sentido, o presente trabalho buscou purificar, caracterizar e utilizar cultura desnitrificante, como inóculo para desenvolvimento de biofilme, em reator anaeróbio de leito fixo preenchido com espumas de poliuretano, além de avaliar o potencial deste biofilme em promover a biodegradação dos compostos de BTEX. Células da cultura apresentaram coloração Gram negativa, com morfologia de cocos (diplococos e cocobacilos). A cultura foi capaz de crescer, sob condições desnitrificantes, utilizando diferentes substratos. A cultura não apresentou capacidade de crescer sob condições sulfetogênicas. Velocidades de crescimento (μ) de $0,046\text{ h}^{-1}$ e $0,050\text{ h}^{-1}$ e tempos de geração (T_g) de 15,1 horas e 13,9 horas foram obtidos para as células crescidas em benzeno e etilbenzeno, respectivamente. A cultura purificada foi utilizada para formar biofilme em RAHLF. Em todas as condições de alimentação as quais os reatores foram submetidos houve remoção da matéria orgânica, nitrato e dos hidrocarbonetos. A menor eficiência de remoção de hidrocarbonetos foi de 89,4%, obtida durante a alimentação dos reatores com benzeno. A matéria orgânica (DQO) foi removida com eficiência média de 87,1%. A eficiência média de remoção de nitrato foi de 94%. O sequenciamento das amostras revelou que o biofilme do RAHLF1 foi formado, principalmente, por espécies de *Paracoccus*, *Pseudomonas* e *Bacteroides*, enquanto que no RAHLF2, alimentado com etilbenzeno, observou-se espécies dos gêneros: *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Variovorax*.

Palavras chave: biodegradação, benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos, RAHLF, bactérias desnitrificantes, *Paracoccus* e *Pseudomonas*.

ABSTRACT

GUSMÃO, V.R. (2005). *Microbiologic characterization of anaerobic packed-bed reactor denitrifying culture used for BTEX removal*. Ph.D. Thesis – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

The monoaromatic hydrocarbons known as BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene) are among the greatest environmental pollution problems. These compounds are known by their recalcitrance in anoxic environments, and the removal of these toxics from anaerobic contaminated sites depends on the presence of an adapted microbial population capable of to promote the biodegradation of these compounds under such condition. Thus, in the current study a denitrifying culture was purified, characterized and used as inoculum to form a biofilm in a in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor filled with polyurethane foam, and to assess the potential of this biofilm to promote BTEX compounds biodegradation. Culture cells were Gram negative, with coccus (diplococcus and cocobacilli) morphology. The culture was able to grow, under denitrifying conditions, using different substrates. No growth was seen in sulfate-reducing conditions. Growth velocity (μ) of 0.046h^{-1} and 0.050h^{-1} , and generation time of 15.1 and 13.9 hours were obtained for cultures isolated in the presence of benzene and ethylbenzene, respectively. The purified culture was used to form a biofilm inside RAHLF. At all feeding conditions the reactors were submitted the organic matter, nitrate and hydrocarbons were removed. The smallest hydrocarbons removal efficiency was 89.4%, obtained during benzene feeding. The organic matter (COD) was removed with mean efficiency of 87.1%. The mean efficiency of nitrate removal was 94.0%. Sequencing of samples showed that the RAHLF1 biofilm was composed specially for *Paracoccus*, *Pseudomonas* and *Bacteroides* species. Biofilm of RAHLF2 reactor, obtained from ethylbenzene feeding, was composed by *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Variovorax* species.

Keywords: biodegradation, benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes, HAIB, denitrifying bacteria, *Paracoccus* and *Pseudomonas*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Fluxograma da primeira etapa experimental dos ensaios em reatores em batelada	24
FIGURA 2 -	Fluxograma das etapas experimentais realizadas no RAHLF1	25
FIGURA 3 -	Fluxograma das etapas dos ensaios realizados no RAHLF 2	26
FIGURA 4 -	Esquema da metodologia da diluição seriada	31
FIGURA 5 -	Reatores utilizados nos ensaios de determinação do tempo de geração	35
FIGURA 6 -	Fotografia do RALHF instalado na câmara aclimatizada	37
FIGURA 7 -	Microscopia de contraste de fase das morfologias predominantes observadas em amostras dos reatores alimentados com meio Zinder: bacilos, (b) cocobacilos, (c) morfologia semelhante a <i>Methanosaeta</i> sp. 1500X	54
FIGURA 8 -	Microscopia de contraste de fase das morfologias predominantes observadas em amostras dos reatores alimentados com meio Dolfing: bacilos, (b) cocobacilos, (c) morfologia semelhante a <i>Methanosaeta</i> sp. 1500X	55
FIGURA 9 -	Variação temporal da concentração média de nitrato (N-NO_3^-) nos reatores em batelada alimentados com meio Zinder e Dolfing.	56
FIGURA 10 -	Variação temporal de nitrato (N-NO_3^-) nos reatores em batelada alimentados com os meios Zinder e Dolfing, modificados	57
FIGURA 11 -	Microscopia de contraste de fase das amostras do reator em batelada alimentado com meio Zinder modificado: (a) bacilos, (b) bacilos em cadeia e cocos. 1500X	58
FIGURA 12 -	Microscopia de contraste de fase das amostras do reator em batelada alimentado com meio Dolfing modificado: (a) bacilos e cocos, (b) bacilos em cadeia, cocobacilos, cocos, bacilos curvos. 1500X	58
FIGURA 13 -	Microscopia de contraste de fase e fluorescência de amostras dos reatores em batelada alimentados com meio Zinder e meio Dolfing: (a) células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp. (b) células semelhantes a <i>Methanosarcina</i> sp. e (c) bacilos fluorescentes. 1500X	59
FIGURA 14 -	Microscopia de contraste de fase das morfologias observadas na fase de purificação do inóculo em presença de benzeno (a, b – diluição 10^{-5}) e etilbenzeno (c, d – diluição 10^{-5}). 1500X	60
FIGURA 15 -	Microscopia de contraste de fase. Morfologias predominantes nos isolamentos em placas de Petri em presença de (a) benzeno (10mg/L) e (b) etilbenzeno (10mg/L). 1500X	61
FIGURA 16 -	Colônias obtidas do isolamento nos meios contendo (a) benzeno e (b) etilbenzeno	61

FIGURA 17 -	Células Gram negativas, isoladas em (a) benzeno e (b) etilbenzeno. 1500X	62
FIGURA 18 -	Microscopia de contraste de fase dos grânulos intracelulares observados nas células isoladas em etilbenzeno. 1500X	62
FIGURA 19 -	Acúmulo de óxido nitroso observado no reator com acetileno	64
FIGURA 20 -	Crescimento em diferentes substratos para as culturas isoladas em presença de benzeno e etilbenzeno, sob condições desnitrificantes	66
FIGURA 21 -	Crescimento em diferentes substratos para as culturas isoladas em presença de benzeno e etilbenzeno, sob condições fermentativas.	66
FIGURA 22 -	Microscopia de contraste de fase das morfologias observadas durante o monitoramento do ensaio de caracterização nutricional sob condições fermentativas. As setas indicam bacilos observados no crescimento com: (a) acetato, (b) glicose, (c) propionato, (d) butirato, (e) etanol e (f) lactato.	67
FIGURA 23 -	Bacilos com extremidades arredondadas, em presença de benzeno (a), tolueno (b), etilbenzeno e (d) <i>p</i> -xileno, sob condições fermentativas.	68
FIGURA 24 -	Microscopia de contraste de fase da cultura em meio contendo lactato (10mM), em condição fermentativa	68
FIGURA 25 -	Variação temporal do crescimento celular (densidade óptica 600nm) e consumo de nitrato (N-NO_3^-) nos reatores alimentados com (a) etilbenzeno, nitrato e etanol e (b) benzeno, nitrato e etanol.	70
FIGURA 26 -	Representação gráfica da absorbância em função do tempo nos reatores alimentados com (a) benzeno, etanol e nitrato e (b) etilbenzeno, etanol e nitrato.	71
FIGURA 27 -	Representação gráfica da absorbância em função do tempo nos reatores controles (etanol e nitrato) com células isoladas em (a) benzeno e (b) etilbenzeno.	72
FIGURA 28 -	Pleomorfismo observado nas células dos reatores, após a retirada da recirculação da cultura em microscopia de contraste de fase(1500X).	75
FIGURA 29 -	Microscopia de contraste de fase dos bacilos observados no biofilme dos reatores alimentados com (a) benzeno e (b) etilbenzeno.	76
FIGURA 30 -	Variação temporal da concentração de $\text{DQO}_{\text{Bruta}}$ (a) e $\text{DQO}_{\text{Filtrada}}$ (b) durante operação do reator RAHLF1.	79
FIGURA 31 -	Variação temporal da concentração de nitrato N-NO_3^- (a) e nitrito N-NO_2^- (b) durante operação do reator RAHLF 1.	80

FIGURA 32 -	Variação temporal do pH (a) e sólidos suspensos voláteis (b), durante operação do reator RAHLF1.	81
FIGURA 33 -	Variação espacial da concentração da matéria orgânica (DQO) e ácido acético no reator RAHLF1 alimentado com benzeno (a, b, c) e tolueno (d).	83
FIGURA 34	Variação espacial da concentração da matéria orgânica (DQO _f) e ácido acético no reator RAHLF 1 alimentado com (a) <i>m</i> -xileno, (b) etilbenzeno e (c) BTEX.	84
FIGURA 35 -	Variação espacial da concentração de nitrato (N-NO ₃ ⁻) e ácido acético, no reator RAHLF1 alimentado com benzeno (a, b, c), tolueno (d), etilbenzeno (e), <i>m</i> -xileno (f) e BTEX (g)	85
FIGURA 36 -	Variação espacial da concentração de nitrato (N-NO ₃ ⁻) e nitrito (N-NO ₂ ⁻) no reator RAHLF1 alimentado com (a, b, c) benzeno em diferentes concentrações, (d) tolueno, (e) <i>m</i> -xileno, (f) etilbenzeno e (g) BTEX.	87
FIGURA 37 -	Variação espacial da concentração de (a) benzeno e (b) tolueno, <i>m</i> -xileno, etilbenzeno e BTEX, no reator RAHLF1.	89
FIGURA 38 -	Variação da concentração de DQO _b (a), DQO _f (b); N-NO ₃ ⁻ (c), N-NO ₂ ⁻ , pH (e) e SSV(f). RAHLF2 alimentado com etilbenzeno.	94
FIGURA 39 -	Variação espacial da concentração da matéria orgânica (DQO _f) e ácido acético ao longo do reator RAHLF2 alimentado com etilbenzeno a 13,1 mg/L (a), 15,1 mg/L (b) e 31,1 mg/L (c)..	96
FIGURA 40 -	Variação espacial da concentração de etilbenzeno no reator RAHLF2.	97
FIGURA 41 -	Variação espacial da concentração de nitrato (N-NO ₃ ⁻) e nitrito (N-NO ₂ ⁻) do reator RAHLF2 alimentado com etilbenzeno a 13,1 mg/L (a), 15,1 mg/L (b) e 31,1 mg/L (c).	97
FIGURA 42 -	Variação espacial da concentração da matéria orgânica (DQO _f) e ácido acético do reator RAHLF2 alimentado com tolueno (a), <i>m</i> -xileno (b), benzeno (c), <i>o</i> -xileno (d), <i>p</i> -xileno (e) e BTEX (f).	101
FIGURA 43 -	Variação espacial da concentração de nitrato (N-NO ₃ ⁻) e ácido acético do RAHLF2 referente à alimentação com (a) benzeno, (b) tolueno e (c) <i>m</i> -xileno	102
FIGURA 44 -	Variação espacial da concentração de N-NO ₃ ⁻ e N-NO ₂ ⁻ do RAHLF2 alimentado com benzeno (a), tolueno (b), <i>m</i> -xileno (c), <i>p</i> -xileno (d), <i>o</i> -xileno (e), e <i>p</i> -xileno (f).	103
FIGURA 45 -	Variação espacial da concentração dos hidrocarbonetos no RAHLF2 alimentado com benzeno (a), tolueno (b), <i>m</i> -xileno (c), <i>o</i> -xileno (d) <i>p</i> -xileno (e) e BTEX (f).	105

FIGURA 46 -	Microscopia de varredura (5000X) mostrando a morfologia predominante observada nos biofilmes dos reatores RAHLF1 e RAHLF2: (a) bacilos e (b) cocos.	111
FIGURA 47 -	Microscopia de contraste de fase (1500X) e eletrônica de varredura (5000X) mostrando os cordões celulares observados nas amostras obtidas dos reatores RAHLF1 e RAHLF2, em diferentes condições de alimentação: (a) RAHLF1 alimentado com BTEX, (b) RAHLF1 alimentado com tolueno, (c) RAHLF2 alimentado com benzeno e (d) reator RAHLF1 alimentado com etilbenzeno.	112
FIGURA 48 -	Microscopia de eletrônica de varredura (5000X) de bacilos em amostra do reator RAHLF2 alimentado com benzeno (L/D 4).	112
FIGURA 49 -	Microscopia de contraste de fase (1500X). Protozoário observado no L/D = 8 do reator RAHLF2 alimentado com tolueno (a), e no reator RAHLF1 alimentado com benzeno (b).	113
FIGURA 50 -	Microscopia de contraste de fase (1500X). Cistos observados no L/D 4 do reator RAHLF1 alimentado com <i>m</i> -xileno (a) e do reator RAHLF2 alimentado com benzeno (b).	113
FIGURA 51 -	Microscopia óptica de contraste de fase (1500X) de bacilos observados em (a) biofilme do reator RAHLF1 alimentado com BTEX (L/D 20) e (b) crescimento em presença de etanol, observado no ensaio de caracterização nutricional, sob condições fermentativas.	114
FIGURA 52 -	Padrão de bandas do DGGE (DNAr 16S) das amostras obtidas ao longo do reator RAHLF1 alimentados com benzeno (26,5mg/L) (a), e reator RAHLF2 alimentado com etilbenzeno (31,1 mg/L) (b). Gradiente de desnaturação 40% a 60%.	115
FIGURA 53	Padrão de bandas do DGGE (DNAr 16S) das amostras obtidas no L/D = 4 em diferentes condições de alimentação do reator RAHLF1. A demarcação no gel mostra o principal local onde se observa um padrão de bandas diferenciado entre as amostras.	116
FIGURA 54 -	Padrão de bandas do DGGE (DNAr 16S) das amostras obtidas do reator RAHLF2, nas diferentes condições de alimentações.	117
FIGURA 55 -	Detalhes do DGGE (DNAr 16S) das amostras obtidas do reator RAHLF2 nas diferentes condições de alimentações: (a) comparação das amostras obtidas da alimentação com benzeno e <i>m</i> -xileno, (b) comparação das amostras obtidas da alimentação com tolueno e etilbenzeno, (c) comparação das amostras obtidas da alimentação com <i>o</i> -xileno, <i>m</i> -xileno e <i>p</i> -xileno. Gradiente de concentração do gel (40% a 60%)	118

- FIGURA 56 - DGGE (DNAr 16S) mostrando os padrões de bandas obtidos a partir das amostras dos inóculos dos reatores RAHLF1 e RAHLF2 119
- FIGURA 57 - DGGE (DNAr 16S) das amostras obtidas em diferentes condições de alimentação dos reator RAHLF1 (a) e RAHLF2 (b). IR1= amostra do inóculo utilizado para formar o biofilme do reator RAHLF1. IR2 = amostra do inóculo utilizado para formar o biofilme do reator RAHLF2. Bz – alimentação com benzeno, Tol - alimentação com tolueno, ox - alimentação com *o*-xileno. mx - alimentação com *m*-xileno. px - alimentação com *p*-xileno. etilbz - alimentação com etilbenzeno, btex - alimentação com BTEX. O retângulo destaca o padrão de bandas observado tanto no inóculo, como no biofilme. Gradiente de desnaturação do gel 40% a 60%. 120
- FIGURA 58 - DGGE (DNAr 16S) das amostras obtidas do reator RAHLF1. As setas indicam as bandas que foram recortadas e seqüenciadas. 122

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Equações estequiométricas da oxidação anaeróbia do tolueno acoplada a redução de diferentes aceptores de elétrons.	9
TABELA 2. –	Linhagens desnitrificantes degradadoras de hidrocarbonetos.	10
TABELA 3 -	Composição do meio Zinder	28
TABELA 4 -	Composição da solução traço de metais do meio Zinder	28
TABELA 5 –	Composição da solução de vitaminas do meio Zinder	28
TABELA 6 -	Composição do meio Dolfing	29
TABELA 7 -	Composição da solução traço de metais do meio Dolfing	29
TABELA 8 –	Composição dos reatores em batelada enriquecidos com meio Zinder	29
TABELA 9 –	Composição dos reatores batelada enriquecidos com meio Dolfing	30
TABELA 10 -	Composição dos frascos nos ensaios de caracterização nutricional.	34
TABELA 11 -	Composição dos reatores utilizados para avaliação do crescimento celular.	36
TABELA 12 –	Parâmetros avaliados durante a operação dos RAHLFs e método analítico utilizado	40
TABELA 13 –	Condições de amplificação do PCR	48
TABELA 14 -	Composição da solução do gel gradiente desnaturante.	49
TABELA 15 –	Valores dos potenciais redox dos reatores em batelada alimentados com meios Zinder e Dolfing, após modificação das condições de alimentação.	57
TABELA 16 –	Concentrações de benzeno e etilbenzeno nos reatores em batelada.	72
TABELA 17 –	Concentrações de etilbenzeno, obtidas por cromatografia, nas triplicatas de reatores em batelada (R1, R2 e R3).	73

TABELA 18 -	Valores dos parâmetros de monitoramento do reator RAHLF1, obtidos durante o período de operação.	78
TABELA 19 -	Concentrações afluentes e efluentes dos parâmetros avaliados durante os perfis realizados no reator RAHLF1, em diferentes condições de alimentação.	82
TABELA 20 -	Valores dos parâmetros de monitoramento do reator RAHLF2, obtidos durante operação com etilbenzeno	93
TABELA 21 -	Valores das concentrações afluentes e efluentes dos parâmetros avaliados nos perfis com diferentes concentrações de etilbenzeno.	95
TABELA 22 -	Concentrações afluentes e efluentes dos parâmetros avaliados nos perfis do RAHLF2.	99
TABELA 23 -	Eficiências de remoção dos hidrocarbonetos obtidas para os reatores	107
TABELA 24 -	Eficiências de remoção da matéria orgânica (DQO_f) e nitrato ($N-NO_3^-$) obtidas em diferentes condições de alimentação dos reatores	108
TABELA 25 -	Concentração de amônia afluente e efluente do RAHLF1 e RAHLF2	109
TABELA 26 -	Avaliação da capacidade de remoção dos compostos de BTEX pelo sistema levando-se em consideração a adsorção dos hidrocarbonetos na espuma e na biopartícula.	110

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Lista de microrganismos considerados desnitrificantes	7
QUADRO 2 -	Revisão da literatura sobre degradação anaeróbia de BTEX com culturas puras, microcosmos e colunas	16
QUADRO 3-	Estudos realizados com diferentes sistemas no tratamento de compostos tóxicos.	18
QUADRO 4 -	Condições de preparo das soluções estoques utilizadas no enriquecimento	30
QUADRO 5 -	Concentração de amônia no lodo (inóculo)	157
QUADRO 6 -	Concentração de amônia inicial e final no ensaio em batelada	157
QUADRO 7 -	Absorbâncias medidas nos ensaios de caracterização nutricional	158
QUADRO 8 -	Valores das absorbâncias, concentrações de nitrato e etanol, medidos no ensaio de crescimento celular, para a cultura isolada em presença de etilbenzeno	159
QUADRO 9 -	Valores das absorbâncias, concentrações de nitrato (N-NO_3^-) e etanol, medidos no ensaio de crescimento celular, para a cultura isolada em presença de benzeno, nos reatores batelada contendo benzeno, nitrato e etanol.	159
QUADRO 10 -	Valores das absorbâncias e concentrações de nitrato (N-NO_3^-), medidos no ensaio de crescimento celular, para a cultura isolada em presença de etilbenzeno nos reatores contendo somente nitrato e etanol.	160
QUADRO 11 -	Valores das absorbâncias e concentrações de nitrato (N-NO_3^-), medidos no ensaio de crescimento celular, para a cultura isolada em presença de benzeno nos reatores contendo somente nitrato e etanol.	160
QUADRO 12 -	Valores das medidas dos parâmetros de monitoramento obtidos no afluente e efluente do reator RAHLF1, durante o período de operação.	161
QUADRO 13 -	Valores das medidas dos parâmetros de monitoramento obtidos no afluente e efluente do reator RAHLF2, durante o período de operação.	162
QUADRO 14 -	Valores das medidas de concentração de amônia avaliada ao longo dos reatores RAHLF1 e RAHLF2	172
QUADRO 15 -	Valores da adsorção dos hidrocarbonetos na biopartícula e meio suporte calculados por Nardi (2002).	173

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AB	Alcalinidade bicarbonato
AI	Alcalinidade intermediária
AP	Alcalinidade parcial
AV	Ácidos voláteis
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
CONAMA	Conselho Nacional do meio ambiente
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DQO	Demanda química de oxigênio
F_{sp}^{Max}	Capacidade máxima de adsorção de composto na partícula
L/D	Length/ diameter (relação extensão/diâmetro)
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
Q	Vazão de líquido
R^2	Coeficiente de correlação
RAHLF	Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
RDNA	Redução dissimilativa de nitrato a amônia
rpm	Rotações por minuto
SSV	Sólidos suspensos voláteis
STV	Sólidos totais voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TDH	Tempo de detenção hidráulica
T _g	Tempo de geração
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo
μ	velocidade específica de crescimento celular

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E SÍMBOLOS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Microrganismos desnitrificantes	6
3.2. Estudos com culturas puras desnitrificantes, degradadoras de BTEX	8
3.3 Estudos com culturas enriquecidas	15
3.3.1 - Estudos em microcosmos e colunas	15
3.3.2 Estudos em biorreatores	17
3.4 Considerações finais	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Inóculo	27
4.2 Ensaio de Enriquecimento	27
4.3 Purificação do inóculo	31
4.4 Purificação em placa de Petri	31
4.5 Aumento da massa celular	32
4.6 Manutenção das culturas	32
4.7. Caracterização nutricional das culturas	33
4.8 Ensaio em reatores batelada	35
4.8.1 Determinação do tempo de geração das culturas	35
4.9 Ensaio em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)	37
4.9.1 Configuração do reator	37
4.9.2 Imobilização das culturas nos reatores	38
4.9.3 Alimentação dos reatores	38
4.9.3.1 Solução etanólica com BTEX	38

4.9.4 Manutenção do reator	39
4.9.5 Estratégias utilizadas na operação dos reatores	39
4.9.6 Análises realizadas no RAHLF	40
4.10 Metodologias utilizadas nos ensaios	40
4.10.1 Exames microscópicos	40
4.10.2 Coloração de Gram	41
4.10.3 Análises Cromatográficas	41
4.10.3.1 Óxido nitroso e metano	41
4.10.3.2 Análise de BTEX	41
4.10.3.3 Ácidos voláteis por cromatografia	43
4.10.3.4 Análise de etanol	44
4.10.4 Análises Físico-químicas	44
4.10.4.1 DQO, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal e sólidos suspensos voláteis	44
4.10.4.2 Alcalinidade e ácidos voláteis por titulometria	45
4.10.5 Potencial Redox	46
4.10.6 Métodos moleculares	46
4.10.6.1 Extração de DNA	46
4.10.6.2 Amplificação do DNA Ribossomal 16S (PCR)	47
4.10.6.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	48
4.10.6.4 Clonagem e sequenciamento	50
4.10.6.4.1 Sequenciamento das bandas	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Escolha do Inóculo	52
5.2 Escolha dos meios de cultivos	53
5.3 Purificação do inóculo	59
5.4 - Confirmação do metabolismo desnitrificante	62
5.5 Caracterização nutricional das culturas	65
5.6 Determinação do tempo de geração das culturas	69
5.7 Avaliação do consumo de etilbenzeno	73
5.8 Imobilização das culturas desnitrificantes no RALHF	74
5.9 Monitoramento dos Reatores de Leito Fixo	76
5.9.1 Considerações	76
5.9.2 Operação do reator RAHLF1	77
5.9.3 Operação do reator RAHLF2	92

5.9.3.1 Alimentação do RAHLF2 com etilbenzeno em diferentes concentrações	93
5.9.3.2 Alimentação do RAHLF2 com tolueno, benzeno, <i>m</i> -xileno, <i>o</i> -xileno, <i>p</i> -xileno e BTEX	98
5.10 Comparação entre os reatores RAHLF1 e RAHLF2	106
5.11 Análises complementares	108
5.11.1 - Avaliação da formação de amônia ao longo do reator	108
5.11.2 Avaliação da adsorção de BTEX	109
5.11.3 - Avaliação da concentração de BTX na saída de gás	110
6 EXAME MICROSCÓPICO DOS REATORES	111
7 ANÁLISE MOLECULAR	115
7.1 Sequenciamento	121
8. CONCLUSÕES	126
9. SUGESTÕES	129
10. REFERÊNCIAS	130
APÊNDICE	141
Apêndice A	141
Apêndice B	154
Apêndice C	155
Apêndice D	156
Apêndice E	157
Apêndice F	158
Apêndice G	159
Apêndice H	160
Apêndice I	162
Apêndice J	171
Apêndice K	172

1. INTRODUÇÃO

Mundialmente, os compostos tóxicos antropogênicos têm se tornado contaminantes ubíquos de solos e águas, devido ao resultado do desconhecimento humano na utilização segura de produtos químicos, descuido na manufatura de compostos sintéticos, acidentes ocasionais e disposição inadequada de resíduos químicos. Esta contaminação ocorre principalmente, a partir de vazamentos em dutos e tanques de armazenamentos subterrâneos de combustível, atividades de mineração e uso de defensivos agrícolas. Estes químicos são encontrados no ambiente, algumas vezes individualmente, mas mais freqüentemente, em misturas complexas, e muitos são potencialmente tóxicos ou carcinogênicos.

Entre os principais contaminantes das águas subterrâneas estão os compostos aromáticos, especialmente os hidrocarbonetos monoaromáticos denominados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos). A presença destes compostos na natureza causa impacto ambiental devido ao potencial dos mesmos em causar danos aos seres vivos.

O benzeno atua no sistema reprodutivo podendo causar deformações no feto (efeito teratogênico), disfunções sexuais como infertilidade e aborto, podendo ainda agir nos sistemas neurológico e imunológico. Mas, o principal prejuízo deste tóxico para o ser humano é sua comprovada carcinogenicidade. O tolueno está associado com as disfunções hepáticas e gastrointestinais sendo, também, teratogênico. O etilbenzeno causa prejuízo ao sistema respiratório, além de provocar irritação nos olhos e desmaios. Os distúrbios mais comuns observados com a exposição crônica aos vapores de xilenos são fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, fraqueza, perda de memória, sonolência, distúrbio do humor e do equilíbrio, zumbido, náuseas, e perda do apetite. Em concentrações elevadas pode levar a inconsciência e morte, por depressão do sistema nervoso central (Ribeiro, 2005).

Estes compostos são componentes do petróleo e são, desta forma, encontrados também na gasolina e outros combustíveis. Além disso, milhões de toneladas de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos são amplamente utilizados a cada ano na indústria química (Phelps e Young, 2001). O benzeno é utilizado na produção de materiais sintéticos como borrachas, plásticos, Nylon[®] além de inseticidas e tintas. O tolueno é usado como solvente na produção de tintas, resinas, colas e óleos. O etilbenzeno é, principalmente, empregado na produção de estireno. Os xilenos, por sua

vez, são utilizados como solventes em borrachas e por curtumes, nos processos de tingimento de couro (Ribeiro, 2005). Assim, devido a grande produção, transporte e utilização, parte destes compostos são perdidos para o ambiente.

A presença de compostos tóxicos em águas subterrâneas vem deixando os níveis de potabilidade da água cada vez mais baixos. De acordo com o estabelecimento da portaria número 518 de março de 2004, do Ministério da Saúde, os valores máximos permitidos para estes poluentes são de 5µg/L para benzeno, 170 µg/L para tolueno, 200µg/L para etilbenzeno e 300µg/L para o xileno.

Nas últimas décadas, em virtude da escassez do petróleo e do excesso de monóxido de carbono, no ar atmosférico nos grandes centros urbanos, alguns países, entre eles o Brasil, passaram a utilizar como combustível alternativo a mistura de álcool e gasolina. No Brasil, esta mistura corresponde entre 20% a 24% de etanol em massa, diferenciando-se da gasolina comercializada em outros países. Até recentemente, somente o efeito negativo da presença de etanol na gasolina era reconhecido, pois, o álcool favorece a solubilização dos hidrocarbonetos monoaromáticos e, conseqüentemente, melhor deslocamento da pluma de contaminação destes compostos no lençol freático (Silva et al., 2002). Recentemente, uma pesquisa sobre desenvolvida no Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina revelou o benefício da combinação etanol/gasolina (Schneider et al., 2005). Nesta pesquisa, uma área de 1,5 m² de água subterrânea foi contaminada por gasolina comercial (24% de etanol) e a área foi monitorada durante 6 anos. Segundo os autores, o efeito negativo da presença do etanol na gasolina ocorre porque os microorganismos degradam o etanol de forma mais intensa que os demais compostos orgânicos da gasolina, permitindo que a pluma dos hidrocarbonetos aumente continuamente. No decorrer dos experimentos, os pesquisadores verificaram que a elevada concentração de biomassa, remanescente da degradação do etanol acelerava significativamente o processo de degradação dos outros contaminantes da gasolina. Assim, três anos depois do derramamento "induzido", a presença do etanol fez com que a redução do benzeno no local próximo à fonte do vazamento fosse de apenas 10%. Mas nos dois anos seguintes, quando o álcool havia sido completamente biodegradado, essa redução passou para 99%. Os autores concluíram que a biomassa remanescente acelerou a redução do benzeno no período seguinte, pois os microorganismos estavam ávidos por substratos e os únicos disponíveis eram os outros contaminantes. Com esta pesquisa, constatou-se o efeito positivo do etanol presente na gasolina.

Devido ao número alarmante de vazamentos de tanques de armazenamento de combustível subterrâneos, a contaminação de aquíferos a partir desses derramamentos tem sido assunto de grande interesse nas últimas décadas (Borden et al., 1986; Hunt et al., 1988; Mackay e Cherry, 1989; Little et al., 1992; Capuano e Johnson, 1996; Corseuil e Alvarez, 1996; Bicalho, 1997). No Brasil, segundo a AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP (Despacho nº 536, 15/09/2000), havia 29.310 postos de gasolina em funcionamento. Por isso, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de águas subterrâneas, por derramamento de combustível, vêm crescendo em diversas cidades brasileiras. São Paulo e Curitiba, por exemplo, possuem legislações sobre o tema e, em Joinville, a prefeitura realizou estudo com 65 postos da cidade, onde apenas um deles não possuía qualquer tipo de vazamento (Corseuil e Marins, 1997).

Uma vez que o vazamento no ambiente tenha ocorrido, a remoção dos hidrocarbonetos aromáticos de sítios contaminados depende da atividade de microrganismos aeróbios e anaeróbios, capazes de metabolizar esses compostos. No entanto como a concentração de oxigênio na água subterrânea diminui nestes sítios, devido ao metabolismo dos microrganismos aeróbios (Gibson e Subramanian, 1984; Ridgway et al., 1990), aquíferos contaminados se tornam anóxicos e dependentes da subsequente atividade de bactérias anaeróbias.

Até 1984, pensava-se que a degradação de hidrocarbonetos aromáticos não ocorria na ausência de oxigênio molecular (Reinhard e Goodman, 1984). Entretanto, nos últimos anos, vários estudos demonstraram a capacidade de culturas puras em degradar anaerobicamente tolueno (Dolfing et al., 1990; Evans et al., 1991; Fries et al., 1994; Rabus e Widdel, 1995; Hess et al., 1997), etilbenzeno (Rabus e Widdel, 1995; Ball et al., 1996), e *o*-, *m*- e *p*- xilenos (Dolfing et al., 1990; Rabus e Widdel, 1995; Hess et al., 1997). A degradação de benzeno foi demonstrada com culturas enriquecidas sob diferentes condições redutoras. (Edwards e Grbic-Galic, 1992; Lovley et al., 1995; Kazumi et al., 1997; Burland e Edwards, 1999). Todos estes estudos estabeleceram claramente a biodegradabilidade anaeróbia do BTEX.

Nesse contexto, portanto, fica evidente a possibilidade de tratamento biológico anaeróbio das águas contaminadas, sendo fundamental a realização de pesquisas, com a finalidade de restaurar a qualidade das águas, até níveis de potabilidade previstos pelos órgãos de fiscalização do meio ambiente, e que busquem o desenvolvimento de

tecnologias, visando a minimização dos custos e maximização da eficiência de remoção de poluentes.

Uma proposta para o tratamento de águas contaminadas vem sendo amplamente realizada no Laboratório de Processos Biológicos – LPB, do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos – USP. Neste laboratório, o reator anaeróbio horizontal de leito fixo, com biomassa imobilizada (RAHLF), tem demonstrado ser uma ferramenta adequada para o tratamento de compostos tóxicos, apresentando alta eficiência na degradação destes poluentes, incluindo BTEX (Damianovic, 1997; Bolanos et al., 2001; Nardi, 2002; Oliveira et al., 2004; Cattony, 2005; Fernandes, 2005; Ribeiro, 2005).

Outro alvo de grande preocupação em relação à contaminação de águas é a presença de nitrogênio, nas formas de nitrato e nitrito nestes locais. O nitrito reage com aminas secundárias para produzir nitrosaminas, um composto considerado altamente carcinogênico. Rajapakse e Scutt (1999) afirmaram que os riscos à saúde, decorrentes da presença de nitrato e nitrito, em água utilizada para consumo humano, vão desde hipertrofia de tireóide, a 15 diferentes tipos de câncer, incluindo defeitos de nascimento e hipertensão em adultos.

Nos últimos anos, muitas tecnologias diferentes têm sido desenvolvidas para solucionar o problema de nitrato na água residuária, subterrânea ou de abastecimento. Nestes sistemas de tratamento, a remoção dos compostos de nitrogênio está, geralmente, acoplada por processos biológicos de desnitrificação. Além da remoção de nitrato, a desnitrificação é importante em sistemas de tratamento de águas residuárias, uma vez que este processo estimula a remoção da matéria orgânica, quando o oxigênio se torna limitante no meio. Este processo requer a ação de grupos especializados de microrganismos, designados bactérias desnitrificantes. Essas bactérias são frequentemente isoladas de sedimento, solo e ambientes aquáticos, e a capacidade desnitrificante está presente em muitos grupos filogenéticos (Gamble et al., 1977). Neste sentido, numerosos esforços vêm sendo realizados para melhorar a remoção de nitrato de forma eficiente e econômica de águas residuárias e vários desses estudos são desenvolvidos no sentido de otimizar os sistemas de biorremediação.

Pelo exposto, este trabalho visa aprimorar os conhecimentos dos estudos sobre a utilização de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, por cultura desnitrificante, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo, e obter informações sobre a microbiologia da cultura utilizada para formar o biofilme deste reator.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

1. Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a capacidade da cultura desnitrificante purificada, na remoção de diferentes concentrações benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

1. Verificar o potencial do lodo granulado de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, em servir como inóculo para obtenção de bactérias desnitrificantes;
2. Definir uma condição nutricional para crescimento para as bactérias desnitrificantes;
3. Purificar cultura desnitrificante capaz de crescer em presença de BTEX;
4. Estudar as características morfológicas e fisiológicas da cultura purificada;
5. Avaliar a capacidade do biofilme adaptado à presença contínua dos hidrocarbonetos em remover estes compostos;
6. Avaliar a capacidade do biofilme em promover a remoção dos compostos de BTEX, separadamente, e em curtos períodos de operação do reator.
7. Avaliar a dinâmica da população de microrganismos do biofilme através do DGGE
8. Identificar, através do sequenciamento, as principais comunidades de microrganismos presentes no biofilme, envolvidas com o processo de remoção de BTEX.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microrganismos Desnitrificantes

A desnitrificação se caracteriza pela redução de nitrato a óxidos de nitrogênio, principalmente nitrogênio gasoso. O passo inicial na desnitrificação é a redução de nitrato a nitrito. Em sequência, nitrito é reduzido a óxido nítrico, um óxido de nitrogênio gasoso. Uma vez que óxido nítrico foi produzido, ele é reduzido a óxido nitroso, que por sua vez, é convertido a nitrogênio gasoso.

A maioria dos organismos desnitrificantes é Gram negativos, no entanto, bactérias desnitrificantes Gram positivas estão também bem representadas neste grupo.

Os microrganismos capazes de realizar a desnitrificação estão amplamente distribuídos na natureza, incluindo *habitats* tais como solo, água doce e do mar, sedimentos, sistemas de tratamento de resíduos, e trato gastrointestinal de animais. Desta forma, qualquer restrição da atividade de redução do nitrato em ambientes naturais não é, provavelmente, causada pela falta de microrganismos, mas sim pelas limitações das condições ambientais (principalmente oxigênio) que regulam estes processos.

A capacidade de desnitrificação pode ser observada em ampla variedade de grupos fisiológicos e taxonômicos. A maioria das bactérias desnitrificantes caracterizadas estão incluídas no grupo conhecido como *Proteobacteria* (bactéria púrpura) que apresenta 5 subdivisões (α , β , γ , δ , ϵ). Os organismos desnitrificantes são encontrados em 4 destas subdivisões. O quadro 1 mostra uma lista de microrganismos que foram sugeridos para serem incluídos como desnitrificantes. O principal critério de inclusão nesta lista foi a capacidade de formar óxidos de nitrogênio gasoso.

Baseando-se nos isolamentos mais frequentes, as espécies de *Pseudomonas* e *Alcaligenes* são, provavelmente, as de maior significância em muitos ambientes (Brown, 1988). Entre as *Pseudomonas*, *Pseudomonas fluorescens*, especialmente o biotipo II, parece ser a mais prevalente em solos. A predominância dessas *Pseudomonas*

é, provavelmente, devido à sua versatilidade e competitividade por fontes de carbono no solo e água.

Quadro 1 - Lista de microrganismos considerados desnitrificantes.

<p>Archaea</p> <p><i>Haloarcula</i> <i>Halobacterium</i> <i>Haloferax</i> <i>Ferroplasma</i> <i>Pyrobaculum</i></p>	<p><i>Oligella</i> <i>Ralstonia</i> (Alcaligenes) <i>Rubrivivax</i> <i>Thauera</i> <i>Thermothrix</i> <i>Thiobacillus</i> <i>Vogesella</i> <i>Zoogloea</i></p>
<p>Bactéria Gram Negativa</p> <p><i>Aquifex</i> <i>Flexibacter</i> (Cytophaga) <i>Empedobacter</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Sphingobacterium</i> <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</p>	<p>Subdivisão Gama</p> <p><i>Acinetobacter</i> <i>Alteromonas</i> <i>Azomonas</i> <i>Beggiatoa</i> <i>Deleya</i> <i>Halomonas</i> <i>Marinobacter</i> <i>Moraxella</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rugamonas</i> <i>Shewanella</i> <i>Thioploca</i> <i>Thiomargarita</i> <i>Xanthomonas</i></p>
<p>Bactéria púrpura Subdivisão alfa</p> <p><i>Agrobacterium</i> <i>Aquaspirillum</i> <i>Azospirillum</i> <i>Blastobacter</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Hyphomicrobium</i> <i>Magnetospirillum</i> <i>Nitrobacter</i> <i>Paracoccus</i> <i>Pseudomonas</i> (G-179) <i>Rhizobium</i> <i>Rhodobacter</i> <i>Rhodoplanea</i> <i>Rhodospseudomonas</i> <i>Roseobacter</i> <i>Sinorhizobium</i> (Rhizobium) <i>Thiobacillus</i></p>	<p>Subdivisão Delta Nenhuma</p> <p>Subdivisão Epsilon</p> <p><i>Wolinella</i> <i>Campylobacter</i> <i>Thiomicrospira</i></p> <p>Outras Gram positivas</p>
<p>Subdivisão Beta</p> <p><i>Achromobacter</i> <i>Acidovorax</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Azoarcus</i> <i>Brachymonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Chromobacterium</i> <i>Comamonas</i> <i>Eikenella</i> <i>Hydrogenophaga</i> <i>Janthinobacterium</i> <i>Kingella</i> <i>Microvirgula</i> <i>Neisseria</i> <i>Nitrosomonas</i> <i>Ochrobactrum</i></p>	<p><i>Bacillus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Frankia</i> <i>Dactylosporangium</i> <i>Dermatophilus</i> <i>Gemella</i> <i>Jonesia</i> (Listeria) <i>Kineosporea</i> <i>Micromonospora</i> <i>Microtetraspora</i> <i>Nocardia</i> <i>Pilimelia</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Saccharothrix</i> <i>Spirillospora</i> <i>Streptomyces</i> <i>Streptosporangium</i></p>

Fonte: Shapleigh.(2000)

Bactérias desnitrificantes utilizam todas as três classes de fontes de energia, ou seja, orgânica (organotróficos), inorgânica (litotróficos), e luz (fototróficos). Os

substratos orgânicos são as fontes de energia mais comumente utilizadas por este grupo (Zehnder, 1988). Além da variedade de produtos naturais que são tipicamente utilizados como fonte de carbono, a decomposição de certos compostos antropogênicos, por bactérias desnitrificantes, tem sido observada. Nos últimos anos, tem-se consolidado que bactérias desnitrificantes podem metabolizar compostos aromáticos.

Bactérias desnitrificantes degradadoras de compostos aromáticos têm sido isoladas, e muitas pertencem ao gênero *Azoarcus* e *Thauera*, (Fries et al., 1994; Anders et al., 1995; Springer et al., 1998). O uso destes microrganismos na degradação de poluentes é um atrativo para os pesquisadores levando-se em conta as seguintes considerações: (a) bactérias desnitrificantes apresentam maior velocidade de crescimento e são mais facilmente cultiváveis em ambientes anóxicos; (b) o entendimento da genética está bem estabelecido e (c) devido a solubilidade e baixo custo, o nitrato está entre os aditivos mais confiáveis que pode ser utilizado em áreas poluídas para favorecer o processo anaeróbio facultativo (Zehnder, 1988).

3.2. Estudos com culturas puras desnitrificantes, degradadoras de BTEX

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos altamente reduzidos. Nos organismos quimiotróficos, os equivalentes reduzidos gerados durante a transformação de hidrocarbonetos a intermediários metabólicos necessitam ser transferidos para um aceptor de elétrons de alto potencial redox para permitir a conservação de energia para crescimento. Pesquisas de laboratório mostram que a degradação anaeróbia de BTEX pode ocorrer sob ampla faixa de potenciais redox, as quais podem ser mediadas por bactérias redutoras de nitrato, sulfato ou ferro (III), bem como por consórcios fermentativo e metanogênico (Stoner, 1994). A utilização preferencial dos aceptores de elétrons ocorre em ordem decrescente, de acordo com o potencial de oxidação do aceptor de elétrons (oxigênio > nitrato > ferro > sulfato > dióxido de carbono) e, em geral, a cinética de oxidação de hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com maiores potenciais de oxidação.

De acordo com Heider et al. (1999), os balanços das reações para a oxidação do tolueno com estes diferentes aceptores finais de elétrons demonstram que, sob condições desnitrificantes, a variação da energia livre produzida por este composto

($\Delta G^{\circ} = -3554$ kJ) é alta, quando comparada com a variação de energia livre gerada na presença de outros aceptores de elétrons (Tabela 1).

Tabela 1 – Equações estequiométricas da oxidação anaeróbia do tolueno acoplada a redução de diferentes aceptores de elétrons.

1. Bactéria desnitrificante:

2. Bactéria redutora de ferro III:

3. Bactéria redutora do íon sulfato:

4. Consórcio metanogênico:

Reações catalisadas por bactérias próton redutoras (a) e metanogênicas (b, c)

Fonte: Heider et al.(1999).

As espécies desnitrificantes descritas mineralizam variedade de alquilbenzenos, incluindo tolueno, *m*-xileno, etilbenzeno, propilbenzeno, *p*-etiltolueno e *p*-cimeno (Dolfing et al., 1990; Evans et al., 1991; Fries et al., 1994; Rabus e Widdel, 1995; Ball et al., 1996). Baseado na comparação de seqüências do RNAr 16S, estas linhagens são atualmente afiliadas ao gênero *Thauera* e *Azoarcus*, dentro da subclasse β *Proteobacteria*. As linhagens desnitrificantes conhecidas exibem espectro amplo de utilização de substratos para compostos aromáticos polares, mas são restritas para poucos hidrocarbonetos aromáticos. Algumas destas linhagens usam mais de um hidrocarboneto aromático como substrato, como pode ser observado na Tabela 2.

Bactérias desnitrificantes crescem relativamente rápidas em alquilbenzenos. A velocidade máxima de crescimento para a linhagem *Thauera aromática* K172 em

tolueno foi de $0,12 \text{ h}^{-1}$, com tempo de geração de 6 horas, correspondendo a 70% da velocidade de crescimento obtida com benzoato como substrato.

Tabela 2. – Linhagens desnitrificantes degradadoras de hidrocarbonetos.

Bactéria desnitrificante (subclasse β Proteobacteria)	Hidrocarbonetos metabolizados	Outros Substratos
<i>Thauera aromatica</i> K172	tolueno	fenol, <i>p</i> -cresol, antranilato, fenilalanina
<i>Thauera aromatica</i> T1	tolueno	<i>p</i> -cresol, 3-metilbenzoato
<i>Azoarcus</i> sp. Linhagem T	tolueno, <i>m</i> -xileno	<i>p</i> -cresol, ciclohexanoarboxilato
<i>Azoarcus tolulyticus</i> To14	tolueno	Não relatado
<i>Azoarcus tolulyticus</i> Td15	tolueno, <i>m</i> -xileno	Não relatado
Linhagem ToN1	tolueno	fenol, <i>p</i> -cresol, fenilacetato
Linhagem EbN1	tolueno, etilbenzeno	acetofenona, fenilalanina
Linhagem PbN1	etilbenzeno	Propilbenzeno, acetofenona, propiofenona, fenilacetato, fenol
Linhagem EB1	etilbenzeno	acetofenona, fenilacetato, fenol
Linhagem mXyN1	tolueno, <i>m</i> -xileno	3-metilbenzoato, <i>p</i> -cresol
Linhagem T3	tolueno	Não relatado
Linhagem M3	tolueno, <i>m</i> -xileno	Não relatado
Linhagem mCyN1	tolueno, <i>p</i> -etiltolueno	<i>p</i> -cresol, <i>p</i> -etilbenzoato, <i>p</i> -isopropilbenzoato
Linhagem mCyN2*	<i>p</i> -cimeno	fenilalanina, <i>p</i> -etilbenzoato, <i>p</i> -isopropilbenzoato

Fonte: Heider et al.(1999).

Dolfing et al. (1990), trabalhando com cultura pura originária do efluente de uma coluna de aquífero anaeróbio, demonstraram que tolueno (26,7mg/L) foi mineralizado por cultura pura (linhagem T), utilizando nitrato (10mM) como aceptor de elétrons. Nos resultados do balanço de carbono marcado, mais de 50% da radioatividade foi recuperada como $^{14}\text{CO}_2$. Além de tolueno, a linhagem T foi, ainda, capaz de utilizar *m*-xileno sob condições desnitrificantes, no entanto, o microrganismo não cresceu em *o*-xileno, *p*-xileno e benzeno.

A degradação do tolueno, sob condições desnitrificantes, foi também estudada por Evans et. al. (1991). Neste estudo, a linhagem desnitrificante denominada T1, foi isolada a partir de cultura mista enriquecida, e cresceu com tolueno (92,1 mg/L) como única fonte de carbono. A linhagem T1 apresentou degradação de $1,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ e foi tolerante à concentração de 276,4 mg/L de tolueno. Utilizando cromatografia gasosa e líquida, os autores demonstraram que 51% do carbono do tolueno foi mineralizado a dióxido de carbono e 29% assimilado em biomassa. A oxidação do tolueno a CO_2 foi estequiometricamente acoplada à redução do nitrato. A linhagem T1 não foi capaz de

utilizar outros hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, etilbenzeno, *p*-xileno, *m*-xileno, e *o*-xileno, como única fonte de carbono para o crescimento. No entanto, *o*-xileno foi transformado em metabólito quando tolueno foi adicionado ao meio de crescimento. Posteriormente, estudos moleculares, baseados na amplificação, seqüenciamento e análise filogenética das seqüências do RNAr 16S, confirmaram a classificação da linhagem T1 como *Thauera aromatica* (Song et al., 1998).

No estudo conduzido por Fries et al. (1994), o isolamento, caracterização e distribuição de microrganismos degradadores de tolueno foi avaliado. A partir do enriquecimento realizado com diferentes inóculos, obtidos de diferentes regiões geográficas (solos de agricultura, sedimento de aquífero, e solos contaminados), 10 isolados foram obtidos. Metodologias moleculares como o “*fingerprint*” produzido pela amplificação do DNA mostraram que 8 dos isolados eram diferentes. Todos os microrganismos isolados demonstraram capacidade de utilizar tolueno (25 mg/L), sob condições desnitrificantes (5mM de nitrato). Análises de seqüências parciais do RNAr 16S de todos os isolados mostraram similaridade substancial às seqüências do RNAr 16S de *Azoarcus* sp. Os autores concluíram que a atividade e o isolamento de pelo menos um microrganismo degradador de tolueno, proveniente de diferentes regiões geográficas, sugere que microrganismos com capacidade de crescer anaerobiamente em tolueno são comumente encontrados na natureza.

Em 1995, estudos de filogenia, conduzidos por dois grupos diferentes (Anders et al., 1995; Zhou et al., 1995), reavaliaram a posição taxonômica de linhagens desnitrificantes degradadoras de tolueno.

O trabalho de Anders et al. (1995), com a linhagem denominada K172, anteriormente descrita como pertencente ao gênero *Pseudomonas*, subclasse γ *Proteobacteria*, redefiniu a posição taxonômica desta linhagem. Através da análise de seqüências do RNAr 16S, os autores demonstraram que este microrganismo era membro da subclasse β *Proteobacteria*, e que a linhagem K172, representava uma nova espécie do gênero *Thauera*, que foi então denominada *Thauera aromatica*.

Zhou et al. (1995), com o objetivo de determinar a posição filogenética de diversos microrganismos degradadores de tolueno, anteriormente descritos nos trabalhos de Dolfing et al. (1990), Evans et al. (1991) e Fries et al. (1994), sequenciaram quase que totalmente o gene RNAr 16S de cada um dos isolados e, através de análises da composição de ácidos graxos e das características bioquímicas e fisiológicas destes microrganismos, demonstraram que estes isolados estavam intimamente relacionados e

se distinguiam das espécies de *Azoarcus* anteriormente descritas. Os autores propuseram, então, uma nova espécie designada como *Azoarcus tolulyticus*.

A degradação de etilbenzeno, sob condições desnitrificantes, foi avaliada no estudo de Rabus e Widdel. (1995). Até esta data, o crescimento anaeróbico em alquilbenzeno com cadeias laterais maiores do que aquela do tolueno não havia sido demonstrada em enriquecimentos ou em culturas puras. Neste estudo, os autores isolaram, a partir de sedimento de água doce, uma linhagem desnitrificante, linhagem EbN1, que cresceu em etilbenzeno como única fonte de carbono. Para a análise fisiológica e filogenética comparativa, outras duas linhagens desnitrificantes, ToN1 e mXyN1, foram isoladas da mesma amostra, em presença de tolueno e *m*-xileno, respectivamente. Os autores caracterizaram os isolados realizando análises das características morfológicas e fisiológicas como forma, dimensão, motilidade, conteúdo de C+G, temperatura de crescimento, pH, tempo de crescimento e capacidade de crescimento anaeróbico em diversos compostos aromáticos. As linhagens apresentaram diferentes capacidades específicas para a degradação dos alquilbenzenos testados. Em relação à capacidade de utilização de hidrocarbonetos aromáticos, especialmente BTEX, além de etilbenzeno, a linhagem Eb1 utilizou tolueno. A linhagem ToN1 usou apenas tolueno, enquanto que a linhagem mXyN1 utilizou tanto *m*-xileno, como tolueno. O seqüenciamento do RNAr 16S das linhagens isoladas revelou relação destes microrganismos com o grupo filogenético que compreende *Thauera selenatis* e espécies do gênero *Azoarcus*. Estes relatos estão de acordo com análises filogenéticas de outros estudos que demonstraram a utilização de tolueno e *m*-xileno por microrganismos desnitrificantes.

Até 1996, sabia-se que diversos microrganismos eram capazes de catalisar a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos na ausência de oxigênio molecular, entretanto, os mecanismos bioquímicos das reações enzimáticas não haviam sido desvendados. Experimentos com bactéria desnitrificante, linhagem EB1, foram conduzidos para examinar os primeiros passos da oxidação anaeróbia do etilbenzeno. Ball et al. (1996) demonstraram que células da linhagem EB1 mineralizaram etilbenzeno (28,8 mg/L) a CO₂, sob condições desnitrificantes (3.3 mM de nitrato), como demonstrado pela conversão de 69% de [C¹⁴] etilbenzeno a ¹⁴CO₂. Durante a conversão de etilbenzeno, observou-se a formação e o consumo de 1-feniletanol, acetofano e um intermediário desconhecido, que foi sugerido como sendo benzoilacetato. Os experimentos com células em suspensão usando H₂¹⁸O demonstraram que a hidroxila do primeiro produto

da oxidação anóxica do etilbenzeno, 1-feniletanol, foi derivado da água. Com estes resultados, os autores propuseram uma via anaeróbia da mineralização do etilbenzeno.

No estudo de Hess et al. (1997) foram obtidas, após 3,5 anos de remediação, amostras de aquífero contaminado com óleo diesel, biorremediado *in situ* pela injeção de oxidantes (O_2 e NO_3^-) e nutrientes. As amostras foram utilizadas para isolar bactérias desnitrificantes capazes de utilizar hidrocarbonetos aromáticos. Deste estudo, cinco linhagens (T_2 , T_3 , T_4 , T_6 e T_{10}) de bactérias capazes de crescer em tolueno (17,5 mg/L) e nove linhagens (M_3 , M_7 e M_9 a M_{12}) que cresciam tanto em tolueno, como em *m*-xileno (17,0 mg/L) foram isoladas, em presença de 5mM de nitrato. Os estudos incluíram a caracterização molecular dos isolados por análises de seqüências comparativas do RNAr 16S, e o uso de sondas específicas para quantificar os isolados pela hibridização *in situ*.

Semelhantemente, Song et al. (1999) realizaram a caracterização taxonômica de 21 linhagens, isoladas de diferentes regiões geográficas capazes de degradar tolueno sob condições desnitrificantes. Os estudos foram realizados com base nas características gerais da morfologia e fisiologia dos microrganismos, bem como na análise de ácidos graxos, composição de base de DNA, seqüência de RNAr, padrão de proteínas da célula, padrão de fragmentação enzimática do genoma e métodos de hibridização. As linhagens foram subdivididas em cinco grupos nos quais seus representantes puderam ser considerados como pertencentes à espécie *Azoarcus tolulyticus* (grupo I), variantes de *Azoarcus tolulyticus* (grupo II), *Azoarcus toluclasticus* (grupo III), variantes de *Azoarcus toluclasticus* (grupo IV) e *Azoarcus toluvorans* (grupo V).

Até 1999, a biodegradação do benzeno ligada à redução do sulfato (Lovley et al., 1995), do ferro (Lovley et al., 1996), e sob condições metanogênicas (Kazumi et al., 1997), já havia sido confirmada. No entanto, não havia nenhum relato que confirmasse a degradação do benzeno, associado à redução do nitrato. Em 1999, um estudo com cultura enriquecida, desenvolvida a partir de microcosmos de solos e água subterrânea, buscaram confirmar a associação entre a biodegradação de benzeno e a redução do nitrato (Burland e Edwards, 1999). A degradação do benzeno (11,7 mg/L) ocorreu concomitantemente com a redução do nitrato (5mM) a taxa constante de 10 moles de nitrato por mol de benzeno degradado, e foi associada ao crescimento celular. Nos experimentos realizados com $[C^{14}]$ benzeno, 92 a 95% do carbono marcado foi recuperado como CO_2 . Embora a degradação de benzeno tenha sido confirmada neste

estudo, a identificação dos microrganismos responsáveis pela biodegradação deste composto não foi realizada.

Shimoda et al. (2000) isolaram e caracterizaram duas espécies desnitrificantes degradadoras de fenol e outros compostos aromáticos, a partir de cultura enriquecida durante 3 anos. A espécie denominada CC-1 apresentou morfologia de bacilo e foi classificada como pertencente ao gênero *Azoarcus*. O outro isolado apresentou células espirais e filogeneticamente associadas às espécies pertencentes ao gênero *Magnetospirillum*, um membro da subclasse α *Proteobacteria*.

Em 2001, Coates e colaboradores relataram duas espécies de *Dechloromonas*, nomeadas RCB e JJ, capazes mineralizar vários compostos monoaromáticos, incluindo o benzeno, a CO_2 , na ausência de oxigênio, mas com nitrato como aceptor de elétrons. Neste estudo os autores relatam o potencial das espécies isoladas e a aplicabilidade destes microrganismos para o tratamento de ambientes contaminados.

Recentemente (Shinoda et al., 2004), uma nova linhagem de *Thauera* sp., denominada DNT-1, cresceu em tolueno como única fonte de carbono e energia, sob condições aeróbias e desnitrificantes. Neste estudo, as observações bioquímicas indicaram que a degradação inicial de tolueno ocorria através de uma via mediada pela dioxigenase e a via benzilsuccinase, sob condições aeróbias e desnitrificantes, respectivamente. Os autores realizaram a clonagem dos genes responsáveis pelas sínteses da dioxigenase e benzilsuccinase, a partir do DNA da espécie DNT-1, e verificaram que os resultados obtidos com as técnicas de biologia molecular (Northern Blot e PCR em tempo real - *real time quantitative reverse transcriptase PCR*) que estes genes foram induzidos pela presença do tolueno. Os autores concluíram que a espécie DNT-1 modula a expressão de diferentes vias de degradação de tolueno de acordo com a disponibilidade de oxigênio no ambiente.

Em 2005, um estudo sobre a organização dos genes envolvidos nas vias metabólicas da degradação de etilbenzeno e tolueno foi realizado por Kühner et al. (2005). Neste estudo a espécie desnitrificante, EbN1, capaz de degradar estes dois compostos anaerobiamente foi utilizada para a análise da expressão global e regulação dos genes envolvidos nessas vias de degradação.

3.3 Estudos com culturas enriquecidas

3.3.1 - Estudos em microcosmos e colunas

A literatura sobre a degradação anaeróbia de BTEX está baseada em estudos de biorremediação *in situ* em áreas contaminadas, simulações de contaminação de lençol freático em colunas, demonstração da biodegradabilidade em microcosmos, e estudos metabólicos e genéticos usando culturas puras. Todos estes estudos deixam claro que a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos sob condições anaeróbias, não só é possível, mas também pode ser uma alternativa prática para outras opções de tratamento.

A maior utilidade dos estudos de campo é que eles demonstram o potencial para a biorremediação sob as condições reais do meio ambiente em estudo. No entanto, é frequentemente impossível controlar adequadamente uma área, sem que fatores, como perda abiótica, sejam considerados. Para resolver este problema, pesquisadores utilizam colunas preenchidas com sedimentos ou amostras de aquíferos como modelos representativos de condições *in situ*. A maioria dos estudos utilizando colunas tem avaliado a estimulação da degradação sob condições desnitrificantes. Muito do que se conhece a respeito da degradação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos foi verificado em estudos com microcosmos. Microcosmos são construídos obtendo-se amostras provenientes de uma área de estudo, as quais são transferidas para frascos selados, onde as condições podem ser controladas e a atividade monitorada. No entanto, tanto os estudos em colunas, quanto em microcosmos são, geralmente, o primeiro passo para demonstrar que microrganismos são capazes de realizar determinada transformação. Phelps e Young. (2001) apresentaram uma revisão dos estudos realizados sobre biorremediação *in situ*, em coluna e microcosmos (Quadro 2).

Quadro 2 – Revisão da literatura sobre degradação anaeróbia de BTEX com culturas puras, microcosmos e colunas

	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	<i>p</i> -xileno	<i>m</i> -xileno	<i>o</i> -xileno
Cultura pura						
Ball et al. (1996)			N			
Beller et al. (1996)		S				
Dolfing et al. (1990)		N			N	
Evans et al. (1991)		N				
Fries et al. (1994)		N			N	
Harms et al. (1999)		S			S	S
Hess et al. (1997)		N			N	
Lovley e Lonergan. (1990)		F				
Rabus et al. (1993)		S				
Rabus e Widdel. (1995)		N	N		N	
Schocher et al. (1991)		N				
Microcosmos						
Ball e Reinhard. (1996)		N,S	N	N,S	N,S	N
Beller et al. (1992)		S				
Bregnard et al. (1996)		N		N	N	N
Edwards e Grbic-Galic. (1994)		C				C
Edwards et al. (1992)		S		S	S	S
Grbic-Galic e Vogel. (1987)	C	C				
Haner et al. (1995)		N		N	N	
Hutchins et al. (1991)		N	N	N	N	
Kao e Borden. (1997)		N	N		N	N
Kazumi et al. (1997)	C,S,F					
Kazumi et al. (1998)	C,S,F	N,S,C,F		N,S,F	N,S,C,F	C,F,S
Langehoff et al. (1997)		Mn				
Lovley et al. (1995)	S					
Lovley et al. 1994	F					
Major et al. 1998	N					
Phelps e Young, 1999	S	N,S,C,F	N,S,C,F	N,S,F	N,S,F	N,S,F
Phelps et al. (1996)	S					
Rabus et al. (1996)		S			S	S
Wilson et al. (1996)	C	C	C			C
Colunas						
Anid et al. (1993)	N	N	N	N	N	N
Haag et al. (1991)		S		S		
Hutchins et al. (1992)		N	N	N	N	
Kuhn et al. (1985)				N	N	N
Kuhn et al. (1988)		N			N	
Langehoff et al. (1996)		N,S,C,F, Mn				
Master e Kosson, (1996)		N				
Ramanand et al. (1995)		N				
Zeyer et al. (1986)		N	N		N	
In situ						
Acton e Barker, 1992		C	C		C	C
Barbaro et al. (1992)		C,N				
Hutchins et al. (1991)		N	N	N	N	
Reinhard et al. (1997)		N,S	N,S	N,S	N,S	N,S

Fonte: Phelps e Young. (2001). N – desnitrificante; S – sulfetogênica; C – metanogênica; F – redução de ferro; redução de Mn

3.3.2 Estudos em biorreatores

Os bioreatores são sistemas que podem apresentar diversas configurações e arranjos. Estes sistemas são compostos por microrganismos e possivelmente outros agentes catalíticos, que agem cooperativamente com os microrganismos. Para estimular o crescimento destes organismos, nutrientes são adicionados ao meio. Nestes sistemas, a biomassa pode crescer em suspensão ou aderidos a uma matriz.

De acordo com Cohen. (2001), na degradação de poluentes, os reatores biológicos com biomassa imobilizada apresentam inúmeras vantagens frente aos reatores operados com biomassa suspensa devido à elevada concentração de biomassa, elevada atividade metabólica atribuída à alta concentração de nutrientes aderidos ao biofilme e às diferentes interações entre espécies microbianas, e resistência à toxicidade, principalmente, devido ao efeito protetor da matriz extracelular (barreira de difusão) que pode reduzir a concentração de tóxico no biofilme.

Em 1997, a configuração do reator anaeróbio horizontal de leito fixo, com biomassa imobilizada em matriz de poliuretano, foi estudada e proposta por Zaiat et al. (1997). Os autores verificaram que esta configuração apresentava bom desempenho com grande estabilidade do processo devido à capacidade de trabalhar com elevados tempos de retenção celular quando operados com baixos tempos de detenção hidráulica. A partir deste estudo, outros trabalhos foram realizados nesta configuração de reator, especialmente relacionados com o tratamento de compostos tóxicos como pentaclorofenol (Damianovic, 1997), fenol (Bolaños et al., 2001), formaldeído (Oliveira et al., 2004) e BTEX (Nardi, 2002; Ribeiro, 2005; Cattony, 2005). Revisão mais aprofundada destes e outros trabalhos com biorreatores pode ser encontrada no estudo de Ribeiro. (2005) e está sumarizada no quadro 3

Quadro 3- Estudos realizados com diferentes sistemas no tratamento de compostos tóxicos.

Sistema de tratamento	Composto tóxico tratado	Resultado obtido	Referência
Filtro biológico, Biodisco e Reator de filme fixo e fluxo ascendente	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, BTEX e compostos fenólicos	Reator com biomassa imobilizada apresentou maior eficiência de remoção dos compostos tóxicos	Van der Hoek et al., 1989
Lagoas aeradas	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e BTEX	98% para benzeno, 94% para tolueno e 99% para etilbenzeno.	Vail, 1991
Bateladas sequenciais	Hidrocarbonetos aromáticos provenientes de sítio contaminado com combustível de avião	Remoção quase completa dos BTEX	Yocum et al., 1995
Batelada e contínuo	Tolueno	Remoção de completa de tolueno (batelada). Em reator contínuo a concentração de tolueno permaneceu abaixo de 1 mg/L, para concnetração afluyente de 150 mg/L	Chaudhuri e Wiesmann, 1996
RAHLF	Pentaclorofenol	Eficiente remoção de pentaclorofenol	Damianovic, 1997
Bateladas sequenciais	Hidrocarbonetos aromáticos provenientes de efluentes de sistema de limpeza de tanques de armazenamento de compostos químicos	99% de remoção de BTEX	Zilverentant, 1997
Biofiltro aerado	Água de lavagem de vapores contaminados por gasolina	Eficiente degradação de BTEX	Wright et al., 1997
Reator híbrido	Efluente contendo BTEX	Remoção de BTEX acima de 90%	Yeom e Yoo, 1999

Continuação do quadro 3

Reator de leito fixo	BTEX	Velocidades de consumo de BTEX pelas células imobilizadas de 9 a 75 vezes altas do que as células livres.	Shim e Yang, 1999
Reator aeróbio fluidizado	Efluente contendo 50mg/L de BTEX	Os processos de adsorção e biodegradação ocorriam simultaneamente otimizando a transferência de BTEX para as células	Mason et al., 2000
Bateladas sequenciais	Compostos aromáticos (BTX)	Degradação de tolueno e <i>m</i> -xileno em presença de nitrato e degradação de benzeno, <i>o</i> -xileno e <i>p</i> -xileno em condições microaerofílicas.	Ma e Love, 2001
Biofiltro aeróbio	BTEX	Eficiência de remoção etilbenzeno > benzeno > <i>o</i> -xileno > <i>m</i> -xileno > <i>p</i> -xileno	Du Plessis et al., 2001
RAHLF	Fenol	remoção na ordem de 99% para concentrações de fenol que variaram de 50 a 1200mg/L	Bolños, 2001
RAHLF	Formaldeído	Eficiência de remoção de formaldeído de 99,7%	Oliveira, 2001
RAHLF	Água residuária composta de solução etanólica e BTEX	Concentrações de BTEX no efluente menores que 0,1mg/L,	Nardi, 2002
Reator de leito fixo submerso e reator fluidificado	Águas subterrâneas contaminadas por BTEX	Remoção de 99% de benzeno, tolueno e xilenos.	Guerin, 2002
Reator aeróbio Fluidificado	Águas subterrâneas contaminadas por BTEX	Remoção completa de BTEX	Pruden et al., 2003

Fonte: Ribeiro 2005

Mais recentemente, outros três estudos foram realizados com RAHLF no tratamento de BTEX.

Os estudos desenvolvidos por Ribeiro. (2005) demonstraram a viabilidade técnica da aplicação do RAHLF sob condições metanogênicas, operando com TDH de 16 horas. O autor verificou remoção de 99% da matéria orgânica e em torno de 95% dos BTX, os quais foram verificadas as seguintes concentrações no efluente (benzeno - $0,62 \pm 0,41$ mg/L; tolueno - $0,71 \pm 0,46$ mg/L; meta-xileno - $0,28 \pm 0,19$ mg/L). O autor também verificou que os valores estimados para as constantes cinéticas, considerando modelo cinético de primeira ordem, com residual para a remoção dos BTX, foram muitos superiores, cerca de cem vezes maiores do que os encontrados na literatura. Neste estudo, outro reator, operado sob condições desnitrificantes, apresentou remoção quase total de nitrato e BTX, praticamente, no primeiro trecho do reator, o que caracterizou o reator como um sistema misto, onde o metabolismo desnitrificante ocorria no primeiro seguimento do mesmo, enquanto que, no restante do reator, o metabolismo era metanogênico.

Cattony. (2005) estudou a remoção de etanol, benzeno e tolueno em reator anaeróbio horizontal de leito fixo na presença de sulfato. Os reatores foram inoculados com lodo de reator UASB tratando águas residuárias provenientes de abatedouro de aves e operados com tempo de detenção hidráulica de 12 h. Tolueno e benzeno foram adicionados, separadamente nos reatores, em concentrações iniciais de $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$, seguidas de aumentos que variaram até valores finais de 9 e 10 mg/L, para tolueno e benzeno, respectivamente. Sulfato foi adicionado em concentrações de 91 e 550 mg/L de sulfato ferroso e sulfato de sódio, respectivamente, para promoção de ambiente sulfetogênico. A eficiência na remoção da matéria orgânica, que variou de 170 mg/L a 960 mg/L nos dois reatores, foi próxima a 90%, com taxa máxima de degradação de tolueno de $0,06 \text{ mg}_{\text{tolueno}} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{SSV}} \cdot \text{d}^{-1}$, e $0,07 \text{ mg}_{\text{benzeno}} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{SSV}} \cdot \text{d}^{-1}$, para benzeno. A redução de sulfato foi de aproximadamente 99,9% em todas as condições nutricionais nos dois reatores.

Fernandes. (2005) utilizando diferentes tipos de biomassa avaliou a influência do inóculo e de aceptores de elétrons no processo de degradação anaeróbia de BTX. Os resultados obtidos comprovaram que a origem do inóculo foi fundamental na degradação anaeróbia de BTX, pois os inóculos apresentaram diferentes períodos de adaptação e porcentagens de degradação destes compostos. A autora concluiu que o inóculo proveniente de reator tratando água residuária de abatedouro de aves apresentou

maior eficiência de remoção de BTEX que foi de 90%, comparada com eficiências de 57% e 83% para biomassa proveniente de um reator, RAHLF tratando BTEX e, inóculo proveniente de estação de tratamento de esgoto, respectivamente. Neste estudo, a autora também verificou que a adição de Fe (III), no reator sob condições sulfetogênicas favoreceu a degradação dos BTX.

3.4 Considerações finais

Todos estes estudos consolidam a possibilidade do tratamento de compostos como os BTEX. Entre os biorreatores citados na revisão da literatura, o reator anaeróbio horizontal de leito fixo tem-se consolidado como sistema viável no tratamento de compostos tóxicos, tanto no que diz respeito ao bom desempenho do reator, quanto à estabilidade alcançada no processo, mesmo quando o sistema é operado com altas cargas orgânicas. Sob o ponto de vista econômico, o RAHLF apresenta a vantagem de ter baixo custo operacional, quando comparado a outras tecnologias utilizadas para biorremediação. Nos últimos anos, os estudos realizados com RAHLF, no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, vêm aprimorando este sistema no sentido de viabilizar sua aplicação, em escala real, para o tratamento de efluentes contaminados por compostos tóxicos. No entanto, as informações a respeito da biomassa envolvida no processo de remoção destes tóxicos são, ainda, escassas. Até o presente momento, todas as informações sobre os microrganismos presentes nos biofilmes destes reatores, ajudaram no melhor entendimento deste sistema, no que diz respeito: (1) morfologias predominantes, (2) esclarecimento sobre a dinâmica destas populações frente aos compostos tóxicos (3), e a composição deste biofilme dentro dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Todos estes estudos foram realizados utilizando-se culturas mistas, em que consórcios complexos estiveram envolvidos. Devido ao alto grau de complexidade destes consórcios, nenhuma informação pôde ser obtida sobre a biologia das células, e sobre quais eram os microrganismos envolvidos diretamente com a degradação dos compostos tóxicos.

A identificação dos microrganismos do biofilme é de suma importância para o aprimoramento de reatores. Conhecendo-se estes microrganismos, pode-se obter importantes informações a respeito dos aspectos ecológicos, fisiológicos e genéticos ligados a biodegradação, que vão auxiliar para o alcance de melhores eficiências dos

processos de remoção nos reatores. Neste contexto, conhecendo-se, por exemplo, o tempo de geração da cultura (inóculo), pode-se prever com que rapidez ou lentidão o biofilme se formará no reator, ou, ainda, o quanto de biomassa será formada, atentando para possível entupimento do sistema, entre outros aspectos. Ainda sobre fisiologia, a caracterização nutricional da cultura, poderá informar sobre as principais fontes orgânicas utilizadas pelas células, e sobre a versatilidade metabólica dos microrganismos em crescer em diferentes condições (desnitrificantes, sulfetogênicas, fermentativas), proporcionando, assim, melhor escolha dos substratos e aceptores de elétrons a serem utilizados. Neste sentido, o presente estudo vem colaborar, de forma inédita, dentro dos estudos realizados com RAHLF, para o melhor entendimento de aspectos ligados a biologia de uma cultura desnitrificante envolvida com o processo de remoção de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, neste tipo de reator.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas etapas distintas. Na primeira etapa, os ensaios foram realizados em reatores em batelada e na segunda, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF).

Nos ensaios em batelada (Figura 1), dois meios de cultivos (meio Zinder e meio Dolfing) foram avaliados para determinar a melhor condição nutricional para o desenvolvimento de microrganismos desnitrificantes. Uma vez obtida a melhor condição nutricional, as metodologias de purificação e isolamento em placa de Petri foram realizadas com o objetivo de obter culturas purificadas e, posteriormente, avaliar a capacidade de remoção de BTEX por estas culturas.

Testes para avaliar a degradação dos hidrocarbonetos foram realizados em reatores em batelada. No entanto, os resultados obtidos não foram conclusivos. Desse modo, optou-se em realizar a segunda etapa do trabalho experimental em reatores preenchidos com material suporte e crescimento celular aderido. Assim, a segunda etapa deste trabalho, teve como objetivo avaliar a remoção de BTEX, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo, pelas culturas purificadas na primeira etapa.

Foram utilizados dois RAHLFs. No reator denominado RAHLF1, utilizou-se como inóculo para formar o biofilme, a cultura purificada em presença de benzeno. Neste reator, o meio suporte (espumas de poliuretano) foi mantido durante todo o período de operação do reator. Esta estratégia teve como objetivo avaliar a capacidade do biofilme em remover BTEX, quando continuamente submetido a esses compostos. Inicialmente, o reator foi alimentado com benzeno, em diferentes concentrações. Após este período, o reator foi alimentado, separadamente, com tolueno, *m*-xileno, etilbenzeno, e com BTEX (todos os hidrocarbonetos presentes em única solução). Os perfis espaciais foram realizados conforme esquematizado na Figura 2.

No reator denominado RAHLF2, utilizou-se como inóculo para forma o biofilme, cultura purificada em presença de etilbenzeno. Neste reator, o meio suporte foi removido todas as vezes que novo hidrocarboneto era utilizado na alimentação. Esta estratégia teve como objetivo avaliar a capacidade do biofilme em remover os

hidrocarbonetos, independentemente da adaptação prévia do mesmo, a outros compostos. O reator foi alimentado, separadamente, com benzeno, tolueno, etilbenzeno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno e com BTEX (Figura 3). Os perfis espaciais dos reatores e RAHLF2 foram realizados todas as vezes que diferentes concentrações foram utilizadas na alimentação dos reatores, conforme esquematizado nas Figuras 2 e 3.

OBS: exames microscópicos foram realizados em todos os ensaios

Figura 1 – Fluxograma da primeira etapa experimental dos ensaios em reatores em batelada.

***Obtenção de amostras para serem avaliadas pelas técnicas moleculares (PCR, DGGE).**

• Amostras submetidas ao sequenciamento

OBS: As análises foram baseadas nas concentrações obtidas dos perfis ocorridos ao final do período de alimentação do reator com o hidrocarboneto específico.

Figura 2 – Fluxograma das etapas experimentais realizadas no RAHLF1

*Obtenção de amostras para serem avaliadas pelas metodologias moleculares (PCR, DGGE).

• Amostras submetidas ao sequenciamento

OBS: As análises foram baseadas nas concentrações obtidas dos perfis ocorridos ao final do período de alimentação do reator com o hidrocarboneto específico.

Figura 3 – Fluxograma das etapas dos ensaios realizados no reator RAHLF2.

Todo material utilizado, durante todas as etapas experimentais, foi previamente esterilizado em autoclave.

Todas as curvas de calibração utilizadas nas análises estão apresentadas no Apêndice A

4.1 Inóculo

A biomassa utilizada como inóculo neste trabalho foi obtida de reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente, instalado em abatedouro de aves no município de Tietê (SP). O lodo foi colocado em peneira e lavado com água quimicamente pura, para retirar o excesso de nitrogênio amoniacal. Posteriormente, o lodo foi homogeneizado e desintegrado em liquidificador doméstico, e submetido a atmosfera de N₂ (100%) durante 10 minutos, antes de sua utilização.

4.2 Ensaios de Enriquecimento

Os ensaios de enriquecimentos foram realizados utilizando-se os meios de cultivos descritos por Zinder et al. (1984) e Dolfig et al. (1990) acrescidos de fontes de carbono (acetato e etanol), sendo o aceptor de elétrons fornecido em solução de nitrato de sódio. As composições das soluções utilizadas no enriquecimento estão apresentadas nas Tabelas 3 a 7.

O enriquecimento foi realizado em frascos de Duran (2L), considerando 1 litro de meio de cultivo em volume e 8% (v/v) de inóculo, conforme representado nas Tabelas 8 e 9. O *headspace* foi mantido em 50%, com atmosfera de N₂ (100%) e N₂/CO₂ (70/30%) para os meios Dolfig e Zinder, respectivamente. A troca da atmosfera gasosa foi realizada com pipetas estéreis, acopladas a mangueiras estéreis anexadas ao sistema de distribuição de gases. Tampas de borracha de butila e rosca plástica foram utilizadas para selar os reatores. Os sistemas foram colocados sob agitação de 150rpm (Domingues, 2001) e temperatura controlada a 30±2°C. Amostras periódicas foram retiradas com seringa estéril, sob assepsia, para o acompanhamento da produção dos gases metano e óxido nitroso, análises de nitrato, nitrito e amônia, e exames microscópicos. Os ensaios foram realizados em batelada, em triplicatas de reatores.

Tabela 3 - Composição do meio Zinder

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
NH ₄ Cl	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,4g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,10g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05g
Na ₂ HPO ₄	1,2g
*Solução traço de metais	10,0mL
*Solução de vitaminas	10,0mL
*Solução sulfeto de sódio 5% (p/v)	10,0mL
*Solução bicarbonato de sódio (10% p/v)	10,0mL
*Resazurina 0,1%	1,0mL

Fonte: Zinder et al. (1984).

* Soluções estoques.

Tabela 4 - Composição da solução traço de metais do meio Zinder

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
Triplex III	4,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,086 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21 g
H ₃ BO ₃	0,19
NiCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g

Fonte: Zinder et al. (1984).

Tabela 5 – Composição da solução de vitaminas do meio Zinder

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina HCl	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantotenato de cálcio	0,005 g
Priridoxina HCl	0,010 g
Vitamina B12	0,0001 g
Ácido lipóico	0,005 g

Fonte: Touzel e Albagnac. (1983).

Tabela 6 - Composição do meio Dolfig

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
KH_2PO_4	0,33g
Na_2HPO_4	1,2g
NH_4Cl	0,11g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10g
*Solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,4 g/L)	10,0 mL
*Solução traço de metais	1 mL
*Solução de sulfeto de sódio 5% (p/v)	10mL

Fonte: Dolfig et al. (1990).

* Soluções estoques

Tabela 7 - Composição da solução traço de metais do meio Dolfig

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
ZnCl_2	0,25 mg
NH_4VO_3	0,1 mg

Fonte: Zeyer e Kearney (1982).

Tabela 8– Composição dos reatores em batelada enriquecidos com meio Zinder

Composição	Quantidade (mL)
Meio de cultura Zinder	860
Bicarbonato de sódio (10%)	10
Solução de vitaminas	10
Acetato de sódio (2M)	10
Etanol (1M)	10
Nitrato de sódio (1M)	10
Sulfeto de sódio (5%)	10
Inóculo	80
Volume total	2000
Headspace (N_2/CO_2) (70/30%)	1000

Tabela 9 – Composição dos reatores batelada enriquecidos com meio Dolfing

Composição	Quantidade (mL)
Meio de cultura Dolfing	870
Cloreto de cálcio	10
Acetato de sódio (2M)	10
Etanol (1M)	10
Nitrato de sódio (1M)	10
Sulfeto de sódio (5%)	10
Inóculo	80
Volume total	2000
Headspace (N ₂) (100%)	1000

As soluções foram preparadas de acordo com as técnicas para a manipulação de anaeróbios estritos descritas detalhadamente por Vazoller (1995). O quadro 4 apresenta resumo das condições nas quais as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas.

Quadro 4 – Condições de preparo das soluções estoques utilizadas no enriquecimento

Solução	Esterilização	Condições	Manutenção
Meio Zinder	Autoclavação (20 min, 121°C, 1 atm)	Assepsia Fluxo de N ₂ /CO ₂ (70/30%)	Escuro até o momento da sua utilização
Meio Dolfing	Autoclavação (20 min, 121°C, 1 atm)	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Escuro até o momento da sua utilização
Traço de metais	Autoclavação (20 min, 121°C, 1 atm)	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Escuro/geladeira
Vitaminas	Esterilização em membrana 0,22µm	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Escuro/geladeira
Bicarbonato de sódio (10%)	Esterilização em membrana 0,22µm	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Temperatura ambiente
Sulfeto de sódio (5%)	Esterilização em membrana 0,22µm	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Escuro/temperatura ambiente
Solução de CaCl ₂ .2H ₂ O (4,4 g/L)	Esterilização em membrana 0,22µm	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Temperatura ambiente
Solução de NaNO ₃ (1M)	Autoclavação (20 min, 121°C)	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Temperatura ambiente
Solução de Acetato de sódio (2M)	Autoclavação (20 min, 121°C)	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Temperatura ambiente
Etanol (1M)	Autoclavação (20 min, 121°C)	Assepsia Fluxo de N ₂ (100%)	Temperatura ambiente

4.3 Purificação do inóculo

O ensaio de purificação do inóculo foi realizado pelo método das diluições seriais (Figura 4). As diluições foram realizadas em frascos estéreis de 100mL selados com tampas de teflon. O meio de cultivo (meio Dolfig, 50mL) foi suplementado com nitrato de sódio (140mg/L – N-NO_3^-), solução contendo etanol (460mg/L) e o hidrocarboneto específico (5mg/L). O *headsapce* foi mantido em 50% (v/v). A maior diluição que apresentou crescimento foi, mais uma vez, serialmente diluída. Uma alíquota da maior diluição, desta nova série, foi utilizada como inóculo para o isolamento em placa de Petri. As purificações foram realizadas para benzeno, tolueno, etilbenzeno, *o*-xileno, *m*-xileno, e *p*-xileno, separadamente.

Figura 4 – Esquema da metodologia da diluição seriada.

4.4 Purificação em placa de Petri

A purificação foi realizada utilizando-se a metodologia de esgotamento por meio de estrias superficiais em placas de Petri. O meio de cultivo recebeu ágar 1,4% (p/v) e foi autoclavado. Após autoclavação, o meio foi deixado em banho-maria até que atingisse temperatura próxima à temperatura ambiente. Nestas condições, o meio foi

suplementado com etanol (460mg/L), nitrato de sódio (350 mg/L) e o hidrocarboneto (10mg/L). O meio foi distribuído, sob assepsia, em placas de Petri estéreis e, após solidificação, o inóculo, anteriormente purificado, foi semeado com alça de platina, na superfície do meio solidificado, utilizando-se a metodologia do esgotamento por meio de estrias superficiais em placas de Petri. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose (BBL™ GasPack™ Anaerobic Systems), submetidas a atmosfera de N₂ (100%), por 5 minutos. A jarra foi incubada em estufa a 30±2°C, por 48 horas. O isolamento foi realizado para benzeno, tolueno, etilbenzeno, *o*-xileno, *m*-xileno e *p*-xileno, separadamente, entretanto, as placas que produziram os melhores resultados (menor diversidade morfológica) foram observadas somente para os isolamentos realizados em benzeno e etilbenzeno (diluição 10⁻⁵).

4.5 Aumento da massa celular

Objetivando-se aumentar a massa celular obtida das culturas isoladas em benzeno e etilbenzeno, uma única colônia, de cada isolamento, foi inicialmente transferida para meio líquido (10ml) com composição e concentrações idênticas àquelas utilizadas para a purificação em placa de Petri. Para favorecer a solubilidade do hidrocarboneto foi utilizada no meio de cultivo, solução de etanol (460 mg/L) acrescida do hidrocarboneto (10mg/L). O aumento da massa celular foi realizado centrifugando-se por 5 minutos a 6000rpm e 10°C, a cultura crescida em meio líquido (48 horas), e transferindo-se o *pellet* celular para volumes cada vez maiores de meio de cultivo fresco, até que se atingisse volume final de solução de 1000ml.

4.6 Manutenção das culturas

O repique da cultura foi realizado uma vez por mês. A cultura em suspensão foi transferida para tubos estéreis de 50mL, os quais foram submetidos a centrifugação durante 5 minutos a 6000rpm e 10°C. O *pellet* resultante (aproximadamente 5ml) foi transferido para meio de cultivo fresco, contendo nitrato e solução etanólica acrescida do hidrocarboneto específico.

4.7. Caracterização nutricional das culturas

Os ensaios de caracterização nutricional foram realizados em triplicatas, em frascos de 100 mL, previamente esterilizados. Dois frascos forneceram amostras para verificação de crescimento e o terceiro, para realização de exames microscópicos. Todas as soluções utilizadas foram preparadas sob condições assépticas. Quatorze substâncias (Tabela 10) foram avaliadas como possíveis substratos para o crescimento celular em condições desnitrificante, sulfetogênicas e fermentativas. As soluções estoques dos substratos foram preparadas na concentração de 500mM. O meio basal utilizado foi acrescido dos substratos orgânicos e nitrato ou sulfato (desnitrificação ou redução do sulfato), ou sem acceptor final de elétrons (fermentação), conforme esquematizado na Tabela 10.

A biomassa utilizada como inóculo foi previamente crescida durante 48 horas, em etanol (10mM), nitrato de sódio (10mM) e do hidrocarboneto (10mg/L), transferida para frascos apropriados e submetida a centrifugação (10°C) a 6000rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em meio basal estéril. Em todos os ensaios de caracterização nutricional foi utilizado 1% (v/v) do inóculo. Os ensaios foram realizados com concentrações do substrato de 1mM e 10mM, exceto para a condição sulfetogênica, em que a concentração dos substratos utilizada foi de 1mM. Para os compostos de BTEX, utilizou-se a concentração de 30mg/L de cada composto e 10mM de etanol e, nos ensaios desnitrificantes, nitrato foi adicionado, em média 30%, além dos cálculos estequiométricos, para garantir o crescimento.

Os frascos foram incubados a $30^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, e o crescimento celular avaliado após 30 horas de crescimento. Três mililitros da cultura em suspensão foram centrifugados, homogeneizando-se o *pellet* em 3 mL de água utrapurificada. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância (600nm), em espectrofotômetro com duplicata de amostras.

Tabela 10. Composição dos frascos nos ensaios de caracterização nutricional.

Substrato orgânico	Sulfetogênese/ substrato orgânico (1mM)	Desnitrificação/ substrato orgânico (10mM)	Fermentação/ substrato orgânico (10mM)
Acetato de sódio	100µL de solução estoque 1,5mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 15mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Glicose	100µL de solução estoque 4mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 40mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Lactato de sódio	100µL de solução estoque 2mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 20mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Propionato de sódio	100µL de solução estoque 2,5mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 25mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Butirato de sódio	100µL de solução estoque 3,5mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 35mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Piruvato de sódio	100µL de solução estoque 2mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 20mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Etanol	100µL de solução estoque 2mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 20mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Metanol	100µL de solução estoque 1mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 10mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Benzoato de sódio	100µL de solução estoque 5mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 50mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Fenol	100µL de solução estoque 5mg de N-NO ₃ ⁻	1mL de solução estoque 50mg de N-NO ₃ ⁻	100µL sol. estoque
Benzeno	1704µL de benzeno 5mg de N-NO ₃ ⁻	50µL de solução estoque 25mg de N-NO ₃ ⁻	50µL sol. estoque
Tolueno	1704µL de tolueno 5mg de N-NO ₃ ⁻	50µL de solução estoque 25mg de N-NO ₃ ⁻	50µL sol. estoque
Etilbenzeno	1704µL de etilbenzeno 5mg de N-NO ₃ ⁻	50µL de solução estoque 25mg de N-NO ₃ ⁻	50µL sol. estoque
<i>p</i> -Xileno	1704µL de <i>p</i> -xileno 5mg de N-NO ₃ ⁻	50µL de solução estoque 25mg de N-NO ₃ ⁻	50µL sol. estoque

4.8 Ensaaios em reatores batelada

4.8.1 Determinação do tempo de geração das culturas

Os ensaios para obtenção da velocidade de crescimento e do tempo de geração das culturas isoladas foram realizados em reatores batelada com volume total de dois litros (Figura 5).

Figura 5 - Reatores utilizados nos ensaios de determinação do tempo de geração

Nesses ensaios foi utilizado meio de cultivo descrito por Dolfing et al. (1990), como descrito anteriormente. Os reatores foram preenchidos com meio de cultivo e suplementados conforme representado na Tabela 11. O *headspace* foi mantido em 50% (v/v) do volume total do reator e preenchido com atmosfera de N₂ (100%). Os ensaios foram realizados em duplicata de reatores. As culturas em crescimento planctônico foram transferidas para frascos apropriados e submetida a centrifugação (10°C) a 6000rpm, durante 3 minutos, visando lavar as células, retirar possíveis intermediários metabólicos e obter biomassa concentrada.

Tabela 11. Composição dos reatores utilizados para avaliação do crescimento celular. Experimento em batelada

Reator	Condição Nutricional
Reator1 e Reator2	3mL de inóculo (cultura isolada em benzeno) Benzeno 10 mg/L Etanol (460 mg/L) Nitrato de sódio (350 mg NO ₃ /L)
Reator 3 e Reator 4	3mL de inóculo (cultura isolada em benzeno) Etanol (460 mg/L) Nitrato de sódio (350 mg NO ₃ /L)
Reator 5 controle	Sem inóculo Benzeno 10 mg/L Etanol (460 mg/L) Nitrato de sódio (350 mg NO ₃ /L)
Reator 6 e Reator 7	3mL de inóculo (cultura isolada em etilbenzeno) Etilbenzeno 10 mg/L Etanol (460 mg/L) Nitrato de sódio (350 mg NO ₃ /L)
Reator 8 e Reator 9	3mL de inóculo (cultura isolada em etilbenzeno) Etanol (460 mg/L) Nitrato de sódio (350 mg NO ₃ /L)
Reator 10 controle	Sem inóculo Etilbenzeno 10 mg/L Etanol (460 mg/L) Nitrato de sódio (350 mg NO ₃ /L)

Os reatores foram vedados com tampas de teflon e mantidos em agitação (100rpm) e temperatura controlada em 30°±2°C.

As amostras foram retiradas com seringas estéreis, sendo que o volume de amostra retirada não excedeu 10% (v/v) do volume total de reação.

O crescimento celular foi avaliado centrifugando-se 3mL da amostra dos reatores e homogeneizando-se o *pellet* em 3mL de água ultrapurificada (sistema milliQ). A leitura da absorbância (600nm) foi realizada em espectrofotômetro DR 4000 U (HACH).

Nestes ensaios, foi também analisado o consumo de nitrato (N-NO₃⁻), a variação da concentração dos hidrocarbonetos e de etanol. As metodologias empregadas para estas análises estão descritas posteriormente.

A determinação da velocidade específica na fase exponencial de crescimento (μ) foi feita graficamente, projetando-se os valores do logaritmo neperiano da absorbância *versus* tempo, onde identificou-se os pontos que possuíam a maior probabilidade de se alinharem numa mesma reta. Estes pontos correspondem à fase exponencial do

crescimento em que a velocidade é máxima e constante (Varesche, 1997). Através do cálculo da regressão linear dos pares de pontos, determinou-se a equação da reta cujo coeficiente angular correspondeu ao valor de μ . A partir da velocidade de crescimento da cultura calculou-se o tempo de geração da cultura (T_g) de acordo com a fórmula descrita a seguir.

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1)$$

4.9 Ensaios em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)

4.9.1 Configuração do reator

A Figura 6 mostra a fotografia dos reatores anaeróbios de leito fixo (RAHLF) utilizados no presente estudo. Os reatores foram confeccionados em vidro borossilicato, e possuíam as seguintes características: 100 cm de comprimento, 5,0 cm de diâmetro, relação extensão/diâmetro (L/D) de 20, volume total de 1995ml, e volume líquido de 800ml. O reator consistiu de 5 pontos de amostragens intermediários distribuídos ao longo de seu comprimento (L/D = 4, 8, 12, 16, e 20). Partículas cúbicas de espumas de poliuretano (5mm em tamanho e densidade aparente de 23 kg/m³) foram usadas como suporte para imobilização da biomassa, resultando na porosidade de leito de 40%. Os reatores também possuíam sistema coletor de gás. Ambos reatores foram operados com tempo de detenção hidráulica de 12 horas, com base no volume líquido, e vazão de 0,0185 mL/s

Figura 6 – Fotografia do RALHF instalado na câmara aclimatizada.

Os RAHLFs foram instalados em câmara com temperatura controlada ($30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) e alimentados através de bomba peristáltica. Os reatores foram preenchidos com os cubos de poliuretano esterilizados, e alimentados com substrato contendo meio de cultura Dolfing, etanol (460mg/L), nitrato (estequiometricamente calculado para cada condição) e os hidrocarbonetos, em diferentes concentrações. Foi mantida atmosfera de N_2 (100%) nos reservatórios de alimentação, utilizando balão preenchido com esse gás.

4.9.2 Imobilização das culturas nos reatores

Anteriormente à imobilização de cada reator, as células isoladas foram repicadas em 4 litros de meio fresco, contendo o hidrocarboneto na mesma concentração a ser utilizada para alimentação do reator. Após 48 horas de crescimento, a $30^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, estas células foram utilizadas para imobilizar o reator, através da recirculação desta cultura, em circuito fechado, durante 2-3 dias, do seguinte modo: frasco de alimentação → reator → frasco de alimentação. Após este período, a recirculação era interrompida e o reator alimentado com substrato fresco.

4.9.3 Alimentação dos reatores

Os reatores foram alimentados com meio de cultivo Dolfing, suplementado de solução de nitrato de sódio e solução etanólica acrescida do hidrocarboneto. Soluções estoques de cada um dos componentes do meio Dolfing, assim como, as soluções de nitrato de sódio e traço de metais, foram esterilizadas e adicionadas a água ultrapurificada estéril. Para suprir um ciclo de alimentação de 48 horas, era preparado volume final 4 litros de substrato de alimentação.

4.9.3.1 Solução etanólica com BTEX

Foram preparadas soluções estoques de etanol e hidrocarboneto aromático (benzeno, tolueno, etilbenzeno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno) nas concentrações próximas a 10g/L de hidrocarboneto e 690mg/L de etanol, ou 30g/L de hidrocarboneto e

690mg/L de etanol, para as alimentações dos reatores nas concentrações próximas a 10mg/L e 30mg/L do hidrocarboneto, respectivamente. Estas soluções eram estocadas em frascos estéreis, fechados com tampas de butila revestida com teflon, lacradas com alumínio e armazenadas a 4°C. Pouco antes de sua utilização, a solução era retirada da geladeira e deixada à temperatura ambiente, homogeneizada, e então, utilizada. O volume requerido para a alimentação do reator era retirado por meio de seringa estéril. Imediatamente após a adição desta solução, o frasco de alimentação era fechado e homogeneizado.

4.9.4 Manutenção do reator

Para minimizar o crescimento de microrganismos nas mangueiras e tampas, assim como em todo material utilizado na preparação do substrato de alimentação (pipetas, seringas, beakers, provetas) periodicamente procedia-se a esterilização em autoclave a 120°C e 1atm. Devido à troca freqüente das mangueiras de alimentação do reator, a calibração da bomba peristáltica, para a vazão desejada (0,0185 mL/s), era realizada periodicamente.

4.9.5 Estratégias utilizadas na operação dos reatores

O reator RAHLF1 foi operado durante 189 dias consecutivos, e alimentado inicialmente com diferentes concentrações de benzeno. Posteriormente, o reator foi submetido à alimentação com tolueno, *m*-xileno, etilbenzeno e BTEX (solução contendo todos os hidrocarbonetos juntos).

O reator RAHLF2 foi operado por diferentes períodos, totalizando um período de operação de 277 dias. Inicialmente, o reator foi alimentado com diferentes concentrações de etilbenzeno. Posteriormente, foram avaliados benzeno, tolueno, *m*-xileno, *o*-xileno, *p*-xileno e BTEX, sendo que o meio suporte foi removido todas as vezes que um hidrocarboneto diferente era utilizado para alimentar o reator.

4.9.6 Análises realizadas no RAHLF

A Tabela 12 apresenta, de forma resumida, os parâmetros avaliados no afluente e efluente dos reatores durante o período de operação e os métodos utilizados para avaliação destes parâmetros.

Tabela 12 – Parâmetros avaliados durante a operação dos RAHLFs e método analítico utilizado

Parâmetro	Método utilizado
BTEX	Cromatografia gasosa
Ácidos voláteis (mg/L)	Cromatografia líquida
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	Titulométrico
Ácidos Voláteis (mg HAc/L)	Titulométrico
DQO bruta (mg/L)	Espectrofotométrico
DQO filtrada (mg/L)	Espectrofotométrico
N-NO ₂ ⁻ (mgN/L)	Espectrofotométrico
N-NO ₃ ⁻ (mgN/L)	Espectrofotométrico
STV (mg/L)	Gravimétrico
pH	Potenciométrico

4.10 Metodologias utilizadas nos ensaios

4.10.1 Exames microscópicos

Os exames microscópicos, das amostras obtidas em todas as fases dos ensaios, foram realizados sob microscopia de contraste de fase, utilizando-se o Microscópio Olympus BX60-FLA, acoplado a câmera com captura de imagem e software Image-Pro Plus versão 4.5.0. Através desse equipamento foi possível captar as imagens e registrar as morfologias presentes nas amostras. Todas as observações microscópicas foram realizadas com as amostras obtidas a fresco.

Amostras do biofilme crescido nas espumas de poliuretano foram submetidas aos exames de microscopia eletrônica de varredura em microscópio de varredura digital Zeiss DSM-960. As amostras foram preparadas de acordo com Araújo et al. (2003).

4.10.2 Coloração de Gram

Amostras obtidas dos isolamentos em benzeno e etilbenzeno foram submetidas à coloração de Gram realizada segundo a metodologia da Scientific Services of Cultures Collections da Alemanha (DSM, 1991) para diferenciação dos microrganismos.

4.10.3 Análises Cromatográficas

4.10.3.1 Óxido nítrico e metano

O método de inibição do acetileno (C_2H_2) foi empregado para verificação da via metabólica utilizada pelos microrganismos, através da observação da produção de óxido nítrico (N_2O) (Yoshinari e Knowles, 1976). Acetileno (10% do volume do *headspace* do reator) foi injetado no reator, por meio de seringa estéril. As amostras de gás foram retiradas da fase gasosa utilizando-se seringas “gastight” (1mL). As concentrações de N_2O foram calculadas através da integração das áreas dos cromatogramas, utilizando-se curva padrão de acordo com a pureza do gás de 99%. Foi utilizado cromatógrafo Gow-Mac com coluna Porapak Q, com 2m de comprimento e diâmetro de $\frac{1}{4}$ ". O forno foi operado a temperatura de 25°C. Como gás de arraste, foi utilizado o hidrogênio. A avaliação da produção de N_2O foi realizada em duplicata.

As mesmas condições cromatográficas foram aplicadas para medir o teor de metano presente no biogás, determinado através da leitura correspondente em curva padrão.

4.10.3.2 Análise de BTEX

Esta análise foi realizada através da injeção do “*headspace*” do frasco. Para a quantificação, utilizou-se o método do padrão interno, pela introdução de quantidades iguais de solução de clorobenzeno em todas as amostras e nos padrões, a partir dos quais foi elaborada reta de calibração (diluiu-se diferente quantidade da substância a ser determinada em volumes iguais do substrato utilizado para alimentar os reatores, de onde foram retiradas as amostras para serem analisadas). A seguir está descrito, detalhadamente, a preparação da amostra e condições de análise.

Preparo das amostras:

- 1) Os frascos (10mL) foram previamente calibrados com pérolas de vidro, de forma que os volumes do “*headspace*” eram padronizados e constantes após a introdução das amostras. A seringa “*gastight*” (1,0mL) com trava foi utilizada para injeção das amostras no cromatógrafo. Para calibração dos frascos, os mesmos foram numerados, pesados e sua massa seca, anotada. A seguir, cada frasco foi preenchido totalmente com água destilada, tomando-se o cuidado para que não ocorresse a formação de bolha de ar no seu interior. Posteriormente, os frascos foram fechados com tampa de butila revestida de teflon, pesados, e as massas dos frascos com a água foram anotadas. Com os valores da massa seca, e da massa com água, de cada frasco, e considerando a densidade da água (1 g/mL), foi possível encontrar o volume de cada frasco, descontando-se a massa da tampa usada. A padronização dos volumes foi efetuada conhecendo-se as diferenças entre os volumes dos frascos maiores e menores. Conhecendo-se a densidade das pérolas de vidro (2,47g/mL), calculou-se as massas de pérolas necessária para compensar a diferença entre os frascos.
- 2) Utilizou-se volume de 2,0mL de amostra e 2,0mL de padrão interno (clorobenzeno 165mg/L), para a realização das análises.
- 3) Após colocar os volumes adequados de amostra e da solução de padrão interno nos frascos calibrados, os mesmos foram fechados com tampa de butila, revestida com teflon e lacrados com alumínio.
- 4) O frasco lacrado foi colocado em recipiente com água em ebulição, sobre uma placa de aquecimento e deixado por 10 minutos.
- 5) A seringa foi lavada com água e acetona e colocada em estufa, entre 60°C e 100°C, até o momento da injeção.
- 6) 300µL do “*headspace*” do frasco de amostra foram coletados, procurando-se introduzir a agulha sempre na mesma altura (mais ou menos na metade do espaço do “*headspace*”). No momento da coleta da amostra; a seringa foi travada antes de ser retirada do frasco da amostra, e inserida no injetor do cromatógrafo. A trava da seringa foi aberta, e a amostra injetada.

Condições de análise:

- 1) Cromatógrafo HP6890, com detector de ionização de chama, coluna HP - 1 (100% dimetilpolissiloxano), 30m x 0,53mm de diâmetro interno x 2,65µm de espessura de filme; gás de arraste: hidrogênio;
- 2) Temperatura do injetor: 250°C, razão de split: 40; pressão: 2,8 psi (a 70°C); “saver flow”: 15 mL/min.; lit offset: 1;
- 3) Temperatura do forno: 70°C (±2') até 110 °C (±3');
- 4) Temperatura do detector: 300°C, fluxo de hidrogênio: 30mL/min.; fluxo de ar sintético: 300mL/min.; fluxo de gás auxiliar (“make-up”): 27mL/min.; modo: col + “make-up”: constante; litoffset: 1.

*As análises foram realizadas em triplicatas nos ensaios em batelada e em duplicatas nos ensaios com RALHF.

4.10.3.3 Ácidos voláteis por cromatografia

A determinação de ácidos voláteis foi realizada em cromatógrafo gasoso HP 6890. A metodologia foi desenvolvida no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos – USP (Moraes et al., 2000), utilizando-se ácido crotônico como padrão interno em meio ácido (ácido sulfúrico) e extração com éter dietílico. A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

- Temperatura do injetor: 250 °C
- Temperatura do detector: 300 °C
- Programação de temperatura da coluna:
 - temperatura inicial: 100 °C
 - taxa de aquecimento: 5 °C/ min
 - temperatura final: 180 °C (5min)
- Razão de split: 20
- H₂ para alimentar a chama: 30mL/min
- Vazão do ar sintético: 300mL/min
- Vazão do gás de make up (N₂): 33mL/min

- Detector: ionização de chama
- Volume de amostra: 1,0µL

4.10.3.4 Análise de etanol

A metodologia de determinação da concentração do etanol foi realizada por cromatografia líquida de acordo com Moraes et al. (2000). A análise foi realizada em cromatógrafo HP 6890, equipado com detector de ionização de chama-FID, com hidrogênio como gás de arraste, e coluna Innowax de 30m, di = 0,25mm; filme de 0,25µm. As condições de análise foram as seguintes:

- Inlet: temperatura de 250°C;
- Pressão de 10,0 psi;
- Relação de split - 20;
- Forno a 70°C (3')-180°C (5'), a 5°C por min;
- Temperatura do detector: 300°C;
- Fluxo de Ar sintético de 300mL/min;
- Fluxo de N₂ (gás auxiliar): 35mL/min;
- Fluxo de H₂: 30mL/min.

4.10.4 Análises Físico-químicas

4.10.4.1 DQO, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal e sólidos suspensos voláteis

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), nitrato (N-NO₃⁻), nitrito (N-NO₂⁻), nitrogênio amoniacal (N-NH₃⁺ N-NH₄⁺) (titulometria e espectrofotometria - FIA) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram determinadas de acordo com as metodologias descritas no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998). Todas estas análises, exceto as referentes a SSV, foram realizadas em duplicatas.

4.10.4.2 Alcalinidade e ácidos voláteis por titulometria

As análises de alcalinidade foram realizadas segundo o protocolo de Dillalo e Albertson (1961) modificado por Ripley et al. (1986). A amostra foi filtrada em membrana com tamanho de poros de 1,2µm, previamente titulada com solução padronizada de ácido sulfúrico, até pH 5,75 (alcalinidade parcial devido ao bicarbonato) e pH 4,3 (alcalinidade intermediária devido aos ácidos voláteis). O volume gasto na titulação foi anotado e o cálculo para alcalinidade total foi realizado da seguinte forma:

$$\text{mg/L de alcalinidade total, como CaCO}_3 = \frac{V_2 \cdot N \cdot 50.000}{V_a} \quad (2)$$

Sendo: V_2 = volume de ácido gasto na titulação até pH 4,3

N = normalidade do ácido empregado

V_a = volume da amostra, mL

Para a obtenção do valor da alcalinidade a bicarbonato, considerou-se o seguinte:

(a) fator de correção de conversão da alcalinidade a ácidos voláteis e iguais a 0,833; (b) fator de conversão (0,85), significando que somente 85% da alcalinidade a ácidos voláteis foram medidas pela titulação até pH 4,3.

$$AB = AT - 0,833 \times 0,85 \cdot AV \Rightarrow \quad \mathbf{AB = AT - 0,71 AV} \quad (3)$$

Sendo,

AB = Alcalinidade a bicarbonato

AT = Alcalinidade total

AV = Ácidos voláteis

Ácidos voláteis totais, como ácido acético, foram analisados segundo metodologia proposta por Dillalo e Albertson (1961). Após realizar análise de alcalinidade, o pH da amostra de 4,3 foi abaixado até 3,3 com ácido sulfúrico. A amostra foi fervida por 3 min para remover ácido carbônico como CO_2 (interferente) e então titulada, com solução padronizada de hidróxido de sódio, de pH 4,0 até 7,0. O volume gasto na titulação foi anotado e o cálculo realizado da seguinte forma:

$$\text{mg/L HAc} = \frac{V \cdot N \cdot 60.000}{V_a} \quad (4)$$

Sendo,

HAc = ácido acético

V = volume gasto de NaOH de pH 4,0 a 7,0

N = normalidade do NaOH

V_a = volume da amostra

4.10.5 Potencial Redox

A medida do potencial redox foi realizada com o aparelho Digimed modelo DM-21 utilizando-se o eletrodo combinado de platina Pt4805 da Mettler-Toledo. O eletrodo foi introduzido no orifício da tampa do frasco contendo a cultura enriquecida, aguardando-se a estabilização dos valores registrados, para posterior anotação do potencial redox do meio reacional.

4.10.6 Métodos moleculares

Espumas imobilizadas com biomassa foram coletadas durante a realização dos perfis, para cada condição de alimentação. As amostras eram coletadas com pinças estéreis, transferidas para tubos apropriados e armazenadas em freezer até o momento da sua utilização.

4.10.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada através do método direto utilizando “*glass beads*”, seguindo o procedimento descrito por Griffiths et al. (2000), como descrito a seguir:

- As amostras (cerca de 10 espumas) foram transferidas para tubos Falcon, maceradas com o auxílio de bastão de vidro, em 5mL de PBS, e submetidas a centrifugação a 10°C por 5 min a 6000rpm.

- O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 0,5g de *glass beads*, 1ml PBS 1X, 1ml de clorofórmio e 1ml de fenol equilibrado (pH= 8,0).
- Os tubos foram colocados em banho de gelo para inibir ação das enzimas e levados ao vortex por 60s.
- As amostras foram submetidas a centrifugação a 10°C por 5 min a 6000rpm.
- Após centrifugação 3 fases foram observadas:

Fase 1 – PBS

Fase 2 – Clorofórmio

Fase 3 – Fenol

- A primeira fase foi retirada e transferida para tubo apropriado onde se adicionou aproximadamente 1mL de fenol. O tubo foi submetido a agitação em vortex, somente para homogeneização e centrifugado a 10°C por 10 min, e 14000rpm.
- O sobrenadante foi transferido para novo tubo apropriado, e adicionou-se aproximadamente 1mL de clorofórmio. O tubo foi submetido a agitação em vortex somente para homogeneização e centrifugado a 10°C por 10 min, e 14000rpm. Este último procedimento foi realizado por mais duas vezes.
- O sobrenadante resultante foi armazenado em freezer (-20°C) até o momento de sua utilização.
- Todo material utilizado durante a extração foi previamente esterilizado.

O produto da extração de DNA foi avaliado em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo (0,5mg/L) por 5 minutos. O excesso do brometo de etídeo foi retirado através de lavagem do gel em água ultrapurificada, por 5 minutos. Os géis foram observados no fotodocumentador Eagle Eye TMIII (Stratagene), com luz ultravioleta, acoplado a microcomputador e Software Eagle Sight. Como marcador foi utilizado λ Hind III fragment.

4.10.6.2 Amplificação de DNA Ribossomal 16S (PCR)

O DNA extraído foi amplificado através da reação de polimerização em cadeia (PCR). Utilizou-se o *primer forward* 968F (5'- AACGCGAAGAACCTTAC -3') com *GC clamp* (5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG -3') e o *reverse* 1392 R (5'- ACG GGC GGT GTG TAC -3') para o Domínio

Bacteria (Nielsen *et al.*, 1999), na avaliação da estrutura da comunidade microbiana por DGGE.

Duas culturas puras, *Thauera chlrobenzóica* (ATCC) e *Azoarcus tolulyticus* (ATCC) foram utilizadas como controle positivo do Domínio *Bacteria*.

As amplificações foram realizadas em termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). A qualidade do produto obtido no PCR foi confirmada em gel de agarose 1%, sendo que as etapas para observação do gel foram as mesmas utilizadas para verificação do produto da extração de DNA. Como marcador foi utilizado ϕ K 174 HAE III. As condições de amplificação estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 – Condições de amplificação do PCR

Etapas	Temperatura (°C)	Duração	Ciclos
Pré-desnaturação	94	5 min	1
Desnaturação	94	45 seg	35
Anelamento	38	45 seg	35
Extensão	72	1 min	1
Extensão final	72	5 min	1

4.10.6.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

A separação dos fragmentos de DNAr 16S, amplificados por PCR, foi utilizado o sistema DGGE-*D Code™ - Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia), com gradiente de desnaturação do gel de 40% a 60%.

O protocolo descrito por Sakamoto (2001) foi utilizado e encontra-se apresentado a seguir:

1. Foram preparadas as soluções do gel nas concentrações de 0%, 40% e 60%, de acordo com a Tabela 14, através da dissolução da uréia nos reagentes líquidos e completando o volume até 100mL com água ultrapurificada.

Tabela 14. Composição da solução do gel gradiente desnaturante.

Reagentes	Concentração do gel		
	0%	40%	60%
40% de gel de acrilamida (mL)	20	20	20
Solução de TAE 50 X (mL)	2	2	2
Formamida (mL)	-	16	24
Uréia (g)	-	16,8	25,2

2. As placas de vidro foram cuidadosamente limpas e montadas em suporte apropriado;
3. Os três géis a serem introduzidos nas placas de vidro foram preparados, utilizando-se as soluções dos géis (Tabela 14), do seguinte modo:

- em tubos de centrífuga de 15mL, adicionou-se 14mL da solução de 40%, 100µL de 10% APS e 10µL de temed.
- em tubos de centrífuga de 15mL, adicionou-se 14mL da solução de 60%; 100µL de 10% APS; e 10µL de temed.
- em tubos de centrífuga de 15mL, adicionou-se 3mL da solução de 0%; 20µL de 10% APS; e 2µL de temed.

Obs: Os tubos de centrífuga contendo as soluções foram mantidos em gelo, durante a preparação dos géis. O temed foi adicionado por último, pois este reagente provocava a solidificação do gel. Por isso, depois de sua adição o gel foi usado imediatamente.

4. Cada gel (40% e 60%) foi transferido para uma das placas de vidro com auxílio de duas seringas presas ao aparelho injetor;
5. Após 10 minutos, o pente de formação dos poços foi introduzido nas placas. Em seguida, adicionou-se a solução do gel 0% ;
6. Aguardou-se 1 hora para os géis solidificarem;
7. A cuba de eletroforese foi preparada através da adição de 140mL de TAE 50 X, completando o volume de 7 litros, com água ultrapurificada, o que resultou em solução TAE 1X;
8. Colocou-se a solução para aquecer a temperatura de 65°C, sendo que a temperatura de “corrida” foi de 60 °C;

9. Quando a temperatura da cuba eletroforética atingiu 65°C, foram colocados no seu interior as placas com os géis;
10. O “pente” foi retirado e os poços formados foram lavados com a solução tampão (TAE 1X), utilizando-se micropipeta;
11. Prepararam-se as amostras, misturando-se 20µL de amostra com 5µL de corante (6X loading dye);
12. Transferiu-se a mistura (amostra+corante) para os poços do gel;
13. A bomba de agitação foi ligada e eletrodos conectados à voltagem de 130V;
14. O tempo de “corrida” foi de 6h;
15. Os géis foram cuidadosamente retirados das placas e transferidos para uma cuba para que fossem corados em solução de brometo de etídeo (0,5 mg/L), por 15 minutos.
16. O excesso de brometo de etídeo foi retirado através da lavagem do gel em água ultrapurificada, por 10 minutos.
17. O gel foi transferido para fotodocumentador e a leitura realizada em luz violeta (Eagle Eye TMIII - Stratagene), acoplado a microcomputador e Software Eagle Sight.

4.10.6.4 Clonagem e Sequenciamento

As amostras obtidas do biofilme e do crescimento em suspensão (inóculo) foram amplificadas por PCR, utilizando “primers” 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 907r (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'), seguindo metodologia descrita por So e Young (1999). e os produtos obtidos foram misturados e clonados no plasmídeo pCR 2.1 TOPO-TA easy vector system (Invitrogen), e transformado em *E. Coli* DHα5. O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fornecedor. Os clones foram seqüenciados em seqüenciador de DNA ABI 377 (Perkin Elmer) usando os primers M13 (*forward* e *reverse*, separadamente). As seqüências de nucleotídeos resultantes foram checadas usando DNASTAR (Lasergene Sequence Analysis Software), para correção dos nucleotídeos. Em seguida, as seqüências foram comparadas *online* com base eletrônica de dados NCBI BLAST.

4.10.6.4.1 Sequenciamento das bandas

Amostras obtidas do biofilme referente ao reator RAHLF1 (final do período de alimentação com benzeno 26,5 mg/L e BTEX 26,5 mg/L) foram amplificadas por PCR utilizando-se *primers* descrito por Muyzer *et al.* (1993) 341f (5'- CCT ACG GGA GGA GGC AGC AG - 3') com GC clamp (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GC-3') e 534r (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3'). Os produtos de PCR foram utilizados para avaliar a diversidade da comunidade microbiana presente nas amostras, utilizando-se a metodologia do DGGE. As bandas mais expressivas foram recortadas do gel, eluídas em água destilada, re-amplificadas com *primers* descrito anteriormente (Muyzer *et al.*, 1993), sem GC clamp, clonadas e submetidas ao sequenciamento, conforme descrito anteriormente. Como controle positivo foram utilizados três gêneros de Bactérias (*Pseudomonas* sp.; *E. coli* and *Desulfococcus* sp). Como controle negativo utilizou-se *Methanosarcina* sp.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha do Inóculo

Em geral, inóculos utilizados nos estudos relativos ao isolamento de microrganismos responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos aromáticos, como os BTEX, são obtidos de locais já contaminados por estes compostos, uma vez que nestas áreas, a possibilidade de se isolar microrganismos adaptados a estes hidrocarbonetos é maior. No entanto, os microrganismos são altamente versáteis e estão amplamente distribuídos no ambiente. Assim, a investigação de inóculos alternativos deve ser considerada para que o estudo sobre a diversidade e versatilidade metabólica dos microrganismos capazes de realizar a remoção de BTEX, não se restrinja à aquisição de inóculo obtido de área contaminada por tais compostos. No presente estudo, utilizou-se como inóculo o lodo granular originado em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) empregado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves. Este inóculo já foi utilizado com sucesso nas diversas pesquisas desenvolvidas na área de Biotecnologia Ambiental, do Laboratório de Processos Anaeróbios, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, onde se comprovou a existência de ampla diversidade microbiana, estabelecida nos consórcios fisiológicos, fundamental para que a matéria orgânica fosse removida eficientemente (Nardi, 2002; Ribeiro, 2005; Cattony, 2005).

Fernandes (2005) estudando a influência de diferentes inóculos no processo de degradação anaeróbia de BTX, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo, constatou que a origem do inóculo foi fundamental na degradação anaeróbia destes compostos, uma vez que, os inóculos avaliados apresentaram diferentes períodos de adaptação e porcentagens de degradação. Entre os inóculos, o que apresentou maior eficiência de remoção de BTX, ou seja, de 90%, foi aquele contendo biomassa proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, quando comparado com eficiências de 57% e 83%, que foram obtidas para biomassa

proveniente de RAHLF anteriormente submetido à alimentação com água contendo os hidrocarbonetos extraídos, e biomassa proveniente de reator UASB da estação de tratamento de esgoto sanitário da USP - São Carlos, respectivamente.

5.2 Escolha dos meios de cultivos

Os microrganismos são altamente afetados pelas condições físicas e químicas do ambiente onde se encontram. Muitos fatores ambientais podem afetar significativamente a habilidades dos microrganismos em realizar reações metabólicas e crescer. Assim, para que o crescimento celular seja satisfatório, fatores essenciais como presença de macronutrientes e micronutrientes, fatores de crescimento (vitaminas), assim como, controle do pH, temperatura, e oxigênio devem ser observados nos estudos com microrganismos.

Visando obter condição de crescimento adequada para organismos desnitrificantes, no presente trabalho, foram estudados dois meios de cultura quimicamente definidos: (1) meio descrito por Zinder et al. (1984) e (2) meio proposto por Dolfing et al. (1990). As composições destes meios estão representadas na Tabelas 3 a 7 na seção Material e Métodos.

O meio Zinder vem sendo utilizado com sucesso no cultivo de microrganismos anaeróbios. Este meio de cultivo destaca-se por ser um meio equilibrado, apresentando fosfato, carbono e nitrogênio que são nutrientes essenciais para o crescimento celular. Entre os fatores presentes neste meio, que favorecem o crescimento de diversos grupos de microrganismos, encontram-se as vitaminas e a solução traço de metais.

A outra condição nutricional (meio Dolfing) foi escolhida para desenvolver este trabalho, por ter sido utilizada em estudo de cultivo e isolamento de uma linhagem de bactéria desnitrificante, capaz de degradar tolueno (Dolfing et al., 1990). Este meio apresenta composição semelhante ao meio de cultivo Zinder, diferenciando-se deste último, apenas, por não apresentar solução de vitaminas.

Comparando-se as composições dos dois meios testados, nota-se que ambos apresentam os compostos essenciais para cultivo de microrganismos. Embora soluções traços de metais diferenciadas tenham sido utilizadas nos meios de cultura, estas se apresentaram também semelhantes, em termos de composição.

Sabe-se que vitaminas são, muitas vezes, requeridas para o crescimento dos microrganismos mais fastidiosos. No entanto, o acréscimo da solução de vitaminas nos ensaios com meio Zinder não foi determinante para favorecer ou selecionar os microrganismos presentes, uma vez que morfologias celulares muito semelhantes puderam ser observadas tanto no meio Zinder, como no meio Dolfig.

Para favorecer o crescimento dos microrganismos desnitrificantes, fonte de energia (doador de elétrons), que não seja rapidamente fermentável, deve ser adicionada ao meio, de forma que organismos fermentadores não sejam selecionados. Como fontes orgânicas adequadas para a desnitrificação incluem-se: etanol, acetato, succinato e benzoato (Madigan et al., 1997). No presente estudo, etanol e acetato foram utilizados como fontes orgânicas nos enriquecimentos dos meios de cultivos.

Os resultados dos enriquecimentos realizados em reatores em batelada demonstraram que, de forma semelhante, os dois meios de cultura favoreceram o crescimento celular. Os exames microscópicos das amostras dos reatores enriquecidos revelaram ampla diversidade morfológica do lodo, sendo que bacilos, cocobacilos e células semelhantes a *Methanosaeta* sp., foram as morfologias predominantes nos dois meios de cultura avaliados (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Microscopia de contraste de fase das morfologias predominantes observadas em amostras dos reatores alimentados com meio Zinder: (a) bacilos, (b) cocobacilos, (c) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. 1500X

Figura 8 - Microscopia de contraste de fase das morfologias predominantes observadas em amostras dos reatores alimentados com meio Dolfig: (a) bacilos, (b) cocobacilos, (c) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. 1500X

O consumo do nitrato (N-NO_3^-) foi avaliado em ensaios com triplicatas de reatores em batelada. Todavia, os primeiros resultados demonstraram que o nitrato foi quase totalmente consumido, em ambas as condições nutricionais avaliadas, em período superior a 100 horas (Figura 9). No entanto, medidas do potencial de oxi-redução não haviam sido realizadas nesses ensaios, o que impossibilitou o controle das condições anóxicas requeridas para que a desnitrificação se estabelecesse. Os valores das concentrações de nitrato medidas neste ensaio estão apresentados no Apêndice B.

Sabe-se que, para ocorrer a desnitrificação, se fazem necessárias condições anóxicas, nas quais o potencial de oxi-redução do meio de cultivo esteja em torno de +100mV a -100mV (Zhender, 1988).

Segundo Zehnder (1988), organismos desnitrificantes são basicamente aeróbios com capacidade alternativa de reduzir óxidos de nitrogênio quando o oxigênio se torna limitante. Além disso, o crescimento destes microrganismos é mais favorecido quando o meio de cultivo é inicialmente aeróbio. Desta forma, os microrganismos aeróbios presentes no meio irão consumir o oxigênio presente e, gradualmente, permitir que a cultura altere seu metabolismo para a desnitrificação. Ainda, se um inóculo aeróbio for transferido para meio anaeróbio estrito, o crescimento poderá ser lento ou até impedido de ocorrer devido à inabilidade do inóculo em gerar energia para sintetizar as enzimas

necessárias para a desnitrificação. Isto pode explicar o elevado tempo observado para o consumo do nitrato nos ensaios de enriquecimentos do presente trabalho. A medida do potencial redox foi de -363,9 mV para o meio Zinder e -412,1 mV para o meio Dolfig; ou seja, potenciais favoráveis ao metabolismo anaeróbio estrito. A condição anaeróbia explica, também, a presença de metano no *headspace* dos reatores e a observação freqüente de morfologias sugestivas de arqueias metanogênicas.

Figura 9 – Variação temporal da concentração média de nitrato (N-NO_3^-) nos reatores em batelada alimentados com meio Zinder e Dolfig.

Desse modo, as condições de cultivos propostas por Zinder e Dolfig foram modificadas, com a finalidade de favorecer o crescimento dos organismos desnitrificantes e, conseqüentemente, utilização de nitrato em menor tempo. Para tanto, foi retirada a solução redutora de sulfeto de sódio proposta pelos autores. A medida do potencial de oxi-redução do meio, nestas novas condições, e sem que o lodo tivesse sido adicionado, demonstrou valores positivos, ou seja, favorável aos microrganismos facultativos (Tabela 15). Imediatamente após a primeira leitura, o lodo foi adicionado ao meio e o valor do potencial de oxi-redução foi se modificando de positivo para negativo com o passar do tempo. Tal procedimento foi favorável e novos ensaios foram, então, realizados na ausência da solução redutora, mantendo-se a troca da atmosfera gasosa, específica para cada condição nutricional (Zinder e Dolfig), por cerca de 5 minutos.

Tabela 15 – Valores dos potenciais redox dos reatores em batelada alimentados com meios Zinder e Dolfing, após modificação das condições de alimentação.

Meio de cultivo	Tempo (minutos)	Potencial redox (mV)
Meio Zinder	0	+296,6*
	12	0,0
	24	-42,1
	30	-60,0
Meio Dolfing	0	+234,2*
	5	+116,4
	15	0,0
	27	-19,1
	30	-52,5

*potencial redox medido antes da adição do lodo. Os outros valores foram obtidos após a adição do lodo

Uma vez que as condições anóxicas foram acertadas para favorecer o crescimento de microrganismos desnitrificantes, novos ensaios de avaliação do consumo de nitrato (N-NO_3^-) foram realizados. Os resultados obtidos estão representados na Figura 10 e Apêndice B.

Os ensaios de desnitrificação demonstraram que tanto no meio Zinder, quanto no meio Dolfing, o nitrato foi eficientemente consumido. Utilizando-se as médias dos ensaios em triplicatas, de cada condição nutricional estudada, a eficiência na utilização do nitrato foi de 98,9% em meio Zinder (em 14 horas) e de 99,8% em meio Dolfing (em 12 horas), para concentração média inicial de nitrato de 146,8 mg/L. Estes resultados demonstraram que as duas condições testadas foram favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos capazes de realizar a desnitrificação.

Figura 10 – Variação temporal de nitrato (N-NO_3^-) nos reatores em batelada alimentados com os meios Zinder e Dolfing, modificados

Durante a fase desnitrificante, observou-se, em ambos os meios de cultivo, o predomínio de bacilos, bacilos em cadeia e cocos (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Microscopia de contraste de fase das amostras obtidas ao final da batelada do reator alimentado com meio Zinder modificado: (a) bacilos, (b) bacilos em cadeia e cocos. 1500X

Figura 12 - Microscopia de contraste de fase das amostras obtidas ao final da batelada do reator alimentado com meio Dolfing modificado: (a) bacilos e cocos, (b) bacilos em cadeia, cocobacilos, cocos, bacilos curvos. 1500X

Com o esgotamento do nitrato, condições anaeróbias se estabelecem favorecendo o metabolismo metanogênico. Nestas condições, a metanogênese pode ocorrer a partir do hidrogênio que reduz o dióxido de carbono a metano (metanogênese hidrogenotrófica), ou ainda, pela conversão de acetato a metano (metanogênese acetotrófica) (Madigan et al., 1997). Nos ensaios realizados com os dois meios de cultivo modificados, a produção de metano ocorreu somente após a estabilização da redução do nitrato, atingindo, em média, 24%, após 190 horas de incubação. Arquéias metanogênicas semelhantes a *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. (organismos acetotróficos), bem como bacilos fluorescentes (organismos hidrogenotróficos) foram observados com frequência na fase metanogênica dos reatores alimentados com meio

Dolfing e Zinder (Figura 13). Estes microrganismos podem ter se beneficiado da presença do acetato presente no meio. A leitura do potencial de oxi-redução dos reatores, após 190 horas de operação, registrou valores próximos de -344mV, confirmando o estabelecimento do potencial favorável ao crescimento das metanogênicas.

Figura 13- Microscopia de contraste de fase e fluorescência de amostras dos reatores em batelada alimentados com meio Zinder e meio Dolfing: (a) células semelhantes a *Methanosaeta sp.* (b) células semelhantes a *Methanosarcina sp.* e (c) bacilos fluorescentes. 1500X

Embora as duas condições nutricionais testadas tenham sido satisfatórias para o crescimento de bactérias desnitrificantes, o meio Dolfing foi escolhido para dar continuidade aos ensaios de isolamento das culturas por apresentar composição mais simples, não necessitando do acréscimo de vitaminas, e favorecer ligeiramente o consumo de nitrato em relação ao meio Zinder.

5.3 Purificação do inóculo

Uma vez que a melhor condição nutricional para o crescimento dos microrganismos desnitrificantes foi determinada, realizou-se a purificação desta cultura.

Na fase de purificação do inóculo, foi observada ampla diversidade morfológica no lodo. A purificação foi realizada em presença de cada um dos hidrocarbonetos,

separadamente. Os melhores resultados destas purificações foram aqueles obtidos com benzeno (10mg/L) e etilbenzeno (10mg/L), ou seja, em presença destes compostos, houve maior seletividade em relação à diversidade morfológica e, portanto, melhor purificação do inóculo. (Figura 14).

Figura 14- Microscopia de contraste de fase das morfologias observadas na fase de purificação do inóculo em presença de benzeno (a, b – diluição 10^{-5}) e etilbenzeno (c, d – diluição 10^{-5}). 1500X

Com o objetivo de se obter resultado ainda mais satisfatório, as culturas purificadas em presença de benzeno e etilbenzeno foram submetidas à purificação em placa de Petri. A microscopia de cada uma das colônias isoladas em placa demonstrou que, embora houvesse predomínio de células com morfologia de cocobacilos, outras morfologias também podiam ser observadas. Na tentativa de se obter culturas ainda mais selecionada, especialmente em presença de benzeno, as colônias obtidas foram, por mais 2 vezes, transferidas para meio líquido fresco, incubadas e, novamente, plaqueadas. Após o terceiro repique, foram observados, predominantemente, cocos (diplococos) e cocobacilos. Todavia, mais raramente, outras morfologias, tais como

bacilos e filamentos foram observadas (Figura 15). Este resultado indicou que as culturas não estavam totalmente puras, podendo se tratar de uma associação positiva, conhecida como co-cultura, onde os microrganismos envolvidos estariam se beneficiando do subproduto da degradação do outro para crescer.

(a)

(b)

Figura 15 – Microscopia de contraste de fase. Morfologias predominantes nos isolamentos em placas de Petri em presença de (a) benzeno (10mg/L) e (b) etilbenzeno (10mg/L). 1500X

No crescimento em placa de Petri, as colônias isoladas apresentaram as seguintes características: superfície lisa, consistência cremosa, forma convexa e cor branco-leitosa (Figura 16).

(a)

(b)

Figura 16 - Colônias obtidas do isolamento nos meios contendo (a) benzeno e (b) etilbenzeno.

A coloração de Gram demonstrou que as células isoladas, nas duas condições (benzeno e etilbenzeno) eram Gram-negativas (Figura 17).

Figura 17- Células Gram negativas, isoladas em (a) benzeno e (b) etilbenzeno. 1500X

No interior destas células, grânulos escuros, provavelmente substância de reserva, foram observados (Figura 18).

Figura 18 – Microscopia de contraste de fase dos grânulos intracelulares observados nas células isoladas em etilbenzeno. 1500X

5.4 - Confirmação do metabolismo desnitrificante

Outro aspecto relevante aos compostos nitrogenados está relacionado com conhecimento da rota metabólica atuante no sistema biológico. Sabe-se que a redução do nitrato em ambientes anóxicos pode se dar por dois processos: (1) desnitrificação, ou (2) redução desassimilativa do nitrato a amônia (RDNA) (Tiedje, 1988). Na desnitrificação, o processo da redução do nitrato a nitrogênio gasoso ocorre de acordo com as seguintes etapas:

Neste processo, 5 elétrons são gastos para que a desnitrificação seja completa. Os microrganismos oxidam um substrato e os equivalentes gerados são transferidos para o

nitrato, que age comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória. Em consequência, para que a desnitrificação se estabeleça, é necessário a presença de um substrato oxidável e concentração adequada de nitrato.

Na redução desassimilativa de nitrato a amônia são requeridos 8 elétrons e o processo ocorre de acordo com as seguintes etapas:

De acordo com Tiedje (1988), o desenvolvimento da população de microrganismos responsáveis pela RDNA ocorre como resultado da competição entre o metabolismo fermentativo e respiratório. O principal fator que afeta a competição entre bactérias desnitrificantes e produtoras de amônia é a proporção entre doador e aceceptor de elétrons disponíveis. Em termos gerais, a RDNA ocorre quando há elevada relação C/N, já que, em condições de limitação de aceceptor de elétrons, é a via que permite a eliminação de maior número de elétrons. Por outro lado, quando há limitação de substrato, a desnitrificação é favorecida, uma vez que esta via permitirá a obtenção de maior quantidade de energia por mol de substrato consumido.

Diversos estudos abordam a discussão a respeito de relações C/N procurando estabelecer valor ótimo para a desnitrificação. Todavia, enquanto relações na faixa entre 0,9 a 1,7, foram relatadas como sendo ótimas para promover de forma adequada o processo de desnitrificação (Callado, 2001; Santos, 2004), valores mais altos foram, também, sugeridos indicando desnitrificação favorável. De acordo com o estudo de Houbbron et al. (1999), a relação C/N, para a desnitrificação, deve ser de aproximadamente 3. No entanto, valores entre 6 e 7 foram utilizados com sucesso em outros estudos (Shieh e Mulcahy, 1986; Pochana e Keller, 1999). Relações C/N iguais a 5,5; 4,5; 4,0 e 2,6, foram recomendadas no estudo de Chiu e Chung (2003), para concentrações de N-NO₃⁻ de 25, 50, 100 e 200 mg/L, respectivamente, utilizando-se acetato de sódio como doador de elétrons. Entretanto, o estudo menciona que sistemas biológicos semelhantes podem ter diferentes relações C/N. Desta forma, os autores sugerem que a relação C/N ótima deve ser determinada experimentalmente para sistemas desnitrificantes, utilizados em tratamentos específicos de águas residuárias.

No enriquecimento realizado no estudo de Dolfig et al. (1990) foi utilizado tolueno (18,4mg/L), como única fonte de carbono, enquanto que a massa total de nitrogênio foi de 170mg/L, correspondendo a relação C/N de 5,2. Desse modo, o presente trabalho adotou a relação C/N de 5,1, baseando-se no estudo destes autores, e procurando atender a teoria proposta por Tiedje (1988), o qual sugere a ocorrência da desnitrificação com

limitação do substrato em relação ao aceptor de elétrons. Para tanto, foi adicionado ao meio, aproximadamente, 0,72 g de carbono, correspondente a 20mM de acetato de sódio e 10mM de etanol, e 0,14 g de nitrogênio equivalente a 10mM de nitrato de sódio.

A metodologia do bloqueio por acetileno foi realizada para confirmar a ocorrência da desnitrificação pelas células do presente estudo. Esta metodologia baseia-se no princípio de que o acetileno, sendo estruturalmente semelhante ao óxido nitroso, bloqueia a redução do óxido nitroso que, por sua vez, acumula-se estequiometricamente a partir de nitrato ou nitrito (Zehnder, 1988). Como a desnitrificação é caracterizada pelas transformações de NO_3^- ou NO_2^- a N_2O e este a N_2 , o acúmulo de óxido nitroso é um critério que identifica a desnitrificação. Os resultados obtidos nos ensaios onde acetileno foi adicionado demonstraram que houve acúmulo de óxido nitroso no *headspace* dos reatores avaliados (Figura 19) (Apêndice C).

De acordo com Zehnder (1988), um dos problemas da metodologia do bloqueio pelo acetileno é que a difusão do gás pode ser restrita, o que pode limitar a dispersão do acetileno e a recuperação de óxido nitroso, ou ainda, o acetileno pode não ser capaz de bloquear completamente a redução do óxido nitroso. Estas observações podem explicar a formação não estequiométrica do óxido nitroso.

Figura 19 – Acúmulo de óxido nitroso observado no reator com acetileno.

Além disso, a quantificação de N-NH_4^+ foi analisada com a finalidade de comprovar que a redução desassimilativa de nitrato a amônia não estava sendo realizada. Neste ensaio, foram observados 57,8 mg/L de N-NH_4^+ , no início do experimento, e 20,3 mg/L de N-NH_4^+ ao final da batelada (Apêndice D). Com estes

resultados, constatou-se que a desnitrificação era o metabolismo realizado pelas células da cultura purificada.

5.5 Caracterização nutricional das culturas

As culturas isoladas foram, também, caracterizadas em relação à versatilidade metabólica das células em utilizar diferentes substratos, sob diferentes condições (desnitrificante, fermentativa e sulfetogênica).

Embora vários trabalhos apresentem caracterização nutricional com 1mM de substrato orgânico (Schocher et al., 1991; Rabus e Widdel, 1995; Zhou et al., 1995), esta concentração demonstrou ser insuficiente para promover o crescimento adequado das células deste trabalho. Por este motivo novo ensaio foi realizado utilizando-se 10mM de cada substrato.

Crescimento celular não foi observado nos ensaios realizados sob condições sulfetogênicas, para todos os substratos avaliados. Exames microscópicos demonstraram a presença de “debris”, sugerindo possível toxicidade do sulfato para a cultura, e confirmando a inabilidade das mesmas em realizar o metabolismo sulfetogênico.

De forma geral, as duas culturas apresentaram resultados semelhantes em relação à versatilidade de utilização dos substratos. No entanto, as melhores respostas de crescimento foram obtidas para a cultura isolada em benzeno. As microscopias realizadas para os ensaios referentes à cultura isolada em etilbenzeno demonstram células morfológicamente menores quando comparadas àquelas observadas nos ensaios com a cultura isolada em benzeno. É possível que o inóculo utilizado nos ensaios tenha sofrido algum prejuízo, comprometendo a qualidade da biomassa e, conseqüentemente, melhores resultados nos ensaios com esta cultura.

Dos substratos avaliados, houve crescimento em presença de lactato, glicose, etanol, propionato, butirato, benzoato, piruvato, acetato e dos hidrocarbonetos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e *p*-xileno) solubilizados em etanol. De forma geral, as melhores respostas de crescimento foram obtidas em lactato, glicose, etanol, propionato e em presença dos hidrocarbonetos. Em acetato, a cultura isolada em benzeno apresentou crescimento bem mais expressivo, quando comparada com a cultura isolada em etilbenzeno, no entanto, este resultado pode estar relacionado à qualidade do inóculo, conforme comentado anteriormente.

Os únicos substratos que não foram utilizados pelas culturas, em nenhuma das condições avaliadas, foram fenol e metanol.

As melhores respostas de crescimentos foram obtidas sob condições desnitrificantes (Figura 20). Em condições fermentativas, a absorbância apresentou valores baixos (Figura 21). Os valores das absorbâncias medidas neste ensaio estão apresentados no Apêndice E.

Figura 20 - Crescimento em diferentes substratos para as culturas isoladas em presença de benzeno e etilbenzeno, sob condições desnitrificantes.

Figura 21 - Crescimento em diferentes substratos para as culturas isoladas em presença de benzeno e etilbenzeno, sob condições fermentativas.

A microscopia referente aos ensaios realizados sob condições fermentativas revelou a presença de células com morfologia diferenciada (bacilos finos) daquelas que predominaram nos ensaios realizados sob condições desnitrificantes (cocobacilos) (Figura 22). A baixa representatividade de bacilos finos, sob condições desnitrificantes, pode estar relacionada à inibição dos mesmos para esta condição.

Figura 22 – Microscopia de contraste de fase das morfologias observadas durante o monitoramento do ensaio de caracterização nutricional sob condições fermentativas. As setas indicam bacilos observados no crescimento com: (a) acetato, (b) glicose, (c) propionato, (d) butirato, (e) etanol e (f) lactato.

Por outro lado, bacilos finos foram raramente observados nos ensaios fermentativos onde os hidrocarbonetos estavam solubilizados em etanol (Figura 23). Esta observação indica que o crescimento destes bacilos pode ter sido inibido pela presença dos hidrocarbonetos. Nesta condição, morfologias características da condição desnitrificantes voltaram a predominar. Considerando-se que células desnitrificantes são

facultativas, ou seja, também realizam o metabolismo aeróbio, é possível que a presença de traços de oxigênio possa ter favorecido o crescimento destas células, nesta condição.

Figura 23 - Bacilos com extremidades arredondadas, em presença de benzeno (a), tolueno (b), etilbenzeno e (d) *p*-xileno, sob condições fermentativas.

Bacilos, formando arranjo celular característico, foram observados em presença de lactato, sob condições fermentativas (Figura 24).

Figura 24 - Microscopia de contraste de fase da cultura em meio contendo lactato (10mM), em condição fermentativa.

Os resultados dos exames microscópicos obtidos na caracterização nutricional da cultura confirmam, mais uma vez, que a cultura purificada constitui-se de diferentes morfologias que predominam conforme as condições do meio.

5.6 Determinação do tempo de geração das culturas

O tempo de geração em pesquisas microbiológicas é utilizado como indicador do estado fisiológico de uma população de células e é freqüentemente usado para testar os efeitos positivos ou negativos de determinados tratamentos em culturas bacterianas. Assim, o conhecimento de como determinada população microbiana pode rapidamente se expandir é muito útil na determinação de métodos de controle desta população. Diversos trabalhos realizados com microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos aromáticos avaliaram o tempo de geração das culturas puras envolvidas na degradação destes compostos. Nakagawa et al. (2002) relatou que em geral bactéria redutora de sulfato, capaz de degradar hidrocarbonetos aromáticos cresce vagarosamente, por exemplo, o tempo de geração para a linhagem oXyS1 em *o*-xileno foi 75 horas, 55 horas para a linhagem mXyS1 em *m*-xileno, 36 horas para a linhagem PROTL1, e 27 horas para a linhagem Tol2 em tolueno, respectivamente. Tempo de geração menor foi observado nos trabalhos realizados com culturas desnitrificantes capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos. No trabalho de Schocher et al. (1991), a avaliação do crescimento de duas linhagens (T e K172) associadas à degradação de tolueno (92,0 mg/L), sob condições desnitrificantes, demonstrou que os tempos de gerações variaram entre 7 e 20 horas. Os tempos de gerações de quatro linhagens desnitrificantes, EbN1, PbN1, ToN1 e mXyN1, isoladas em etilbenzeno, propilbenzeno, tolueno e *m*-xileno, respectivamente, foram avaliados, no estudo de Rabus e Widdel (1995). Esse estudo demonstrou que o menor tempo de geração da linhagem EbN1 durante o crescimento em etilbenzeno (31,0 mg/L) foi de 11 horas. Estudos com culturas desta mesma linhagem, com 5% (v/v) de inóculo, apresentaram crescimento completo em etilbenzeno, em 2 dias. A linhagem ToN1, nas mesmas condições, cresceu em tolueno (27,6 mg/L) em 1 dia, enquanto que a linhagem mXyN1 cresceu em *m*-xileno (31,0 mg/L) tão rápido quando a linhagem EbN1. A linhagem PbN1 requereu de 3-4 dias para crescer em propilbenzeno. No trabalho de Ball et al. (1996) a linhagem denominada

EB1 cresceu, exponencialmente, em etilbenzeno (10,6mg/L), com tempo de geração de 14 horas.

No presente trabalho, o tempo de geração foi calculado para as culturas obtidas em benzeno (11,5mg/L) e etilbenzeno (12,7mg/L). Os valores médios, das duplicatas de reatores avaliados, demonstraram que os microrganismos cresceram exponencialmente entre 12 e 40 horas de ensaio, a 30°C. O crescimento exponencial foi associado ao consumo de nitrato, indicando o metabolismo desnitrificante. (Figura 25). Os valores das absorbâncias, nitrato (N-NO_3^-) e etanol, medidos nestes ensaios, estão apresentados no Apêndice F.

Figura 25 – Variação temporal do crescimento celular (densidade óptica 600nm) e consumo de nitrato (N-NO_3^-) nos reatores alimentados com (a) etilbenzeno, nitrato e etanol e (b) benzeno, nitrato e etanol.

Velocidades de crescimento (μ) de $0,046 \text{ h}^{-1}$ e $0,05 \text{ h}^{-1}$ e tempos de geração (tg) de 15,1 horas e 13,9 horas foram obtidos para as células crescidas em benzeno e etilbenzeno, respectivamente (Figura 26).

Figura 26 - Representação gráfica da absorbância em função do tempo nos reatores alimentados com (a) benzeno, etanol e nitrato e (b) etilbenzeno, etanol e nitrato.

A avaliação da concentração de etanol no meio reacional dos dois reatores demonstrou que o consumo desta substância foi de 99,4% e 100%, nos reatores alimentados com benzeno e etilbenzeno, respectivamente. O consumo de nitrato ($N-NO_3^-$) foi de 81,6% e 83,4% nos reatores alimentados com benzeno e etilbenzeno, respectivamente, em 200 horas de ensaio, considerando a concentração inicial média de nitrato ($N-NO_3^-$) de 373,5mg/L.

A variação temporal da concentração dos hidrocarbonetos foi também avaliada neste ensaio (Tabela 16). A análise da concentração de benzeno nos reatores demonstrou valores flutuantes, com decaimento inicial, e posterior retorno para valores próximos ao medidos inicialmente. O reator controle (ausência de célula e presença de benzeno, etanol e nitrato) mostrou-se estável, com baixas flutuações na concentração de benzeno. Assim, concluiu-se que o benzeno não foi consumido pelas células do inóculo, durante o tempo de realização do ensaio. A variação da concentração de etilbenzeno, nos reatores utilizados para análise deste composto, variou de forma semelhante ao observado no reator controle (ausência de célula e presença de etilbenzeno), o que inviabilizou a conclusão a respeito da degradação do hidrocarboneto. A variação na concentração de etilbenzeno se deveu, provavelmente, à adsorção no reator, à baixa solubilidade no meio reacional, e/ou à alta volatilidade do hidrocarboneto fazendo com que o mesmo permanecesse no *headspace* do reator.

Tabela 16 – Concentrações de benzeno e etilbenzeno nos reatores em batelada.

Tempo (h)	Concentração de benzeno (mg/L)		Concentração de etilbenzeno (mg/L)	
	Reator c/ células	Reator s/ células	Reator c/ células	Reator s/ células
0	11,5	9,13	12,72	11,12
7	5,46	8,34	3,93	3,87
15	5,7	7,21	3,30	3,87
21	8,45	nd	4,65	5,67
30	11,08	nd	4,34	5,27
48	12,1	10,2	2,02	1,56

nd = não determinado

Tempo de geração menor (6,5 horas) foi obtido quando as células isoladas em benzeno foram avaliadas em reatores alimentados somente com etanol e nitrato. Estes resultados indicaram que, provavelmente, a toxicidade proporcionada pela presença do benzeno no meio reacional retardou o crescimento celular da cultura. Entretanto, esta diferença não foi observada para as células isoladas em etilbenzeno, quando foram avaliadas somente em presença de etanol e nitrato, sendo que o tempo de geração foi o mesmo daquele observado para o crescimento em presença de etilbenzeno (13,9 horas) (Figura 27). Os valores das medidas realizadas neste ensaio estão apresentados no Apêndice G.

Figura 27 - Representação gráfica da absorbância em função do tempo nos reatores controles (etanol e nitrato) com células isoladas em (a) benzeno e (b) etilbenzeno.

5.7 Avaliação do consumo de etilbenzeno

A constatação da variação temporal da concentração de benzeno e etilbenzeno, pode ter sido prejudicada uma vez que retiradas freqüentes de amostras dos reatores foram realizadas para análise de absorbância. Assim, foram realizados novos ensaios em bateladas, com o intuito de avaliar, somente, a variação temporal no consumo de etilbenzeno. Entretanto, os resultados das análises cromatográficas para o etilbenzeno, também, não foram conclusivos. As áreas referentes ao etilbenzeno, e ao padrão interno utilizado nas análises (clorobenzeno) não foram reproduzidas nas triplicatas dos reatores, o que gerou resultados bem diferentes na concentração do etilbenzeno, como demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17 – Concentrações de etilbenzeno, obtidas por cromatografia, nas triplicatas de reatores em batelada (R1, R2 e R3).

Reator	Tempo (h)	Área da clorobenzeno	Área do etilbenzeno	Fator resposta	Concentração de etilbenzeno (mg/L)
R1 A	0	21,76	112,71	5,2	4,6
R1 B		15,1	169,26	11,2	9,3
R2 A		27,29	273,5	10,0	8,3
R2 B		14,23	240,46	16,9	13,7
R3 A		21,03	281,32	13,4	10,9
R3 B		30,02	358,28	11,9	9,8
R1 A	24	13,41	106,82	8,0	6,8
R1 B		16,47	169,21	10,3	8,5
R2 A		14,36	163,41	11,4	9,4
R2 B		17,69	116,14	6,6	5,7
R3 A		18,3	97,24	5,3	4,7
R3 B		18,66	182,27	9,8	8,2
R1 A	48	82,4	411,06	5,0	4,5
R1 B		6,7	155,04	23,1	18,4
R2 A		23,57	167,3	7,1	6,1
R2 B		16,2	161,54	10,0	8,3
R3 A		19,72	137,85	7,0	6,0
R3 B		69,23	516,35	7,5	6,4

As variações nas concentrações de etilbenzeno persistiram, embora diversos testes como mudança do padrão interno, aumento do tempo de aquecimento da amostra, troca de seringa de injeção e troca de seringa para coleta de amostra tenham sido realizados, na tentativa de identificar falhas de procedimento. Uma explicação possível para estas variações foi relacionada, provavelmente, com a solubilidade desse

composto; ou seja, o etilbenzeno é praticamente insolúvel em água. Embora a solução estoque do etilbenzeno tenha sido preparada em etanol para possibilitar a homogeneidade do composto no meio mineral utilizado nos ensaios, provavelmente, esse composto pode não ter sido completamente solubilizado no meio, o que provocou as variações de concentrações observadas.

Os exames microscópicos das amostras da biomassa microbiana contida nos reatores em batelada alimentados com etilbenzeno revelaram que, após 48 horas de ensaio, as células já se apresentaram com morfologia deformada e debris celulares foram observados, demonstrando a baixa resistência das mesmas ao hidrocarboneto presente no meio.

Variações nas concentrações dos BTEX, por cromatografia, em reatores em batelada, foram também observadas no trabalho realizado por Cattony (2003), com estes hidrocarbonetos. Portanto, com as considerações apresentadas anteriormente, verificou-se a necessidade da implementação de outra configuração de reator visando avaliar a remoção do BTEX por culturas desnitrificantes. A utilização de reatores anaeróbios com biomassa imobilizada (RAHLF), para tratamento de águas residuárias que contêm compostos tóxicos, vem sendo amplamente investigada (Damianovic, 1997, Bolaños et.al., 2001; Oliveira et al., 2004), inclusive no tratamento de BTEX (Nardi, 2002; Ribeiro, 2005; Cattony, 2005). Baseado nos relatos de que elevada eficiência na remoção de tóxico vem sendo alcançada nos estudos realizados em reatores com biomassa imobilizada, a capacidade de degradação de BTEX, pelas culturas desnitrificantes isoladas neste estudo, foi avaliada nesta configuração de reator.

5.8 Imobilização das culturas desnitrificantes no RALHF

A partir da purificação celular, as culturas foram por várias vezes repicadas, em volumes maiores de meio líquido, para que se obtivesse o aumento da biomassa suficiente para a inoculação nos reatores.

Para diminuir a possível contaminação externa, as células foram imobilizadas nas espumas de poliuretano estéreis, por meio de recirculação, em circuito fechado. Após, retirada da recirculação, células pleomórficas foram observadas (Figura 28). As mudanças observadas foram relacionadas ao fato de que, durante a fase de recirculação, não houve reposição das fontes orgânicas (etanol, etilbenzeno e benzeno) e, devido às

condições adversas do meio, e a possível toxicidade promovida por benzeno e etilbenzeno, provavelmente, os microrganismos entraram em estado de latência.

Figura 28 - Pleomorfismo observado nas células dos reatores, após a retirada da recirculação da cultura em microscopia de contraste de fase(1500X).

Com restabelecimento da alimentação contínua dos reatores com substrato fresco, as células voltaram a apresentar morfologia íntegra. No entanto, o monitoramento microscópico, realizado com amostras do biofilme, demonstrou que, diferentemente do observado no crescimento em suspensão, onde cocobacilos eram predominantes, no biofilme, bacilos passaram a predominar (Figura 29). Esta população pode ter se favorecido das condições propiciadas pelo RAHLF. Este reator apresenta configuração cuja imobilização da biomassa ocorre em meio suporte, a espuma de poliuretano. Esse material apresenta como características a porosidade que permite a formação de biofilme denso com elevada atividade metabólica. Estes sistemas apresentam inúmeras vantagens em relação aos reatores operados com biomassa suspensa. Segundo Cohen (2001), um dos fatores que favorece a resistência a compostos tóxicos é o fato de que os polímeros produzidos pelo biofilme exercem uma barreira celular protetora, uma vez que este polímero reduz a concentração do tóxico no interior da célula.

Figura 29- Microscopia de contraste de fase dos bacilos observados no biofilme dos reatores alimentados com (a) benzeno e (b) etilbenzeno.

5. 9 Monitoramento dos Reatores de Leito Fixo

5.9.1 Considerações

Este item tem como objetivo esclarecer as variações referentes a DQO, observadas durante toda a fase experimental.

Após cerca de 80 dias de operação dos reatores, a concentração da solução etanólica, utilizada no substrato de alimentação, foi alterada, passando-se a utilizar concentração mais elevada de etanol. Esta alteração justificou-se, uma vez que, nas fases seguintes, o reator seria alimentado com concentrações mais elevadas dos hidrocarbonetos. Desta forma, com aumento da concentração do etanol, evitar-se-ia problemas relacionados com baixa solubilidade dos hidrocarbonetos. Devido ao aumento da concentração de etanol no meio, a concentração de nitrato foi, também, corrigida para compensar este aumento.

Outra alteração referente ao etanol deveu-se à adição extra da solução etanólica, em determinadas ocasiões. Compostos de BTEX são altamente voláteis e, embora todos os cuidados tenham sido tomados para que esta volatilização fosse minimizada, muitas vezes, o monitoramento da concentração dos hidrocarbonetos no afluente, indicava concentração inferior à desejada.

Assim, para que determinada concentração fosse alcançada no afluente, volume conhecido da solução etanólica (etanol + hidrocarboneto), além daquele inicialmente calculado, era adicionado no frasco de alimentação do reator para compensar essa perda que era freqüentemente observada. Todas estas intervenções no substrato de alimentação foram responsáveis pela tendência de aumento das concentrações afluentes, dos parâmetros de monitoramento dos reatores.

As análises realizadas para alcalinidade e ácidos voláteis por titulometria não reproduziram resultados conclusivos e foram desconsideradas nas discussões seguintes. Somente as análises de ácido voláteis realizadas por cromatografia foram consideradas para as discussões relativas aos reatores RAHLF1 e RAHLF2.

5.9.2 Operação do reator RAHLF1

O reator RAHLF1 foi operado durante 189 dias, ininterruptamente, substituindo-se somente os hidrocarbonetos no substrato de alimentação do reator. O esquema de operação deste reator está representado na Figura 2, no capítulo referente a Material e Métodos. Os valores de todas as medidas realizadas dos parâmetros de monitoramento deste reator estão apresentados no Apêndice H. Os perfis espaciais referentes aos hidrocarbonetos estão disponíveis no Apêndice I.

A Tabela 18 e Figuras 30, 31 e 32 apresentam os resultados dos parâmetros de monitoramento obtidos durante todo o período de operação do reator RAHLF1.

Tabela 18 - Valores dos parâmetros de monitoramento do RAHLF1, obtidos durante o período de operação.

Parâmetros	Afluente		Efluente		Eficiência Média de Remoção (%)
	Média	Variação	Média	Variação	
Alimentação com benzeno					
DQO _{Bruta} (mg/L)	969,9	869,0 - 1258,1	116,7	59,6 - 259,1	88,0
DQO _{Filtrada} (mg/L)	944,2	823,5 – 1213,8	84,1	31,4 – 162,5	91,1
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	398,6	348,5 – 581,0	48,3	0,85 – 121,6	87,9
PH	7,2	7,0 – 7,5	8,9	7,3 – 9,6	-
SSV (mg/L)	14,0	10,0 - 47,0	39,4	22,0 - 58,0	-
Alimentação com tolueno					
DQO _{Bruta} (mg/L)	1171,0	914,8 - 1316,5	35,5	10,3 - 48,1	97,0
DQO _{Filtrada} (mg/L)	1121,4	838,9 – 1264,1	30,0	0,0 – 72,9	97,3
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	547,6	502,2 – 622,5	52,0	0,0 – 127,0	90,5
pH	7,2	7,0 – 7,5	9,1	8,6 – 9,7	-
SSV (mg/L)	45,2	21,0 - 62,0	49,7	18,0-65,0	-
Alimentação com <i>m</i> -xileno					
DQO _{Bruta} (mg/L)	1287,4	1252,4 - 1322,3	143,7	65,6 - 300	88,8
DQO _{Filtrada} (mg/L)	1262,1	1252,4 – 1269,9	120,9	46,7 –262,1	90,4
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	482,2	439,0 – 527,8	5,1	40 – 6,2	98,9
pH	7,2	7,18 – 7,23	8,9	8,9 – 9,0	-
SSV (mg/L)	47,7	40,0 –58,0	55,0	47,0 – 68,0	-
Alimentação etilbenzeno					
DQO _{Bruta} (mg/L)	1497,1	1438,8 - 1526,2	285,4	272,3 - 305,8	80,9
DQO _{Filtrada} (mg/L)	1500,9	1409,7 – 1561,1	277,7	228,7 – 330,6	81,5
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	514,8	497,8 – 538,9	4,1	2,8 – 5,1	99,2
pH	7,4	7,4 – 7,5	8,9	8,9 – 9,0	-
SSV (mg/L)	51,0	21,0 – 70,0	60,7	27,0 – 78,0	-
Alimentação com BTEX					
DQO _{Bruta} (mg/L)	1992,3	1957,1 - 2027,5	532,5	461,6 - 603,5	73,3
DQO _{Filtrada} (mg/L)	1837,7	1782,4 – 1893,1	500,9	419,4 –582,5	72,7
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	446,5	417,5 – 475,5	4,0	3,1 – 4,9	99,1
pH	7,7	-	9,0	-	-
SSV (mg/L)	34,0	33,0 – 35,0	41,5	36,0 – 47,0	-

As primeiras análises dos parâmetros de monitoramento já mostravam a estabilidade do reator, indicando a rápida adaptação do biofilme (Figuras 30, 31 e 32).

O reator apresentou boa estabilidade durante os primeiros 80 dias (alimentação com benzeno), com elevadas eficiências de remoção da matéria orgânica (avaliada na forma de DQO), (Figura 30 e Tabela 18).

Durante a fase de alimentação com benzeno e tolueno, mesmo com o aumento da DQO afluente, devido à alteração da concentração de etanol no substrato, o reator retomou sua estabilidade, apresentando eficiência de remoção da matéria orgânica superior a 90%. No entanto, o reator mostrou uma tendência à instabilidade, durante a fase de alimentação do mesmo com *m*-xileno, etilbenzeno e BTEX (Figura 30). Nestas condições, foi observada diminuição da eficiência de remoção de DQO (Tabela 18). Esta instabilidade foi associada, principalmente, à diminuição do tempo destinado à alimentação com estes hidrocarbonetos (15 dias com cada composto), dificultando a adaptação do biofilme às novas condições, e conseqüentemente afetando o equilíbrio dinâmico do reator.

Os valores obtidos para a DQO bruta apresentaram-se muito semelhantes àqueles obtidos para a DQO filtrada, mostrando o reduzido desprendimento celular no efluente do reator (Figura 30).

Figura 30 - Variação temporal da concentração de DQO_{Bruta} (a) e DQO_{Filtrada} (b) durante operação do reator RAHLF1.

Para compensar o aumento da concentração de etanol no substrato, a concentração de nitrato foi, também, corrigida. Este aumento na concentração de nitrato (N-NO_3^-) pode ser observado após aproximadamente 80 dias de operação do reator (Figura 31 a). O aumento da concentração de nitrato (N-NO_3^-), foi acompanhado por melhores eficiências de remoção desta substância no decorrer do período de operação

do reator (Tabela 18). A maior concentração de nitrato efluente ($127,0 \text{ mg/L N-NO}_3^-$) observada (aproximadamente, 145 dias de operação) deveu-se ao excesso do aceptor final de elétrons em relação à quantidade de carbono, devido a um erro durante o preparo da solução etanólica utilizada no substrato.

A formação de nitrito (N-NO_2^-) foi verificada durante todo o período de operação, indicando a realização do metabolismo desnitrificante pelas células do biofilme (Figura 31 b).

Figura 31 - Variação temporal da concentração de nitrato N-NO_3^- (a) e nitrito N-NO_2^- (b) durante operação do reator RAHLF1.

As flutuações observadas na alcalinidade efluente foram acompanhadas pela alcalinização do pH efluente que foi, em média, de 8,9 (Figura 32 a).

Após, cerca de 80 dias de operação foi observado comportamento diferenciado em relação aos sólidos suspensos voláteis (que avalia a presença de biomassa) (Figura 32 b). Percebeu-se que após este período, a concentração afluente de SSV foi substancialmente superior ao observado no início da operação do reator. Este resultado foi relacionado com a mudança do local de coleta para esta análise. Inicialmente, esta amostragem era realizada diretamente no frasco de alimentação. No entanto, as análises referentes às concentrações afluentes dos hidrocarbonetos ficavam superestimadas, quando avaliadas a partir deste local, uma vez que, a perda destes compostos era observada no percurso entre o frasco de alimentação e a entrada do reator. Desta forma, optou-se por fazer as amostragens referentes ao afluente, desconectando-se a mangueira existente entre o frasco de alimentação e a entrada do reator. Como neste local o crescimento da biomassa era intenso, a presença de células era frequentemente

detectada nas amostragens afluentes, como observado para as análises de SSV. Em relação à instabilidade observada para o SSV efluente, observou-se que esta instabilidade ocorreu principalmente quando o reator passou a ser operado por períodos cada vez mais curtos, o que pode ter dificultado a adaptação celular às novas condições, ocasionando maior desprendimento de células.

Figura 32 - Variação temporal do pH (a) e sólidos suspensos voláteis (b), durante operação do reator RAHLF1.

A Tabela 19 apresenta as concentrações afluentes e efluentes dos hidrocarbonetos, DQO_f, nitrato (N-NO₃⁻), nitrito (N-NO₂⁻) e ácido acético, obtidas nos perfis espaciais referentes as alimentações com cada hidrocarboneto.

Tabela 19 - Concentrações afluentes e efluentes dos parâmetros avaliados durante os perfis realizados no reator RAHLF1, em diferentes condições de alimentação.

Parâmetro	Tempo de operação (dias)	Concentração (mg/L)		Eficiência média de Remoção (%)
		Afluente	Efluente	
Benzeno	24	13,8	0,9	93,5
DQO _{FILTRADA} (mg/L)		823,5	100,7	87,9
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		348,5	57,9	83,4
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,00	43,9	-
Ácido acético (mg/L)		0,00	0,6	-
Benzeno	51	15,4	0,1	99,3
DQO _{FILTRADA} (mg/L)		849,3	31,4	96,3
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		351,8	0,8	99,8
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,00	0,00	-
Ácido acético (mg/L)		0,00	0,00	-
Benzeno	27	26,5	0,4	98,5
DQO _{FILTRADA} (mg/L)		1220,2	53,6	95,6
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		554,6	30,2	94,5
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,5	13,5	-
Ácido acético (mg/L)		0,00	0,00	0,00
Tolueno	42	30,8	0,1	99,6
DQO _{FILTRADA} (mg/L)		839,9	0,00	100,0
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		526,7	127,0	75,9
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,00	5,5	-
Ácido acético (mg/L)		0,00	5,1	-
m-xileno	15	32,1	0,1	99,7
DQO _{FILTRADA} (mg/L)		1252,4	262,1	79,1
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		439,0	5,0	98,9
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,00	0,00	-
Ácido acético (mg/L)		18,4	214,4	-
Etilbenzeno	15	33,3	0,4	98,8
DQO _{FILTRADA} (mg/L)		1409,7	273,8	80,6
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		507,8	2,8	99,5
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,00	0,00	-
Ácido acético (mg/L)		0	261,9	-
BTEX	15	26,5	0,3*	98,8
DQO _{FILTRADA} (mg/L)		1893,1	582,5	69,2
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		417,5	3,1	99,3
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,35	0,00	-
Ácido acético (mg/L)		20,9	571,5	-

*concentração referente ao benzeno = 0,26 mg/L; tolueno = 0,05mg/L; etilbenzeno = 0,01 mg/L; *o*-xileno = 0,00 mg/L; *m,p*-xilenos = 0,00 mg/L.

Nos perfis espaciais, observou-se que a matéria orgânica (DQO_f) era removida, principalmente, no primeiro ponto de amostragem ($L/D = 4$) (Figura 33).

O consumo da matéria orgânica levou a formação de ácido acético em todas as condições de alimentação do reator. No entanto, a produção e o consumo de ácido acético só foram verificados durante a fase de alimentação do reator com benzeno e tolueno (Figura 33).

Figura 33 - Variação espacial da concentração da matéria orgânica (DQO) e ácido acético no reator RAHLF1 alimentado com benzeno (a, b, c) e tolueno (d).

Nas alimentações com *m*-xileno, etilbenzeno e BTEX, elevadas concentrações deste ácido foram detectadas no efluente (Figura 34).

Figura 34 - Variação espacial da concentração da matéria orgânica (DQO_f) e ácido acético no reator RAHLF1 alimentado com (a) *m*-xileno, (b) etilbenzeno e (c) BTEX.

As análises dos resultados obtidos dos perfis referentes às alimentações com *m*-xileno, etilbenzeno e BTEX demonstraram que, nestas condições, também foram detectadas baixas concentrações de nitrato (N-NO_3^-), no quinto ponto de amostragem do reator ($\text{L/D} = 20$), onde as concentrações desta substância foram de 6,7 mg/L, 4,4 mg/L, e 3,8 mg/L, para as alimentações com *m*-xileno, etilbenzeno e BTEX, respectivamente (Figura 35 e, f, g). Assim, o acúmulo de ácido acético pode estar associado ao esgotamento do aceptor final de elétrons (nitrato). É importante ressaltar que, o tempo destinado para a operação do reator, com cada um destes hidrocarbonetos, foi de cerca de 15 dias. Portanto, é possível que o tempo de operação, para estas condições, tenha sido insuficiente para que as populações responsáveis pelo consumo de ácido acético se

adaptassem às novas condições não sendo capazes de consumir ácido acético presente nos últimos trechos do reator.

Figura 35 - Variação espacial da concentração de nitrato (N-NO_3^-) e ácido acético, no reator RAHLF1 alimentado com benzeno (a, b, c), tolueno (d), etilbenzeno (e), *m*-xileno (f) e BTEX (g)

Devido à presença de ácido acético no efluente, foram obtidas menores eficiências de remoção da DQO_f , nas alimentações com *m*-xileno (79,1%), etilbenzeno (80,6%) e BTEX (69,2%), quando comparada às alimentações com benzeno (87,9%, 96,3% e 95,6%) e tolueno (100%). (Tabela 19).

Comportamento semelhante foi também observado por Ribeiro (2005) e Nardi (2002) operando RAHLF desnitrificante, tratando BTEX. Nesses trabalhos, os autores verificaram o acúmulo de ácido acético após a sobrecarga orgânica, o que promoveu o desbalanceamento dos sistemas.

No presente estudo, durante a alimentação com *m*-xileno e BTEX, foi detectado ácido acético no afluente do reator (Tabela 19). Considerando-se que as amostras retiradas para análises do afluente eram coletadas na mangueira de alimentação do reator, a presença de ácido acético no afluente decorreu, provavelmente, da atividade do biofilme indevidamente formado na mangueira, nesta condição. Embora estas mangueiras fossem esterilizadas freqüentemente, a formação do biofilme neste local era constantemente observada.

A Figura 36 apresenta os perfis de concentração de nitrato ($N-NO_3^-$) e nitrito ($N-NO_2^-$) ao longo do reator RAHLF1. As remoções mais acentuadas de nitrato ($N-NO_3^-$) ocorreram no primeiro trecho do reator, coincidindo com a maior concentração da biomassa. No entanto, o nitrato esteve disponível ao longo de todo o reator, permitindo que o metabolismo desnitrificante fosse realizado por toda a biomassa presente no sistema. Estes resultados demonstram que a cultura desnitrificante presente no biofilme apresentou-se altamente eficiente para o consumo da matéria orgânica no RAHLF. De forma diferente, no estudo de Ribeiro (2005), o autor observou que, ao final do período de operação com o RAHLF desnitrificante, tratando gasolina, a remoção da matéria orgânica ocorria apenas no primeiro trecho do reator, produzindo elevada quantidade de ácido acético que, por sua vez, era consumido em condições metanogênicas, no restante do reator. Assim o RAHLF estudado por Ribeiro (2005), foi caracterizado como um sistema misto.

Figura 36 - Variação espacial da concentração de nitrato (N-NO_3^-) e nitrito (N-NO_2^-) no reator RAHLF1 alimentado com (a, b, c) benzeno em diferentes concentrações, (d) tolueno, (e) *m*-xileno, (f) etilbenzeno e (g) BTEX

A dinâmica esperada no metabolismo de desnitrificação completa, onde o nitrato (N-NO_3^-) foi totalmente consumido, e o nitrito (N-NO_2^-) foi produzido e consumido ao longo do reator, pôde ser constatada durante os perfis referentes às alimentações com benzeno, *m*-xileno, etilbenzeno, e BTEX (Figura 36 b, e, f, g). Residuais de nitrito de 43,9 mg/L, 13,5 mg/L, e 5,1mg/L foram detectados no efluente das alimentações com benzeno e tolueno (Figura 36 a, c, d).

No Brasil, a resolução 357 de 17 de Março de 2005 do CONAMA (Conselho Nacional do meio ambiente) não estabelece diretamente as concentrações de nitrato e nitrito que podem estar presentes nos efluentes de sistemas de tratamento de esgotos. Apenas a concentração de amônia encontra-se limitada em 20 mg-N/L. No entanto, a limitação das concentrações de nitrato e nitrito segue a determinação baseada na classificação das águas doces, pertencentes às classes 1, 2 e 3, do Território Nacional, sendo que as concentrações máximas admitidas destas substâncias são iguais a 10 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ e 1,0 mg $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$, respectivamente.

Segundo os estudos de Kuhn et al. (1988) e Schocher et al. (1991), o nitrito formado durante a desnitrificação pode ser tóxico para a biomassa. Élmen et al. (1997) obtiveram constantes de inibição pelo nitrato de 582,8 mg/L, e pelo nitrito de 552,0 mg/L, respectivamente. No presente estudo, a maior concentração de nitrato (N-NO_3^-) e nitrito (N-NO_2^-) detectada, durante todo o período experimental com o reator RAHLF1, foi de 554,6 mg/L e 176,7 mg/L, respectivamente. No entanto, nenhuma conclusão pôde ser feita a respeito da inibição destas substâncias para a biomassa, uma vez que estudos sobre o tema não foram realizados neste trabalho.

A Figura 37 apresenta a variação das concentrações dos hidrocarbonetos obtidas durante os perfis.

O reator apresentou altas eficiências de remoção dos hidrocarbonetos em todas as condições de alimentação as quais o mesmo foi submetido (Tabela 19). A menor eficiência de remoção foi de 93,5%, obtida durante o perfil referente à alimentação do reator com benzeno 13,8 mg/L.

Estudos realizados com RAHLF tratando BTEX, sob condições desnitrificantes, demonstram elevada eficiência deste sistema no tratamento destes compostos. No estudo de Ribeiro (2005), as eficiências para remoção de benzeno (4,9mg/L), tolueno (7,2 mg/L), *m*-xileno (3,7 mg/L) e BTEX (15,9 mg/L), após o reator ter atingido o estado estacionário, foram de 96,3%, 95,7%, 96,3% e 96,1%, respectivamente. Elevadas eficiências de remoção para BTEX foram, também, observadas no trabalho de Nardi

(2002), durante a fase de alimentação do reator com solução etanólica com BTEX (5,0 mg/L de cada composto, aproximadamente). Neste último estudo, as concentrações de benzeno, tolueno e etilbenzeno no efluente foram menores que 0,1mg/L, e isômeros de xileno não foram detectados durante todo o período do experimento.

A remoção dos hidrocarbonetos ocorreu, principalmente, no primeiro trecho do reator. No entanto, especialmente, durante o perfil do benzeno 26,5 mg/L, observou-se que a remoção foi, ligeiramente, mais distribuída ao longo do reator (Figura 37 a). Este comportamento sugere ligeira dificuldade da biomassa em promover a remoção do benzeno em elevadas concentrações.

Figura 37 - Variação espacial da concentração de (a) benzeno e (b) tolueno, *m*-xileno, etilbenzeno e BTEX, no reator RAHLF1.

No Brasil, em relação às concentrações máximas de hidrocarbonetos aromáticos que os despejos industriais podem conter, o CONAMA (Resolução nº20 de 18 de junho de 1986) estabelece somente alguns teores máximos para alguns compostos orgânicos, entre eles o benzeno ($10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$). A Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, a qual estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, determina além do valor máximo permitido para o benzeno na água potável ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$), valores para o tolueno ($0,170 \text{ mg.L}^{-1}$), o etilbenzeno ($0,200 \text{ mg.L}^{-1}$) e os xilenos ($0,300 \text{ mg.L}^{-1}$).

Embora em nenhuma das condições de operação do reator tenha-se obtido concentrações de benzeno dentro do estabelecido pelo Ministério da saúde (Tabela 19), as eficiências obtidas, foram ainda, consideradas satisfatórias, uma vez que o benzeno

tem sido relatado como um dos compostos de BTEX menos biodegradável anaerobicamente (Burland e Edwards, 1999).

Os efluentes referentes às alimentações com tolueno e *m*-xileno apresentaram concentrações dentro dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde (Tabela 19). Quando o reator foi alimentado com 33,3mg/L de etilbenzeno, detectou-se residual de 0,4mg/L deste composto no efluente. Este residual corresponde ao dobro da concentração de etilbenzeno permitida pelo Ministério da Saúde nos corpos d'água, para o padrão de potabilidade. A presença de concentrações residuais de benzeno e etilbenzeno, acima dos padrões, mostra a necessidade da utilização de outras técnicas de tratamentos, como por exemplo, o tratamento físico (adsorção com carvão ativado, *stripping*), ou químico (ozônio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio), para que estes compostos possam ser devidamente removidos (Ribeiro, 2005), caso o objetivo da utilização do efluente vise alcançar os padrões de potabilidade.

Muitas vezes, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, ocorrem juntos na natureza, como é o caso do petróleo e da gasolina. Por este motivo, avaliou-se, também, a capacidade do biofilme em remover estes compostos quando os mesmos estivessem juntos. Assim, após a alimentação com cada um dos hidrocarbonetos, separadamente, o reator foi alimentado com substrato contendo aproximadamente, 5mg/L de cada um dos hidrocarbonetos, gerando concentração final de aproximadamente 26,5mg/L de BTEX. Nesta solução, além do *m*-xileno, anteriormente analisado, foram, também, adicionados *o*-xileno e *p*-xileno. Estes compostos foram analisados conjuntamente devido à proximidade dos tempos de retenção de *m*-xileno e *p*-xileno na coluna cromatográfica, gerando a superposição dos picos produzidos durante as análises, e à limitação da coluna utilizada para separar os mesmos.

Eficiência de remoção de 98,8% de BTEX foi obtida durante o perfil para esta condição (Tabela 19). As concentrações efluentes de tolueno, etilbenzeno e, *o-m-p*-xilenos apresentaram-se dentro dos padrões permitidos pelo Ministério da Saúde para estes compostos, sendo que o residual observado no efluente (0,31 mg/L) deveu-se, principalmente, à presença de benzeno, constatando a maior recalcitrância deste composto. Estes resultados demonstram que, concentrações mais baixas dos hidrocarbonetos foram mais facilmente removidas, gerando efluentes mais satisfatórios.

Em todos trabalhos realizados com RAHLF tratando BTEX (Nardi 2002, Ribeiro 2005, Cattony 2005, Fernandes 2005), incluindo o presente estudo, as concentrações de BTEX utilizadas, que variaram de 1,5 mg/L a 41, 4mg/L, não

apresentaram toxicidade para os organismos presentes nos biofilmes, mostrando a elevada adaptação, das células do inóculo utilizado, a estes compostos, nesta configuração de reator. Neste ponto de vista, Shim e Yang (1999), também relataram a maior tolerância de células imobilizadas, quando comparada a células suspensas, a elevadas concentrações de BTEX.

5.9.3 Operação do reator RAHLF2

Durante a operação do RAHLF1, o biofilme foi continuamente submetido à presença dos diferentes hidrocarbonetos, o que resultou em biofilme bem adaptado e capaz de produzir elevadas eficiências de remoção, de etanol, nitrato e BTEX. No entanto, esta capacidade de remoção, pode ter sido consequência da exposição gradual destas células, a cada um dos hidrocarbonetos, gerando células transformadas, e mais competentes para a biodegradação destes compostos.

Neste ponto de vista, não se poderia concluir, que o inóculo utilizado para gerar o biofilme, foi capaz de biodegradar, por exemplo, somente etilbenzeno, pois anteriormente à submissão do biofilme ao etilbenzeno, as células estiveram em contato com benzeno, tolueno e *m*-xileno. Assim, este contato prévio poderia ser o fator determinante para que estas células fossem capazes de remover o etilbenzeno.

Segundo Alvarez e Vogel (1991) compostos individuais poderiam estimular ou inibir a degradação de outro, pela indução de enzimas, ou atuando como substrato primário estimulando o crescimento microbiano que aumentaria o cometabolismo de um outro composto. Por outro lado, a presença de um composto poderia apresentar efeito inibitório devido à toxicidade, repressão catabólica, inibição competitiva, por enzimas.

Assim, a estratégia de operação do RALF2 foi modificada, objetivando-se avaliar a capacidade da cultura em remover os hidrocarbonetos, separadamente, sem que esta cultura tenha tido contato prévio com outros hidrocarbonetos. Neste reator, o meio suporte foi removido todas as vezes que um dos compostos de BTEX foi utilizado na alimentação do reator.

Além de avaliar a capacidade do biofilme em promover a remoção de BTEX, buscou-se, também, avaliar a remoção destes compostos, separadamente, e em curtos períodos de operação.

Geralmente, nos trabalhos realizados com reatores com biomassa imobilizada, o biofilme passa pelas fases de formação e adaptação. Em alguns trabalhos, os reatores são previamente alimentados com substrato sintético composto por fontes complexas como lipídios, glicídios e proteínas, que favorecem o crescimento da biomassa. Posteriormente, o biofilme formado é submetido a concentrações progressivas de hidrocarbonetos, para que as células possam ser adaptadas ao meio.

No presente estudo, já se tinha conhecimento do rápido crescimento celular da biomassa ($T_g = 13,9$ horas, em presença de etilbenzeno e etanol). Como as células já

tinham sido submetidas à presença contínua do hidrocarboneto, durante as fases de purificação e manutenção da cultura, foi observada formação rápida de biofilme denso na matriz de poliuretano, já nos primeiros dias, após a imobilização da cultura.

5.9.3.1 Alimentação do RAHLF2 com etilbenzeno em diferentes concentrações

O esquema de operação deste reator, mostrando as concentrações dos hidrocarbonetos avaliados e o tempo de operação com cada um destes compostos estão representado na Figura 3, do capítulo Material e Métodos. Os valores de todas as medidas realizadas dos parâmetros de monitoramento deste reator estão apresentados no Apêndice H. Os perfis espaciais referentes aos hidrocarbonetos estão disponíveis no Apêndice I.

A Tabela 20 e Figura 38 apresentam os resultados dos parâmetros de monitoramento obtidos durante o período de operação do reator alimentado com diferentes concentrações de etilbenzeno. As eficiências médias de remoção da matéria orgânica (DQO_f) e nitrato ($N-NO_3^-$) foram de 92,7 % e 89,0%, respectivamente. De forma geral, nesta fase de operação, o RAHLF2 apresentou comportamento muito semelhante ao reator RAHLF1. As baixas flutuações destes parâmetros durante todo o período de operação com etilbenzeno, indicaram a boa estabilidade do reator (Figura 38).

Tabela 20 - Valores dos parâmetros de monitoramento do RAHLF2, obtidos durante operação com etilbenzeno.

Parâmetros	Afluente		Efluente		Eficiência Média de Remoção (%)
	Média	Variação	Média	Variação	
DQO_{bruta} (mg/L)	971,2	832,9 - 1253,4	99,8	51,4 - 219,8	89,7
$DQO_{filtrada}$ (mg/L) ¹	956,3	809,4 - 1205,7	69,7	20,8 - 196,5	92,7
$N-NO_3^-$ (mg/L)	390,1	325,8 - 387,5	42,9	8,0 - 167,2	89,0
pH	22,3	6,9 - 7,5	33,3	68,2 - 9,4	-
SSV (mg/L)	7,2	7,0 - 44	8,7	5,0 - 57,0	-

Figura 38 –Variação da concentração de DQO_b (a), DQO_f (b); $N-NO_3^-$ (c), $N-NO_2^-$ (d), pH (e) e SSV (f). RAHLF 2 alimentado com etilbenzeno.

A Tabela 21 e as figuras 39 a 41 referem-se aos comentários relativos aos perfis espaciais realizados com diferentes concentrações de etilbenzeno.

Tabela 21 - Valores das concentrações afluentes e efluentes dos parâmetros avaliados nos perfis com diferentes concentrações de etilbenzeno.

Parâmetro	Concentração (mg/L)		Eficiência Média de Remoção (%)
	Afluente	Efluente	
Etilbenzeno	13,1	0,08	99,4
DQO _{Filtrada} (mg/L)	832,9	36,1	95,7
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	349,6	11,5	96,7
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0,0	0,78	-
Ácido acético (mg/L)	*	*	*
Etilbenzeno	15,1	0,01	99,9
DQO _{Filtrada} (mg/L)	809,4	42	94,8
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	355,2	8,0	97,8
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0,06	5,5	-
Ácido acético (mg/L)	*	*	*
Etilbenzeno	31,1	0,2	99,4
DQO _{Filtrada} (mg/L)	1205,7	38,5	96,8
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	547,9	15,5	97,2
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0,5	2,2	-
Ácido acético (mg/L)	*	*	*

* valores abaixo do limite de detecção da curva de calibração para ácido acético (6,0 mg/L)

Nos perfis, a eficiência média de remoção da matéria orgânica (DQO_f) foi de 95,8% para as três concentrações de etilbenzeno analisadas. Ácido acético foi produzido e consumido ao longo do reator, em todas as condições de alimentação desta fase de operação (Figura 39), demonstrando a boa estabilidade do reator.

Figura 39 - Variação espacial da concentração da matéria orgânica (DQO_f) e ácido acético ao longo do reator RAHLF2 alimentado com etilbenzeno a 13,1 mg/L (a), 15,1 mg/L (b) e 31,1 mg/L (c).

A variação da concentração de etilbenzeno, ao longo do reator está representada na Figura 40. Elevadas porcentagens de remoção de etilbenzeno foram obtidas em todas as condições de alimentação, e os residuais observados nos efluentes, nas diferentes condições, correspondem ao estabelecido para o valor máximo permitido deste composto nas águas de abastecimento que é de 0,2 mg/L (Tabela 21), conforme determinado pelo Ministério da Saúde (padrão de potabilidade)

Figura 40- Variação espacial da concentração de etilbenzeno no RAHLF2.

A eficiência média de remoção de nitrato, obtida durante os perfis, foi de 97,2% $\pm$ 0,5. Nitrito (N-NO_2^-) foi produzido, e quase que totalmente consumido ao longo do reator, gerando, baixos valores residuais no efluente. (Figura 41).

Figura 41 – Variação espacial da concentração de nitrato (N-NO_3^-) e nitrito (N-NO_2^-) do reator RAHLF2 alimentado com etilbenzeno a 13,1 mg/L (a), 15,1 mg/L (b) e 31,1 mg/L (c).

Elevadas eficiências de remoção obtidas para etilbenzeno, matéria orgânica, e nitrato, assim como, a produção e consumo de nitrito e ácido acético, demonstraram a boa estabilidade do reator nesta primeira fase de operação.

5.9.3.2 Alimentação do RAHLF2 com tolueno, benzeno, *m*-xileno, *o*-xileno, *p*-xileno e BTEX

Devido ao pouco tempo de operação do reator durante a alimentação com tolueno, benzeno, xilenos e BTEX, e às poucas amostragens realizadas para os parâmetros de monitoramento, neste item, não será abordada a discussão a respeito da estabilidade do reator baseada nos parâmetros de monitoramento (ácidos voláteis totais, alcalinidade, pH, e sólidos suspensos voláteis). A seguinte discussão considera somente os resultados obtidos dos perfis, realizado ao final da alimentação do reator com cada um dos compostos.

A Tabela 22 apresenta as concentrações dos parâmetros avaliados no afluente e efluente do reator durante a operação do mesmo com os hidrocarbonetos.

Tabela 22 - Concentrações afluentes e efluentes dos parâmetros avaliados nos perfis do RAHLF2.

Parâmetros	Tempo de operação (dias)	Concentração (mg/L)		Eficiência Média de Remoção (%)
		Afluente	Efluente	
Tolueno	34	7,6	0,1	98,7
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		710,8	179,2	74,8
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		534,5	103,1	80,7
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,0	79,2	-
Ácido acético (mg/L)		1,6	8,3	-
Tolueno	17	27,8	0,3	98,9
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		1240,8	345,1	72,2
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		451,4	6,1	96,7
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,0	0,0	-
Ácido acético (mg/L)		6,25	286,4	-
Benzeno	18	15,1	1,6	89,4
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		1270,0	128,2	89,9
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		524,5	11,5	97,8
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,02	0,0	-
Ácido acético (mg/L)		0,0	0,0	-
Benzeno	17	41,4	4,4	89,4
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		1322,3	142,8	89,2
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		520,0	2,0	99,6
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,0	0,0	-
Ácido acético (mg/L)		0,0	62,3	-
m-xileno	13	9,46	0,5	94,6
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		1473,7	413,6	71,9
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		534,5	39,6	92,6
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,0	0,0	-
Ácido acético (mg/L)		0,0	286,4	-
m-xileno	15	28,4	0,3	98,9
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		1619,3	521,9	67,8
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		417,5	4,3	99,0
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,12	0,0	-
Ácido acético (mg/L)		15,2	502,9	-
o-xileno	15	28,5	1,8	93,7
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		1258,5	163,2	87,0
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		516,7	11,5	97,8
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,03	0,0	-
Ácido acético (mg/L)		0,0	0,0	-
p-xileno	15	32,1	0,1	99,7
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		1648,5	208,3	87,4
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		510,0	28,3	94,5
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,0	0,2	-
Ácido acético (mg/L)		0,0	0,0	-
BTEX	15	32,9	1,4*	95,7
DQO _{Fil;trada} (mg/L)		1642,5	169,4	89,7
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		574,6	85,1	85,2
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,5	64,1	-
Ácido acético (mg/L)		6,2	18,3	-

* concentração referente ao benzeno = 0,5 mg/L; tolueno = 0,1mg/L; etilbenzeno = 0,2 mg/L; o-xileno = 0,2 mg/L; mp-xilenos = 0,4 mg/L.

Nos períodos de alimentação do RAHLF2 com tolueno, benzeno, *m*-xileno, *o*-xileno, *p*-xileno e BTEX, o consumo da matéria orgânica levou à formação de ácido acético em todas as condições de alimentação (Figura 42). Com a diminuição do tempo de operação do reator, as eficiências de remoção da matéria orgânica (DQO_f) foram menores.

Elevadas concentrações de ácido acético foram detectadas no efluente, ao final da alimentação do reator com tolueno, *m*-xileno e benzeno, cujos valores foram de 286,8 mg/L, 502,9 mg/L e 62,3 mg/L, respectivamente (Tabela 22). Nestas mesmas condições, as concentrações de nitrato ($N-NO_3^-$), observadas no quarto seguimento do reator (L/D16), foram de 9,3 mg/L, 6,8 mg/L e 7,1 mg/L, para as alimentações com tolueno, *m*-xileno e benzeno, respectivamente (Figura 43). Este comportamento já havia sido observado no RAHLF1, quando o mesmo foi operado por períodos de 15 dias. Assim, o acúmulo de ácido acético foi, mais uma vez, associado à instabilidade do reator, ao esgotamento do aceptor final de elétrons (nitrato), e a dificuldade da biomassa se adaptar às novas condições, em pouco tempo de operação do reator.

Figura 42 - Variação espacial da concentração da matéria orgânica (DQO_f) e ácido acético do RAHLF2 alimentado com tolueno (a), *m*-xileno (b), benzeno (c), *o*-xileno (d), *p*-xileno (e) e BTEX (f).

Figura 43 - Variação espacial da concentração de nitrato (N-NO₃⁻) e ácido acético do RAHLF2 referente à alimentação com (a) benzeno, (b) tolueno e (c) *m*-xileno

Embora as eficiências de remoção da matéria orgânica (DQO_f) tenham sido inferiores nestas condições de alimentação, foram observadas elevadas eficiências de remoção de nitrato (N-NO₃⁻) (Tabela 22). Nitrito (N-NO₂⁻) foi produzido e consumido ao longo do reator, em todas as condições, exceto para a alimentação com BTEX, sendo detectados 64,1 mg/L N-NO₂⁻ (Figura 44).

Figura 44 - Variação espacial da concentração de N-NO_3^- e N-NO_2^- do RAHLF2 alimentado com benzeno (a), tolueno (b), *m*-xileno (c), *p*-xileno (d), *o*-xileno (e), e *p*-xileno (f).

Diferentemente, ao observado para remoção de matéria orgânica (DQO) foram obtidas elevadas porcentagens de remoções dos hidrocarbonetos, nas diferentes

condições de alimentação (Tabela 22 e Figura 45). Este fato pode estar relacionado, principalmente, à adaptação prévia sofrida pelas células, uma vez que as mesmas foram purificadas, isoladas, e cultivadas em meio contendo o hidrocarboneto. Outro fator importante, que pode ter contribuído para a maior eficiência de remoção dos hidrocarbonetos, diz respeito à adsorção apresentada pelos compostos de BTEX nestas células (especialmente nos polímeros produzidos), assim como no meio suporte (espuma de poliuretano), disponibilizando o hidrocarboneto para as células a todo o momento e facilitando, também, o processo de adaptação das células a estes compostos.

Todos estes fatores podem ter favorecido o desenvolvimento de células competentes, que foram capazes de sintetizar, prontamente, enzimas necessárias para o processo de biodegradação do hidrocarboneto, quando as mesmas se encontraram em contato com os mesmos, não sendo necessário longos períodos de adaptação.

A adaptação aos hidrocarbonetos foi também verificada quando o reator foi submetido à alimentação com concentrações mais elevadas destes compostos, o que não alterou morfológicamente as células do biofilme. Nestas condições, o exame microscópico das células demonstrou morfologias íntegras, sem qualquer alteração, conforme comentado posteriormente na seção de “análise microscópica”.

A Figura 45 mostra as transformações dos hidrocarbonetos, nas diferentes condições de alimentação do reator.

O composto que apresentou menor porcentagem de remoção foi o benzeno (89,4%), gerando residual de 4,4mg/L quando o reator foi submetido à concentração de 41,4mg/L (Tabela 22). Mais uma vez, a dificuldade de remoção deste composto, pelos microrganismos do biofilme, foi confirmada. De forma semelhante ao já observado no RAHLF1, o decréscimo da concentração dos hidrocarbonetos ocorreu, principalmente, no primeiro ponto de amostragem ($L/D = 4$) (Figura 45).

Figura 45 - Variação espacial da concentração dos hidrocarbonetos no RAHLF2 alimentado com benzeno (a), tolueno (b), m-xileno (c), o-xileno (d) p-xileno (e) e BTEX (f).

Embora elevadas porcentagens de remoção de hidrocarbonetos tenham sido obtidas, os efluentes gerados ao final das alimentações com tolueno, benzeno e *o*-xileno (Tabela 22), não atenderam aos padrões de emissão destes compostos nos corpos

d'água, no que diz respeito ao padrão de potabilidade, estabelecidos pelo Ministério da saúde, cujas concentrações máximas permitidas para estes compostos é de 0,17 mg/L de tolueno, 0,005 mg/L de benzeno e 0,3 mg/L para xilenos. Portanto, caso o objetivo do lançamento do efluente vise a questão da potabilidade da água, o pós- tratamento (adsorção com carvão ativado, *stripping*, ou tratamento utilizando ozônio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio), é mais uma vez, recomendado, como alternativa para a remoção não só dos residuais dos BTEX, mas também, para a remoção dos residuais de nitrato e ácido acético gerados nos processos de remoção. No entanto, os resultados obtidos com este reator demonstraram eficiência do biofilme desnitrificante em remover a matéria orgânica (principalmente etanol), o nitrato e os compostos de BTEX, no RAHLF, mesmo quando operado por período extremamente curto (15 dias), indicando elevada adaptação destas células.

A remoção de cada composto de BTEX, separadamente, demonstrou que a degradação de um hidrocarboneto específico não foi dependente da presença de outro hidrocarboneto. Alguns estudos sugerem que a degradação de *o*-xileno ocorre somente em presença de tolueno (Ball e Reinhard, 1996; Kao e Borden, 1997; Phelps e Young, 1999). No presente trabalho, *o*-xileno foi removido independentemente da presença de tolueno. Estes resultados confirmam que o co-metabolismo não foi um fator limitante para que a degradação destes compostos ocorresse, independentemente. No entanto, a eficiência de remoção do *o*-xileno foi inferior quando comparada aos seus isômeros, *p*-xileno e *m*-xileno, mostrando a maior dificuldade do biofilme em promover a remoção.

5.10 Comparação entre os reatores RAHLF1 e RAHLF2

A Tabela 23 apresenta uma comparação das eficiências de remoção dos hidrocarbonetos, obtidas nas diferentes condições de alimentações as quais os reatores RAHLF1 e RAHLF2 foram submetidos.

Independentemente da estratégia adotada para operar os reatores, as eficiências de remoção dos hidrocarbonetos obtidas, foram semelhantes para estes dois reatores. Esta semelhança demonstra que, o tempo requerido para que o reator entrasse em estado de equilíbrio, e o biofilme se adaptasse a nova condição, não foi fator limitante para o processo de remoção de hidrocarboneto. Nota-se que, mesmo quando o período operacional dos reatores foi em torno de 15 dias, elevadas eficiências de remoção para

os hidrocarbonetos já podiam ser observadas. Como mencionado anteriormente, a capacidade em remover os BTEX, em período de operação tão baixo foi, principalmente, associado à adaptação prévia das células ao hidrocarboneto, durante as fases de purificação, isolamento e manutenção da cultura, tornando as células altamente adaptadas à presença dos hidrocarbonetos, além da adsorção na espuma de poliuretano.

Esta adaptação foi também importante, para que o biofilme do RAHLF2, atingisse eficiência de remoção dos hidrocarbonetos, mesmo quando o meio suporte foi substituído, e outro hidrocarboneto foi utilizado para alimentar o reator. Este resultado demonstra que a cultura utilizada como inóculo para formar o biofilme, quando imobilizada em reator anaeróbico horizontal de leito fixo, e submetida às mesmas condições determinadas neste estudo, é capaz de remover benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, separadamente, ou quando estes compostos se encontrarem juntos, mesmo em períodos reduzidos de operação do reator.

Tabela 23 – Eficiências de remoção dos hidrocarbonetos obtidas para os reatores.

Hidrocarboneto (mg/L)	% Remoção de hidrocarboneto (RAHLF1)	% Remoção de hidrocarboneto (RAHLF2)	Tempo de operação (dia)
Benzeno 13,8	93,5		24
Benzeno 15,4	99,3		50
Benzeno 26,5	98,5		28
Benzeno 15,1		89,4	18
Benzeno 41,4		89,4	17
Tolueno 7,6		98,7	34
Tolueno 27,8		98,9	17
Tolueno 30,8	99,6		42
Etilbenzeno 13,1		99,4	42
Etilbenzeno 15,1		99,3	48
Etilbenzeno 31,1		99,4	28
Etilbenzeno 33,3	98,8		15
<i>m</i> -xileno 9,5		94,6	13
<i>m</i> -xileno 28,4		98,9	15
<i>m</i> -xileno 32,1	99,7		15
<i>o</i> -xileno 28,5		93,7	15
<i>p</i> -xileno 32,1		99,7	15
BTEX 26,5	98,8		15
BTEX 32,9		95,7	15

Em relação à eficiência média de remoção da matéria orgânica (DQO_f) e de nitrato ($N-NO_3^-$), observou-se que houve leve tendência de melhores eficiências destes parâmetros, quando o reator foi operado por mais tempo (Tabela 24).

Tabela 24 – Eficiências de remoção da matéria orgânica (DQO_f) e nitrato ($N-NO_3^-$) obtidas em diferentes condições de alimentação dos reatores.

Condição de Alimentação	% média de Remoção DQO_f		% média de Remoção $N-NO_3^-$		Tempo de operação (dias)	
	RAHLF1	RAHLF2	RAHLF1	RAHLF2	RAHLF1	RAHLF2
Benzeno	91,1	89,5	87,9	98,7	102	35
Tolueno	97,3	81,5	90,5	88,6	42	51
<i>m</i> -xileno	90,4	84,7	98,9	97,0	15	28
Etilbenzeno	81,5	92,7	99,2	89,0	15	118
BTEX	72,7	89,7	99,1	85,2	15	15
<i>o</i> -xileno	-	87,0	-	97,8	-	15
<i>p</i> -xileno	-	87,4	-	94,5	-	15

Salienta-se, que com este reduzido tempo de operação, os reatores produziram efluentes contendo elevadas concentrações de ácido acético. Por este motivo, sugere-se que o efluente proveniente de um reator operado nestas condições, passe por um sistema de pós-tratamento, para que haja remoção, não só do excedente de ácido acético e nitrato, assim como, dos residuais dos compostos BTEX, também presentes neste efluente.

5.11 Análises complementares

5.11.1 - Avaliação da formação de amônia ao longo do reator

Para confirmar que a redução desassimilativa de nitrato a amônia não estava ocorrendo nos reatores, foram realizadas análises para detectar a presença de $N-NH_4^+$, ao longo dos sistemas (Tabela 25). A presença de baixas concentrações de amônia somente no afluente demonstrou, mais uma vez, que as culturas isoladas não realizaram o metabolismo de redução desassimilativa de nitrato a amônia e sim, a desnitrificação. Os valores das concentrações medidas neste ensaio estão apresentados no Apêndice J.

Tabela 25 – Concentração de amônia afluenta e efluente do RAHLF1 e RAHLF2

Pontos de amostragem	RAHLF1 Concentração N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	RAHLF2 Concentração N-NH ₄ ⁺ (mg/L)
Afluente	7,27	6,96
L/D 4	-	-
L/D 8	-	-
L/D 12	-	-
L/D 16	-	-
L/D 20	-	-
Efluente	-	-

(-) Valores abaixo do limite de detecção do método.

5.11.2 Avaliação da adsorção de BTEX

A capacidade de adsorção dos compostos de BTEX pelo meio suporte (espuma de poliuretano) e biopartícula (biomassa aderida na espuma) foi avaliada no estudo realizado por Nardi (2002), com a finalidade de se verificar a influência da adsorção na remoção destes hidrocarbonetos. De acordo com a autora, a capacidade de adsorção dos compostos de BTEX pela espuma foi o dobro em relação à adsorção observada para a biopartícula, no entanto, a autora concluiu que a adsorção era pouco significativa quando comparada à quantidade total de BTEX que era removido pelo sistema.

Baseando-se nos dados de adsorção relatados por Nardi (2002), a quantificação da adsorção dos hidrocarbonetos, no meio suporte e na biopartícula, foi estimada para os compostos utilizados nos do presente estudo. Os cálculos realizados para esta estimativa estão disponíveis no Apêndice K. Os resultados relativos à adsorção (Tabela 26) demonstraram que em todas as condições de alimentação as quais os reatores foram submetidos, a adsorção dos hidrocarbonetos, no meio suporte e biopartícula, foi bastante inferior, quando comparada à quantidade de BTEX removida nos sistemas (Tabela 26). Este resultado indica que a remoção foi o principal processo ocorrido no reator. Esta mesma conclusão também foi relatada por Cattony (2005) no estudo com RAHLF tratando benzeno e tolueno, sob condições sulfetogênicas.

Tabela 26 - Avaliação da capacidade de remoção dos compostos de BTEX pelo sistema levando-se em consideração a adsorção dos hidrocarbonetos na espuma e na biopartícula.

Reator	Tóxico avaliado	Total de tóxico que passou no sistema (mg)	Adsorção na espuma e na biopartícula (mg)	Remoção de tóxico (mg)
RAHLF1	Benzeno	2989,2	53,29	2935,91
RAHLF1	Tolueno	2166,19	81,93	2084,26
RAHLF1	Etilbenzeno	829,08	113,05	716,03
RAHLF1	<i>m</i> -xileno	806,4	108,92	697,48
RAHLF2	Benzeno	1464,96	53,29	1411,67
RAHLF2	Tolueno	1213,8	81,93	1131,87
RAHLF2	Etilbenzeno	3581,83	113,05	3468,78
RAHLF2	<i>o</i> -xileno	660,24	108,92	551,32
RAHLF2	<i>m</i> -xileno	903,59	108,92	794,67
RAHLF2	<i>p</i> -xileno	806,4	108,92	697,48

5.11.3 - Avaliação da concentração de BTX na saída de gás

Além da adsorção, deve-se ainda considerar a perda de BTEX através da saída de gás do reator. No estudo de Fernandes (2005), com reatores RALHF, imobilizado com lodo de abatedouro de aves, tratando compostos de BTEX, a autora relatou a ocorrência de perda destes hidrocarbonetos, através do arraste dos gases formados durante o processo da biodegradação. Neste estudo, concluiu-se que o tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado no sistema e a produção de gás foram fatores determinantes destas perdas, sendo que, quanto maior fosse o TDH, maiores perdas eram observadas. Assim, para TDH de 16 horas e produção de metano de 586 mmol/TDH, a autora relatou que as perdas de benzeno, tolueno e *m*-xileno foram estimadas em 0,28 mg/L, 0,36 mg/L e 0,16 mg/L, respectivamente.

Conclui-se, portanto, que embora tenham ocorrido perdas dos hidrocarbonetos através da adsorção no meio suporte e biopartícula e, possivelmente, pelo arraste dos gases, produzidos no processo de biodegradação, a remoção de BTEX observada no presente estudo ocorreu, principalmente, pelo processo de biodegradação.

6. EXAME MICROSCÓPICO DOS REATORES

O acompanhamento microscópico das amostras mostrou que os biofilmes dos reatores foram predominantemente colonizados por bacilos e cocos. (Figura 46). Estas morfologias foram observadas em todas as condições de alimentação as quais os reatores foram submetidos.

Figura 46 - Microscopia de varredura (5000X) mostrando morfologias predominantes observadas nos biofilmes dos reatores RAHLF1 e RAHLF2: (a) bacilos e (b) cocos.

A presença constante de cordões celulares de bacilos, assim como de cocos, foi observada, especialmente, nos primeiros seguimentos dos reatores (L/D 4 e L/D 8), onde a concentração da matéria orgânica foi maior. Este arranjo celular foi associado às condições adversas do meio, o que fez com que as células se agrupassem (Figura 47).

Figura 47 – Microscopia de contraste de fase (1500X) e eletrônica de varredura (5000X) mostrando os cordões celulares observados nas amostras obtidas dos reatores RAHLF1 e RAHLF2, em diferentes condições de alimentação: (a) RAHLF1 alimentado com BTEX, (b) RAHLF1 alimentado com tolueno, (c) RAHLF2 alimentado com benzeno e (d) RAHLF1 alimentado com etilbenzeno.

Outra morfologia frequentemente observada nos biofilmes foi bacilos mais alongados destacados na Figura 48.

Figura 48 – Microscopia de eletrônica de varredura (5000X) de bacilos em amostra do reator RAHLF2 alimentado com benzeno (L/D 4).

Embora pouco freqüentes protozoários foram observados em alguns pontos do reator (Figura 49). Estes microrganismos podem ter se favorecido da presença do etanol, presente no substrato de alimentação do reator.

Figura 49 – Microscopia de contraste de fase (1500X). Protozoário observado no L/D = 8 do reator RAHLF2 alimentado com tolueno (a), e no reator RAHLF1 alimentado com benzeno (b).

Cistos foram freqüentemente observados, nos locais onde o crescimento celular era intenso (L/D 4 e 8) (Figura 50).

Figura 50 – Microscopia de contraste de fase (1500X). Cistos observados no L/D 4 do reator RAHLF1 alimentado com *m*-xileno (a) e do reator RAHLF2 alimentado com benzeno (b).

Suspeitando-se de que a anaerobiose tivesse se estabelecido em microambientes na espuma de poliuretano devido, principalmente, ao crescimento celular denso e à formação de polímeros, procedeu-se ao exame de microscopia de fluorescência para avaliar a possibilidade da presença de arqueias metanogênicas. Nenhuma fluorescência foi registrada nas microscopias realizadas, assim como, também não se verificou nenhuma produção de metano, nas amostras coletadas para a análise deste gás.

Especialmente durante a alimentação do RAHLF1 com BTEX, uma morfologia bem diferenciada foi observada nas amostras obtidas do último seguimento do reator (L/D20). Neste ponto de amostragem, aglomerados de bacilos, com aspecto de cultura pura, foram constantemente observados (Figura 51a). Células semelhantes foram observadas durante a caracterização nutricional da cultura, quando a mesma foi avaliada quanto a capacidade de crescer utilizando etanol como fonte de carbono, sob condições fermentativas (Figura 51b). Assim, é possível que os microrganismos observados no biofilme, cresceram como resultado da fermentação do etanol, presente neste segmento do reator. De fato, neste ponto de amostragem (L/D 20), durante a alimentação com BTEX, o nitrato já havia sido totalmente consumido e ácido acético foi detectado na concentração de 571,5 mg/L.

Figura 51 - Microscopia óptica de contraste de fase (1500X) de bacilos observados em (a) biofilme do RAHLF1 alimentado com BTEX (L/D 20) e (b) crescimento em presença de etanol, observado no ensaio de caracterização nutricional, sob condições fermentativas.

7. ANÁLISE MOLECULAR

As análises realizadas pela metodologia da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foram feitas para verificar a possível mudança da comunidade ao longo do reator, ou em consequência das alimentações com os diferentes hidrocarbonetos. Amostras obtidas ao final das alimentações com benzeno (RAHLF1) e etilbenzeno (RAHLF2), nos pontos de amostragens L/D 4, L/D 8, L/D 12, L/D 16 e L/D 20 dos reatores foram submetidas à análise por DGGE, para avaliar possíveis modificações da comunidade ao longo dos reatores (Figura 52). Um mesmo padrão de bandas foi observado para as amostras obtidas ao longo do reator, demonstrando que as comunidades presentes no primeiro seguimento dos reatores se mantiveram em toda sua extensão. Embora um mesmo padrão tenha sido observado ao longo do reator, algumas populações apresentaram flutuações, sendo mais representativas, ou menos representativas, em determinados pontos do reator.

Figura 52 – Padrão de bandas do DGGE (DNA ribossomal 16S - *primer*: Nielsen *et al.*, 1999) das amostras obtidas ao longo do reator RAHLF1 alimentados com benzeno (26,5mg/L) (a), e reator RAHLF2 alimentado com etilbenzeno (31,1 mg/L) (b). Gradiente de desnaturação 40% a 60%.

Para verificar se as diferentes condições de alimentação as quais os reatores foram submetidos (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno e BTEX) provocaram a seleção ou o desenvolvimento de comunidades específicas, amostras do biofilme foram coletadas em cada uma destas condições e avaliadas pelo DGGE. Todas as amostras foram obtidas no primeiro ponto de amostragem (L/D = 4). A Figura 53 representa o DGGE realizado para as diferentes condições de alimentação do reator RAHLF1 (benzeno 26,5 mg/L, tolueno 30,8 mg/L, *m*-xileno 32,1 mg/L, etilbenzeno 33,3 mg/L e BTEX 26,5 mg/L)

Figura 53 – Padrão de bandas do DGGE (DNA ribossomal 16S - *primer*: Nielsen *et al.*, 1999) das amostras obtidas no L/D = 4 em diferentes condições de alimentação do reator RAHLF1.

Nas amostras referentes às alimentações com tolueno, etilbenzeno, *m*-xileno e BTEX, os padrões de bandas produzidos foram bastante semelhantes, com diferenças apenas nas intensidades de determinadas bandas. A presença de uma banda expressiva (banda A), nestas condições de alimentação, demonstra o desenvolvimento de uma população altamente adaptada, capaz de crescer em presença de altas concentrações destes hidrocarbonetos.

Entre as amostras analisadas, o único padrão de bandas diferenciado foi observado para amostra obtida da alimentação com benzeno. A ausência da banda A e outras bandas menos expressivas, somente nesta condição de alimentação, foi relacionada à alta toxicidade do benzeno (26,5 mg/L), que pode ter sido fator seletivo para estas comunidades. É possível que estas populações estivessem presentes no

biofilme, quando o reator estava sendo alimentado com concentrações mais baixas de benzeno (13,8 mg/L e 15,4 mg/L). No entanto, análise de DGGE, nestas condições, não foram realizadas, para que esta observação fosse conclusiva.

A Figura 54 apresenta o DGGE referente às amostras obtidas no L/D 4, nas diferentes condições de alimentação do RAHLF2 (benzeno 41,4 mg/L, tolueno 27,8 mg/L, etilbenzeno 31,1 mg/L, *o*-xileno 28,5 mg/L, *m*-xileno 28,4mg/L, *p*-xileno 32,1 mg/L e BTEX 32,9mg/L). Enquanto que no reator RAHLF1 um mesmo padrão de bandas foi observado para as diferentes condições de alimentação, demonstrando a estabilidade da comunidade, no RAHLF2, diferentes padrões de bandas foram observados para as amostras obtidas das diferentes condições alimentação.

Figura 54 – Padrão de bandas do DGGE (DNA ribossomal 16S - *primer*: Nielsen *et al.*, 1999) das amostras obtidas do reator RAHLF2, nas diferentes condições de alimentações.

Embora populações diferentes tenham ocorrido nas diferentes condições de alimentação, algumas semelhanças entre determinados padrões de bandas foram observadas. A Figura 55 apresenta o DGGE referente ao reator RAHLF2, de forma mais detalhada.

Figura 55 - Detalhes do DGGE (DNA ribossomal 16S - *primer*: Nielsen *et al.*, 1999) das amostras obtidas do reator RAHLF2 nas diferentes condições de alimentação: (a) comparação das amostras obtidas da alimentação com benzeno e *m*-xileno, (b) comparação das amostras obtidas da alimentação com tolueno e etilbenzeno, (c) comparação das amostras obtidas da alimentação com *o*-xileno, *m*-xileno e *p*-xileno. Gradiente de concentração do gel (40% a 60%)

Padrões de bandas semelhantes foram observados nas amostras referentes às alimentações com benzeno e *m*-xileno (Figura 55a) e, tolueno e etilbenzeno (Figura 55b). Nestas duas últimas condições, observou-se uma diferenciação entre as amostras, apenas em relação à intensidade das bandas.

Esperava-se que um único padrão de bandas fosse obtido para as alimentações com *o*-xileno, *m*-xileno e *p*-xileno, uma vez que estes compostos são isômeros. No entanto, padrões de bandas diferenciados foram produzidos para as amostras referentes às estas alimentações (Figura 55c).

O padrão de banda observado na amostra referente à alimentação com BTEX apresentou menor número de bandas do que os observados para as outras condições de alimentação (Figura 54). Uma explicação para a menor representatividade populacional nesta condição, seria a alta concentração de BTEX utilizada (32,9 mg/L) e ao pouco tempo destinado à operação do reator, dificultando a adaptação de determinadas populações a estas condições.

Conclui-se destas análises que diferentes padrões de bandas foram obtidos para as diferentes condições de alimentação, demonstrando que, embora o inóculo utilizado para colonizar o reator RAHLF2 tenha sido o mesmo para todas condições de alimentações, a presença dos diferentes compostos levou ao desenvolvimento de comunidades específicas para hidrocarbonetos específicos. Portanto, o desenvolvimento de comunidades específicas pode estar relacionado à produção de diferentes intermediários, gerados a partir da degradação de cada um destes compostos, favorecendo o desenvolvimento de diferentes comunidades. Deve-se considerar também que, a remoção do meio suporte, juntamente com os baixos períodos de operação com os hidrocarbonetos, pode ter dificultado a formação de comunidades estáveis no biofilme. Neste ponto de vista, somente as comunidades observadas nas alimentações com etilbenzeno e tolueno, nas quais o reator foi operado durante 118 dias e 51 dias, respectivamente, representariam comunidades realmente estabilizadas e adaptadas às condições impostas ao reator, enquanto que, nas outras condições, as populações estariam ainda em fase de adaptação, e por isso altas flutuações destas comunidades foram observadas no DGGE.

Os inóculos utilizados para formar os biofilmes nos reatores RAHLF1 e RAHLF2 foram, também, submetidos às análises de DGGE. Os padrões de bandas obtidos para os dois inóculos foram idênticos, mostrando que os biofilmes dos reatores RAHLF1 e RAHLF2 foram formados por uma mesma comunidade de microrganismos (Figura 56). Pelo menos 5 bandas foram observadas para a amostra dos inóculos, sendo 2 destas bandas mais expressivas (banda B e Banda C). Possivelmente, estas duas bandas estejam relacionadas às duas morfologias predominantes observadas nos exames microscópicos (bacilos e cocos).

Figura 56 - DGGE (DNA ribossomal 16S - *primer*: Nielsen *et al.*, 1999) mostrando os padrões de bandas obtidos a partir das amostras dos inóculos dos reatores RAHLF1 e RAHLF2

A Figura 57 apresenta o DGGE das amostras dos inóculos, juntamente com as amostras obtidas dos biofilmes dos reatores. Comparando-se os padrões de bandas obtidos das amostras dos inóculos com aqueles obtidos dos biofilmes (demarcado com um retângulo), observou-se que, embora a comunidade original presente no inóculo tenha permanecido no biofilme, outras comunidades estiveram presentes somente no interior do reator. É possível que as condições em que o inóculo foi desenvolvido, (crescimento planctônico, em atmosfera desnitrificante) não tenha sido favorável ao desenvolvimento de determinadas comunidades, que vieram a se desenvolver somente no interior do reator. No entanto, pode-se considerar que estas populações sejam organismos contaminantes, uma vez que no RAHLF fica impossível se manter as condições estéreis. As análises de DGGE realizadas para as amostras obtidas dos reatores RAHLF1 e RAHLF2 demonstraram que as comunidades presentes no RAHLF1 mostraram-se bastante estáveis, permanecendo, praticamente, as mesmas, em todas as condições de alimentação as quais o reator foi submetido. De forma contrária, diferentes comunidades foram observadas, para as diferentes condições de alimentação do reator RAHLF2, mostrando a instabilidade destas populações.

Figura 57- DGGE (DNA ribossomal 16S - primer: Nielsen *et al.*, 1999) das amostras obtidas em diferentes condições de alimentação dos reatores RAHLF1 (a) e RAHLF2 (b). **IR1**= amostra do inóculo utilizado para formar o biofilme do RAHLF1. **IR2** = amostra do inóculo utilizado para formar o biofilme do RAHLF2. **Bz** – alimentação com benzeno, **Tol** - alimentação com tolueno, **ox** - alimentação com *o*-xileno. **mx** - alimentação com *m*-xileno. **px** - alimentação com *p*-xileno. **etilbz** - alimentação com etilbenzeno, **btex** - alimentação com BTEX. O retângulo destaca o padrão de bandas observado tanto no inóculo, como no biofilme. Gradiente de desnaturação do gel 40% a 60%.

7.1 Sequenciamento

Com o objetivo de se obter mais informações sobre quais eram as principais populações presentes nas amostras dos inóculos e dos biofilmes, procedeu-se o sequenciamento das amostras utilizando-se o *primer* descrito por So e Young (1999). O predomínio de espécies do gênero *Paracoccus* foi observado em todas as amostras sequenciadas. Para as amostras obtidas do biofilme do reator RAHLF2, alimentado com etilbenzeno, dos 80 clones sequenciados, 77 clones apresentaram seqüências descritas para espécies do gênero *Paracoccus*. Os outros três clones apresentaram associação parcial com as seqüências de *Variovorax* sp., *Pseudomonas stutzeri* e *Xanthomonas* sp.

Nas amostras obtidas do RAHLF1, alimentado com benzeno, foram sequenciados 33 clones, dos quais 23 seqüências apresentaram similaridade com o gênero *Paracoccus* e dez seqüências apresentaram similaridade com bactérias não cultiváveis. No sequenciamento referente aos inóculos, todos os clones sequenciados (16 clones do inóculo do RAHLF1 e 22 clones do RAHLF2) apresentaram seqüências que foram associadas ao gênero *Paracoccus*.

O *primer* (So e Young, 1999) utilizado no sequenciamento foi escolhido por ser específico e capaz de gerar seqüências de DNA grande o suficiente (880pb) para serem comparadas com o banco eletrônico de dados NCBI BLAST. No entanto, a diversidade de populações observada no DGGE não foi refletida no sequenciamento, ou seja, o sequenciamento apontava o predomínio de apenas um grupo de microrganismos (*Paracoccus*) nas amostras. Suspeitando-se que a complexidade da microbiota tanto dos inóculos, quanto dos biofilmes, pudesse ser mais complexa do que o resultado do sequenciamento apontava, avaliou-se a necessidade de utilizar um segundo *primer* (Muyzer, et al., 1993) para confirmar os resultados obtidos.

A Figura 58 apresenta o DGGE das amostras referentes ao reator RAHLF1, gerado a partir da utilização do *primer* descrito por Muyzer et al. (1993). Para se conhecer quais eram os grupos de microrganismos mais representativos no DGGE, as bandas mais expressivas foram recortadas do gel e, posteriormente, sequenciadas.

Figura 58 - DGGE (DNA ribossomal 16S - Muyzer et al 1993) das amostras obtidas do RAHLF1. As setas indicam as bandas que foram recortadas e seqüenciadas.

Os resultados dos sequenciamentos revelaram a presença de uma comunidade microbiana formada por espécies do gênero *Paracoccus* (bandas 1 e 2), *Bacteroides* (banda 3) e *Pseudomonas* (banda 4).

O gênero *Paracoccus* é membro de uma parte do subgrupo α -*Proteobacteria* conhecido como grupo *Rhodobacter*. Atualmente, abrange 17 espécies que são encontradas em diferentes ambientes (Bartosik et al., 2002).

Morfológicamente, todas as espécies são cocoides apresentando de 0,4 a 0,9 μm de diâmetro, ou cocobacilos com até 2,0 μm de comprimento, e ocorrem como células únicas, pares ou em aglomerados. Todas as espécies são Gram-negativas e a maioria não apresentam motilidade. Todas as espécies crescem aerobicamente numa variedade ampla de substratos orgânicos e algumas são capazes de crescimento anaeróbio com nitrato ou óxido nítrico como aceptor de elétrons, gerando nitrogênio gasoso como produto final. Nenhuma espécie de *Paracoccus* apresenta capacidade de crescer fermentativamente e a maioria pode acumular poli-hidroxibutirato sob condições de crescimento onde haja suficiente fonte de carbono.

Algumas dessas espécies, incluindo *Paracoccus alcaliphilus*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Paracoccus aminophilus*, e *Paracoccus kondratievae*, foram isoladas do solo. Outras espécies foram isoladas de ambientes contendo variedade de compostos tóxicos; *Paracoccus methylutens* foi isolado de lençol freático contaminado com diclorometano (Doronina et al., 1998); *Paracoccus pantotrophus* foi isolado de reator

de leite fluidificado desnitrificante (Roberston e Kuenen, 1983); *Paracoccus alkenifer* foi isolado de biofiltro usado no tratamento de resíduos gasosos de criação (Lipski et al., 1998) e *Paracoccus kocurii* foi isolado de água residuária indústria de semicondutor (Ohara et al., 1990). Algumas espécies de *Paracoccus denitrificans*, que foi a primeira espécie do gênero *Paracoccus* isolada, também tem sido encontrada em diferentes habitats, incluindo esgoto, lodo, solo e estrume de cavalo e de vaca. Duas espécies (*P. seriniphilus* e *P. zeaxanthinifaciens*) foram isoladas, recentemente, de ambiente marinho (Pukall et al., 2003). As bactérias do gênero *Paracoccus* estão entre os microrganismos mais metabolicamente versáteis. Estes organismos são quimiorganotróficos (utilizando ampla variedade de compostos orgânicos, incluindo aqueles potencialmente poluentes, como acetona) ou facultativos quimiolitotróficos (utilizando compostos reduzidos de enxofre, tais como sulfeto, tiosulfato, tiocianato, ou hidrogênio molecular, como fonte de energia). A utilização de compostos como formiato, metanol, trimetilamina, tetrametilamonía é freqüentemente observada em condições anaeróbias (respiração pelo nitrato) (Baj, 2000). Assim, por causa da sua versatilidade metabólica, as espécies do gênero *Paracoccus* têm importante papel no ciclo de elementos no ambiente.

Parece que todas estas características fisiológicas sugerem a possibilidade do gênero *Paracoccus* ser utilizado em sistemas de biorremediação, particularmente porque muitas espécies podem utilizar nitrato como aceptor de elétrons. Uma dessas espécies é *Paracoccus solventivorans*, isolada em área de uma companhia de gás natural, que demonstrou capacidade de degradar acetona e reduzindo nitrato (Siller et al., 1996).

Além da versatilidade metabólica descrita anteriormente, deve-se destacar, também, a presença de megaplasmídio (Bartosik et al., 2002). Megaplasmídios são um grupo de plasmídios variando em tamanho de 100 a 1700 kb, que podem ser encontrados em microrganismos da subdivisão α *Proteobacteria*. Estes megaplasmídios carregam genes envolvidos em diversas vias catabólicas, determinando o potencial de biorremediação de seus hospedeiros. No trabalho de Bartosik et al. (2002), o sistema de replicação do megaplasmídio pTAV3 de aproximadamente 400kb, identificado em *Paracoccus versutus*, foi caracterizado pelos autores, confirmando o potencial deste microrganismo para degradação de compostos tóxicos.

Espécies do gênero *Pseudomonas* apresentam função importante na decomposição, biodegradação e ciclos do carbono e nitrogênio. Membros do gênero *Pseudomonas* são conhecidos por suas habilidades em degradar centenas de compostos orgânicos diferentes, incluindo inseticidas, pesticidas, herbicidas, plásticos e

hidrocarbonetos do petróleo. A associação de espécies de *Pseudomonas* com a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos, como os BTEX, já está bem estabelecida. A biodegradação de benzeno, tolueno etilbenzeno e *o*-xileno, por co-cultura de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*, foi verificada em biorreator com leito de fibras (Shim e Yang, 1999). Duas espécies de *Pseudomonas* redutoras de nitrato (*Pseudomonas* sp.BS2201, e BS2203) isoladas de solo contaminado por petróleo foram capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo (Grishchenkov et al., 2000). Espécies de *Pseudomonas* foram, também, objetos de estudos sobre a cinética de crescimento destes microrganismos, em presença de BTEX (Alagappan e Cowan, 2004), interações entre os BTEX (Hamed, et al., 2003), e em estudo sobre a dinâmica da comunidade bacteriana, em presença destes compostos. (Kaplan e Kitts, 2004).

Entre as características básicas de todas espécies de *Pseudomonas* estão a morfologia de bacilos Gram-negativos que podem ser retos ou moderadamente curvos, podendo ocorrer sozinhos, em pares ou em cadeias, com presença de flagelo polar e ausência de esporos. Membros deste gênero são caracterizados por apresentarem propriedades fisiológicas tais como nutrição quimiorganotrófica, metabolismo respiratório, ausência de fermentação e capacidade de crescer em ampla variedade de substratos orgânicos, com exceção de compostos contendo 1 carbono.

Anteriormente, o gênero *Pseudomonas* incluía tanto espécies aeróbias estritas quanto as espécies anaeróbias, mas, atualmente, apenas as espécies aeróbias obrigatórias são consideradas componentes legítimas deste grupo. No entanto, funções anaeróbias não são totalmente excluídas e podem ser demonstradas por alguns membros, sob certas condições como é o caso, por exemplo, das espécies *Pseudomonas denitrificans* e *Pseudomonas aeruginosa*, capazes de crescer realizando o metabolismo desnitrificante.

Uma das bandas seqüenciadas foi associada ao gênero *Bacteroides*. Espécies desse gênero se caracterizam como bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos e anaeróbios obrigatórios. São organismos sacarolíticos e geram elevados níveis de acetato e succinato como produto final do metabolismo.

Embora a representatividade de *Bacteroides* sp. tenha sido expressiva no DGGE (Figura 58, banda C) das amostras obtidas do biofilme, apenas uma banda fraca, correspondente a este gênero, foi observada na amostra do inóculo. A baixa representatividade de *Bacteroides* no inóculo pode estar associada presença de oxigênio durante o cultivo celular. Nesta condição, o excesso de oxigênio foi removido, através da troca da atmosfera gasosa para N₂, para deixar o meio com potencial de oxi-redução

favorável ao crescimento de bactérias desnitrificantes. No entanto, mesmo em presença de baixas concentrações de oxigênio o crescimento de *Bacteróides* sp. pode ter sido prejudicado, uma vez que estas espécies são anaeróbias obrigatórias. Assim, a atmosfera anóxica, durante o crescimento em suspensão, favoreceu o desenvolvimento das populações desnitrificantes, fazendo com que as populações de *Bacteroides* fossem inibidas tanto pela condição anóxica, quanto pelo alto crescimento das bactérias desnitrificantes. Por outro lado, no interior do reator, com consumo do aceptor final de elétrons (nitrato), pelas células desnitrificantes, zonas anaeróbias se formam proporcionando condições ótimas para o desenvolvimento de organismos anaeróbios, o que justifica a alta expressão da banda referente a este grupo no DGGE (banda c).

Não há relatos da associação de espécies do gênero *Bacteroides* com a biodegradação de compostos tóxicos. No entanto, a presença destes microrganismos nas amostras justifica-se, uma vez que, o inóculo utilizado para gerar o biofilme foi proveniente de um abatedouro de aves e, algumas espécies de *Bacteroides* já foram isoladas do trato intestinal de animais, incluindo uma espécie, denominada *Bacteroides ovatus*-like, que foi isolada de ceco de galinha (ZHU et al., 2002). Desta forma, estes microrganismos poderiam estar envolvidos, não propriamente, com a utilização dos BTEX, mas com seus subprodutos ou outra fonte orgânica, como o etanol e ácido acético presente no meio. Estes mesmos subprodutos podem ser a fonte orgânica utilizada por outras comunidades observadas no DGGE das amostras (bandas menos expressivas), uma vez que o etanol e ácido acético, podem ser facilmente utilizado, por diversos grupos microbianos.

8. CONCLUSÕES

A principal conclusão deste estudo foi a constatação da remoção de etanol, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo, com biofilme formado por cultura desnitrificante purificada.

Este estudo permitiu também as seguintes conclusões:

- ✓ O lodo granular de reator UASB, usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, pode ser utilizado como fonte de inóculo alternativa para bactérias desnitrificantes associadas à degradação de BTEX.
- ✓ O meio de cultivo descrito por Dofing et al, sem a solução redutora, mostrou-se adequado para o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes.
- ✓ As culturas purificadas em presença de benzeno e etilbenzeno apresentaram predomínio de células Gram-negativas com morfologia de cocos (diplococos/cocobacilos), com versatilidade metabólica na utilização de diferentes substratos, sob condições desnitrificantes e baixo tempo de geração, à semelhança do observado para outras culturas desnitrificantes degradadoras de BTEX.
- ✓ A cultura desnitrificante purificada demonstrou ser capaz de remover benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo, em todas as condições de alimentação as quais os sistemas foram submetidos.
- ✓ Tanto o reator cujo biofilme foi continuamente submetido aos hidrocarbonetos (manutenção do meio suporte), quanto aquele onde o biofilme foi submetido a apenas um hidrocarboneto específico (retirada do meio suporte) apresentou elevadas eficiências de remoção de BTEX.
- ✓ Os compostos de BTEX foram eficientemente removidos, mesmo em curtos tempos de operação dos reatores (15 dias), indicando a possibilidade da utilização deste sistema, imobilizado com a cultura purificada, e operado nas

mesmas condições determinadas neste estudo, para a biorremediação rápida de locais contaminados com BTEX. Devido aos residuais de BTEX, ácido acético e nitrato presente no efluente dos reatores operados nestas condições, sugere-se o pós-tratamento do efluente gerado para promover a remoção destes residuais.

- ✓ Os reatores operados por períodos mais longos apresentaram-se mais estáveis e com leve tendência de melhores eficiências de remoção da matéria orgânica (DQO) e nitrato.

Em relação aos limites máximos de BTEX permitidos pelo Ministério da Saúde, conclui-se que:

- ✓ Em nenhuma das condições de alimentação com benzeno, as concentrações residuais no efluente enquadraram-se no limite máximo permitido para este composto.
- ✓ De forma geral tolueno, etilbenzeno e xilenos foram removidos gerando residuais dentro dos limites máximos permitidos para estes compostos, seja no reator RAHLF1 ou RAHLF2.

As análises moleculares permitiram as seguintes conclusões:

- ✓ No reator onde o biofilme foi mantido durante todo o período de operação, a comunidade apresentou-se bastante estável, com manutenção de um mesmo padrão de bandas em todas condições de alimentação as quais o reator foi submetido, exceto durante a alimentação com benzeno, onde determinadas populações foram eliminadas. Este resultado confirma a toxicidade do benzeno para as células.
- ✓ No reator onde o meio suporte foi removido de acordo com a alimentação com hidrocarboneto específico, observou-se que diferentes condições de alimentação produziram diferentes padrões de bandas. O desenvolvimento de comunidades específicas pode estar relacionado à produção de diferentes intermediários, gerados a partir da degradação de cada um destes compostos, favorecendo o desenvolvimento de diferentes comunidades. Deve-se considerar também que, a remoção do meio suporte, juntamente com os baixos períodos de operação com os hidrocarbonetos, pode ter dificultado a formação de comunidades estáveis no biofilme.

- ✓ Os padrões de bandas obtidos para as duas culturas utilizadas como inóculos nos reatores foram idênticos, mostrando que uma mesma comunidade de microrganismos formou os biofilmes dos reatores RAHLF1 e RAHLF2.
- ✓ Tanto o biofilme do reator RAHLF1, quanto do reator RAHLF2, apresentou maior diversidade na comunidade microbiana, quando comparada à diversidade da comunidade dos inóculos. Este resultado sugere que as condições oferecidas pelo RAHLF foram mais adequadas ao desenvolvimento destas populações, ou ainda, a possível contaminação no reator, uma vez que neste sistema fica impossível se manter as condições estéreis.

O sequenciamento das amostras revelou que:

- ✓ O biofilme do RAHLF1 apresentou populações predominantes formadas por espécies de *Paracoccus*, *Pseudomonas* e *Bacteróides*.
- ✓ O biofilme do RAHLF2, alimentado com etilbenzeno, foi formado por espécies dos gêneros: *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Variovorax*

9 - SUGESTÕES

- ✓ Utilizar a metodologia do carbono marcado para comprovar a biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos pelas células do biofilme.
- ✓ Utilizar sistemas de pós-tratamento para remover os residuais dos compostos que não se enquadram nos limites permitidos pelo órgão de controle ambiental
- ✓ Utilizar os resultados obtidos neste estudo para investigar a cinética de degradação dos BTEX.
- ✓ Utilizar o RAHLF imobilizado com a cultura purificada, em escala real, visando a remoção de BTEX de locais contaminados por estes compostos.
- ✓ Utilizar as técnicas de clonagem e sequenciamento para identificação das amostras a nível de espécie.
- ✓ Realizar o sequenciamento das amostras do reator RAHLF2, submetido a alimentação com tolueno, etilbenzeno, e xilenos

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGAPPAN, G. and COWAN, R.M. (2004). Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida* F1 growing on benzene and toluene. *Chemosphere*. v.54, p.1255-1265.

ALVAREZ P. J. J.; VOGEL T. M. (1991). Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and environmental Microbiology*. v.57, n.10, p.2981-2985.

ANDERS, H. J; KAETZKE, A; KAMPFER, P.; LUDWIG, W. and FUCHS, G. (1995). Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying Pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. Nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *Internacional. Journal of. Systematic Bacteriology*, v.40, p.327-333.

ARAUJO, J.C; TÉRAN F.C; OLIVEIRA, R.A; NOUR, E.A.A; MONTENEGRO, M.A.P; CAMPOS, J.R. and VAZOLLER, R.F. (2003). Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *Journal of electron microscopy*. v.52, p.429-433.

BAJ, J. (2000). Taxonomy of the genus *Paracoccus*. *Acta Microbiol. Pol.* v.49, p.185–200

BALL, H.A; JOHNSON, H.A; REINHARD, M.; SPORMANN, AM. (1996). Initial Reactions in Anaerobic Ethylbenzene Oxidation by a Denitrifying Bacterium, Strain EB1. *Journal of Bacteriology*. v.178, p. 5755-5761.

BARTOSIK, D.; BAJ, J.; BARTOSIK, A.A. (2002). Characterization of the replicator region of megaplasmid pTAV3 of *Paracoccus versutus* and search for plasmid-encoded traits. *Microbiology*. v.148, p. 871-881.

BICALHO, K.V. (1997). *Dissolução de gasolina em presença de água e etanol*. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Civil, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1997

BOLAÑOS, M. L.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2001). Phenol Degradation in Horizontal-flow Anaerobic Immobilized Biomass (HAIB) Reactor Under Mesophilic Conditions. *Water Science Technology*, v.44, p.167-174.

BORDEN, R.C.; LEE, M.D.; THOMAS, J.M.; BEDIENT, P.B.; WARD, C.H. and WILSON, J.T. (1986). Transport of dissolved hydrocarbons influenced by oxygen limited biodegradation: Field application. *Water Resource Research.*, v.22. p.1983-1990

BROWN, C.M. (1988). Nitrate metabolism by aquatic bacteria. In: *Methods in aquatic bacteriology*. John Wiley & Sons, Ltda.

BURLAND, S.M. and EDWARDS, E.A. (1999). Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n.2, p. 529-533.

CALLADO, N.H. (2001). *Reatores seqüenciais em batelada em sistema anaeróbio / aeróbio tratando esgoto sanitário sintético*. 221p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2001.

CAPUANO, R.N. and JOHNSON, M.A. (1996). Geochemical reactions during biodegradation/vapor-extraction remediation of petroleum contamination in the vadoze zone. *Ground water*. v.34, p.31-40.

CATTONY, E.B.M (2005). *Remoção de etanol, benzeno e tolueno em reator anaeróbio horizontal de leito fixo na presença de sulfato*. 121p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005

CATTONY, E.B.M.; CHINALIA, F.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; VARESCHE, M.B.A. (2003). Remoção de tolueno em reator anaeróbio de leito fixo na presença de sulfato. In: ANAIS DO III SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE, APRIMORAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE REATORES ANAERÓBIOS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS. 2003, São Carlos, UFSCAR. p.1-10

CHIU, Y.C. and CHUNG, M.S. (2003). Determination of optimal DQO/nitrate ratio for biological denitrification. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v.51, p. 43-49.

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

COHEN, Y. (2001). Biofiltration the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a mini review. *Bioresourse Technology*, v.77, p.257-274.

CORSEUIL, H. X. and MARINS, M.D.M. (1997). Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: o problema é grave? *Engenharia Sanitária e Ambiental*. v.2, p.50-54

CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J. (1996). Implications of the presence of ethanol on intrinsic bioremediation of BTEX plumes in Brasil: *Hazardous Waste and Hazardous Materials*. v.13, n.2, p.213-221.

DAMIANOVIC, M.H.RZ. (1997) *Degradação de Pentaclorofenol, (Pcp) em Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo (RAHLF)*. 176p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 1997.

DILLALO, R.; ALBERTSON, O.E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal of Water Pollution Control federation*. v. 33, n.4, p.356-365.

DOLFING, J.; ZEYER, P.; BINDER-EICHER, P.; SCHWARZENBACH, R. P. (1990). Isolation and Characterization of a Bacterium that Mineralizes Toluene in the Absence of Molecular Oxygen. *Archieves of Microbiology*, v.154, p. 336-341.

DOMINGUES, M.R. (2001) *Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada de leito fixo, sob condições termofílicas*. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2001

DORONINA, N.V.; TROTSENKO, Y.AV.; KRAUSOWA, I. and N. E. SUZINA. (1998). *Paracoccus methylutens* sp. nov.—a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. *Systematic Applied Microbiology*. v. 21, p.230–236.

DSM – Scientific services of culture collections. (1991). Curso ministrado na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas – SP

EDWARDS, E.A., and GRBIC-GALIC, D. (1992). Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. v.58, n.8, p.2663-2666.

ÉLMEN J.; PAN, W.; LEUNG S, Y.; MAGYAROSY, A.; KEASLING, J. D. (1997). Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a ground water aquifer. *Biotechnology and bioengineering*. v.55, n.1, p. 82-90.

EVANS, P.J.; MANG D, T.; KIM, K.S.; YOUNG, L.Y. (1991). Anaerobic degradation of toluene by a denitryfyng bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. v.57, n.4, p.1139-1145.

FERNANDES, B.S. (2005). *Influencia da origem do inóculo e da adição de sulfato sobre a degradação de BTX em reator anaeróbio horizontal de leito fixo*. 78p. Tese (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos .2005.

FRIES, M.R.; ZHOU, J.; CHEE-SANFORD, J. and Tiedje, J. M. (1994). Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology*. v.60, p.2802-2810.

GAMBLE, T.N.; BETLACH, H.R.; and TIEDJE, J. M. (1977). Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Applied and Environmental Microbiology*. v.33, p.926-939.

GIBSON, D.T.; and SUBRAMANIAN, V. (1984). Microbial degradatin of aromatic hydrocarbons. p.181-252. In: GIBSON, D.T. (ed), Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker, Inc., New York.

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

GRISHCHENKOV. V.G.; TOWNSEND, R.T.; McDONALD, T.J.; AUTENRIETH, R.L.; BONNER, J.S. and Boronin, A.M. (2000). Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process of Biochemistry*.v.35, p.889-896.

HAMED, T.A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, T. and MEHMETOGLU, U. (2003). Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene and phenol mixtures. *Process of Biochemistry*. v.39, p.27-35.

HEIDER, J.; SPORMANN, A. M.; BELLER, H. R.; WIDDEL, F.(1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. ***FEMS Microbiology Review***. v.22, p.459-473.

HESS, A.; ZARDA, B.; HAHN, D.; HANER, A.; STAX, D.; HÖHENER, P.; ZEYER, J. (1997). *In Situ* Analysis of Denitrifying Toluene and *m*-Xylene Degrading Bacteria in a Diesel Fuel- contaminated Laboratory Aquifer Column. ***Applied and Environmental Microbiology***. v. 63, p. 2136-2141.

HOUBRON, E.; TORRIJOS, M.; CAPDEVILLE, B. (1999). An alternative use of biogas applied in water denitrification. ***Water Science and Technology***. v.40, n.8, p.115-122.

HUNT, J. R.; SITTAR, N.; and UDELL, K. S. (1988). Non-aqueous phase liquid transport and cleanup: 1-Analysis of mechanisms. ***Water Resources Research***. v.24, p.1247-1258.

KAO, C. and BORDEN, R. C. (1997). Site specific variability in BTEX biodegradation under denitrifying conditions. ***Ground water***. v.35, n.2, p.305-311.

KAPLAN, C.W. and KITTS C.L. (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. ***Applied and Environmental Microbiology***. v.70, p.1777-1786.

KAZUMI, J.; CALDWELL, M. E.; SUFLITA, J. M.; LOVELY, D.R.; and YOUNG, L. Y. (1997). Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. ***Environmental Science Technology***. v.31, p.813-818.

KUHN, E. P.; ZEYER, J.; EICHER, P.; and SCHWARZENBACH, R. P. (1988). Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. ***Applied and Environmental Microbiology***. v.54, n.2, p.490-496.

KÜHNER, S.; WÖHLBRAND, L.; FRITZ, I.; WRUCK, W.; HULTSCHIG, P.; KUBE, M.; REINHARDT, R. and RABUS, R. (2005). Substrate-dependent regulation of anaerobic degradation pathways for toluene and ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. ***Journal of Bacteriology***. v.187, p. 1493-1503.

LIPSKI, A.; REICHERT, K.; REUTER, B.; SPRÖER, C.; and ALTENDORF, K. (1998). Identification of bacterial isolates from biofilters as *Paracoccus alkenifer* sp. nov. and *Paracoccus solventivorans* with emended description of *Paracoccus solventivorans*. ***International Journal of Systematic Bacteriology***. v.48, p.529–536.

LITTLE, J.C.; DAISEY, J.M.; and NAZAROFF, W.W. (1992). Transport of subsurface contaminants into buildings. *Environmental Science and Technology*. v. 26, p.2058-2065

LOVLEY, D.R.; COATES, J.D.; WOODWARD, J.C. and PHILLIPS, E.J.P. (1995). Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*. v.61, n.3, p.953-958.

LOVLEY, D.R; WOODWARD, J.C. and CHAPELLE, F.H. (1996). Rapid anaerobic benzene degradation with a variety chelated Fe(III)forms. *Applied and Environmental Microbiology*. v.62, p.288-291.

MACKAY, D. and CHERRY, J.A. (1989). Groundwater contamination: Pump and treat remediation. *Environmental Science and Technology*. v. 23, p.7-13.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (1997). Brock. Biology of microorganisms. 8th Prentice Hall, Inc USA

MORAES, E.M; ADORNO, M.A.T; ZAIAT, M; FORESTI, E. (2000). Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: VI OFICINA E SEMINÁRIO LATINOAMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, 2000. Recife, PE. Anais, v.2, p. 235-238.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. (1993). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR - amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. v.59, n.3, p. 695 - 700.

NAKAGAWA, T.; SATO, S.; YAMAMOTO, Y.; FUKUI, M. (2002). Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. *Water Research*. v.36, p.2813-2823.

NARDI, I. R. (2002) *Degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2002.

NIELSEN, T. A.; LIU, W-T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D. A. (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*. v.65, p.1251-1258.

OHARA, M.; KATAYAMA, Y.; TSUZAKI, M.; NAKAMOTO, S. and KURAISHI, H.. (1990). *Paracoccus kocurii* sp. nov., a tetramethylammonium-assimilating bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.40, p.292–296.

OLIVEIRA, S.V.W.B.; MORAES, E.M.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B.A.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. (2004). Formaldehyde Degradation in an Anaerobic Packed-Bed Biorreactor. *Water Research*, v.38, p.1685-1694.

PHELPS, C.D. and YOUNG, L.Y. (2001). Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Advances in Agronomy*.v.70, p.329-357.

PHELPS, C.D.; YOUNG, L.Y. (1999). Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation*. v.10, p.15-25.

POCHANA, K.; KELLER, J. (1999). Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water science technology*. v.39, n.6, p.61-68.

PUKALL, R.; LAROCHE, M.; KROPPESTEDT, R. M.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E. and ULBER, R.. (2003). *Paracoccus seriniphilus* sp. nov., an L-serine-dehydrataseproducing coccus isolated from the marine bryozoan *Bugula plumosa*. *International Journal of Systematic Evol. Microbiology*. v.53, p.443–447.

RABUS, R. and WIDDEL, F. (1995). Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives Microbiology*.v.163, p. 96-103.

RAJAPAKSE, J. P.; SCUTT, J. E. (1999). Denitrification with natural gas and various new growth media. *Water Research*.v. 33,n.18, p.3723-3734.

REINHARD, M.; GOODMAN, N. L. (1984). Occurrence and distribution of organic chemicals in two landfill leachate plumes. *Environmental Science and Technology*. v.18, n.12, p.953-961.

RIBEIRO, R. (2005). *Recuperação de águas contaminadas com gasolina utilizando reatores de leito fixo*. 186p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos.2005.

RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D. (1990). Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*. v.56, p.3565-3575.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal of water Pollution Control Federation*, v.58, n.5, p.406-411.

ROBERSTON, L. A. and KUENEN, J. G. (1983) *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultative anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. *Journal of Gen. Microbiology*. v.129, p.2847–2855.

SAKAMOTO, I. K. (2001). *Comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica de fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)*. 162p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2001.

SANTOS, S. G. (2004). *Utilização de metanol, etanol e metano como doadores de elétrons para a desnitrificação*. 144p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2004

SCHNEIDER, M. R.; CORSEUIL, H. X.; ROSÁRIO, M. (2005). Weathering of ethanol-blended gasoline in aquifers - a field experiment. In: The International Conference on Environmental Science and Technology. New Orleans. The International Conference on Environmental Science and Technology. New Orleans : National Academy of Science, 2005. v. 1. p. 100-106.

SCHOCHER, R. J.; SEYFRIED, B.; VAZQUEZ, F. and ZEYER, J. (1991). Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*. v.157, p. 7-12.

SHAPLEIGH, J.P. (2000) The Denitrifying Prokaryotes Release 3.1. The Prokaryotes, a evolving electronic resource for the microbiological community.

SHIEH, W. K.; MULCAHY, L. T. (1986). Experimental determination of intrinsic kinetic coefficients for biological wastewater treatment systems. *Water science technology*. v.18, p.1-10.

SHIM, H.; YANG, S. T. (1999). Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and *o*-xylene by coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescence* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Journal of Biotechnology*. v.67, p.9-12.

SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UE, M.; HIRAISHI, A.; and KATO, N. (2000). Isolation and Characterization of a New Denitrifying Spirillum Capable of Anaerobic Degradation of Phenol. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, p.1286–1291

SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UENISHI, H.; UCHIHASHI, Y.; HIRAISHI, A.; YUKAWA, H.; YURIMOTO, H.; and KATO, N. (2004). Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Applied and Environmental Microbiology*. v.70, p. 1385-1392.

SILLER, H.; RAINEY, F.A.; STACKEBRANDT, E. and WINTER, J.(1996). Isolation and characterization of a new gram-negative, acetone-degrading, nitrate-reducing bacterium from soil, *Paracoccus solventivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.46, p.1125–1130.

SILVA, R.L.B.; BARRA, C.M.; MONTEIRO, T.C.N.; BRILHANTE, O.M. (2002). Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno da. Saúde Pública*. v.18, n.6, p.1599-1607.

SO, C.M. and YOUNG, L.Y. (1999). Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*. v.65, n.7, p.2060-2976

SONG, B.; YOUNG, L.Y.; PALLERONI, N.J. (1998). Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.48, p.889-894.

SONG, B; HAGGBLOM, M.M.; ZHOU, J.; TIEDJE, J.M.; PALLERONI, N.J. (1999). Taxonomic Characterization of Denitrifying Bacteria that Degrade Aromatic Compounds and Description of *Azoarcus toluvarans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.49, p. 1129-1140.

SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; PHILIPP, B. and SCHINK, B. (1998). *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium *International Journal of Systematic Bacteriology*. vol. 48, p. 953–956

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998). 19th ed. Amer. Public Health Assoc., Americ. Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington, D.C., 1134p.

STONER, D.L. (1994). Hazardous organic waste amenable to biological treatment, 1-25. In: Stoner D. L. (ed). Biotechnology for the treatment of hazardous waste. Lewis Publishers. Boca Raton.

TIEDJE, J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Zehnder, J. B. (editor). John Wiley & Sons, New York.

TOUZEL, J.P.; and ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*. v.16, p.241-245.

VARESCHE, M.B.A. (1997). *Estudo com Bacterias Fototróficas Anoxigênicas: Enriquecimento, Isolamento, Caracterização Nutricional e Cinética de Crescimento*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1997.

VAZOLLER, R.F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operando com vinhaça sob condições termofílicas*. 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1995.

YOSHINARI, T.; KNOWLES, R. (1976). Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemistry and Biophysics Research Community*. v.69, p. 705-10.

ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; FORESTI, E. (1997). Spatial and temporal variations in monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Water Research*. v,31, p. 1760-1766.

ZEHNDER, A.J.B. (1988). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, Inc.

ZEYER and KEARNEY (1982). Microbial degradation of *para*-anilina as sole carbon and nitrogen source. *Pestic. Biochem. Fisiol.*, v.17, p.215-223

ZHOU, J.; FRIES, M. R.; CHEE-SANFORD, J. C. and TIEDJE, J. M. (1995). Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus toluliticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.45, n.3, p.500-506.

Zhu, X.; ZHONG, T.; PANDYA, Y. and JOERGER, R.D. (2002). 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*.v.68, p.124–137.

ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester. *Methanothrix* sp. as an important acetoclastic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology*. v.47, p.796-807.

APÊNDICE A - Curvas de calibração

CURVAS PARA A BENZENO

Curva baixa para benzeno - concentração 0,1 a 2,0 mg/L

conc	area benzeno	área Clorobenz	FR	média FR
0,1	684	28547	0,02	0,02
0,1	759	39746	0,02	
0,5	3575	39935	0,09	0,09
0,5	3520	37764	0,09	
1,0	6354	34883	0,18	0,18
1,0	6300	34140	0,18	

Conc	média FR
0,1	0,02
0,52	0,09
1	0,18

Curva alta para benzeno - concentração 2,0 a 30,0 mg/l

conc	area Benzeno	area Clbz	FR	média FR
2,0	12705	36145	0,35	0,34
2,0	13184	39401	0,33	
5,0	31604	42772	0,74	0,73
5,0	27745	38180	0,73	
10,0	68637	35298	1,94	1,89
10,0	62235	34014	1,83	
20,0	118394	28526	4,15	4,28
20,0	143233	32458	4,41	
30,0	183503	31327	5,86	6,31
30,0	181380	26810	6,77	

Concentração Média do FR

2,0	0,34
5,0	0,73
10,0	1,89
20,0	4,28
30,0	6,3

CURVAS PARA TOLUENO

143

Curva baixa para tolueno - concentração 0,1 a 2,0 mg/l

concentração	area Tolueno	area Clorobenz	Fator Resposta	média FR
0,1	361	19646	0,018	0,018
0,1	116,6	6347	0,018	
0,5	1804	19027	0,095	0,1825
0,5	816	5191	0,157	
1,0	3445	10979	0,314	0,3125
1,0	1999	6436	0,311	
2,0	4266	6214	0,687	0,6595
2,0	6730	10650	0,632	

concentração	média FR
0,1	0,0
0,5	0,2
1,0	0,3
2,0	0,7

Curva alta para tolueno - concentração 2,0 a 30,0 mg/l

concentração	area Tolueno	area Clorobenz	Fator Resposta	média FR
2,0	1995	20794	0,096	0,0895
2,0	1895	22767	0,083	
5,0	12165	18067	0,673	0,6795
5,0	13519	19704	0,686	
10,0	34986	22607	1,548	1,6125
10,0	8651	5160	1,677	
20,0	79343	27230	2,914	2,938
20,0	51099	17254	2,962	
30,0	73910	14339	5,154	5,1625
30,0	93156	18014	5,171	

concentração	média FR
2,0	0,1
5,0	0,7
10,0	1,6
20,0	2,9
30,0	5,2

CURVAS PARA ETILBENZENO

144

Curva baixa para etilbenzeno - concentração 0,1 a 2,0 mg/L

concentração	area etilbz	area Clorobz	Fator Resposta	Média FR
0,1	582	9985	0,06	0,06
0,1	761	13009	0,06	
0,5	1077	13326	0,08	0,08
0,5	806	10106	0,08	
1,0	1931	11285	0,17	0,17
1,0	2260	13587	0,17	
2,0	3781	9394	0,40	0,40

concentração	média FR
0,5	0,1
1,0	0,2
2,0	0,4

Curva alta para etilbenzeno - concentração de 2,0 A 30,0 mg/l

concentração	area etilbz	area Clorobz	Fator Resposta	Média FR
2,0	1166	7790	0,1	0,2
2,0	1546	8058	0,2	
5,0	3906	8809	0,4	0,5
5,0	3123	6421	0,5	
10,0	4568	4856	0,9	0,9
10,0	7413	8783	0,8	
20,0	15717	9124	1,7	1,7
20,0	14893	8827	1,7	
30,0	21340	7993	2,7	2,7
30,0	18967	7125	2,7	

concentração	Média do FR
2,0	0,2
5,0	0,5
10,0	0,9
20,0	1,7
30,0	2,7

CURVAS orto-XILENO

145

Curva baixa para o-xileno - concentração de 0,1 a 2,0 mg/l

concentração	area O-xileno	area Clorobenzen	Fator Resposta	média FR
0,1	1304	32263	0,04	0,04
0,1	1417	35707	0,04	
0,5	3004	37739	0,08	0,08
0,5	2602	34420	0,08	
1,0	5154	34198	0,15	0,15
1,0	5207	35125	0,15	
2,0	30508	8665	0,28	0,29
2,0	32403	9624	0,30	

concentração	média FR
0,1	0,04
0,5	0,08
1	0,15
2	0,29

Curva alta para o-xileno - concentração de 2,0 A 30,0 mg/l

concentração	area O-xileno	area Clorobenz	Fator Resposta	média FR
2,0	30508	8665	0,28	0,29
2,0	32403	9624	0,30	
5,0	23232	32849	0,71	0,74
5,0	29642	38546	0,77	
10,0	49950	34691	1,44	1,49
10,0	44662	29097	1,53	
20,0	99836	30599	3,26	3,24
20,0	108917	33879	3,21	
30,0	140028	30011	4,67	4,62
30,0	138947	30393	4,57	

concentração	Média do FR
2,0	0,3
5,0	0,7
10,0	1,5
20,0	3,2
30,0	4,6

Curva baixa para m-xileno - concentração 0,1 a 2,0 mg/L

concentração	area m-xileno	Área Clorobz	Fator Resposta	média FR
0,1	1342	39614	0,034	0,03
0,1	1584	67150	0,024	
0,5	2890	34407	0,084	0,08
0,5	3458	41434	0,083	
1,0	4539	30188	0,150	0,15
1,0	4616	32447	0,142	
2,0	30839	103687	0,297	0,31
2,0	9677	30851	0,314	

concentração média FR

0,1 0,0
0,5 0,1
1,0 0,2
2,1 0,3

Curva alta para m- xileno - Concentração de 2,0 A 30,0 mg/l

concentração	area m-xileno	Área Clorobz	Fator Resposta	média FR
2,0	13413	83045	0,162	0,14
2,0	3583	30932	0,116	
5,0	20788	57992	0,358	0,36
5,0	11061	31368	0,353	
10,0	19267	25484	0,756	0,70
10,0	17051	26279	0,649	
20,0	46411	27135	1,710	1,75
20,0	48779	27161	1,796	
30,0	256730	100661	2,550	2,52
30,0	89299	35745	2,498	

concentração Média do FR

2,0 0,1
5,0 0,4
10,0 0,7
20,0 1,8
30,0 2,5

CURVA *para*-XILENO

147

Curva baixa p-xileno - concentração 0,1 a 2,0 mg/L

concentração	area p-xileno	ea Clorobenzer	Fator Resposta	média FR
0,1 a	484	20216	0,02	0,02
0,1 b	425	18270	0,02	
0,5 a	1918	15842	0,12	0,11
0,5 b	3034	29926	0,10	
1,0 A	5530	19249	0,29	0,29
1,0 B	6176	21586	0,29	
2,0 A	8190	14728	0,56	0,53
2,0 B	9165	18074	0,51	

concentração	média FR
0,1	0,0
0,5	0,1
1,0	0,3
2,0	0,5

Curva alta p-xileno - Concentração de 5,0 a 30,0 mg/l

concentração	area p-xileno	area Clorobz	Fator Resposta	média FR
2,0	8190	14728	0,56	0,53
2,0	9165	18074	0,51	
5,0	22306	20603	1,08	1,07
5,0	25187	23713	1,06	
10,0	43023	17235	2,50	2,47
10,0	63666	26108	2,44	
20,0	111782	20076	5,57	5,60
20,0	112677	20028	5,63	
30,0	242490	26829	9,04	9,20
30,0	125531	13412	9,36	

concentração	Média do FR
5,0	1,1
10,0	2,5
20,0	5,6
30,0	9,2

CURVAS

149

concentração FR Benzeno

0,2	0,07
0,5	0,09
1,0	0,25
4,0	1,58
6,0	2,2

concentração FR Tolueno

0,2	0,13
0,5	0,12
1,0	0,25
4,0	1,21
6,0	1,62

concentração FR Etilbenzeno

0,2	0,03
0,5	0,09
1,0	0,24
4,0	0,87
6,0	1,21

concentração FR mp-xilenos

0,4	0,06
1,0	0,17
2,0	0,41
8,0	1,66
12,0	2,29

concentração FR o-xileno

0,2	0,03
0,5	0,08
1,0	0,17
4,0	0,63
6,0	0,87

CURVAS PARA BTEX-concentração 0,2- 6,0 mg/L (cada tóxico)

148

áreas

conc	clorobz	benzeno	tolueno	etilbz	mp-xileno	o-xileno
0,2	14326	1045	1814	421	896	345
0,2	17478	1091	2177	552	1154	462
0,5	36830	3465	5012	3485	6556	2901
0,5	34391	3055	3862	3029	5620	2538
1	6760	1830	1822	1812	2923	1178
1	10858	2402	2525	2284	4183	1757
2	24518	11828	11773	9815	20157	7769
2	24640	11581	12360	10587	20885	8484
4	16878	21191	19087	15607	29742	11300
4	6907	13143	8887	5638	10700	4031
6	5283	14988	9575	6412	12173	4593
6	17045	27375	24318	20405	38756	14702

Fator Resposta

Conc	FR benzeno	FR tolueno	FR etilbenz	FR mp-xileno	FR -xileno
0,2	0,07	0,13	0,03	0,06	0,02
0,2	0,06	0,12	0,03	0,07	0,03
média	0,07	0,13	0,03	0,06	0,03
0,5	0,09	0,14	0,09	0,18	0,08
0,5	0,09	0,11	0,09	0,16	0,07
média	0,09	0,12	0,09	0,17	0,08
1	0,27	0,27	0,27	0,43	0,17
1	0,22	0,23	0,21	0,39	0,16
média	0,25	0,25	0,24	0,41	0,17
2	0,48	0,48	0,40	0,82	0,32
2	0,47	0,50	0,43	0,85	0,34
média	0,48	0,49	0,41	0,83	0,33
4	1,26	1,13	0,92	1,76	0,67
4	1,90	1,29	0,82	1,55	0,58
média	1,58	1,21	0,87	1,66	0,63
6	2,84	1,81	1,21	2,30	0,87
6	1,61	1,43	1,20	2,27	0,86
média	2,22	1,62	1,21	2,29	0,87

Curva de calibração para Nitrato (N-NO_3^-)

abs220-2*abs275	concentração N-NO3_
0,249333	1,1
0,223333	1,0
0,205667	0,9
0,186333	0,8
0,155	0,7
0,136667	0,6
0,117333	0,5
0,093333	0,4
0,067	0,3
0,044333	0,2
0,022	0,1
0,025333	0,09
0,021667	0,08

Curva para nitrito N-NO2-

Concentração N-NO_2^-	Absorbância média
0,01	0,037
0,02	0,077
0,06	0,234
0,12	0,451
0,24	0,8425
0,48	1,7755

Curva de calibração para amônia - Metodologia FIA

N-NH ₄ ⁺ mg/L	absorbância	absorbância	abs média
10	0,106	0,106	0,106
25	0,29	0,287	0,2885
50	0,551	0,553	0,552
75	0,767	0,785	0,776
100	0,975	0,971	0,973
125	1,137	1,119	1,128

Curva de calibração para óxido nitroso (N₂O)

Valores obtidos por cromatografia gasosa.

Volume de gás injetado (μl)	Volume de N ₂ O (μl)	Média do volume de N ₂ O (μl)	Volume N ₂ O (μmol)	Áreas cromatográficas	Média das áreas
10	6,8	6,9	0,262	8322	8658,667
	6,9			8344	
	7,1			9310	
15	11,8	11,00	0,417	12692	16947
	11,8			19240	
	9,4			18918	
20	15,2	15,2	0,577	21149	20751,67
	15,4			21263	
	15,0			19843	
25	18,0	19,2	0,729	30150	32829,00
	19,3			32039	
	20,3			36298	
40	33,7	32,8	1,245	45517	45602,33
	32,6			45881	
	32,2			45409	
60	43,1	45,4	1,723	59383	64972,33
	43,3			62703	
	49,8			72831	
80	69,0	67,5	2,561	98027	97829,67
	65,3			93947	
	68,2			101515

CURVA PARA ETANOL

153

conc (mg/L)	área	fator resposta
7,9	1,206	6,553
39,5	4,834	8,171
79	13,208	5,981
474	104,06	4,555
632	124,69	5,069

CURVA PARA ÁCIDO ACÉTICO

conc (mg/L)	área	fator resposta
6	0,91943	6,526
12	1,031	11,643
24	2,131	11,26
48	4,085	11,749
96	7,992	12,012
192	16,553	11,599
348	33,607	10,355

APÊNDICE B - Medidas das concentrações de nitrato - ensaios enriquecimento

Ensaio em aproximadamente 100 horas

Tempo(h)	Reatores com meio Zinder				Reatores com meio Dolfig			
	Z1	Z2	Z3	média	D1	D2	D3	média
0	178,4	151,3	157,6	162,4	218,4	244,3	212,4	225,0
10	143,5	146,1	155,7	148,4	202,9	212	186,5	200,5
20	152	140,5	140,1	144,2	212	195,6	233,9	213,8
30	121,5	126	123,8	123,8	194,3	197,3	229,2	206,9
40	128,6	123,8	131,6	128,0	156,4	180,5	200,3	179,1
50	124,5	111,1	121,9	119,2	141,3	158,5	198,2	166,0
60	118,6	110	113,4	114,0	98,2	117,6	115	110,3
70	114,8	102,6	96,3	104,6	79,6	83,5	74	79,0
80	111,1	93,7	16,8	73,9	71,9	56,4	44,7	57,7
90	105,2	87,7	16,8	69,9	66,3	45,6	43	51,6
100	26,4	41,7	0	22,7	58,1	43	35,2	45,4
110	4,8	2,6	0	2,5	27,5	43,9	38,7	36,7
120	4,1	1,9	0	2,0				

Ensaio em aproximadamente 14 horas

Tempo (h)	Reatores com meio Zinder				Reatores com meio Dolfig			
	Z1	Z2	Z3	média	D1	D2	D3	média
0	150,5	146,1	142,7	146,4	150,5	147,9	143,1	147,2
2	145,3	146,1	146,8	146,1	152,2	150,1	155,3	152,5
4	155	137,9	142,3	145,1	142	137,5	128,6	136,0
6	142,3	120,4	129,3	130,7	128,6	128,2	94,1	117,0
8	114,5	80,7	112,6	102,6	103	104,5	63,2	90,2
10	90	27,2	42	53,1	61,4	45	23,8	43,4
12	17,5	5,2	36,8	19,8	0,8	0	0	0,3
14	2,7	1,5	0,8	1,7				

APÊNDICE C - Ensaio do bloqueio pelo acetileno.

Concentração de óxido nítrico no headspace dos reatores batelada

área	x (umol)	headspace	µg de N-N2O	mg de N-N2O/L
Reator1				
7513	0,19	185,94	5206,34	5,21
18764	0,48	483,37	13534,47	13,53
31533	0,82	820,94	22986,23	22,99
48518	1,27	1269,95	35558,73	35,56
90179	2,37	2371,31	66396,71	66,40
81921	2,15	2153,00	60284,04	60,28
Reator2				
21848	0,56	564,90	15817,28	15,82
37347	0,97	974,64	27289,83	27,29
60993	1,60	1599,75	44792,88	44,79
97036	2,55	2552,58	71472,34	71,47
105274	2,77	2770,36	77570,21	77,57
Reator3				
14385	0,37	367,61	10293,08	10,29
28561	0,74	742,37	20786,32	20,79
49091	1,29	1285,10	35982,88	35,98
82132	2,16	2158,58	60440,22	60,44
107795	2,84	2837,01	79436,28	79,44
84710	2,23	2226,73	62348,49	62,35
Reator4				
6903	0,17	169,81	4754,81	4,75
14014	0,36	357,80	10018,46	10,02
27820	0,72	722,78	20237,83	20,24
53945	1,41	1413,42	39575,86	39,58
86926	2,29	2285,31	63988,80	63,99
95850	2,52	2521,23	70594,45	70,59

APÊNDICE D - Medida da concentração de amônia

Ensaio para verificar a concentração de amônia no lodo

Quadro 5 - Concentração de amônia no lodo (inóculo)

	Valor medido na titulação	Concentração (mg/L)
Meio de cultivo	2,17	27,1
Lodo lavado	0,34	255,4
Lodo sem lavar	0,56	551,0

OBS: valor da titulação do branco: 0,15 mL

Quadro 6 - Concentração de amônia inicial e final no ensaio em batelada

Reator	N-NH ₄ ⁺ inicial	N-NH ₄ ⁺ final	Normalidade = 0,096 Diluição = 10 Valor do branco = 0,15
Reator 1	0,56	Erro na destilação	
Reator 2	0,60	0,31	
média	0,58		

$$\text{N-NH}_4^+ = \frac{(\text{Vol. titulado} - \text{Vol. titulação do branco}) \times \text{Normalidade do ácido} \times 14000}{\text{Vol da amostra destilada (mL)}}$$

$$\text{N-NH}_4^+ \text{ INICIAL} = \frac{(0,58 - 0,15) \times 0,096 \times 14000}{100} \times 10 = \mathbf{57,8 \text{ mg/L}}$$

$$\text{N-NH}_4^+ \text{ FINAL} = \frac{(0,31 - 0,15) \times 0,096 \times 14000}{100} \times 10 = \mathbf{21,5 \text{ mg/L}}$$

APÊNDICE E - Valores das absorvâncias medidas nos ensaios de caracterização nutricional, das culturas purificadas em presença de benzeno e etilbenzeno, sob condições desnitrificantes e fermentativas.

Quadro 7 - Absorvâncias medidas nos ensaios de caracterização nutricional

Substratos	Cultura isolada em benzeno		Cultura isolada em etilbenzeno	
	Absorvância sob condição Desnitrificante	Fermentativa	Absorvância sob condição Desnitrificante	Fermentativa
inóculo	0,025	0,03	0,021	0,021
etanol	0,354	0,112	0,138	0,124
lactato	0,604	0,101	0,289	0,182
glicose	0,432	0,084	0,247	0,147
propionato	0,336	0,108	0,137	0,093
butirato	0,107	0,058	0,098	0,088
piruvato	0,179	0,128	0,066	0,053
benzeno	0,296	0,105	0,212	0,139
tolueno	0,248	0,07	0,248	0,157
etilbenzeno	0,289	0,087	0,258	0,172
p-xileno	0,216	0,067	0,125	0,09
acetato	0,221	0,099	0,04	0,041
benzoato	0,053	0,041	0,082	0,085
fenol	0,018	0,021	0,02	0,026
metanol	0,027	0,022	0,014	0,021

<0,035 não ocorreu crescimento; 0,036 – 0,20 crescimento moderado; 0,201 – 0,400 crescimento bom; $\geq 0,401$ crescimento ótimo.

APÊNDICE F - Medidas da absorvância e concentração de nitrato e etanol nos ensaios de crescimento das culturas purificadas. Reatores batelada

Quadro 8 - Valores das absorvâncias, concentrações de nitrato e etanol, medidos no ensaio de crescimento celular, para a cultura isolada em presença de etilbenzeno.

	Cultura purificada em etilbenzeno								
	Nitrato (N-NO ₃ ⁻)			Absorvância			Etanol		
Tempo (h)	Reator 1	Reator 2	Média	Reator 1	Reator 2	Média	Reator 1	Reator 2	Média
0	347,4	360,7	354,0	0,011	0,016	0,01	339,8	256,0	297,9
11,5	367,4	389,7	378,5	0,103	0,143	0,12			
14,5	293,9	316,1	304,9	0,129	0,174	0,15			
18,5	222,9	256	239,3	0,171	0,234	0,20	214,4	178,1	196,2
22,5	191,9	215,9	203,6	0,215	0,271	0,24			
27	206,9	222,5	214,7	0,301	0,358	0,33			
33	215,9	262,7	239,3	0,456	0,443	0,45			
40,5	175,8	235	205,4	0,472	0,473	0,47			
60	157,9	149	153,5	0,491	0,425	0,46			
90	97,1	98,8	97,9	0,368	0,365	0,37			
112	83,3	91,7	87,5						
136	65,9	74,8	70,3						
200	60,6	57	58,8				0,0	0,0	

Quadro 9 - Valores das absorvâncias, concentrações de nitrato (N-NO₃⁻) e etanol, medidos no ensaio de crescimento celular, para a cultura isolada em presença de benzeno, nos reatores batelada contendo benzeno, nitrato e etanol.

	Cultura purificada em benzeno								
	Nitrato (N-NO ₃ ⁻)			Absorvância			Etanol		
Tempo (h)	Rator1	Reator 2	Média	Reator 1	Reator 2	Média	Reator 1	Reator 2	Média
0	380,8	405,3	393,0	0,029	0,022	0,0255	326,0	265,7	295,8
11,5	432,0	376,3	404,2	0,168	0,112	0,14			
14,5	298,3	329,5	313,9	0,21	0,155	0,1825			
18,5	307,3	329,5	318,4	0,277	0,18	0,2285	189,9	128,7	159,3
22,5	247,1	269	258,1	0,287	0,231	0,259			
27	218,1	233,7	225,9	0,407	0,308	0,3575			
33	211,4	242,6	227,0	0,467	0,443	0,455			
40,5	182,5	220,3	201,4	0,556	0,48	0,518			
60	135,7	153,5	144,6	0,448	0,452	0,45			
90	108,7	123,8	116,2	0,387	0,352	0,3695			
112	96,2	117,1	106,7						
136	69,8	101,6	85,5						
200	47,6	97,1	72,4				1,8	1,7	1,8

APÊNDICE G - Valores das absorvâncias medidas para obtenção do tempo de geração das culturas purificadas. Reatores em batelada

Quadro 10 - Valores das absorvâncias e concentrações de nitrato (N-NO_3^-), medidos no ensaio de crescimento celular, para a cultura isolada em presença de etilbenzeno nos reatores contendo somente nitrato e etanol.

Tempo (h)	Célula isolada em etilbenzeno					
	Nitrato (N-NO_3^-)			Absorvância		
	Reator 1	Reator 2	Média	Reator 1	Reator 2	Média
0	360,7	340,7	350,7	0,015	0,028	0,02
11,5	418,7	412,0	415,3	0,101	0,105	0,10
14,5	327,3	307,3	317,3	0,141	0,145	0,14
18,5	351,8	345,1	348,5	0,164	0,167	0,17
22,5	282,8	267,1	274,9	0,22	0,225	0,22
27	262,7	236,0	249,4	0,28	0,293	0,29
33	253,8	258,2	256,0	0,421	0,39	0,41
40,5	242,6	229,3	236,0	0,47	0,476	0,47
60	140,2	137,9	139,0	0,451	0,551	0,50
90	52,5	44,1	48,3	0,41	0,445	0,43
112	37,8	33,8	35,8			
136	27,6	20,9	24,2			
200	12,4	10,2	11,3			

Quadro 11 - Valores das absorvâncias e concentrações de nitrato (N-NO_3^-), medidos no ensaio de crescimento celular, para a cultura isolada em presença de benzeno nos reatores contendo somente nitrato e etanol.

Tempo (h)	Cultura isolada em benzeno					
	Nitrato (N-NO_3^-)			Absorvância		
	Reator 1	Reator 2	Média	Reator 1	Reator 2	Média
0	374,1	383	378,6	0,02	0,03	0,03
11,5	391,9	360,7	376,3	0,13	0,14	0,14
14,5	309,5	316,2	312,8	0,17	0,20	0,19
18,5	296,1	311,7	303,9	0,26	0,30	0,28
22,5	236,0	238,2	237,1	0,35	0,34	0,35
27	220,4	218,1	219,2	0,43	0,44	0,43
33	229,3	229,3	229,3	0,43	0,45	0,44
40,5	202,5	213,7	208,1	0,50	0,49	0,49
60	126,8	166,9	146,8	0,48	0,50	0,49
90	72,6	117,2	94,9	0,39	0,44	0,42
112	67,7	114,9	91,3			
136	34,7	106	70,4			
200	30,3	97,1	63,7			

APÊNDICE H - Medidas dos parâmetros de monitoramento dos reatores RAHLF1 e RAHLF2.

Quadro 12 - Valores das medidas dos parâmetros de monitoramento obtidos no afluente e efluente do reator RAHLF1, durante o período de operação.

Alimentação	DQO _B AF	DQO _B EF	DQO _F AF	DQO _F EF	NO ₃ ⁻ AF	NO ₃ ⁻ EF	NO ₂ ⁻ AF	NO ₂ ⁻ EF	SSV AF	SSV EF	pH AF	pH EF
Benzeno	908,0	115,7	918,0	98,2	352,6	119,4	0,08	62,2	11,0	35,0	7,3	9,1
Benzeno	977,7	259,1	911,9	162,5	352,6	121,6	0,0	82,2	13,0	35,0	7,2	9,2
Benzeno	877,5	138,2	823,5	10,7	348,5	57,9	0,08	43,9	10,0	46,0	7,0	9,5
Benzeno	915,1	131,2	905,7	86,6	364,1	14,0	0,04	4,6	12,0	33,0	7,0	9,6
Benzeno	898,6	107,2	854,0	73,7	355,2	74,4	-	-	10,0	40,0	7,3	7,3
Benzeno	869,0	92,4	858,7	67,8	367,4	6,4	0,0	0,08	10,0	45,0	7,2	8,7
Benzeno	877,5	97,1	886,9	80,7	358,5	1,7	0,08	38,5	11,0	28,0	7,0	9,0
Benzeno	879,9	59,6	849,3	31,4	351,8	0,85	0,034	0,01	15,0	22,0	-	-
Benzeno	1258,1	102,6	1213,8	86,2	581,0	564,0	0,115	48,0	10,0	52,0	7,5	8,5
Benzeno	1237,7	64,1	1220,2	53,6	554,6	30,2	0,5	13,5	47,0	58,0	-	-
Tolueno	1328,2	96,2	1264,1	72,9	502,2	20,0	11,0	0,0	61,0	18,0	7,1	9,0
Tolueno	1281,6	48,1	1136,0	35,0	622,5	61,0	-	-	37,0	46,0	7,5	9,7
Tolueno	1316,5	48,1	1246,6	29,2	539,0	0,0	-	-	62,0	70,0	7,0	8,6
Tolueno	914,8	10,3	838,9	0,0	526,7	127,0	0,0	5,5	21,0	65,0	-	-
m-xileno	1322,3	65,6	1269,9	46,7	479,9	62,0	-	-	58,0	47,0	7,2	9,0
m-xileno	1287,4	65,6	1264,1	53,9	527,8	4,0	-	-	45,0	68,0	7,2	8,9
m-xileno	1252,4	300,0	1252,4	262,1	439,0	5,0	0,0	0,0	40,0	50,0	-	-
Etilbenzeno	1526,2	278,2	1561,1	228,7	497,8	5,1	-	-	21,0	27,0	7,5	8,9
Etilbenzeno	1526,2	272,3	1532,0	300,6	538,9	4,4	-	-	70,0	78,0	7,4	8,9
Etilbenzeno	1438,8	305,8	1409,7	273,8	507,8	2,8	0,0	0,0	62,0	77,0	-	-
BTEX	1957,1	461,6	1782,4	419,4	475,5	4,9	-	-	35,0	47,0	7,7	9,0
BTEX	2027,0	603,5	1893,1	582,5	417,5	3,1	0,35	0,0	33,0	36,0	-	-

Quadro 13 - Valores das medidas dos parâmetros de monitoramento obtidos no afluente e efluente do reator RAHLF2, durante o período de operação.

Alimentação	DQO _B AF	DQO _B EF	DQO _F AF	DQO _F EF	NO ₃ ⁻ AF	NO ₃ ⁻ EF	NO ₂ ⁻ AF	NO ₂ ⁻ EF	SSV AF	SSV EF	pH AF	pH EF
Etilbenzeno	978,0	165,5	1073,0	125,5	329,5	60,6	0,08	12,7	19,0	5,0	7,3	8,7
Etilbenzeno	1031,3	219,8	1006,3	196,5	365,9	52,5	0,08	23,6	39,0	47,0	7,3	8,9
Etilbenzeno	955,0	129,6	915,1	84,2	325,8	167,2	0,08	21,4	19,0	43,0	7,0	8,7
Etilbenzeno	879,9	85,4	832,9	36,1	349,6	11,5	0,08	0,78	17,0	27,0	6,9	8,8
Etilbenzeno	882,2	74,8	929,2	70,1	377,4	14,9	0,06	8,3	7,0	18,0	7,2	9,4
Etilbenzeno	884,6	83,0	854,0	53,7	361,0	40,3	0,08	20,7	24,0	8,0	-	-
Etilbenzeno	851,7	94,8	854,0	20,8	357,4	32,0	0,0	0,08	16,0	57,0	7,2	8,2
Etilbenzeno	882,2	84,2	870,5	56,0	387,5	39,8	0,08	17,3	12,0	34,0	7,0	8,3
Etilbenzeno	832,9	51,4	809,4	42,0	355,2	8,0	0,06	5,5	24,0	35,0	-	-
Etilbenzeno	1253,4	56,0	1169,5	43,2	534,9	39,4	0,13	12,5	44,0	52,0	7,5	8,9
Etilbenzeno	1252,3	53,6	1205,7	38,5	547,9	15,5	0,5	2,2	24,0	40,0	-	-
Tolueno	1403,9	256,3	1222,3	182,1	624,8	219,0	-	-	10,0	60,0	7,4	8,9
Tolueno	1683,4	308,7	1328,2	118,0	545,7	12,9	-	-	16,0	42,0	7,0	8,3
Tolueno	891,3	203,9	710,8	179,2	534,5	103,1	0,0	79,2	29,0	46,0	-	-
Tolueno	1334,0	214,1	1351,4	171,9	496,6	7,7	-	-	-	-	7,2	9,3
Tolueno	1287,4	350,9	1194,2	307,2	473,3	6,8	-	-	-	-	7,2	9,1
Tolueno	1258,3	406,3	1240,8	345,1	451,4	6,1	0,0	0,0	49,0	54,0	-	-
m-xileno	1467,6	516,9	1444,9	345,1	510,0	7,5	-	-	80,0	86,0	7,5	9,7
m-xileno	1586,3	524,2	1566,9	537,3	542,3	8,0	-	-	55,0	100,0	7,2	8,7
m-xileno	1526,2	524,2	1473,7	413,6	534,5	39,6	0,0	0,0	55,0	100,0	-	-
m-xileno	1654,3	596,5	1619,3	521,9	417,5	4,3	0,12	0,0	117,0	22,0	-	-
Benzeno	1322,5	209,7	1270,0	128,2	524,5	11,5	0,02	0,0	26,0	66,0	-	-
Benzeno	1310,7	190,8	1322,3	142,8	510,0	2,0	0,0	0,0	4,0	7,0	-	-
o-xileno	1299,0	250,5	1258,5	163,2	516,7	11,5	0,03	0,0	24,0	34,0	-	-
p-xileno	1607,7	286,9	1648,5	208,3	510,0	28,2	0,0	0,2	22,0	25,0	-	-
BTEX	1596,8	257,4	1642,5	169,4	574,6	85,1	0,5	64,1	14,0	49,0	-	-

APÊNDICE I

Perfis de concentração dos hidrocarbonetos. Reatores RAHLF1 e RAHLF2

Perfil RAHLF1 - alimentação com tolueno

L/D	área Tolueno	área Clbz	FR	média FR	conc (mg/l)	curva
entrada	88566	18022	4,9	5,130	30,8	curva alta
entrada	140501	26284	5,3			
4	15971	10633	1,5	1,319	9,0	curva alta
4	23678	20854	1,1			
8	15341	14017	1,1	0,966	2,9	curva baixa
8	21823	26067	0,8			
12	11740	26305	0,4	0,444	1,4	curva baixa
12	11582	26252	0,4			
20	1739	26657	0,1	0,064	0,2	curva baixa
20	1591	25045	0,1			
saída	0	25756	0,0	0,000	0,0	curva baixa
saída	0	26286	0,0			

Perfil RAHLF 1 - alimentação com m-xileno

L/D	área m- xileno	área Clbz	F R	média FR	conc (mg/L)	curva
entrada	83388	30422	2,741	2,7	32,1	curva alta
entrada	68222	25219	2,705			
4	10276	33975	0,302	0,3	4,3	Curva baixa
4						
8	8109	32339	0,251	0,3	1,7	Curva baixa
8	8472	32695	0,259			
12	4395	31949	0,138	0,1	0,4	Curva baixa
12						
16	2628	32314	0,081	0,1	0,5	Curva baixa
16	2974	38395	0,077			
20	0	27341	0,000	0,02	0,0	Curva baixa
20	1179	37010	0,032			
saida	0	31833	0,000	0,0	0,0	Curva baixa
saida	0	32980	0,000			

Perfil RAHLF1 - alimentação com etilbenzeno

L/D	área etilbz	área Clbz	FR	média FR	conc (mg/L)	curva
entrada	21347	7260	2,94	2,94	33,3	curva alta
entrada	20829	7085	2,94			
4	6386	25598	0,25	0,28	2,9	curva alta
4	4350	14281	0,30			
8	5436	24724	0,22	0,23	2,3	curva alta
8	5860	24812	0,24			
12	8002	36299	0,22	0,20	1,1	curva baixa
12	5131	27284	0,19			
16	3229	26430	0,12	0,12	0,7	curva baixa
16	3960	31958	0,12			
saida	1175	20358	0,06	0,06	0,4	curva baixa
saida	1348	23961	0,06			

L/D		área clbz	área benzeno	área tolueno	área etilbz	área mp-xilenos	área o-xileno	total BTEX (mg/L)
entrada		34650,00	62309,00	48415,00	35594,00	49090,00	24083,00	
entrada		36677,00	62717,00	49857,00	37686,00	52106,00	25524,00	
	média	35663,50	62513,00	49136,00	36640,00	50598,00	24803,50	
	FR		1,75	1,38	1,03	1,42	0,70	
	conc		4,70	4,94	4,97	7,24	4,66	26,50
4		31137,00	16154,00	8727,00	4205,00	5273,00	2964,00	
4		31741,00	15316,00	8761,00	4242,00	5361,00	3020,00	
	média	31439,00	15735,00	8744,00	4223,50	5317,00	2992,00	
	FR		0,50	0,28	0,13	0,17	0,10	
	conc		1,47	0,92	0,62	0,86	0,56	4,42
8		15629,00	6346,00	3371,00	2196,00	2748,00	1822,00	
	FR		0,41	0,22	0,14	0,18	0,12	
	conc		1,22	0,70	0,65	0,89	0,70	4,16
12		23649,00	11196,00	4917,00	2005,00	2293,00	1096,00	
12		24447,00	11690,00	5094,00	2201,00	2303,00	1266,00	
	média	24048,00	11443,00	5005,50	2103,00	2298,00	1181,00	
	FR		0,48	0,21	0,09	0,10	0,05	
	conc		1,40	0,67	0,39	0,48	0,24	3,18
16		12745,00	3581,00	1376,00	287,00	0,00	141,00	
	FR		0,28	0,11	0,02	0,00	0,01	
	conc		0,90	0,30	0,07	0,00	0,00	1,28
20		17005,00	1044,00	848,00	199,00	0,00	0,00	
	FR		0,06	0,05	0,01	0,00	0,00	
	conc		0,33	0,09	0,02	0,00	0,00	0,45
saída		28603,00	914,00	1109,00	271,00	0,00	0,00	
	FR		0,03	0,04	0,01	0,00	0,00	
	conc		0,26	0,05	0,01	0,00	0,00	0,31

Perfil RAHLF2 - alimentação com benzeno

166

L/D	area benzeno	area Clbz	FR	média FR	conc (mg/L)	curva
entrada	96063	31487	3,1	3,07	15,06	curva alta
entrada	89867	29057	3,1			
4	45166	40153	1,1	1,27	6,83	curva alta
4	43107	30541	1,4			
8	40376	34070	1,2	1,21	6,58	curva alta
8	40694	32707	1,2			
12	28257	32135	0,9	0,83	4,82	curva alta
12	28597	36832	0,8			
16	13475	25830	0,5	0,49	3,27	curva alta
16	13685	30039	0,5			
20	10998	27053	0,4	0,38	2,77	curva alta
20	12097	34435	0,4			
saída	8905	34243	0,3	0,28	1,58	curva baixa
saída	9335	30640	0,3			

Perfil RAHLF 2 - alimentação com benzeno

L/D	area benzeno	area Clbz	FR	média FR	conc	curva
entrada	209084	23392	8,9	8,84	41,38	curva alta
	190805	21834	8,7			
4	105579	24354	4,3	4,12	19,84	curva alta
	105461	27038	3,9			
8	78188	24759	3,2	3,20	15,65	curva alta
	79440	24490	3,2			
12	60113	23612	2,5	2,50	12,47	curva alta
	57560	23360	2,5			
16	45349	33619	1,3	1,73	8,94	curva alta
	49350	23357	2,1			
20	34330	21771	1,6	1,48	7,82	curva alta
	37733	27102	1,4			
saída	20870	27257	0,8	0,74	4,40	curva alta
	20622	29207	0,7			

Perfil RAHLF 2 - alimentação com tolueno
167

L/D	area Toluenc	area Clbz	FR	média FR	conc (mg/l)	curva
entrada	26226	24309	1,1	1,088	7,6	curva alta
entrada	25055	22840	1,1			
4	9329	25427	0,4	0,387	1,2	curva baixa
4	9945	24393	0,4			
8	4395	21159	0,2	0,211	0,7	curva baixa
8	5408	25334	0,2			
12	2032	19921	0,10	0,100	0,3	curva baixa
12	2228	22507	0,10			
16	1082	25183	0,04	0,042	0,1	curva baixa
16	1270	31322	0,04			
20	0	25207	0,0	0,000	0,0	curva baixa
saída	0	27233	0,0	0,000	0,0	curva baixa
saída	0	21100	0,0			

Perfil RAHLF 2 - alimentação com tolueno

L/D	area tolueno	area Clbz	FR	média FR	conc (mg/L)	curva
entrada	149893	30000	4,996	4,61	27,8	curva alta
	87886	20828	4,220			
4	18538	29827	0,622	0,62	1,9	curva baixa
	20841	33744	0,618	0,31		
8	10218	33076	0,309	0,35	1,1	curva baixa
	12548	31852	0,394			
12	9034	26970	0,335	0,37	1,1	curva baixa
	17945	45199	0,397			
16	13393	61922	0,216	0,22	0,7	curva baixa
	8056	37253	0,216			
20	4102	33591	0,122	0,13	0,4	curva baixa
	6332	48303	0,131			
saida	3430	32778	0,105	0,10	0,3	curva baixa
	3352	32877	0,102			

Perfil RAHLF 2 - alimentação com m-xileno
168

L/D	area m-xileno	area Clbz	FR	média FR	conc (mg/L)	curva
entrada	19267	25484	0,76	0,75	9,46	curva alta
4	11607	37628	0,31	0,31	2,11	curva baixa
8	3019	24480	0,12	0,13	0,81	curva baixa
8	3961	31210	0,13			
12	3340	27341	0,12	0,12	0,79	curva baixa
12	3068	24643	0,12			
16	2738	22858	0,12	0,12	0,80	curva baixa
16	3337	26099	0,13			
saída	2890	34407	0,084	0,08	0,51	curva baixa
saída	3458	41434	0,083			

Perfil RAHLF 2 - alimentação com m-xileno

L/D	area m- xileno	area Clbz	FR	Média FR	conc (mg/L)	curva
entrada	67674	28533	2,4	2,4	28,4	curva alta
entrada	74715	30692	2,4			
4	8477	22174	0,382	0,4	5,3	Curva alta
4	11676	29977	0,389			
8	22908	40336	0,568	0,6	3,9	Curva baixa
8	15892	28521	0,557			
12	10863	25083	0,433	0,4	3,0	Curva baixa
12	9283	20638	0,450			
16	10868	34342	0,316	0,3	2,0	Curva baixa
16	8409	29840	0,282			
20	4676	29924	0,156	0,2	1,0	Curva baixa
20	3411	21751	0,157			
saída	1725	33316	0,052	0,05	0,3	Curva baixa
saída	2136	39892	0,054			

Perfil RAHLF 2 - alimentação com p-xileno

169

L/D	area p-xileno	area Clbz	FR	média FR	conc (mg/L)	curva
entrada	156298	17037	9,2	9,74	32,09	curva alta
entrada	250279	24284	10,3			
4	26412	29599	0,9	0,91	4,95	curva alta
4	19656	21353	0,9			
8	13138	18350	0,72	0,68	4,26	curva alta
8	14906	22995	0,65			
12	6401	22047	0,29	0,29	1,08	curva baixa
12	6634	23567	0,28			
16	1046	26004	0,04	0,04	0,19	curva baixa
16	1083	23180	0,05			
20	196	26473	0,01	0,01	0,06	curva baixa
20	201	29048	0,01			
saída	226	22248	0,01	0,02	0,09	curva baixa
saída	669	31133	0,02			

Perfil RAHLF 2 - alimentação com o-xileno

L/D	area O-xileno	area Clbz	FR	média FR	conc (mg/L)	curva
entrada	99913	21571	4,6	4,45	28,52	curva alta
entrada	74270	17372	4,3			
4	32685	36428	0,9	0,90	5,89	curva alta
4	31381	35049	0,9			
8	17336	19725	0,88	0,86	5,67	curva alta
8	30909	36673	0,84			
12	29856	38026	0,79	0,76	5,00	curva alta
12	29269	40335	0,73			
16	16333	36849	0,44	0,46	3,13	curva alta
16	19401	40242	0,48			
20	4106	26358	0,16	0,16	1,05	curva baixa
saída	9701	36582	0,27	0,26	1,81	curva baixa
saída	7271	28302	0,26			

Perfil RAHLF 2 - alimentação com BTEX

170

L/D	área clbz	área benzeno	área tolueno	área etilbz	área mp-xilenos	área o-xileno	total BTEX (mg/L)
entrada	24893,00	42601,00	34035,00	27321,00	53773,00	28496,00	
	28391,00	46049,00	37251,00	30330,00	59721,00	31187,00	
média	26642,00	44325,00	35643,00	28825,50	56747,00	29841,50	
FR		1,66	1,34	1,08	2,13	1,12	
conc		4,47	4,79	5,23	10,87	7,56	32,93
4	25184,00	22679,00	11377,00	5387,00	10438,00	6283,00	
4	29396,00	24616,00	12625,00	6090,00	11827,00	7074,00	
média	27290,00	23647,50	12001,00	5738,50	11132,50	6678,50	
FR		0,87	0,44	0,21	0,41	0,24	
conc		2,41	1,51	0,99	2,07	1,58	8,57
8	24606,00	16332,00	7584,00	3492,00	6779,00	4138,00	
8	26606,00	15550,00	7064,00	3173,00	6119,00	3709,00	
média	25606,00	15941,00	7324,00	3332,50	6449,00	3923,50	
FR		0,62	0,29	0,13	0,25	0,15	
conc		1,78	0,95	0,60	1,28	0,95	5,57
12	25971,00	17246,00	8622,00	4200,00	8307,00	5259,00	
12	27653,00	17126,00	8404,00	3972,00	7791,00	4851,00	
média	26812,00	17186,00	8513,00	4086,00	8049,00	5055,00	
FR		0,64	0,32	0,15	0,30	0,19	
conc		1,83	1,07	0,71	1,52	1,20	6,32
16	27041,00	16831,00	8209,00	4125,00	8708,00	5405,00	
16	26391,00	17835,00	8801,00	4419,00	9324,00	5757,00	
média	26716,00	17333,00	8505,00	4272,00	9016,00	5581,00	
FR		0,65	0,16	0,16	0,34	0,21	
conc		1,85	0,49	0,74	1,71	1,33	6,14
20	27660,00	10068,00	5746,00	2463,00	5331,00	3070,00	
20	28468,00	9661,00	5181,00	2223,00	4803,00	2793,00	
média	28064,00	9864,50	5463,50	2343,00	5067,00	2931,50	
FR		0,35	0,19	0,08	0,18	0,10	
conc		1,08	0,62	0,37	0,91	0,62	3,61
saída	27769,00	3405,00	1643,00	1050,00	2339,00	1168,00	
saída	25987,00	3398,00	1650,00	1064,00	2359,00	1212,00	
média	26878,00	3401,50	1646,50	1057,00	2349,00	1190,00	
conc		0,50	0,13	0,16	0,44	0,21	1,44

APÊNDICE J- Perfil espacial da concentração de amônia no RALHF

Quadro 14 - Valores das medidas de concentração de amônia avaliada ao longo dos reatores RAHLF 1 e RAHLF 2

Reator	Absorbância	Absorbância	Média	mg/L
RAHLF 1				
Entrada	0.081	0.079	0.08	6.69
4	0.025	0.023	0.024	-
8	0.018	0.016	0.017	-
12	0.013	0.015	0.014	-
16	0.018	0.017	0.0175	-
20	0.021	0.022	0.0215	-
Saída	0.02	0.018	0.019	-
RAHLF 2				
Entrada	0.084	0.081	0.0825	7.27
4	0.022	0.023	0.0225	-
8	0.009	0.009	0.009	-
12	0.011	0.011	0.011	-
16	0.013	0.015	0.014	-
20	0.015	0.014	0.0145	-
Saída	0.015	0.017	0.016	-

Equação da reta da curva de calibração utilizada: $y = 125,45x - 3,0762$ onde $R^2 = 0,9943$
e x = concentração em mg/L de NH_4^+

APÊNDICE K - Estimativa da biodegradação no RALHF

A análise de biodegradação do presente estudo foi estimada a partir dos valores de adsorção na espuma e na biopartícula, relatados por Nardi (2002). De acordo com este autor, os valores máximos de adsorção encontrados foram:

Quadro 15 - Valores da adsorção dos tóxicos na biopartícula e meio suporte calculados por Nardi (2002).

Composto	F_{sp}^{Max} ($\mu\text{mol/g}$ suporte)	R^2
Espuma de poliuretano		
Tolueno	35,18 $\pm$ 0,72	0,8891
Etilbenzeno	42,16 $\pm$ 0,36	0,9891
0-xileno	40,62 $\pm$ 0,40	0,9850
Benzeno	27,0	
Biopartícula		
Benzeno	12,81 $\pm$ 1,21	0,7285
Tolueno	16,93 $\pm$ 0,81	0,9185
Etilbenzeno	19,10 $\pm$ 0,80	0,9009
0-xileno	18,36 $\pm$ 0,79	0,8916

Com esses valores como base, efetuaram-se os cálculos a seguir, para estimar a biodegradação ocorrida nos reatores do presente estudo.

Valores da adsorção de cada tóxico, para as condições operacionais do reator **RAHLF1**, levando-se em conta os valores de adsorção no meio suporte e biopartícula do estudo de Nardi (2002).

$M_{mol} = F_{sp}^{Max} \cdot M_{esp} + M_{bio} \cdot STV$, onde:

M_{mol} = massa total do tóxico adsorvida na espuma e biopartícula (μmol)

F_{sp}^{Max} = capacidade de adsorção do tóxico na espuma de poliuretano ($\mu\text{mol/g}$) relatado por Nardi (2002)

M_{esp} = massa de espuma de poliuretano usada no reator (g).

M_{bio} = capacidade de adsorção do tóxico na biopartícula ($\mu\text{mol/g}$) relatado por Nardi

STV = massa referente aos sólidos totais voláteis (g) = 0,57 g/g espuma. Valor referente aos sólidos totais voláteis, obtidos ao final do período de operação do reator desnitrificante, ensaiado por Nardi (2002)

Então para cada tóxico tem-se:

$$M_{\text{mol (tolueno)}} = 35,18 \mu\text{mol/g} \cdot 25 \text{ g} + 16,93 \mu\text{mol/g} \cdot 0,57 \text{ g} = 889,15 \mu\text{mol}$$

$$1 \text{ mol de tolueno} \Rightarrow 92,14 \text{ g}$$

$$889,15 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \Rightarrow x \text{ onde } x = \mathbf{81,93 \text{ mg de tolueno.}}$$

$$M_{\text{mol (etilbenzeno)}} = 42,16 \mu\text{mol/g} \cdot 25 \text{ g} + 19,10 \mu\text{mol/g} \cdot 0,57 \text{ g} = 1064,89 \mu\text{mol}$$

$$1 \text{ mol de etilbenzeno} \Rightarrow 106,16 \text{ g}$$

$$1064,89 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \Rightarrow x \text{ onde } x = \mathbf{113,05 \text{ mg de etilbenzeno.}}$$

$$M_{\text{mol (m-xileno)}} = 40,62 \mu\text{mol/g} \cdot 25 \text{ g} + 18,36 \mu\text{mol/g} \cdot 0,57 \text{ g} = 1025,96 \mu\text{mol}$$

$$1 \text{ mol de o-xileno} \Rightarrow 106,16 \text{ g}$$

$$1025,96 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \Rightarrow x, \text{ onde } x = \mathbf{108,92 \text{ mg de o-xileno.}}$$

$$M_{\text{mol (benzeno)}} = 27,00 \mu\text{mol/g} \cdot 25 \text{ g} + 12,81 \mu\text{mol/g} \cdot 0,57 \text{ g} = 682,30 \mu\text{mol}$$

$$1 \text{ mol de benzeno} \Rightarrow 78,11 \text{ g}$$

$$682,30 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \Rightarrow x \text{ onde } x = \mathbf{53,29 \text{ mg de benzeno.}}$$

A seguir calculou-se o total de tóxico que passou pelo reator pelo equacionamento:

$$M = Q [C_0 - C_s] \tau, \text{ onde:}$$

M = quantidade de tóxico que passou pelo reator em (mg).

Q = vazão de operação do reator em (l/h).

C_0 = concentração do tóxico na entrada do reator em (mg/l).

C_s = concentração do tóxico na saída do reator em (mg/l).

τ = tempo de operação do reator em (h), para cada tóxico.

Quantificando-se os tóxicos estudados tem-se:

$$M_{\text{tolueno}} = 0,07 \text{ l/h} \cdot (30,8 - 0,1) \text{ mg/l} \cdot 1008 \text{ h} = 2166,19 \text{ mg}$$

$$M_{\text{etilbenzeno}} = 0,07 \text{ l/h} \cdot (33,3 - 0,4) \text{ mg/l} \cdot 360 \text{ h} = 829,08 \text{ mg}$$

$$M_{\text{m-xileno}} = 0,07 \text{ l/h} \cdot (32,1 - 0,1) \text{ mg/l} \cdot 360 \text{ h} = 806,4 \text{ mg}$$

$$M_{\text{benzeno}} = 0,07 \text{ l/h} \cdot (26,5 - 0,4) \text{ mg/l} \cdot 648 \text{ h} = 1183,89 \text{ mg}$$

$$M_{\text{benzeno}} = 0,07 \text{ l/h} \cdot (13,8 - 0,9) \text{ mg/l} \cdot 576 \text{ h} = 520,12 \text{ mg}$$

$$M_{\text{benzeno}} = 0,07 \text{ l/h} \cdot (15,4 - 0,1) \text{ mg/l} \cdot 1200 \text{ h} = 1285,2 \text{ mg}$$

$$M_{\text{total benzeno}} = 2989,2 \text{ mg}$$

Finalmente, o cálculo que nos permite estimar a biodegradação é feito pela diferença entre a quantidade de tóxico que passou pelo reator e a massa de tóxico que foi adsorvida pelo meio suporte e biomassa

composto	Massa do tóxico(mg)	Massa adsorvida (espuma + biopartícula)(mg)	Biodegradação (mg)
Tolueno	2166,19	81,93	2084,26
Etilbenzeno	829,08	113,05	716,03
m-xileno	806,4	108,92	697,48
Benzeno	2989,20	53,29	2935,91

Para a operação do reator **RAHLF 2** adotou-se o mesmo procedimento.

composto	Massa do tóxico(mg)	Massa adsorvida (espuma + biopartícula)(mg)	Biodegradação (mg)
Tolueno	1213,8	81,93	1131,87
Etilbenzeno	3581,83	113,05	3468,78
o-xileno	660,24	108,92	551,32
m-xileno	903,59	108,92	794,67
p-xileno	806,4	108,92	697,48
Benzeno	1464,96	53,29	1411,67